

NextSeq 550Dx, mode recherche

Guide de référence de l'instrument



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

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

Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Document n° 1000000041922 v03	Octobre 2021	Ajout de l'avis concernant le minuteur de 7 jours dans la section Vérifications des analyses de séquençage Mise à jour du flux de travail de séquençage via l'ajout de la section pour créer une analyse avec le logiciel Local Run Manager. Modification de la limite de stabilité Ajout des types de puce BeadChip Infinium Methylation EPIC Mise à jour des images d'icône pour tenir compte des changements apportés à l'interface utilisateur.
Document n° 1000000041922 v02	Novembre 2020	Mise à jour de la figure dans la section Effectuer un lavage manuel pour tenir compte des nouvelles cartouches de lavage des réactifs et de lavage du tampon. Mise à jour des renseignements de la barre d'état avec des couleurs supplémentaires.
Document n° 1000000041922 v01	Mars 2018	Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Configurer les paramètres du système.
Document n° 1000000041922 v00	Novembre 2017	Publication originale.

Table des matières

Chapitre 1 Vue d'ensemble	1
À propos de ce guide	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	1
Composants de l'instrument	2
Présentation de la trousse de réactifs	5
Présentation des consommables pour le séquençage	5
Chapitre 2 Pour commencer	9
Démarrage de l'instrument	9
Personnaliser les paramètres du système	10
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	11
Chapitre 3 Séquençage	13
Introduction	13
Flux de travail de séquençage	14
Préparer la cartouche de réactifs	14
Préparer la Flow Cell	15
Préparer des bibliothèques pour le séquençage	15
Configurer une analyse de séquençage	16
Surveiller la progression de l'analyse	23
Lavage automatique après analyse	24
Chapitre 4 Balayage	25
Introduction	25
Flux de travail de balayage	26
Télécharger le dossier DMAP	26
Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur	27
Configurer un balayage	28
Surveiller la progression du balayage	30
Chapitre 5 Maintenance	33
Introduction	33
Effectuer un lavage manuel	33
Remplacer le filtre à air	36
Mises à jour logicielles	37
Options de redémarrage et d'arrêt	39
Annexe A Dépannage	41
Introduction	41
Fichiers de dépannage	41
Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques	42
Réservoir à réactifs usagés plein	44

Flux de travail de réhybridation	45
Erreurs de puce BeadChip et de balayage	47
Formules personnalisées et dossiers de formules	48
Message d'erreur RAID	49
Configuration des paramètres du système	49
Annexe B Real-Time Analysis	53
Présentation de Real-Time Analysis	53
Flux de travail de Real-Time Analysis	54
Annexe C Fichiers et dossiers de sortie	59
Fichiers de sortie de séquençage	59
Structure du dossier de sortie	62
Fichiers de sortie du balayage	63
Structure du dossier de sortie de balayage	63
Index	65
Assistance technique	69

Chapitre 1 Vue d'ensemble

À propos de ce guide	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	1
Composants de l'instrument	2
Présentation de la trousse de réactifs	5
Présentation des consommables pour le séquençage	5

À propos de ce guide

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

Introduction

Fonctionnalités du séquençage

- ▶ **High-throughput sequencing** (Séquençage à débit élevé) : l'instrument NextSeq^{MC} 550Dx permet le séquençage des bibliothèques d'ADN.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : traite les images et la définition des bases. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, à la page 53.
- ▶ **On-instrument data analysis capability** (Capacité d'analyse des données sur instrument) : les modules d'analyse du logiciel Analyse Software indiqués pour l'analyse peuvent analyser les données de l'analyse.
- ▶ **Dual Boot** (Amorçage double) : l'instrument NextSeq 550Dx contient des disques durs séparés qui permettent le mode diagnostic (Dx) et le mode recherche uniquement (RUO).

Fonctionnalités du balayage de la puce à ADN

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

Ressources supplémentaires

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

Ressource	Description
<i>Guide de préparation du site de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 100000009869)</i>	Fournit les spécifications relatives à l'espace du laboratoire, les exigences électriques et les considérations environnementales.
<i>Guide de sécurité et de conformité de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 100000009868)</i>	Fournit des renseignements concernant les questions de sécurité, les déclarations de conformité et l'étiquetage de l'instrument.
<i>Guide de conformité du lecteur RFID (document n° 1000000030332)</i>	Fournit des renseignements sur le lecteur RFID de l'instrument, les certificats de conformité et les questions de sécurité.
<i>Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx en mode recherche (document n° 1000000041922)</i>	Donne les instructions d'utilisation de l'instrument et les procédures de dépannage. À utiliser pour faire fonctionner l'instrument NextSeq 550Dx en mode recherche avec le logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS) v3.0.
<i>Guide du système NextSeq 550 (document n° 15069765)</i>	Donne les instructions d'utilisation de l'instrument et les procédures de dépannage. À utiliser pour faire fonctionner l'instrument NextSeq 550Dx en mode recherche avec le logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS) v4.0 ou version ultérieure.
<i>Guide du système NextSeq 550</i>	Donne un aperçu des composants de l'instrument, les directives d'utilisation de l'instrument, ainsi que les procédures d'entretien et de dépannage.
<i>Aide de BaseSpace</i>	Fournit des renseignements concernant l'utilisation de BaseSpace ^{MC} Sequence Hub et les options d'analyse disponibles.

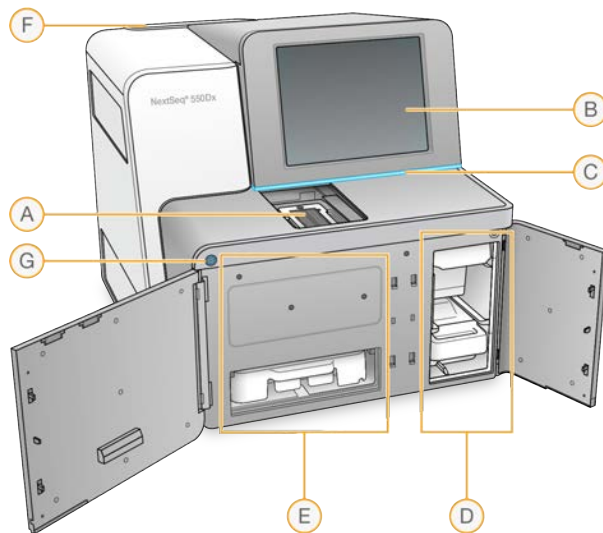
Consultez la [page d'assistance de l'instrument NextSeq 550Dx](#) sur le site Web d'Illumina pour accéder à la documentation, aux téléchargements de logiciels, à la formation en ligne et aux foires aux questions.

Consultez les [pages d'aide du système NextSeq 550Dx](#) sur le site Web d'Illumina pour accéder à la documentation, aux téléchargements de logiciels, à la formation en ligne et aux foires aux questions.

Composants de l'instrument

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

Figure 1 Composants de l'instrument



- A **Compartiment d'imagerie** : contient la Flow Cell pendant une analyse de séquençage.
- B **Moniteur tactile** : permet la configuration et le paramétrage sur l'instrument à l'aide de l'interface du logiciel d'exploitation.
- C **Barre d'état** : indique si l'instrument est en cours de traitement (bleu), s'il nécessite une attention particulière (orange), s'il est prêt pour le séquençage (vert), s'il est en cours d'initialisation (alternance de bleu et de blanc), s'il n'est pas encore initialisé (blanc) ou si un lavage doit être effectué dans les 24 prochaines heures (jaune).
- D **Compartiment du tampon** : contient la cartouche de tampon et le réservoir de réactifs usagés.
- E **Compartiment de réactifs** : contient la cartouche de réactifs.
- F **Compartiment du filtre à air** : contient le filtre à air. Le filtre est accessible par l'arrière de l'instrument.
- G **Bouton d'alimentation** : sert à mettre sous tension l'instrument et l'ordinateur de l'instrument et à les fermer.

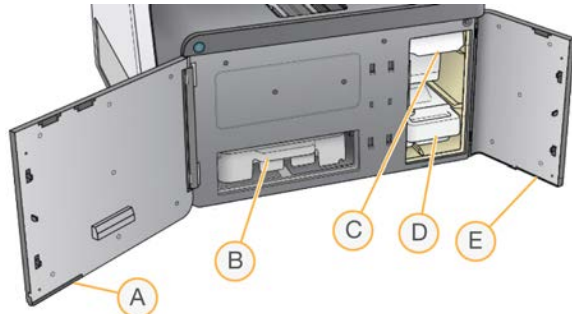
Compartiment d'imagerie

Le compartiment d'imagerie contient la platine, qui comprend trois broches d'alignement pour positionner la Flow Cell. Après le chargement de la Flow Cell, la porte du compartiment d'imagerie se ferme automatiquement et positionne les composants.

Compartiments des réactifs et du tampon

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

Figure 2 Compartiments des réactifs et du tampon



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

Compartiment du filtre à air

Le compartiment du filtre à air contient le filtre à air et est situé à l'arrière de l'instrument. Remplacez le filtre à air tous les 90 jours. Pour obtenir de l'information sur le remplacement du filtre, consultez la section [Remplacer le filtre à air](#), à la page 36.






Logiciels de l'instrument NextSeq 550Dx

Les logiciels de l'instrument comprennent des applications intégrées qui effectuent des analyses de séquençage.

- ▶ **Logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS)** : le logiciel de commande vous accompagne à chaque étape de configuration d'une analyse de séquençage.
- ▶ **Logiciel Real-Time Analysis (RTA)** : RTA effectue l'analyse d'images et la définition des bases lors de l'analyse. L'instrument NextSeq 550Dx utilise RTA v2, qui diffère grandement des versions antérieures en matière de fonctionnalités et d'architecture. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, à la page 53.

Icônes d'état

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

icône d'état	Nom de l'état	Description
	Status OK (État OK)	Le système est normal.
	Processing (Traitement)	Le système est en cours de traitement.
	Warning (Avertissement)	Un avertissement a eu lieu. Les avertissements n'interrompent pas l'analyse et ne nécessitent pas d'intervention pour la poursuite de l'analyse.
	Error (Erreur)	Une erreur a eu lieu. Les erreurs nécessitent une intervention avant la poursuite de l'analyse.
	Service Needed (Action requise)	Un avis a été généré et nécessite une attention. Reportez-vous au message pour avoir des renseignements supplémentaires.

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

REMARQUE

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

Bouton d'alimentation

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

Pour obtenir de l'information sur la mise sous tension initiale de l'instrument, consultez la section *Démarrage de l'instrument*, à la page 9.

Pour obtenir de l'information sur l'arrêt de l'instrument, consultez la section *Arrêt de l'instrument*, à la page 39.

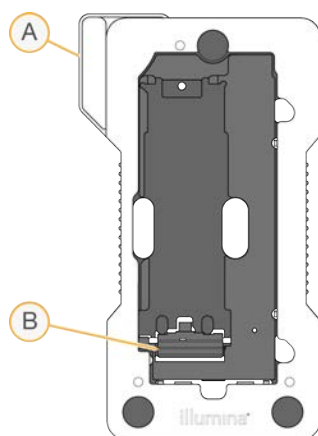
État de l'alimentation	Action
Instrument hors tension	Appuyez sur le bouton pour mettre l'instrument sous tension.
Instrument sous tension	Appuyez sur le bouton pour mettre l'instrument hors tension. Une boîte de dialogue s'affiche à l'écran pour confirmer l'arrêt de l'instrument.
Instrument sous tension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

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

Présentation de l'adaptateur de puce BeadChip réutilisable

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

Figure 3 Adaptateur de puce BeadChip réutilisable



- A Adaptateur de puce BeadChip
- B Pince de maintien

Présentation de la trousse de réactifs

Présentation des consommables pour le séquençage

Les consommables de séquençage nécessaires au fonctionnement de l'instrument NextSeq 550Dx sont fournis séparément, dans une trousse à usage unique. Chaque trousse comprend une Flow Cell, une cartouche de réactifs, une cartouche de tampon et un tampon de dilution de librairie. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la notice d'accompagnement des *trousses NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)*, *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)* ou *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)*.

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

ATTENTION

Les trousse NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 nécessitent NOS 1.3 ou version ultérieure pour que l'instrument accepte la cartouche de Flow Cell v2.5. Effectuez les mises à jour du logiciel avant de préparer les échantillons et les consommables afin d'éviter le gaspillage de réactifs ou d'échantillons.

REMARQUE

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

Étiquetage de compatibilité de la trousse

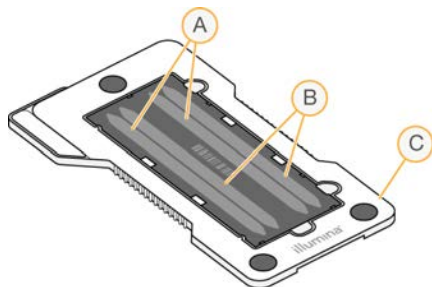
Des codes de couleurs figurent sur les composants de la trousse, afin d'indiquer la compatibilité des Flow Cell avec les cartouches de réactifs. Utilisez toujours une cartouche de réactifs et une Flow Cell compatibles. La cartouche de tampon est universelle.

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

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

Présentation de la Flow Cell

Figure 4 Cartouche de Flow Cell



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

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

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

- Les lignes 1 et 3 (paire de lignes A) sont imagées simultanément.

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

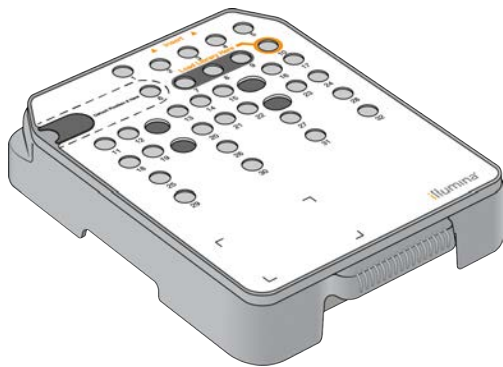
Bien que la Flow Cell contienne quatre lignes, une seule librairie ou un seul ensemble de librairies uniquement est séquencé sur la Flow Cell. Les librairies sont chargées sur la cartouche de réactifs dans un réservoir unique et transférées automatiquement sur les quatre lignes de la Flow Cell.

Chaque ligne est imagée par petites zones d'imagerie appelées plaques. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Plaques de la Flow Cell*, à la page 59.

Présentation de la cartouche de réactifs

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

Figure 5 Cartouche de réactifs



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

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

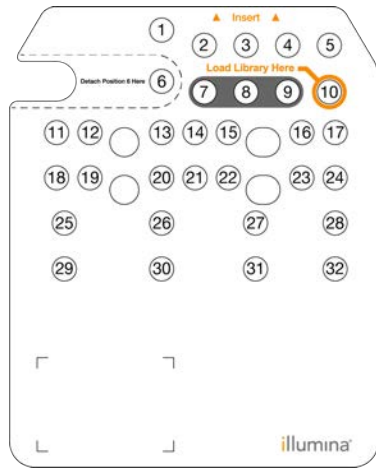


AVERTISSEMENT

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

Réservoirs réservés

Figure 6 Réservoirs numérotés



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

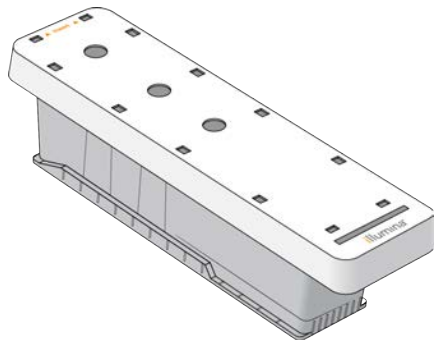
Réservoir amovible en position n° 6

La cartouche de réactifs préremplie comprend un réactif de dénaturation en position n° 6 qui contient du formamide. Pour faciliter l'élimination sûre de tout réactif non utilisé après l'analyse de séquençage, le réservoir en position n° 6 est amovible. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section [Retirer le réservoir usagé de la position n° 6](#), à la page 20.

Présentation de la cartouche de tampon

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

Figure 7 Cartouche de tampon



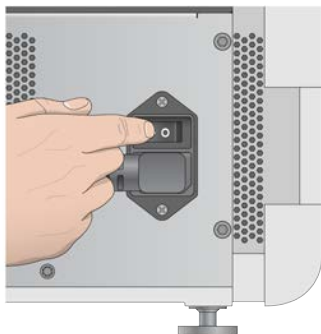
Chapitre 2 Pour commencer

Démarrage de l'instrument	9
Personnaliser les paramètres du système	10
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	11

Démarrage de l'instrument

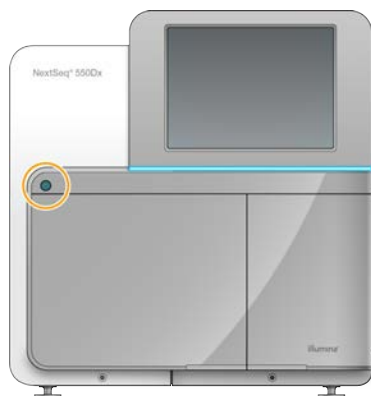
Mettez l'interrupteur principal en position I (Marche).

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



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

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



- 2 Attendez le chargement complet du système d'exploitation.
Le logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS) démarre et initialise automatiquement le système. À la fin de l'étape d'initialisation, l'écran d'accueil s'ouvre.
- 3 Entrez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe de Local Run Manager.
Pour obtenir des renseignements sur les mots de passe, consultez la section *Mots de passe de l'utilisateur*, à la page 1. Pour obtenir des renseignements sur la configuration d'un compte dans Local Run Manager, consultez la section *Tâches et paramètres administratifs*, à la page 1.
- 4 Cliquez sur **Login** (Ouvrir une session).
La page d'accueil s'ouvre et comporte les icônes Sequence (Séquence), Local Run Manager, Manage Instrument (Gérer l'instrument) et Perform Wash (Procéder au lavage).

Indicateurs de mode de l'instrument

Le mode par défaut de NextSeq 550Dx est le mode diagnostic. Les données suivantes à l'écran du logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS) indiquent le mode de l'instrument.

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

Personnaliser les paramètres du système

Le logiciel d'exploitation comporte des paramètres système personnalisables pour l'identification de l'instrument, les préférences d'entrée, les paramètres audio et l'emplacement du dossier de sortie. Pour changer les paramètres de configuration du réseau, consultez la section *Configuration des paramètres du système*, à la page 49.

Options de personnalisation :

- ▶ Personnaliser l'identification de l'instrument (avatar et surnom)
- ▶ Configurer l'option d'entrée et l'indicateur sonore
- ▶ Configurer les options de configuration de l'analyse
- ▶ Options d'arrêt
- ▶ Configurer le démarrage de l'instrument après la vérification avant analyse
- ▶ Choisir d'envoyer les données de performance de l'instrument à Illumina
- ▶ Désigner le dossier de sortie de l'analyse

Personnaliser l'avatar et le surnom de l'instrument

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

Configurer l'option de clavier et l'indicateur sonore

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 3 Cochez la case **Use on-screen keyboard** (Utiliser le clavier à l'écran) afin d'activer le clavier à l'écran pour saisir des renseignements à communiquer à l'instrument.

- 4 Cochez la case **Play audio** (Lire les sons) pour activer les indicateurs audio pour les événements suivants :
 - ▶ lors de l'initialisation de l'instrument;
 - ▶ au démarrage d'une analyse;
 - ▶ lors de certaines erreurs;
 - ▶ lorsqu'une interaction avec l'utilisateur est nécessaire;
 - ▶ à la fin d'une analyse.
- 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer les options de configuration de l'analyse

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

Configurer l'option d'élimination automatique

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

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

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

Consommables et équipement fournis par l'utilisateur

L'équipement et les consommables suivants sont utilisés sur l'instrument NextSeq 550Dx. Les consommables et l'équipement suivants sont utilisés pour la préparation des consommables, le séquençage et la maintenance de l'instrument. Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *Guide du système NextSeq 550*.

Consommables pour le séquençage

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714 (ou équivalent) Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage de la Flow Cell et usage général
Tissu de laboratoire non pelucheux	VWR, n° de référence 21905-026 (ou équivalent)	Nettoyage de la Flow Cell et usage général

Consommables pour la maintenance et le dépannage

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

Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

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

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

Équipement

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

Chapitre 3 Séquençage

Introduction	13
Flux de travail de séquençage	14
Préparer la cartouche de réactifs	14
Préparer la Flow Cell	15
Préparer des bibliothèques pour le séquençage	15
Configurer une analyse de séquençage	16
Surveiller la progression de l'analyse	23
Lavage automatique après analyse	24

Introduction

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

Génération d'amplifiats

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

Séquençage

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

Analyse

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

Durée de l'analyse de séquençage

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

Nombre de cycles d'une lecture

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

Flux de travail de séquençage

Create Run

Créez l'analyse dans le module logiciel de Local Run Manager. Consultez le guide du flux de travail de l'analyse propre à votre module.



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



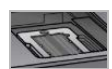
Dénaturez et diluez les bibliothèques. Consultez la notice d'accompagnement sur la préparation de bibliothèques pour obtenir les instructions.



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



À l'écran d'accueil du logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS), sélectionnez **Sequence** (Séquence) et l'identifiant de votre analyse, puis commencez les étapes de configuration de l'analyse. Sélectionnez **Run** (Analyse).



Chargez la Flow Cell.



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



Examinez les résultats de la vérification avant analyse. Sélectionnez **Start** (Démarrer). (cette étape n'est pas requise si le système est configuré pour démarrer automatiquement).



Surveillez l'analyse sur l'interface du logiciel d'exploitation ou sur un ordinateur en réseau avec Local Run Manager.



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

Préparer la cartouche de réactifs

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

- 1 Retirez la cartouche de réactifs de son lieu de stockage entre -25 et -15 °C.
- 2 Choisissez l'une des méthodes suivantes pour décongeler les réactifs. N'immergez pas la cartouche. Après la décongélation de la cartouche, asséchez-la avant de passer à l'étape suivante.

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

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

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



AVERTISSEMENT

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

Préparer la Flow Cell

- 1 Sortez une nouvelle boîte de Flow Cell du lieu de stockage réfrigéré à une température maintenue entre 2 et 8 °C.
- 2 Retirez l'emballage en aluminium de la boîte et laissez-le à température ambiante pendant 30 minutes.

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

Préparer des bibliothèques pour le séquençage

Dénaturez et diluez les bibliothèques à un volume de chargement de 1,3 ml. En pratique, la concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation et de quantification des bibliothèques. La dilution des bibliothèques d'échantillons dépend de la complexité des pools d'oligonucléotides. Pour savoir comment préparer les bibliothèques d'échantillons pour le séquençage, y compris la dilution et le regroupement de bibliothèques, consultez la section Mode d'emploi sur la trousse de préparation des bibliothèques applicable. L'optimisation de la densité des amplifiats sur NextSeq 550Dx est requise.

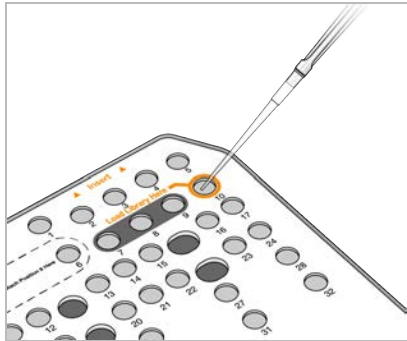
Dénaturer et diluer des bibliothèques

Dénaturez et diluez les bibliothèques à un volume de chargement de 1,3 ml et une concentration de chargement de 1,8 pM. En pratique, la concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation et de quantification des bibliothèques. Consultez la notice d'accompagnement sur la préparation de bibliothèques pour obtenir les instructions.

Chargement des bibliothèques sur la cartouche de réactifs

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

Figure 10 Charger les bibliothèques



Configurer une analyse de séquençage

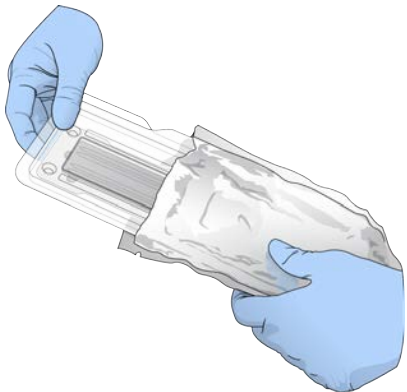
Se connecter à BaseSpace

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

Chargement de la Flow Cell

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

Figure 11 Retirer de l'emballage en aluminium



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

Figure 12 Retirer de l'emballage double coque

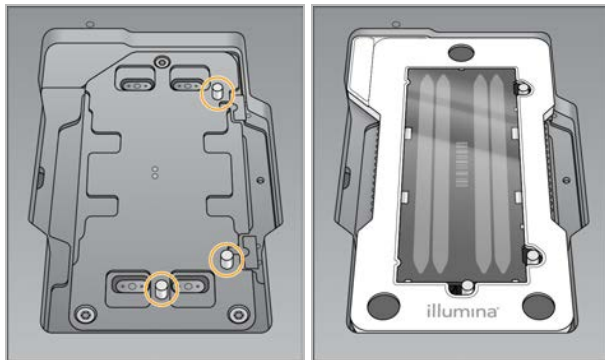


- 4 Nettoyez la surface en verre de la Flow Cell à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse. Séchez le verre à l'aide d'un chiffon de laboratoire peu pelucheux.

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

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

Figure 13 Chargement de la Flow Cell



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

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

- 7 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Vider le réservoir à réactifs usagés

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

Figure 14 Retirer le réservoir à réactifs usagés



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

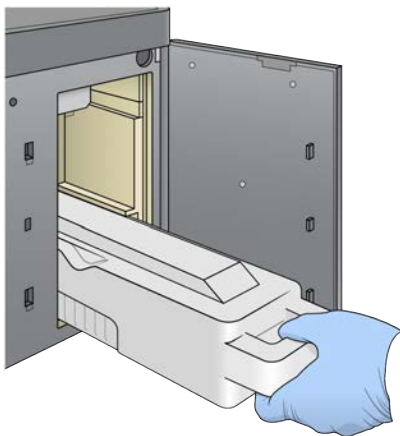


AVERTISSEMENT

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

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

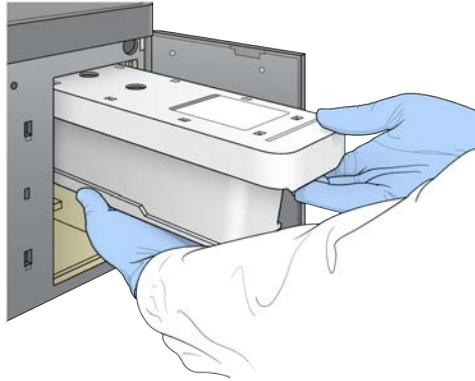
Figure 15 Charger le réservoir à réactifs usagés vide



Charger la cartouche de tampon

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

Figure 16 Charger la cartouche de tampon



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

Charger la cartouche de réactifs

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



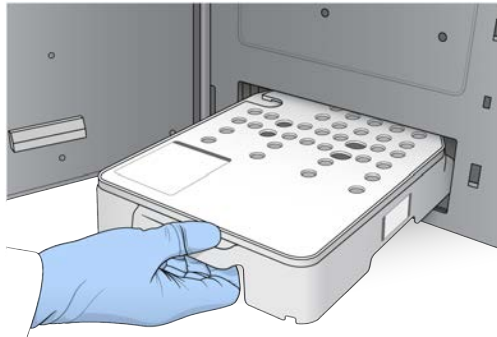
AVERTISSEMENT

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

REMARQUE Le réservoir à la position 6 est amovible pour faciliter la mise au rebut en toute sécurité des réactifs inutilisés. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Retirer le réservoir usagé de la position n° 6*, à la page 20.

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

Figure 17 Charger la cartouche de réactifs

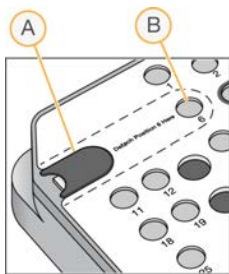


- 4 Sélectionnez **Load** (Charger).
Le logiciel positionne automatiquement la cartouche (environ 30 secondes), l'identifiant de la cartouche de réactifs s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Retirer le réservoir usagé de la position n° 6

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

Figure 18 Position n° 6 amovible



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

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

Indiquer les paramètres de l'analyse

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

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

Sélectionner une analyse disponible (Configuration BaseSpace)


- 1 Sélectionnez le nom d'une analyse dans la liste des analyses disponibles.
Utilisez les flèches haut et bas pour faire défiler la liste ou saisissez le nom d'une analyse dans le champ de recherche.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 3 Confirmez les paramètres de l'analyse.
 - ▶ **Run Name** (Nom de l'analyse) : le nom de l'analyse tel qu'attribué dans BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID de librairie) : le nom des librairies groupées tel qu'attribué dans BaseSpace.
 - ▶ **Recipe** (Formule) : le nom de la formule, **NextSeq High** ou **NextSeq Mid**, en fonction de la cartouche de réactifs utilisée pour l'analyse.
 - ▶ **Read Type** (Type de lecture) : lecture unique ou appariée.
 - ▶ **Read Length** (Longueur de la lecture) : le nombre de cycles par lecture.
 - ▶ **[Facultatif]** Primers personnalisés, le cas échéant.
 - ▶ **Run parameters** (Paramètres d'analyse) : modifiez le nombre de lectures ou le nombre de cycles par lecture.
 - ▶ **Custom primers** (Primers personnalisés) : modifiez les réglages des primers personnalisés.
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)*.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Éliminer les consommables pour cette analyse) : modifiez ce paramètre pour que les consommables soient automatiquement éliminés après l'analyse en cours.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Entrer les paramètres d'analyse (configuration autonome)

- 1 Saisissez un nom d'analyse de votre choix.
- 2 **[Facultatif]** Saisissez l'identifiant de librairie de votre choix.
- 3 Sélectionnez un type de lecture, soit **Single Read** (Lecture unique), soit **Paired End** (Lecture appariée).
- 4 Indiquez le nombre de cycles pour chaque lecture de l'analyse de séquençage.
 - ▶ **Read 1** (Lecture 1) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles.
 - ▶ **Index 1** : saisissez le nombre de cycles nécessaire pour le primer d'index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** : saisissez le nombre de cycles nécessaire pour le primer d'index 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Lecture 2) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles. Cette valeur est généralement identique au nombre de cycles de la lecture 1.




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

 - ▶ Le nombre total de cycles ne dépasse pas le nombre total de cycles permis.
 - ▶ Les cycles de la lecture 1 sont supérieurs aux cinq cycles utilisés pour la génération du modèle.
 - ▶ Les cycles de lecture d'index ne dépassent pas les cycles de lecture 1 et de lecture 2.
- 5 **[Facultatif]** Si vous utilisez des primers personnalisés, cochez la case correspondant aux primers utilisés. Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)*.
 - ▶ **Read 1** (Lecture 1) : primer personnalisé pour la lecture 1.
 - ▶ **Index 1** : primer personnalisé pour l'index 1.
 - ▶ **Index 2** : primer personnalisé pour l'index 2.
 - ▶ **Read 2** (Lecture 2) : primer personnalisé pour la lecture 2.

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

Vérification avant analyse

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

- ▶ **Crochet**  **gris** : la vérification n'a pas été encore effectuée.
- ▶ **Icône**  **de progression** : la vérification est en cours.
- ▶ **Crochet**  **vert** : la vérification a réussi.
- ▶ **✘ rouge** : la vérification a échoué. Pour tous les éléments qui n'ont pas réussi la vérification, une action est nécessaire avant que vous puissiez continuer. Consultez la section *Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques*, à la page 42.

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

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

Si l'instrument n'est pas configuré pour lancer automatiquement l'analyse, démarrez-la après la vérification automatisée avant analyse.

Démarrer l'analyse

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

Pour configurer le système afin de démarrer automatiquement l'analyse après une vérification réussie, consultez la section *Configurer les options de configuration de l'analyse*, à la page 11.



ATTENTION

Assurez-vous de rester connecté à Windows. Si vous vous déconnectez de Windows au cours d'une analyse de séquençage, l'analyse arrête.

REMARQUE Les réactifs ne peuvent pas rester à l'état d'inactivité dans l'instrument pendant plus de 24 heures.

Surveiller la progression de l'analyse

- 1 Surveillez la progression, les intensités et les scores de qualité de l'analyse à mesure que les indicateurs s'affichent à l'écran.








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

Cycles des indicateurs de l'analyse

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

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

Transfert des données

État	Local Run Manager	Dossier de sortie
Connecté		
Connecté, transfert des données en cours		
Déconnecté		
Désactivé		

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

Universal Copy Service

L'instrument NextSeq 550Dx comprend l'Universal Copy Service. RTA2 demande au service de copier des fichiers situés à un emplacement source vers un emplacement de destination; et le service traite les demandes de copie dans l'ordre d'arrivée. Si une exception survient, le fichier est remis en file d'attente de copie en fonction du nombre de fichiers présents dans la file d'attente.

Sequencing Analysis Viewer

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

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

Lavage automatique après analyse

Une fois l'analyse de séquençage terminée, le logiciel lance un lavage automatique après analyse à l'aide de la solution de lavage contenue dans la cartouche de tampon et du NaOCl contenu dans la cartouche de réactifs.

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

Après le lavage

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

Chapitre 4 Balayage

Introduction	25
Flux de travail de balayage	26
Télécharger le dossier DMAP	26
Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur	27
Configurer un balayage	28
Surveiller la progression du balayage	30

Introduction

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

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

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

Effectuez l'analyse à l'aide du logiciel BlueFuse Multi, qui nécessite que les données de balayage soient disponibles au format de fichier de typage génotypique (GTC). Par défaut, l'instrument NextSeq 550Dx génère des données normalisées et les définitions de génotype qui y sont associées dans un fichier au format GTC. Si vous le souhaitez, vous pouvez configurer l'instrument afin de générer des fichiers de données d'intensité (IDAT) supplémentaires. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Configuration des balayages de la puce BeadChip*, à la page 51.

Decode File Client

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

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

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

Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Télécharger le dossier DMAP*, à la page 26.

Fichiers de manifeste et fichiers de groupement

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

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

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

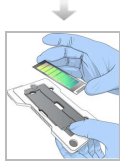
L'emplacement des fichiers est défini dans l'écran BeadChip Scan Configuration (Configuration des balayages de la puce BeadChip). Depuis l'écran d'accueil du logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS), sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument), **System Configuration** (Configuration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

Lorsque l'instrument NextSeq 550Dx est installé, le représentant d'Illumina télécharge ces fichiers et indique le chemin dans le logiciel de commande. Il n'est pas nécessaire de modifier ces fichiers, sauf en cas de perte ou de disponibilité d'une mise à jour. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Remplacer les fichiers de manifeste et les fichiers de groupement*, à la page 48.

Flux de travail de balayage

DMAP

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



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



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



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



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



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

Télécharger le dossier DMAP

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

Accéder au dossier DMAP par compte

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

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

Accéder au dossier DMAP par puce BeadChip

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

Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur

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

Figure 19 Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur



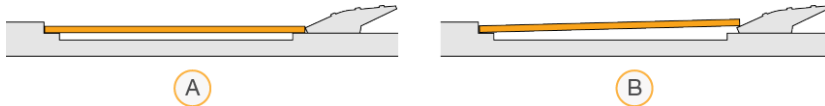
- 3 En utilisant l'une des ouvertures présentes sur les côtés de la puce BeadChip, assurez-vous que celle-ci est fixée dans l'étagère encastrée de l'adaptateur.

Figure 20 Positionner et fixer la puce BeadChip



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

Figure 21 Inspecter la position de la puce BeadChip



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

Configurer un balayage

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

Décharger les consommables de séquençage

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

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



AVERTISSEMENT

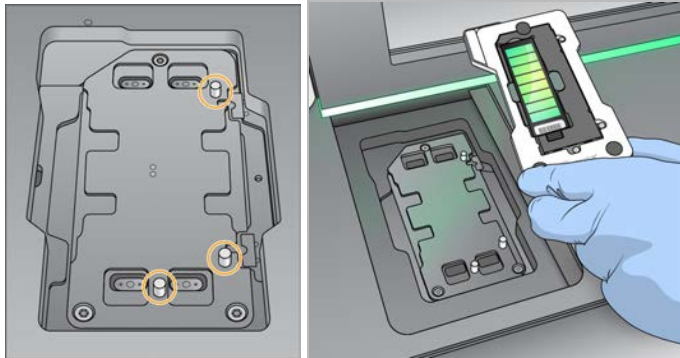
Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire,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

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

Charger l'adaptateur de puce BeadChip

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

Figure 22 Charger l'adaptateur de puce BeadChip






- Sélectionnez **Load** (Charger).
La porte se ferme automatiquement, l'identifiant de la puce BeadChip s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés. Un court délai est normal. Si le code à barres de la puce BeadChip ne peut pas être lu, une boîte de dialogue s'affiche. Elle vous permet d'entrer manuellement le code à barres. Consultez la section *Le logiciel ne peut pas lire le code à barres de la puce BeadChip*, à la page 47.
- Sélectionnez **Next** (Suivant).

Configuration du balayage

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

Vérification avant analyse

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

- ▶ **Crochet**  **gris** : la vérification n'a pas été encore effectuée.
- ▶ **Icône**  **de progression** : la vérification est en cours.
- ▶ **Crochet**  **vert** : la vérification a réussi.
- ▶ **X rouge** : la vérification a échoué. Pour tous les éléments qui n'ont pas réussi la vérification, une action est nécessaire avant que vous puissiez continuer. Consultez la section *Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques*, à la page 42.

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

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

Si l'instrument n'est pas configuré pour lancer automatiquement l'analyse, démarrez-la après la vérification automatisée avant analyse.

Démarrer le balayage

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

Pour configurer le système afin de démarrer automatiquement le balayage après une vérification réussie, consultez la section *Configurer les options de configuration de l'analyse*, à la page 11.

Surveiller la progression du balayage

1 Surveillez la progression du balayage grâce à l'image de la puce BeadChip. Chaque couleur qui se trouve sur l'image indique l'état du balayage.

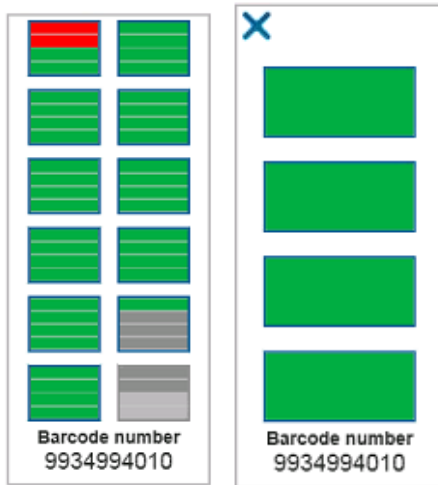
- ▶ **Gris clair** : balayage non effectué.
- ▶ **Gris foncé** : balayage effectué, mais non enregistré.
- ▶ **Vert** : balayage effectué et enregistré avec succès.
- ▶ **Rouge** : échec du balayage et de l'enregistrement.

En cas d'échec de l'enregistrement, vous pouvez balayer à nouveau les échantillons comprenant des sections dont le balayage a échoué. Consultez la section *Échec du balayage de la puce BeadChip*, à la page 47.

2 Sélectionnez l'image de la puce BeadChip pour basculer entre la vue complète et la vue détaillée d'un échantillon sélectionné.

- ▶ La vue complète affiche les échantillons sur la puce BeadChip et les sections au sein de chaque échantillon.
- ▶ La vue détaillée affiche chaque section au sein de l'échantillon sélectionné.

Figure 23 Image de la puce BeadChip : vue complète et vue détaillée



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

Transfert des données

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

La durée nécessaire au transfert des données dépend de votre connexion réseau. Avant de lancer un balayage ultérieur, vérifiez que les données ont été écrites dans le dossier de sortie. Pour ce faire, vérifiez que des fichiers GTC sont présents dans le dossier du code à barres. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Structure du dossier de sortie de balayage*, à la page 63.

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

Chapitre 5 Maintenance

Introduction	33
Effectuer un lavage manuel	33
Remplacer le filtre à air	36
Mises à jour logicielles	37
Options de redémarrage et d'arrêt	39

Introduction

Les procédures de maintenance comprennent des lavages manuels de l'instrument et le remplacement du filtre à air. Les options d'arrêt et de redémarrage de l'instrument sont aussi décrites.

- ▶ **Lavages de l'instrument** : un lavage automatique après chaque analyse de séquençage permet d'optimiser les performances de l'instrument. Toutefois, il est nécessaire d'effectuer régulièrement un lavage manuel dans certaines conditions. Consultez la section *Effectuer un lavage manuel*, à la page 33.
- ▶ **Remplacement du filtre à air** : le remplacement régulier du filtre à air assure une bonne circulation de l'air dans l'instrument.

Maintenance préventive

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

Effectuer un lavage manuel

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

Types de lavage	Description
Quick Wash (Lavage rapide) Durée : 20 minutes	Rince le système avec une solution de lavage fournie par l'utilisateur composée d'eau de laboratoire et de Tween 20 (cartouche de lavage du tampon). <ul style="list-style-type: none">• Nécessaire pour chaque période de 14 jours d'inactivité de l'instrument avec une cartouche de réactifs et une cartouche de tampon en place.• Doit être effectué tous les 7 jours lorsque l'instrument est sec (cartouche de réactifs et cartouche de tampon retirées).
Manual Post-Run Wash (Lavage manuel après analyse) Durée : 90 minutes	Rince le système avec une solution de lavage fournie par l'utilisateur composée d'eau de laboratoire, de Tween 20 (cartouche de lavage du tampon) et d'hypochlorite de sodium à 0,12 % (cartouche de lavage des réactifs). Nécessaire lorsque le lavage automatique après analyse n'a pas été effectué.

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

Figure 24 Cartouche de lavage des réactifs et cartouche de lavage du tampon d'origine.

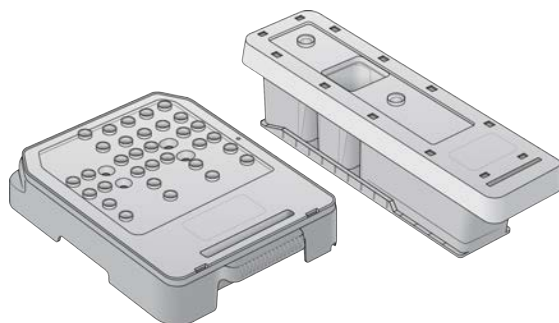
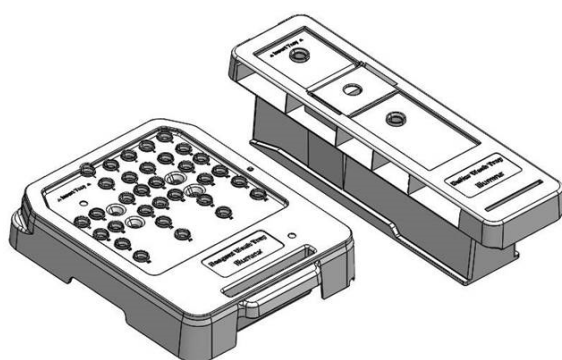


Figure 25 Nouvelle cartouche de lavage des réactifs et nouvelle cartouche de lavage du tampon.



Préparer un lavage manuel après analyse

Vous devez choisir entre la préparation d'un lavage manuel après analyse, comme il est décrit ci-dessous, ou la préparation d'un lavage rapide (section suivante). Si vous prévoyez faire un lavage manuel après analyse, passez la section sur le lavage rapide et allez à la section *Charger une Flow Cell usagée et les cartouches de lavage*, à la page 36.

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

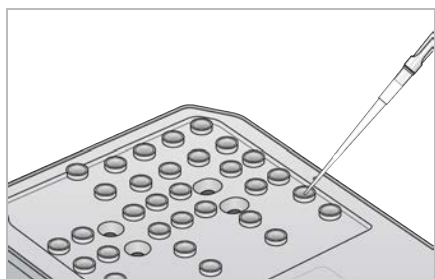
REMARQUE Utilisez toujours une nouvelle dilution de NaOCl préparée au cours des **24 dernières heures**.

Si vous préparez un volume supérieur à 1 ml, stockez la dilution restante entre 2 et 8 °C pour une utilisation dans les 24 heures suivantes. Sinon, jetez la dilution de NaOCl restante.

- Mélangez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour obtenir une solution de 1 ml de NaOCl à 0,12 % :
 - ▶ NaOCl à 5 % (24 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (976 µl)
- Retournez le tube pour mélanger.

- Ajoutez 1 ml de NaOCl à 0,12 % à la cartouche de lavage des réactifs. Le réservoir approprié est équivalent à la position n° 28 de la cartouche préremplie.

Figure 26 Charger le NaOCl



- Combinez les volumes suivants afin d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,05 % :

Cartouche de lavage du tampon d'origine

 - ▶ Tween 20 à 100 % (62 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (125 ml)
 - ▶ Ajoutez 125 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.

Nouvelle cartouche de lavage du tampon

 - ▶ Tween 20 à 100 % (75 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (150 ml)
 - ▶ Ajoutez 150 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
- Sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage), puis sélectionnez **Manual Post-Run Wash** (Lavage manuel après analyse).

Préparer un lavage rapide

Vous pouvez préparer un lavage rapide, comme il est décrit ci-dessous, comme une option de rechange à la [Préparer un lavage manuel après analyse](#), à la page 34.

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

- Combinez les volumes suivants afin d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,05 % :

 - ▶ Tween 20 à 100 % (20 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (40 ml)
- Ajoutez 40 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
- Sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage), puis sélectionnez **Quick Wash** (Lavage rapide).

Charger une Flow Cell usagée et les cartouches de lavage

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



AVERTISSEMENT

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

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

Démarrer le lavage

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

Après le lavage

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

Remplacer le filtre à air

Les nouveaux systèmes sont livrés avec trois filtres à air de rechange. Ils doivent être stockés et utilisés lorsque l'instrument génère une invite indiquant qu'il faut changer le filtre.

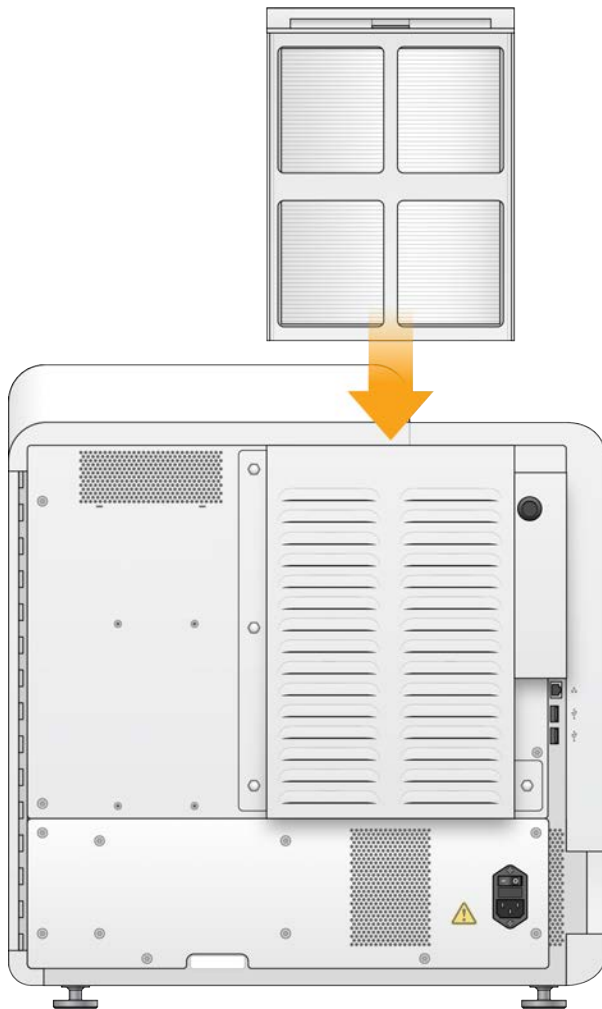
Le filtre à air assure la circulation de l'air dans l'instrument. Le logiciel affiche un message demandant de changer le filtre à air tous les 90 jours. Lorsqu'on vous le demande, sélectionnez **Remind in 1 day** (Rappeler dans un jour) ou suivez la procédure suivante et sélectionnez **Filter Changed**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

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

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

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

Figure 27 Insertion du filtre à air




Mises à jour logicielles

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

- ▶ Logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Formules du système NextSeq
- ▶ RTA2
- ▶ Logiciel de service NextSeq (NSS)

- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

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

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

Mise à jour automatique des logiciels

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

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

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

Mise à jour manuelle des logiciels

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

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

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

Options de redémarrage et d'arrêt

Accédez aux fonctions suivantes en cliquant sur le bouton Reboot/Shutdown (Redémarrer/Arrêter) :

- ▶ Reboot to RUO (Redémarrer en mode recherche uniquement) : l'instrument s'ouvre en mode recherche.
- ▶ Restart (Redémarrer) : l'instrument s'ouvre en mode diagnostic.
- ▶ Restart to Dx from RUO (Redémarrer en mode diagnostic depuis le mode recherche) : l'instrument s'ouvre en mode diagnostic (Dx).
- ▶ Shutdown (Arrêter) : l'instrument s'ouvre en mode diagnostic lorsqu'il est remis sous tension.
- ▶ Exit to Windows (Quitter et retourner vers Windows) : selon les autorisations, vous pouvez fermer NCS et voir Windows.

Redémarrer en mode diagnostic

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

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Reboot/Shutdown** (Redémarrer/Arrêter).
- 3 Sélectionnez **Restart** (Redémarrer).

Arrêt de l'instrument

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Reboot/Shutdown** (Redémarrer/Arrêter).
- 3 Sélectionnez **Shutdown** (Arrêter).

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

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



ATTENTION

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

Exit to Windows (Quitter et retourner vers Windows)

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

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Reboot/Shutdown** (Redémarrer/Arrêter).
- 3 Sélectionnez **Exit to Windows** (Quitter et retourner vers Windows).

Annexe A Dépannage

Introduction	41
Fichiers de dépannage	41
Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques	42
Réservoir à réactifs usagés plein	44
Flux de travail de réhybridation	45
Erreurs de puce BeadChip et de balayage	47
Formules personnalisées et dossiers de formules	48
Message d'erreur RAID	49
Configuration des paramètres du système	49

Introduction

En cas de problème de qualité d'analyse ou de performances, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina. Consultez la section *Assistance technique*, à la page 69.

Fichiers de dépannage

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

Fichiers de dépannage pour les analyses de séquençage

Fichier clé	Dossier	Description
Fichier de renseignements sur l'analyse (RunInfo.xml)	Dossier racine	Comprend les renseignements suivants : <ul style="list-style-type: none">• Nom de l'analyse• Nombre de cycles de l'analyse• Nombre de cycles dans chaque lecture• Lecture indexée ou non• Nombre de stries et de plaques sur la Flow Cell
Fichier des paramètres de l'analyse (RunParameters.xml)	Dossier racine	Contient des renseignements concernant les paramètres et les composants des analyses. Parmi les renseignements figurent la RFID, le numéro de série, la référence et la date de péremption.
Fichiers de configuration RTA (RTAConfiguration.xml)	Dossier racine	Comprend les paramètres de configuration RTA pour l'analyse. Le fichier RTAConfiguration.xml est créé au début de l'analyse.
Fichiers InterOp (*.bin)	InterOp	Fichiers de compte rendu binaire. Les fichiers InterOp sont mis à jour tout au long de l'analyse.
Fichiers journaux	Journaux	Les fichiers journaux décrivent chaque étape effectuée par l'instrument au cours de chaque cycle et répertorient les versions de logiciels et de progiciels utilisées lors de l'analyse. Le fichier nommé [NomInstrument]_CurrentHardware.csv répertorie les numéros de série des composants de l'instrument.
Fichiers journaux des erreurs (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs	Journal des erreurs RTA. Les fichiers journaux des erreurs sont mis à jour à chaque fois qu'une erreur se produit.
Fichiers journaux globaux (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs	Journal de tous les événements RTA. Les fichiers journaux globaux sont mis à jour tout au long de l'analyse.
Fichiers journaux des lignes (*LaneLog*.txt)	RTA Logs	Journal des événements RTA en cours. Les fichiers journaux des lignes sont mis à jour tout au long de l'analyse.

Erreurs RTA

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

Fichiers de dépannage pour les balayages des puces à ADN

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

Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques

Si les vérifications automatiques relèvent une erreur, utilisez les recommandations d'action suivantes pour résoudre l'erreur.

Vérifications des analyses de séquençage

Si une vérification avant analyse échoue, la RFID de la cartouche de réactifs n'est pas verrouillée et peut être utilisée pour une nouvelle analyse. Cependant, les RFID de la cartouche de tampon, de la cartouche de réactifs et de la Flow Cell seront verrouillées durant l'initialisation du logiciel de commande, ce qui pourrait être nécessaire pour résoudre une erreur. L'utilisateur doit retirer la Flow Cell, la cartouche de réactifs et la cartouche de tampon de l'instrument avant le redémarrage du système. De plus, les RFID des consommables sont verrouillées une fois que les opercules en aluminium sont percés. Dès qu'une RFID de Flow Cell est lue par le logiciel, un minuteur de 7 heures démarre avant que la Flow Cell ne soit considérée comme étant verrouillée et inutilisable.

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

Vérifications des balayages de puce à ADN

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

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

Réservoir à réactifs usagés plein

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

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

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

Vider le réservoir des réactifs usagés

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

Flux de travail de réhybridation

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

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

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

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

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

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

À quel moment arrêter une analyse pour réhybridation

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

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

Consommables requis

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

Arrêter l'analyse en cours

- 1 Sélectionnez **End Run** (Terminer l'analyse). Lorsque vous êtes invité à confirmer la commande, sélectionnez **Yes** (Oui).

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

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

Effectuer un lavage manuel

- 1 À l'écran d'accueil, sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage).
- 2 Sur l'écran Wash Selection (Sélection du lavage), sélectionnez **Manual Post-Run Wash** (Lavage manuel après analyse). Consultez la section *Effectuer un lavage manuel*, à la page 33.

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

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

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

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

Configurer une analyse sur l'instrument

- 1 Préparez une nouvelle cartouche de réactifs.
- 2 Si la Flow Cell enregistrée a été stockée, placez-la de façon à ce qu'elle atteigne la température ambiante (15 à 30 minutes).
- 3 Nettoyez et chargez la Flow Cell enregistrée.
- 4 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez le contenu de façon appropriée, puis rechargez le flacon vide.
- 5 Chargez la nouvelle cartouche de tampon et la nouvelle cartouche de réactifs.
- 6 Sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** : sélectionnez l'analyse et confirmez les paramètres de l'analyse.
 - ▶ **Standalone** (Autonome) : saisissez le nom de l'analyse et spécifiez des paramètres identiques à ceux de l'analyse d'origine.
- 7 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour effectuer une vérification avant analyse, puis démarrez l'analyse.

Erreurs de puce BeadChip et de balayage

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

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

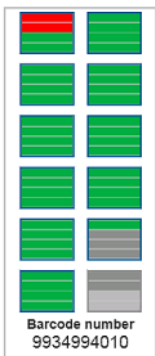
- ▶ Sélectionnez **Rescan** (Nouveau balayage). Le logiciel tente à nouveau de lire le code à barres.
- ▶ Sélectionnez le champ de texte et saisissez le code à barres numérique tel qu'affiché dans l'image. En fonction de la puce Beadchip, les numéros de code à barres peuvent comporter jusqu'à 12 chiffres.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

Échec du balayage de la puce BeadChip

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

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

Figure 28 Puce BeadChip affichant des sections échouées



Une fois le balayage terminé et les données de balayage écrites dans le dossier de sortie, le bouton Rescan (Nouveau balayage) est activé.

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

- ▶ Exécution d'un nouveau balayage des échantillons qui comportent des sections échouées avec un chevauchement entre plaques plus élevé.
- ▶ Génération des fichiers de sortie dans le dossier de sortie original.
- ▶ Écrasement des fichiers de sortie précédents pour les sections échouées.
- ▶ Incrémentation du compteur de balayage d'une unité pour chaque nouveau balayage, mais en arrière-plan. Le logiciel ne renomme pas le dossier de sortie.

Commencer ou renouveler un balayage

- 1 Sélectionnez **Rescan** (Nouveau balayage) pour effectuer un balayage des échantillons comportant des sections ayant échoué.

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

Remplacer les fichiers de manifeste et les fichiers de groupement

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

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

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

Formules personnalisées et dossiers de formules

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

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

Formules personnalisées

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

 **Mid** : formules personnalisées utilisées avec une trousse de débit moyen.

 **High** : formules d'origine utilisées avec une trousse de débit élevé.

 **Mid** : formules d'origine utilisées avec une trousse de débit moyen.

 **Wash** : contient la formule de lavage manuel.

Message d'erreur RAID

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

Vous pouvez continuer la procédure de configuration de l'analyse et les opérations normales. Le but de ce message est de pouvoir planifier à l'avance une visite de service pour éviter des interruptions durant le fonctionnement normal de l'instrument. L'avertissement RAID ne peut être accepté que par un administrateur. L'utilisation de votre instrument avec un seul disque dur pourrait entraîner la perte de données.

Configuration des paramètres du système

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

- ▶ **Network Configuration** (Configuration du réseau) : fournit des options de configuration des paramètres de l'adresse IP, de l'adresse du serveur de noms de domaine (DNS), du nom de l'ordinateur et du nom de domaine.

Définir la configuration réseau

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

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

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

- ▶ Entrez l'adresse IP. L'adresse IP est une série de quatre nombres séparés par des points, par exemple 168.62.20.37.
 - ▶ Entrez le masque de sous-réseau, qui est une subdivision du réseau IP.
 - ▶ Entrez l'adresse de la passerelle par défaut, c'est-à-dire le routeur du réseau qui se connecte à Internet.
- 3 Sélectionnez **Obtain a DNS server address automatically** (Obtenir une adresse de serveur DNS automatiquement) pour connecter l'instrument au serveur de noms de domaine associé à l'adresse IP. Vous pouvez également sélectionner **Use the following DNS server addresses** (Utiliser les adresses des serveurs DNS suivantes) pour connecter manuellement l'instrument au serveur de noms de domaine comme suit.
 - ▶ Entrez les adresses DNS à privilégier. L'adresse DNS est le nom du serveur utilisé pour traduire les noms de domaine en adresses IP.

- ▶ Entrez l'adresse DNS secondaire. L'adresse secondaire est utilisée si l'adresse DNS à privilégier ne peut pas traduire un nom de domaine particulier en adresse IP.
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour passer à l'écran Computer (Ordinateur).

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

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

Définir la configuration de l'analyse

- 1 À l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Configuration** (Configuration du système).
- 2 Sélectionnez **Analysis Configuration** (Configuration de l'analyse).
- 3 Sélectionnez l'une des options suivantes afin de définir l'emplacement où les données seront envoyées pour une analyse ultérieure.
- ▶ Sélectionnez **BaseSpace** pour envoyer les données de séquençage à l'environnement BaseSpace d'Illumina. **[Facultatif]** Cochez la case **Output Folder** (Dossier de sortie), sélectionnez **Browse** (Parcourir), puis accédez à un emplacement réseau secondaire où les fichiers BCL seront enregistrés, en plus de l'enregistrement BaseSpace.
 - ▶ Sélectionnez **BaseSpace Onsite**. Dans le champ Server Name (Nom du serveur), saisissez le chemin d'accès complet menant à votre serveur BaseSpace Onsite. **[Facultatif]** Cochez la case **Output Folder** (Dossier de sortie), sélectionnez **Browse** (Parcourir), puis accédez à un emplacement réseau secondaire où les fichiers BCL seront enregistrés, en plus de l'enregistrement sur le serveur BaseSpace Onsite.
 - ▶ Sélectionnez **Standalone instrument** (Instrument autonome) pour enregistrer les données à un emplacement situé sur le réseau. Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour sélectionner l'emplacement réseau de votre choix. Le logiciel de commande génère automatiquement le nom du dossier de sortie.
 - ▶ **[Facultatif]** Sélectionnez **Use Run Monitoring** (Utiliser la surveillance de l'analyse) pour surveiller l'analyse en utilisant les outils de visualisation sur BaseSpace. Des identifiants de connexion BaseSpace ainsi qu'une connexion Internet sont nécessaires.
- 4 Si vous avez sélectionné BaseSpace ou BaseSpace Onsite, réglez les paramètres BaseSpace de la manière suivante.
- ▶ Saisissez un **nom d'utilisateur** et un **mot de passe** BaseSpace afin d'enregistrer l'instrument sur BaseSpace.

- ▶ Sélectionnez **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Utiliser la connexion par défaut et passer l'écran de connexion BaseSpace) pour définir le nom d'utilisateur et le mot de passe enregistrés en tant qu'identifiants de connexion par défaut. Ce paramètre contourne l'écran BaseSpace pendant la configuration de l'analyse.
- 5 Sélectionnez **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Envoyer les données sur la performance de l'instrument à Illumina) pour activer le service de surveillance Illumina Proactive. Le nom du paramètre affiché dans l'interface du logiciel pourrait être différent du nom indiqué dans le présent guide, selon la version du logiciel de commande NextSeq Control Software (NCS) utilisée. Lorsque ce paramètre est activé, les données relatives à la performance de l'instrument sont transmises à Illumina. Ces données facilitent le dépannage par Illumina et lui permettent de détecter les pannes potentielles, d'exécuter une maintenance proactive et d'optimiser le temps d'utilisation de l'instrument. Pour obtenir plus de renseignements sur les avantages de ce service, consultez la *note technique d'Illumina Proactive (document n° 1000000052503)*.
Ce service :
- ▶ Ne transmet pas de données de séquençage.
 - ▶ Nécessite la connexion de l'instrument à un réseau ayant accès à Internet.
 - ▶ Est désactivé par défaut. Pour choisir ce service, activez le paramètre **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Envoyer les données sur la performance de l'instrument à Illumina).
- 6 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Configuration des balayages de la puce BeadChip

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

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

- 4 Pour spécifier un emplacement de sortie par défaut, sélectionnez **Browse** (Parcourir) et accédez à l'emplacement de votre choix sur le réseau de votre installation.
- 5 Sélectionnez un format de fichier d'image pour les images enregistrées. Le type d'image par défaut est **JPG**.
- 6 Sélectionnez un format de fichier de sortie pour les données de balayage. Le type de fichier de sortie par défaut est **GTC only** (GTC uniquement).
- 7 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).
- 8 Dans l'écran Scan Map (Carte de balayage), indiquez le chemin complet du fichier de manifeste et du fichier de groupement pour chaque type de puce BeadChip. Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour chaque type de fichier et accédez au dossier qui contient les fichiers pertinents.
- 9 **[Facultatif]** Sélectionnez **Hide Obsolete BeadChips** (Masquer les puces BeadChip obsolètes) pour ne pas afficher les puces BeadChip obsolètes.
- 10 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Annexe B Real-Time Analysis

Présentation de Real-Time Analysis	53
Flux de travail de Real-Time Analysis	54

Présentation de Real-Time Analysis

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

Entrées dans RTA2

RTA2 nécessite les entrées suivantes pour le traitement :

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

RTA2 reçoit des commandes du logiciel d'exploitation à propos de l'emplacement du fichier **RunInfo.xml** et de tout dossier de sortie facultatif.

Fichiers de sortie RTA2

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

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

RTA2 fournit des indicateurs en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockés dans des fichiers InterOp. Les fichiers InterOp sont des fichiers de sortie binaires contenant des mesures relatives aux plaques, aux cycles et au niveau de lecture.

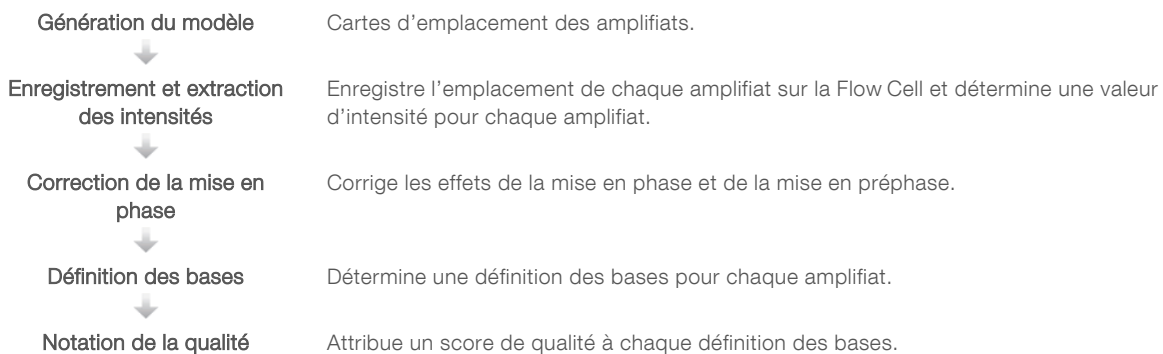
Gestion des erreurs

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

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

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

Flux de travail de Real-Time Analysis



Génération du modèle

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

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

REMARQUE Pour la détection d'un amplifiat pendant la génération du modèle, il doit y avoir au moins une base autre que G dans les **cinq** premiers cycles. Pour toutes les séquences d'indexage, RTA2 nécessite au moins une base autre que G dans les **deux** premiers cycles.

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

Enregistrement et extraction des intensités

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

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

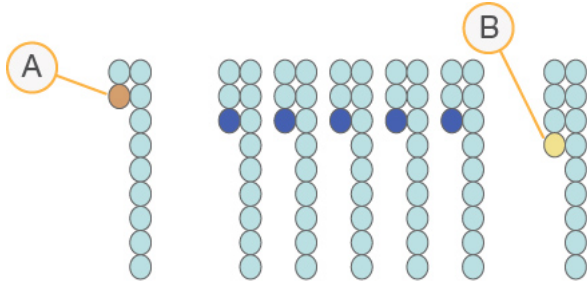
S'il y a échec d'enregistrement de l'image d'un cycle, quelle qu'elle soit, aucune définition des bases ne sera générée pour cette plaque dans ce cycle.

Correction de la mise en phase

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

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

Figure 29 Mise en phase et en préphase



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

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

Définition des bases

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

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

Figure 30 Visualisation de l'intensité des amplifiats

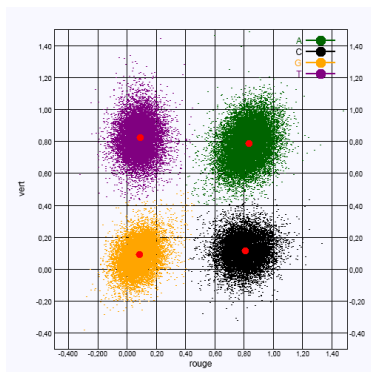


Tableau 1 Définition des bases dans le séquençage à deux canaux

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

Amplifiats passant le filtre

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

Dans le cas d'une analyse sur deux canaux, RTA2 utilise un système basé sur une population pour déterminer la pureté d'une définition des bases. Les amplifiats franchissent le filtre (PF) lorsqu'au plus une définition des bases au cours des 25 premiers cycles a une pureté inférieure à 0,63. Les amplifiats qui ne passent pas le filtre ne servent pas à la définition des bases.

Considérations relatives à l'indexage

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

Une lecture d'index doit contenir une base autre que G au moins dans l'un des deux premiers cycles. Si deux bases G sont définies au début d'une lecture d'index, aucune intensité de signal n'est générée. Il faut obtenir un signal dans l'un des deux premiers cycles pour assurer la performance de démultiplexage.

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

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

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

Notation de la qualité

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

Le score de qualité est un moyen simple d'indiquer la probabilité de petites erreurs. Les scores de qualités sont représentés sous la forme Q(X), où X est le score. Le tableau suivant montre la relation entre le score de qualité et la probabilité d'une erreur :

Score de qualité Q(X)	probabilité d'une erreur
Q40	0,0001 (1 sur 10 000)
Q30	0,001 (1 sur 1 000)

Score de qualité Q(X)	probabilité d'une erreur
Q20	0,01 (1 sur 100)
Q10	0,1 (1 sur 10)

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

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

Une fois le score de qualité établi, les résultats sont enregistrés dans des fichiers de définition des bases (*.bcl.bgzf).

Annexe C Fichiers et dossiers de sortie

Fichiers de sortie de séquençage	59
Structure du dossier de sortie	62
Fichiers de sortie du balayage	63
Structure du dossier de sortie de balayage	63

Fichiers de sortie de séquençage

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

Plaques de la Flow Cell

Les plaques sont de petites zones d'imagerie sur la Flow Cell qui constituent pour la caméra une unité de vision. Le nombre total de plaques dépend du nombre de lignes, de stries et de surfaces imagées sur la Flow Cell et de la façon dont les caméras fonctionnent conjointement pour recueillir les images.

Les Flow Cell à débit élevé comportent 864 plaques au total.

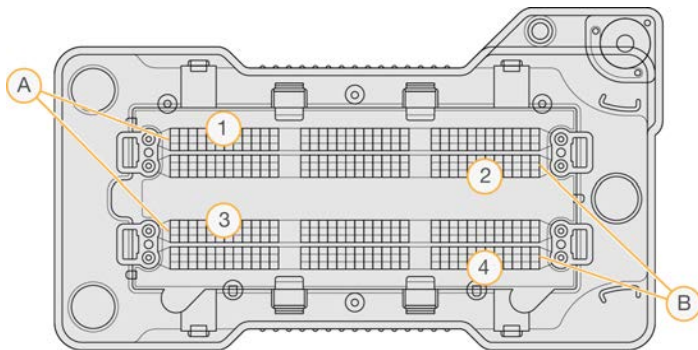
Tableau 2 Plaques de la Flow Cell

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

Numérotation des lignes

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

Figure 31 Numérotation des lignes

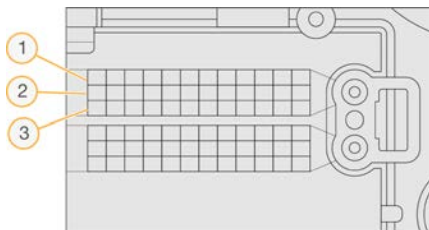


- A Paire de lignes A : lignes 1 et 3
- B Paire de lignes B : lignes 2 et 4

Numérotation des stries

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

Figure 32 Numérotation des stries

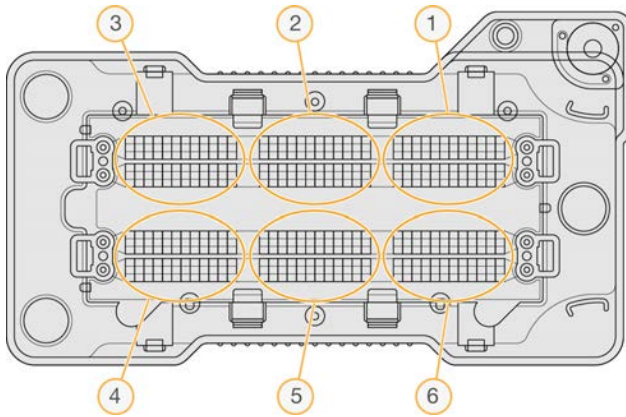


Numérotation des caméras

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

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

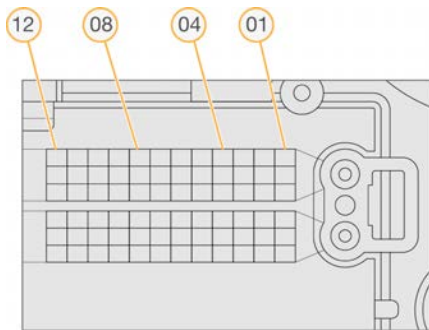
Figure 33 Numérotation des caméras et des segments (Flow Cell à débit élevé illustrée)



Numérotation des plaques

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

Figure 34 Numérotation des plaques



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

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

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

Le numéro complet à cinq chiffres de la plaque est utilisé dans le nom des vignettes et des fichiers de mise en phase empirique. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, à la page 59.

Structure du dossier de sortie

Le logiciel d'exploitation génère automatiquement le nom du dossier de sortie.

Data (Données)

Intensities (Intensités)

BaseCalls (Appels de bases)


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

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

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

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

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

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

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

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

Images

Focus (Mise au point)

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

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

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

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

 InterOp : fichiers binaires.

 Logs : fichiers journaux décrivant les étapes de fonctionnement.

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

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

 RTAComplete.txt

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

Fichiers de sortie du balayage

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

Structure du dossier de sortie de balayage

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

Index

A

adaptateur
 chargement de puce BeadChip 29
 orientation de la puce BeadChip 27
 présentation 5
aide
 documentation 1
aide, technique 69
alertes d'état 4
algorithme Phred 56
amplifiats passant le filtre 56
analyse
 fichiers de sortie 59
analyse, primaire
 pureté du signal 56
arrêter l'instrument 39
assistance clientèle 69
assistance technique 69
audio 10

B

barre d'état 3
BaseSpace 50
 connexion 16
BeadChip
 analyse 1
 types 1
bouton d'alimentation 4, 9

C

cartouche de réactifs
 présentation 7
 réservoir n° 28 34
 réservoir n° 6 20
cartouche de tampon 8, 19
clavier 10
compartiment d'imagerie 3
compartiment de réactifs 3
compartiment du tampon 3
compatibilité
 flow cell, cartouche de réactifs 5
 suivi RFID 5, 7
composants
 barre d'état 3
 compartiment d'imagerie 3
 compartiment de réactifs 3

 compartiment de tampon 3
Configuration 50
configuration autonome 21
configuration BaseSpace 21
configuration de l'analyse, option avancée 11
considérations relatives à l'indexage 56
consommables 5
 analyses de séquençage 11
 cartouche de réactifs 7
 cartouche de tampon 8
 consommables de lavage 33-34
 eau de laboratoire 12
 Flow Cell 6
 maintenance de l'instrument 12
consommables fournis par l'utilisateur 11-12
cycles d'une lecture 13

D

Decode File Client 25
 accès par compte 26
 accès par puce BeadChip 27
définition des bases 55
 considérations relatives à l'indexage 56
dépannage
 échec de l'enregistrement du balayage 47
 fichiers propres à une analyse 41
 fichiers spécifiques au balayage 42
 impossible de lire le code à barres de la
 puce BeadChip 47
 indicateurs de faible qualité 45
 remplacer les fichiers de manifeste et les
 fichiers de groupement 48
 réservoir de réactifs usagés 44
 vérification avant analyse 42
directives à propos de l'eau de laboratoire 12
documentation 1, 69
dossier DMAP
 Decode File Client 25
 téléchargement 26
durée de l'analyse 13-14

E

éliminer les consommables 11
emplacement de dossier 21
emplacement des amplifiats
 fichiers 59
 génération du modèle 54

erreurs et avertissements 4, 54
 erreurs lors de la vérification avant analyse 42

F

fichiers d'entrée, balayage
 dossier DMAP 25
 dossier DMAP, téléchargement 26
 fichiers de groupement 25, 48
 fichiers de manifeste 25, 48
 fichiers de définition des bases 59
 fichiers de filtrage 59
 fichiers de sortie 59
 fichiers de sortie du balayage
 GTC, IDAT 63
 fichiers de sortie, balayage
 GTC, IDAT 63
 fichiers GTC 63
 fichiers InterOp 41, 59
 fichiers locs 59
 filtre à air 3, 36
 filtre de pureté 56
 flow cell
 réhybridation 45
 Flow Cell
 broches d'alignement 16
 emballage 15
 imagerie 61
 nettoyage 15
 numéro de strie 60
 numérotation des lignes 60
 numérotation des plaques 61
 paires de lignes 6
 plaques 59
 présentation 6
 flux de travail
 cartouche de réactifs 19
 cartouche de tampon 19
 connexion à BaseSpace 16
 considérations relatives à l'indexage 56
 durée de l'analyse 13-14
 Flow Cell 16
 hypochlorite de sodium 34
 indicateurs de l'analyse 23
 mode autonome 21
 mode BaseSpace 21
 option de chargement avancé 11
 préparation de la Flow Cell 15
 présentation 14, 26
 puce BeadChip 29
 réactifs usagés 17

séquençage 54
 vérification avant analyse 22, 30
 flux de travail de séquençage 14, 54
 formamide, position 6 20
 formation en ligne 1

G

génération d'amplifiats 13, 23
 génération du modèle 54
 gérer l'instrument
 arrêter 39

H

hypochlorite de sodium, lavage 34

I

icônes
 erreurs et avertissements 4
 état 4
 imagerie, séquençage à deux canaux 55
 indicateurs
 cycles d'intensité 23
 cycles de densité des amplifiats 23
 définition des bases 55
 indicateurs de l'analyse 23
 instrument
 arrêter 39
 avatar 10
 bouton d'alimentation 4
 démarrage 9
 indicateurs de mode 10
 paramètres de configuration 49
 redémarrer 39
 surnom 10
 intensités 55
 interrupteur 9

L

lavage
 automatique 24
 composants du lavage 33
 consommables fournis par l'utilisateur 33
 lavage manuel 33
 lavage après analyse 24
 lavage de l'instrument 33

- logiciel
 - durée de l'analyse 13-14
 - initialisation 9
 - mise à jour automatique 38
 - mise à jour manuelle 38
 - paramètres de configuration 49
- logiciel BlueFuse Multi 1
- logiciel Real-Time Analysis 4
 - résultats 59
- logiciels
 - analyse d'image, définition des bases, logiciel de commande 4
 - sur instrument 4
- longueur de lecture 13-14

M

- maintenance de l'instrument
 - consommables 12
- maintenance préventive 33
- message d'erreur RAID 49
- mise à jour du logiciel 37
- mise en phase empirique 55
- mise en phase, mise en préphase 55
- mode recherche uniquement 10

N

- nom d'utilisateur et mot de passe 9
- nom d'utilisateur et mot de passe du système 9
- numérotation des caméras 61
- numérotation des lignes 60
- numérotation des plaques 61
- numérotation des stries 60

O

- option de chargement avancé 11

P

- paires de lignes 60
- paramètres d'analyse
 - mode autonome 21
 - mode BaseSpace 21
 - modifier les paramètres 21
- paramètres de configuration 49
- paramètres du système 10
- passant le filtre (PF) 56

- probabilité d'une erreur 56
- puce BeadChip
 - adaptateur 5, 27
 - chargement 29
 - échec de l'enregistrement 47
 - impossible de lire le code à barres 47
 - orientation du code à barres 27

R

- réactifs
 - fournis 5
 - mise au rebut adéquate 19
- réactifs usagés
 - mise au rebut 17, 36
 - réservoir plein 44
- Real-Time Analysis
 - flux de travail 54
 - mise en phase 55
- redémarrage 39
- redémarrage en mode recherche 10
- redémarrer
 - instrument 39
- réhybridation de primer 45
- réhybridation, lecture 1 45
- RunInfo.xml 41, 59

S

- scores de qualité 56
- séquençage
 - consommables fournis par l'utilisateur 11
 - introduction 13
- séquençage, fichiers de sortie 59
- service de surveillance Illumina Proactive 50
- suivi RFID 5

T

- transfert des données
 - données de balayage 31
 - Universal Copy Service 23

U

- Universal Copy Service 23

V

- vérification avant analyse 22, 30

W

Windows
quitter 39

Assistance technique

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

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

Numéros de téléphone de l'assistance clientèle d'Illumina

Région	Sans frais	Regional (Régional)
Amérique du Nord	+ (1) 800 809-4566	
Allemagne	+ (49) 8001014940	+ (49) 8938035677
Australie	+ (1) 800 775 688	
Autriche	+ (43) 800006249	+ (43) 19286540
Belgique	+ (32) 80077160	+ (32) 34002973
Chine	400 066 5835	
Corée du Sud	+ (82) 80 234 5300	
Danemark	+ (45) 80820183	+ (45) 89871156
Espagne	+ (34) 911899417	+ (34) 800300143
Finlande	+ (358) 800918363	+ (358) 974790110
France	+ (33) 8 05 10 21 93	+ (33) 1 70 77 04 46
Hong Kong, Chine	800960230	
Irlande	+ (353) 1800936608	+ (353) 016950506
Italie	+ (39) 800985513	+ (39) 236003759
Japon	0800 111 5011	
Norvège	+ (47) 800 16836	+ (47) 21939693
Nouvelle-Zélande	0800 451 650	
Pays-Bas	+ (31) 8000222493	+ (31) 207132960
Royaume-Uni	+ (44) 8000126019	+ (44) 2073057197
Singapour	+ 1 800 579 2745	
Suède	+ (46) 850619671	+ (46) 200883979
Suisse	+ (41) 565800000	+ (41) 800200442
Taiwan, Chine	00806651752	
Autres pays	+ (44) 1799 534 000	

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

Documentation sur les produits – Disponible en téléchargement sur le site support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Californie 92122 États-Unis

+ (1) 800 809 ILMN (4566)

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

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina®