

HiSeq 4000

Руководство по работе с системой



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

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

НЕВЫПОЛНЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ ПО ПОЛНОМУ ПРОЧТЕНИЮ И ТОЧНОМУ ВЫПОЛНЕНИЮ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ (-ИЙ), ТРАВМАМ (ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ИНЫХ ЛИЦ) И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИМУЩЕСТВА И ПРИВЕДЕТ К ОТМЕНЕ ЛЮБЫХ ГАРАНТИЙНЫХ ОБЯЗАТЕЛЬСТВ, ПРИМЕНИМЫХ К ИЗДЕЛИЮ (-ЯМ).

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

© Illumina, Inc., 2018. Все права защищены.

Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Информацию о конкретных товарных знаках см. на веб-сайте по адресу www.illumina.com/company/legal.html.

История редакций

Документ	Дата	Описание изменений
Материал № 20015630 Документ № 15066496, версия 05	Март 2018 г.	Добавлена информация о службе мониторинга Illumina Proactive в раздел «Просмотр и отправка данных о приборе». Обновлена информация о реактиве: название «HP12» изменено на «HP14».
Материал № 20015630 Документ № 15066496, версия 04	Январь 2017 г.	Обновлена процедура профилактической промывки. Удален Sigma-Aldrich (№ по каталогу SRE0076) для промывочного раствора SeqClip. Обновлено название программного обеспечения до названия «Управляющее программное обеспечение HiSeq Control Software HD v3.4».
Материал № 20013047 Документ № 15066496, версия 03	Сентябрь 2016 г.	В раздел «Дополнительные ресурсы» добавлено средство выбора пользовательского протокола. Добавлен Sigma-Aldrich (№ по каталогу SRE0076) для промывочного раствора SeqClip. Добавлено примечание о приблизительной частоте замены бутылей и пробирок для промывания. Обновлены инструкции запуска прибора. <ul style="list-style-type: none"> • Добавлена информация о необходимости дождаться загрузки системы до выполнения входа в операционную систему, а не после него. • Увеличена продолжительность выполнения конфигурирования устройств внутри прибора и время инициализации диска под названием DoNotEject с одной до трех минут. • Добавлено примечание о том, что для надлежащей работы жесткие диски должны быть пустыми. В инструкции по быстрому форматированию добавлена информация о временном диске (S:\). Исправлена инструкция по получению доступа к файлу журнала. Исправлены описания вариантов сервера BaseSpace.

Документ	Дата	Описание изменений
<p>Материал № 20007157 Документ № 15066496, версия 02</p>	<p>Май 2016 г.</p>	<p>Обновлено описание программного обеспечения для управляющего программного обеспечения HiSeq версии 3.3.76.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Добавлены инструкции по конфигурации домена для абонентов службы BaseSpace Enterprise. • Обновлены инструкции для циклов ступенчатого удлинения, в которые включен пункт об использовании кнопки Pause (Пауза). <p>Система BaseSpace переименована в BaseSpace Sequence Hub, а BaseSpace Onsite — в BaseSpace Onsite Sequence Hub.</p> <p>Добавлена следующая информация.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Номера по каталогу для кластерных комплектов. • Упоминание о документе <i>Руководство по работе с системой cBot 2 (документ № 15065681)</i>, который используется в качестве справочного для процесса кластеризации. • Структура папок для выходных файлов секвенирования и имя и путь папки цикла. • Поиск и устранение неисправностей в случае потери регистрации при считывании 1. • Рекомендация по ежегодному профилактическому техническому обслуживанию. <p>Удалены следующие элементы.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Конические устойчивые пробирки и наконечники пипеток из числа расходных материалов, приобретаемых пользователем. • Используемые по умолчанию имя и пароль пользователя, необходимые для того, чтобы войти в операционную систему. Компания Illumina рекомендует использовать особые пароли и имена пользователей для каждой лаборатории. • Номер по каталогу, используемый для данного руководства. <p>Исправлены следующие элементы.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Инструкции по подготовке и загрузке реактивов индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов для цикла с одним считыванием без индексирования. Для цикла с одним считыванием с однократным индексированием не требуется реактив HRM. • Название программного обеспечения для проведения анализа в реальном времени, используемого на инструменте, изменено с RTA вер. 2 на RTA2.

Документ	Дата	Описание изменений
<p>Материал № 20000063 Документ № 15066496, версия 01</p>	<p>Август 2015 г.</p>	<p>Обновлены описания программного обеспечения для управляющего программного обеспечения HiSeq Control v3.3.52 с добавлением следующих характеристик:</p> <ul style="list-style-type: none"> • возможности секвенирования проточной кюветы для одного считывания; • возможности подключения к функции BaseSpace Onsite; • индикаторов датчиков, отображающих статус передачи данных службы копирования циклов и BaseSpace. <p>Переименование поля PE Reagent Kit ID (Идентификационный номер комплекта реактивов ПКФ) на экране реактивов в Cluster Kit ID (Идентификационный номер кластерного комплекта).</p> <p>Обновлены инструкции для циклов ступенчатого удлинения на проточной кювете А и проточной кювете В.</p> <p>Добавлена возможность указания пользовательского числа циклов SBS на экране реактивов, а также обновлены настройки по умолчанию для оставшихся циклов.</p> <p>Добавлена следующая информация.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Инструкции по подготовке реактивов для SBS, чтения ПКФ и индексирования. • Указание о необходимости протереть держатель проточной кюветы смоченной водой тканью перед тем, как протирать его спиртом. • Примечание о том, что использованный раствор для профилактической промывки нужно утилизировать в соответствии с местными стандартами, принятыми правительством. <p>Исправлена длительность профилактической промывки и ожидаемый объем промывной жидкости.</p>
<p>Часть № 15066496, ред. А</p>	<p>Февраль 2015 г.</p>	<p>Первый выпуск.</p>

Содержание

История редакций	iii
Глава 1. Обзор	1
Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
Компоненты прибора	2
Обзор расходных материалов для секвенирования	7
Глава 2. Начало работы	9
Начало работы с HiSeq 4000	9
Пользовательские настройки системы	10
Просмотр и отправка данных о приборе	11
Расходные материалы, приобретаемые пользователем	12
Глава 3. Подготовка реактивов	13
Введение	13
Подготовка реактивов SBS	13
Подготовка реактивов для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов	13
Глава 4. Секвенирование	15
Введение	15
Рабочий процесс секвенирования	15
Ввод параметров цикла	16
Загрузка и заливка реактивов	19
Загрузка проточной кюветы секвенирования	24
Мониторинг цикла	26
Выгрузка реактивов	27
Выполнение водной промывки	27
Быстрое форматирование диска выходных данных и временного диска	29
Глава 5. Техническое обслуживание	30
Введение	30
Выполнение профилактической промывки	30
Работа прибора в холостом режиме	35
Выключение прибора	36
Приложение А. Поиск и устранение неисправностей	37
Файл журнала	37
Возможные проблемы при настройке цикла	37
Выполнение проверки струйной автоматике	38
Приостановка или окончание цикла HiSeq 4000	39

Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В	40
Возможность проведения регибридизации праймера для считывания 1	40
Приложение В. Анализ в реальном времени	41
Обзор анализа в реальном времени (RTA)	41
Рабочий процесс анализа в реальном времени	43
Приложение С. Файлы выходных данных	47
Выходные файлы секвенирования	47
Структура папки выходных данных	47
Нумерация плиток	48
Алфавитный указатель	50
Техническая помощь	54

Глава 1. Обзор

Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
Компоненты прибора	2
Обзор расходных материалов для секвенирования	7

Введение

Благодаря сочетанию инновационной разработки и доказанной эффективности система HiSeq® 4000 обеспечивает максимальную производительность и малую затратность в сфере геномики промышленного масштаба.

Характеристики

- ▶ **Визуализация двух поверхностей** — в устройстве HiSeq 4000 используется эпифлуоресцентная система с четырьмя датчиками и двумя камерами, оснащенная сверхсовременной технологией сканирования, которая позволяет визуализировать две поверхности кюветы.
- ▶ **Структурированная проточная кювета** — структурированная проточная кювета позволяет генерировать кластеры секвенирования в соответствии с упорядоченной схемой, что повышает качество считываний выходных данных и количество самих данных.
- ▶ **Две проточные кюветы** — в системе HiSeq 4000 используются две проточные кюветы, что позволяет выполнять секвенирование одной кюветы или двух кювет с разными длинами считывания одновременно.
- ▶ **Холодильник большой емкости для хранения реактивов** — в отсеке для реактивов имеется холодильник большой емкости для хранения реактивов, вмещающий запас реактивов на весь цикл секвенирования.
- ▶ **Встроенная струйная автоматика для циклов секвенирования парных концевых фрагментов** — встроенная струйная автоматика при секвенировании парных концевых фрагментов подает реактивы из отсека для реактивов в проточную кювету для ресинтезирования в ходе считывания 2 и для индексированного секвенирования.
- ▶ **Опции контроля интерфейса** — программный интерфейс прибора предоставляет возможность настраивать цикл и работу прибора. Используйте сенсорный экран или встроенную клавиатуру для ввода данных.
- ▶ **Распознавание оснований в реальном времени** — программное обеспечение прибора извлекает интенсивности из изображений и выполняет распознавание оснований с оценкой качества на компьютере инструмента. Этот метод позволяет контролировать показатели качества в процессе выполнения цикла и экономить время в ходе последующего анализа данных.
Последующий анализ данных секвенирования может быть выполнен при помощи аналитического программного обеспечения компании Illumina® или стороннего программного обеспечения с использованием специализированной инфраструктуры.
- ▶ **Интеграция концентратора BaseSpace® Sequence Hub** — рабочий процесс секвенирования интегрирован в концентратор BaseSpace Sequence Hub, среду, созданную компанией Illumina для вычислений в области геномики, анализа данных, их хранения и сотрудничества в соответствующей сфере. По мере выполнения цикла выходные файлы в режиме реального времени передаются в BaseSpace Sequence Hub или BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Дополнительные ресурсы

Следующую информацию можно загрузить с веб-сайта компании Illumina. Всегда проверяйте страницы раздела поддержки, чтобы получить самые последние версии ресурсов.

Ресурс	Описание
<i>Custom Protocol Selector (Средство выбора пользовательского протокола)</i>	Мастер, позволяющий создать документацию полного цикла, которая описывает конкретные методы подготовки библиотеки, параметры цикла и методы анализа, используемые для цикла секвенирования.
<i>Руководство по подготовке рабочего места систем HiSeq 4000 и HiSeq 3000 (документ № 15066492)</i>	Содержит технические характеристики, касающиеся лабораторного пространства, требований к электроснабжению и рекомендаций по условиям окружающей среды.
<i>Руководство по технике безопасности и нормативно-правовому соответствию для систем HiSeq 4000 и HiSeq 3000 (документ № 15066491)</i>	Содержит сведения о маркировке прибора, сертификатах соответствия и рекомендации по безопасности.

Посетите страницу поддержки прибора HiSeq 4000 на веб-сайте компании Illumina, чтобы получить доступ к документации, загрузкам программного обеспечения, обучению онлайн и часто задаваемым вопросам.

Компоненты прибора

Система HiSeq 4000 состоит из прибора, монитора, управляющего компьютера и вспомогательных приспособлений, таких как клавиатура, мышь и сканер штрихкодов. В приборе имеются четыре основных отсека: оптический модуль, отсек проточной кюветы, отсек струйной автоматики и отсек реактивов. Подсвечиваемая строка состояния свидетельствует о состоянии процесса работы.

Рисунок 1. Внешние комплектующие



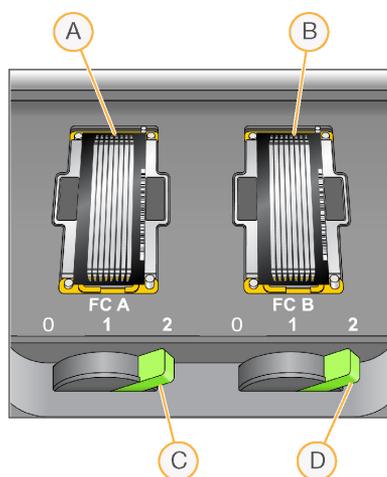
- A Оптический модуль** — содержит оптические комплектующие, которые позволяют осуществить визуализацию проточной кюветы по двум поверхностям, одновременно отображая основания А, Ц, Г и Т с использованием эпифлуоресценции. Луч возбуждающего лазера проходит через объектив, и флуоресценция одновременно регистрируется через тот же самый объектив.
- B Отсек проточной кюветы** — содержит площадку для проточной кюветы с вакуумным управлением, которая удерживает проточную кювету на месте в ходе цикла секвенирования.

- C **Отсек струйной автоматики** — содержит насосы струйной автоматики, которые подают реактивы в проточную кювету, а оттуда — в контейнер для отходов.
- D **Строка состояния**— для обозначения состояния прибора используются три цвета. Синий цвет означает, что прибор выполняет цикл, оранжевый — что состояние прибора требует внимания пользователя, а зеленый — что прибор готов к началу следующего цикла секвенирования.
- E В **отсеке для реактивов** находятся штативы для реактивов, в которых хранятся реактивы для секвенирования и промывочные растворы для мытья прибора.

Отсек проточной кюветы

В отсеке для проточной кюветы располагается площадка проточной кюветы, температурные станции, вакуумная система и подключения системы струйной автоматики для каждой проточной кюветы.

Рисунок 2. Площадка проточной кюветы с двумя проточными кюветами



- A Проточная кювета A
- B Проточная кювета B
- C Рычаг проточной кюветы A
- D Рычаг проточной кюветы B

Проточная кювета A располагается слева, а проточная кювета B — справа. Каждая проточная кювета располагается на площадке проточной кюветы, которая задвигается в оптический модуль и выдвигается из него согласно командам управляющего программного обеспечения. Для открытия дверцы отсека проточных кювет и загрузки или извлечения проточной кюветы площадка проточной кюветы должна быть максимально выдвинута вперед.

Проточная кювета расположена на держателе проточной кюветы таким образом, что входное и выходное отверстия направлены вниз. Вакуум в области под держателем проточной кюветы удерживает кювету на месте. Рычаг проточной кюветы в передней части держателя каждой кюветы служит для управления вакуумом и оснащен световой сигнализацией. Когда вакуумный затвор надежно фиксирует проточную кювету на месте, включается зеленый свет.

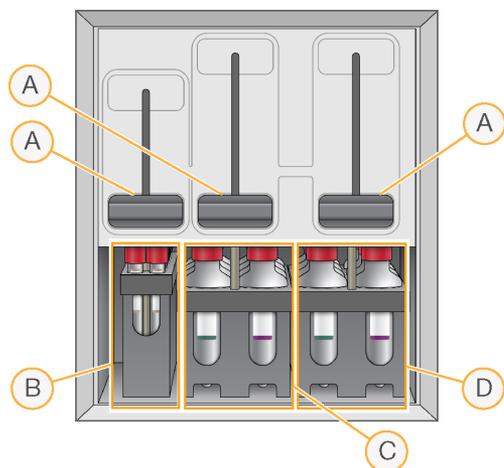
Отсек реактивов

Отсек для реактивов — это высокоэффективный холодильник для реактивов, в котором расположены три штатива для реактивов: два для реактивов SBS и 1 для реактивов, предназначенных для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов.

Рукоятки сипперов служат для опускания сипперов в бутылки с реактивами.

- ▶ **Штатив для реактивов SBS** служит для установки конических флаконов вместимостью 250 мл. Штатив для реактивов проточной кюветы А располагается в центре, штатив для проточной кюветы В — в крайнем положении справа. Каждый штатив для реактивов имеет пронумерованные положения, соответствующие соединениям клапана встроенного переключателя реактивов.
- ▶ **Штатив для реактивов индексирования и секвенирования ПКФ** расположен слева. В нем два ряда пронумерованных мест, в которых находятся конические пробирки объемом 15 мл с реактивами для секвенирования парных концевых фрагментов и индексирования. Левый ряд предназначен для проточной кюветы А, правый — для проточной кюветы В.
- ▶ **Холодильник для реактивов** — в холодильнике для реактивов расположены штативы для реактивов, а температура поддерживается на уровне от 2 до 8 °С.

Рисунок 3. Отсек реактивов



- A Рукоятки сипперов
- B Штатив с реактивами для индексирования и секвенирования ПКФ
- C Штатив для реактивов SBS проточной кюветы А
- D Штатив для реактивов SBS проточной кюветы В

Программное обеспечение HiSeq 4000

На компьютере прибора установлены три программных приложения.

- ▶ **Управляющее программное обеспечение HiSeq 4000** — интерфейс управляющего программного обеспечения HiSeq Control Software HD v3.4 поможет вам шаг за шагом настроить цикл секвенирования. В ходе цикла управляющее программное обеспечение контролирует работу оборудования прибора, управляет струйной автоматикой, задает параметры температуры и обеспечивает визуальное представление статистики по качеству.
- ▶ **Программное обеспечение для анализа в режиме реального времени (RTA)** — будучи объединенным с управляющим программным обеспечением, ПО анализа в реальном времени выполняет распознавание оснований и оценивает качество распознавания каждого основания в каждом цикле. Дополнительную информацию см. в разделе [Анализ в реальном времени на стр. 41](#).

- ▶ **Программное обеспечение Sequencing Analysis Viewer** — программа просмотра анализов секвенирования (SAV) обеспечивает получение подробной статистики по качеству.

Значки состояния

Значок состояния, расположенный в правом верхнем углу каждого экрана, отражает состояние, ошибки или предупреждения во время настройки и выполнения цикла.

Значок состояния	Название состояния	Описание
	Состояние в порядке	Изменения отсутствуют. Система в обычном состоянии.
	Информация	Только информация. Действия не требуются.
	Внимание	Информация, которая может потребовать внимания.
	Предупреждение	Предупреждения не останавливают цикл, но могут потребовать выполнения определенных действий перед продолжением работы.
	Ошибка	С появлением ошибок цикл обычно останавливается и требуется выполнение определенных действий перед тем, как можно будет продолжить.

При изменении состояния связанный значок мигает для привлечения внимания.

- ▶ Нажмите на значок, чтобы открыть окно состояния и просмотреть описание состояния.
- ▶ Выберите опцию **Acknowledge** (Подтвердить) и подтвердите получение сообщения, или выберите опцию **Close** (Закреть), чтобы закрыть диалоговое окно.

Индикаторы операций и датчиков

В нижнем правом углу экрана приветствия представлен ряд значков. Значки указывают на активность прибора и состояние отдельных компонентов на основании данных, получаемых с датчиков прибора.

Рисунок 4. Индикаторы операций



Индикаторы операций отображают слева направо: двигатели для перемещений по осям X, Y и Z, функциональные средства электроники, камеру, струйную автоматику и функции обработки.

Рисунок 5. Индикаторы датчиков



Индикаторы датчиков отображают слева направо: температуру проточной кюветы A, температуру холодильника для реактивов, состояние передачи данных, состояние облачного концентратора BaseSpace Hub и температуру проточной кюветы B.

Состояние передачи данных

Комплект программного обеспечения HiSeq включает службу копирования циклов, которая занимается передачей данных в папки выходных данных. Опция BaseSpace направляет данные о состоянии прибора и данные секвенирования в облачные службы BaseSpace Sequence Hub или BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Два индикатора датчиков в интерфейсе программного обеспечения показывают состояние передачи данных службой копирования циклов и состояние концентратора BaseSpace Sequence Hub.

Служба копирования циклов

Состояние передачи службы копирования циклов указывает на возможность начала нового цикла или безопасного форматирования диска выходных данных.

Значок состояния	Описание
	Идет передача данных. Не выполняйте форматирование диска выходных данных до завершения передачи.
	Идет передача данных, но скорость сетевого соединения медленная. Настроить цикл секвенирования и отформатировать диск выходных данных можно после завершения передачи.
	Программное обеспечение Run Copy Service выключено.
	Программное обеспечение Run Copy Service включено, но передача данных не выполняется.

Концентратор последовательностей BaseSpace Sequence Hub

Индикатор датчика BaseSpace показывает состояние BaseSpace Sequence Hub. Облако синего цвета соответствует активному подключению. Облако серого цвета означает, что программное обеспечение не может подключиться к системе. В следующей таблице приведены дополнительные подробности о каждом значке состояния.

Значок состояния	Описание
	Нет подключения к BaseSpace Sequence Hub.
	Соединение с BaseSpace Sequence Hub установлено, но данные не передаются.
	Установлено соединение с BaseSpace Sequence Hub, переданы данные для четырех циклов или менее.

Значок состояния	Описание
	<p>Установлено соединение с BaseSpace Sequence Hub, переданы данные для пяти циклов или более.</p> <p>Если отображается данный значок, это означает, что управляющее программное обеспечение не позволяет подключать новые циклы к концентратору BaseSpace Sequence Hub.</p>
	<p>Соединение с BaseSpace Sequence Hub прервано, данные ожидают передачи в очереди.</p>

Обзор расходных материалов для секвенирования

Для выполнения цикла секвенирования на приборе HiSeq 4000 требуется один комплект SBS HiSeq 3000/4000 и один кластерный комплект. Кластерные комплекты выпускаются в версии для парных концевых фрагментов (PE) и однократных считываний (SR).

Наименование комплекта	Номер по каталогу
Комплект SBS HiSeq 3000/4000 (300 циклов)	FC-410-1003
Комплект SBS HiSeq 3000/4000 (150 циклов)	FC-410-1002
Комплект SBS HiSeq 3000/4000 (50 циклов)	FC-410-1001
Кластерный комплект HiSeq 3000/4000 PE	PE-410-1001
Кластерный комплект HiSeq 3000/4000 SR	GD-410-1001

В комплекты SBS входят реактивы для секвенирования, используемые в системе HiSeq, в количестве, достаточном для секвенирования одной проточной кюветы. Реактивы для секвенирования выпускаются в бутылках объемом 250 мл, которые загружаются непосредственно в штативы для реактивов. Этикетки реактивов имеют цветовую кодировку, которая призвана снизить количество ошибок при загрузке.

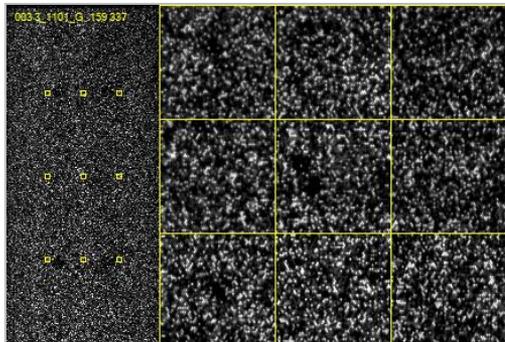
Кластерные комплекты содержат реактивы для кластеризации, используемые на приборе cBot, и реактивы для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов, используемые на приборе HiSeq 4000. Каждый кластерный комплект содержит комплект дополнительных принадлежностей, в состав которых входят прокладки проточной кюветы, колпачки-воронки для бутылей с реактивом SBS и контейнер для хранения проточной кюветы.

Структурированная проточная кювета

В приборе HiSeq 4000 используется структурированная проточная кювета, содержащая миллионы упорядоченных нанолунок, выделанных в стекле проточной кюветы. Упорядоченное расположение позволяет повысить количество выходных считываний и объем генерируемых данных секвенирования.

Структурированная проточная кювета входит в состав кластерного комплекта для системы HiSeq 3000/4000.

Рисунок 6. Пример расположения кластеров в структурированной проточной кювете



Глава 2. Начало работы

Начало работы с HiSeq 4000	9
Пользовательские настройки системы	10
Просмотр и отправка данных о приборе	11
Расходные материалы, приобретаемые пользователем	12

Начало работы с HiSeq 4000

- 1 Включите управляющий компьютер прибора.
- 2 Дождитесь загрузки системы, а затем выполните вход в операционную систему. При необходимости свяжитесь с системным администратором, чтобы узнать имя пользователя и пароль для входа в систему.
- 3 Найдите на левой стороне прибора переключатель питания и переведите его в положение ON (ВКЛ.).
- 4 Подождите не менее трех минут, чтобы все устройства внутри прибора завершили конфигурирование и чтобы диск под названием DoNotEject инициализировался.
- 5 Закройте окно, которое откроется после инициализации диска DoNotEject. Если окно не открылось, воспользуйтесь функцией «Мой компьютер», чтобы проверить наличие диска DoNotEject.



ПРИМЕЧАНИЕ

Запрещается извлекать флеш-накопитель DoNotEject, расположенный внутри корпуса прибора, или изменять файлы, находящиеся на нем. На этом диске находятся файлы аппаратной конфигурации, и он инициализируется всякий раз при включении питания прибора.

- 6 Чтобы на диске было достаточно места, необходимо произвести архивирование данных предыдущих циклов, сохраненных на компьютере, и перенести их в сетевое хранилище. Выполните быстрое повторное форматирование дисков O:\ и S:\, чтобы удалить все оставшиеся данные.
Для надлежащей работы программного обеспечения жесткие диски должны быть пустыми.
- 7 Откройте HCS с помощью значка быстрого запуска на рабочем столе.
После инициализации программного обеспечения откроется экран приветствия, а в правом нижнем углу экрана отобразится значок инициализации.

Рекомендации по работе с прибором и управляющим компьютером

- ▶ Не следует включать компьютер при работающем приборе. Всегда включайте компьютер перед включением прибора.
- ▶ Не следует выключать прибор при работающем управляющем программном обеспечении прибора.
- ▶ После выключения прибора нужно подождать не менее одной минуты, прежде чем снова включать его.
- ▶ Подключите USB-кабели для прибора, монитора и клавиатуры к разъемам на задней панели компьютера перед включением компьютера.
- ▶ Подключите сканер штрихкода и мышь к USB-портам на передней панели компьютера.

Пользовательские настройки системы

Управляющее программное обеспечение включает настраиваемые пользователем параметры системы для папок циклов, предпочтений LIMS и доменов. Окно опций меню позволяет осуществлять настройки, которые определяют: шаблон идентификационного номера цикла; местоположения папок, принятые по умолчанию; то, нужно ли отправлять данные о состоянии прибора; идентификацию LIMS и домены BaseSpace Enterprise.

Чтобы выполнить пользовательскую настройку просмотра интерфейса, выберите **Menu | View** (Меню | Просмотр). Можно выбрать просмотр интерфейса в полноэкранном режиме, в окне или свернуть интерфейс.

Установка настроек папки цикла

- 1 На экране приветствия выберите **Menu | Tools | Options** (Меню | Инструменты | Опции), чтобы открыть окно опций меню.
- 2 Чтобы настроить правила создания имен для папок циклов, измените настройки в поле **Run ID Template** (Шаблон идентификатора цикла). Выберите опцию **Reset** (Сброс), чтобы очистить поле.
- 3 Чтобы настроить расположение выходных файлов по умолчанию, введите расположение для каждой из следующих папок.
 - ▶ **Default Output Folder** (Папка выходных файлов по умолчанию) является папкой выходных файлов для циклов в проточной кювете A по умолчанию.
 - ▶ **Default Output Folder2** (Папка 2 выходных файлов по умолчанию) является папкой выходных файлов для циклов в проточной кювете B по умолчанию.



ПРИМЕЧАНИЕ

Компания Illumina рекомендует размещать папки выходных данных в сети. Однако можно указать расположение на диске O:\, если это расположение отличается от указанного для папки HiSeq Temp. Не используйте диски S:\ или C:\. Диск S:\ зарезервирован для операций прибора, а диск C:\ слишком мал.

- 4 Чтобы задать расположение протоколов анализа LIMS, введите расположение в поле **Run Setup Folder** (Папка настроек цикла).
- 5 Выберите **OK**, чтобы сохранить работу и закрыть окно опций меню. Выберите **Cancel** (Отмена), чтобы закрыть окно, не сохраняя изменений.

Настройка предпочтений LIMS

- 1 На экране приветствия выберите **Menu | Tools | Options** (Меню | Инструменты | Опции), чтобы открыть окно опций меню.
- 2 Введите следующие настройки LIMS.
 - ▶ **LIMS Server** (Сервер LIMS) является именем сервера для взаимодействия с LIMS, поддерживаемой Illumina.
 - ▶ **LIMS User Name** (Имя пользователя LIMS) является именем пользователя для входа в Illumina LIMS.
 - ▶ **LIMS Password** (Пароль LIMS) является паролем для входа в Illumina LIMS.
- 3 Выберите **OK**, чтобы сохранить работу и закрыть окно опций меню. Выберите **Cancel** (Отмена), чтобы закрыть окно, не сохраняя изменений.

Конфигурирование домена

Если вы абонент системы BaseSpace Enterprise, воспользуйтесь приведенными ниже инструкциями для конфигурирования своего домена.

- 1 На экране приветствия выберите **Menu | Tools | Options** (Меню | Инструменты | Опции), чтобы открыть окно опций.
- 2 Выберите вариант сервера BaseSpace
 - ▶ **Cloud** — подключение к домену BaseSpace Sequence Hub.
 - ▶ **Onsite** — подключение к домену BaseSpace Onsite Sequence Hub.
- 3 Введите домен для выбранного сервера.
- 4 Выберите **OK**, чтобы сохранить работу и закрыть окно опций. Выберите **Cancel** (Отмена), чтобы закрыть окно, не сохраняя изменений.

Просмотр и отправка данных о приборе

Кнопка меню на экране приветствия и окно опций меню содержат функции просмотра и отправки данных о приборе.

- ▶ Чтобы просмотреть информацию об аппаратной части прибора, версиях программного обеспечения и контактную информацию службы технической поддержки, выберите пункт **Menu | About** (Меню | О системе).
- ▶ Выберите **Menu | Tools | Options** (Меню | Инструменты | Параметры), а затем выберите **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Отправить данные состояния прибора предприятию Illumina, чтобы помочь совершенствованию продукции Illumina), чтобы включить службу мониторинга Illumina Proactive. Название настройки в интерфейсе программного обеспечения может отличаться от названия в настоящем руководстве, в зависимости от используемой версии HCS.

При включении этой настройки на предприятие Illumina будут отправляться данные о производительности прибора. Эти данные помогают предприятию Illumina в поиске и устранении неисправностей и распознавании потенциальных сбоев, позволяя выполнять профилактическое техническое обслуживание и увеличивать срок службы прибора. Дополнительную информацию о пользе такого обслуживания см. в документе *Техническая записка компании Illumina о профилактическом обслуживании (Illumina Proactive Technical Note) (документ №1000000052503)*

Данная служба:

- ▶ не отправляет данные секвенирования;
- ▶ требует подключения прибора к сети с доступом в интернет;
- ▶ по умолчанию включена. Чтобы отказаться от ее использования, снимите флажок **Send instrument health information to Illumina to help Illumina improve its products** (Отправить данные состояния прибора предприятию Illumina, чтобы помочь совершенствованию продукции Illumina).



ПРИМЕЧАНИЕ

Эта настройка снова включается после обновления программного обеспечения. Если пользователь не хочет отправлять данные производительности прибора предприятию Illumina, эту службу нужно отключать после каждого обновления программного обеспечения.

Расходные материалы, приобретаемые пользователем

Расходный материал	Поставщик	Цель
Спиртовые салфетки, изопропиловый спирт 70 % или 70 % этиловый спирт	VWR, № по каталогу: 95041-714 Основной поставщик лаборатории	Очистка проточной кюветы и площадки проточной кюветы.
Carboy, минимум 6 литров	Основной поставщик лаборатории	Подготовка раствора для профилактической промывки.
Центрифужные пробирки, 250 мл	Corning, № по каталогу: 430776	Штативы для реактивов SBS, положения, содержащие PW1. Промывка прибора.
Конические пробирки, 15 мл	Corning, № по каталогу: 430052	Штативы для реактивов PE, положения, содержащие PW1. Промывка прибора. Сбор и измерение объема отходов.
Одноразовые перчатки, неопудренные	Основной поставщик лаборатории	Общего назначения.
Лабораторные низковорсные салфетки	VWR, № по каталогу: 21905-026	Очистка держателя проточной кюветы.
Бумага для оптических стекол, 4 x 6 дюймов	VWR, № по каталогу: 52846-001	Очистка проточной кюветы.
ProClin 300, 50 мл	Sigma-Aldrich, № по каталогу: 48912-U	Профилактическая промывка.
Tween 20, вязкая жидкость, 100 мл	Sigma-Aldrich, № по каталогу: P7949	Профилактическая промывка.
Пинцет с квадратными пластиковыми кончиками	McMaster-Carr, № по каталогу: 7003A22	Удаление прокладок проточной кюветы.
Вода лабораторного класса, 18 МОм	Millipore	Штативы для реактивов SBS и PE, в гнездах содержится PW1. Промывка прибора.

Подготовка реактивов

Введение	13
Подготовка реактивов SBS	13
Подготовка реактивов для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов	13

Введение

Перед настройкой цикла подготовьте все реактивы для секвенирования, в том числе реактивы для SBS, реактивы для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов. Все реактивы загружаются после того, как будет получен запрос программного обеспечения во время настройки цикла. Нет необходимости возвращаться к прибору во время цикла для повторной загрузки реактивов.

Реактивы для секвенирования можно подготовить во время генерации кластеров.

Подготовка реактивов SBS

Реактивы SBS загружают в прибор в начале цикла. Для разморозки и осмотра реактивов HCM, HIM и HSM необходимо соблюдать приведенные ниже инструкции.

Разморозка реактивов SBS

- 1 Извлеките реактивы HCM, HIM и HSM из хранилища с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Дайте им оттаять при температуре от 2 до 8 °C на протяжении около 16 часов. Возможен другой метод размораживания, при котором реактивы HIM и HSM можно выдержать на водяной бане комнатной температуры с использованием деионизированной воды в течение 90 минут. Реактив HCM следует размораживать в **отдельной** водяной бане.



ПРИМЕЧАНИЕ

После каждого контакта с реактивом HCM необходимо сменить перчатки.

- 3 Переверните каждую бутылку несколько раз для перемешивания содержимого.
- 4 Осмотрите реактив HSM и убедитесь, что в нем не видно завихрений.
- 5 Отложите реактивы HIM и HSM в сторону, поместив их на лед.
- 6 Отложите реактив HCM, поместив его на лед, **отдельно** во избежание перекрестного загрязнения.

Подготовка реактивов для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов

Реактивы для индексирования и считывания ПКФ загружаются в прибор в начале цикла. Они применяются на этапе считывания с индексированием и на этапе повторного синтеза считывания 2 в цикле секвенирования.

Следуйте инструкциям по подготовке реактивов для индексирования и реактивов для считывания ПКФ только в том случае, если вы секвенируете проточную кювету со считыванием ПКФ или если вы секвенируете индексированные библиотеки на проточной кювете с одним считыванием.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

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

Разморозка и подготовка индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов

- 1 Извлеките из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C следующие реактивы.
 - ▶ Для выполнения цикла с проточной кюветой для считывания ПКФ — HAM, HDR, HLM2, HP11, HP14, HPM и HRM. Для неиндексированных библиотек реактив HP14 не требуется.
 - ▶ Для выполнения цикла на проточной кювете для одного считывания
 - ▶ Библиотеки с двойным индексированием — реактивы HDR, HP14 и HRM.
 - ▶ Библиотеки с одним индексированием — реактивы HDR и HP14.
- 2 Размораживайте реактивы в лабораторном стакане, наполненном деионизированной водой комнатной температуры, на протяжении 20 минут.
- 3 Переверните каждую пробирку несколько раз для перемешивания содержимого.
- 4 Обработайте на центрифуге в течение 1 минуты при 1000 об/мин.
- 5 Отложите реактивы HAM, HLM2 и HRM в сторону, поместив их на лед.
- 6 Отложите реактивы HDR, HP11, HP14, HP14 и HPM и держите их при комнатной температуре.

Глава 4. Секвенирование

Введение	15
Рабочий процесс секвенирования	15
Ввод параметров цикла	16
Загрузка и заливка реактивов	19
Загрузка проточной кюветы секвенирования	24
Мониторинг цикла	26
Выгрузка реактивов	27
Выполнение водной промывки	27
Быстрое форматирование диска выходных данных и временного диска	29

Введение

Чтобы выполнить цикл секвенирования на приборе HiSeq 4000, подготовьте все необходимые для цикла реактивы и следуйте инструкциям программного обеспечения для настройки цикла. Настройка цикла секвенирования включает следующие этапы: ввод параметров цикла, загрузку и заливку реактивов, загрузку проточной кюветы и проверку струйной автоматике.

Этапы настройки цикла распределены по трем вкладкам: Run Configuration (Конфигурирование цикла), Pre-Run Setup (Настройка перед циклом) и Initiate Run (Начать цикл).

- ▶ Экран конфигурации цикла содержит выпадающие списки, чекбоксы или текстовые поля для указания параметров цикла. Используйте ручной сканер штрихкодов для сканирования идентификационного номера проточной кюветы или комплекта реактивов или введите идентификационный номер при помощи клавиатуры сенсорного экрана. Символ клавиатуры располагается справа от текстовых полей. 
- ▶ Нажмите **Next** (Далее) для перехода на следующую страницу экрана или **Back** (Назад) для возврата на предыдущую страницу.
- ▶ В любой момент в ходе пошаговой настройки цикла можно нажать кнопку **Cancel** (Отмена) и вернуться на экран приветствия.

Зайдите на страницу [технических характеристик работы HiSeq 4000](#) на веб-сайте компании Illumina и найдите там информацию о длительности цикла и о других технических характеристиках работы данного прибора.

Циклы ступенчатого удлинения

Новый цикл для проточной кюветы A или B можно начать во время выполнения цикла для смежной проточной кюветы. Дополнительные сведения см. в разделе [Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет A и B](#) на стр. 40.

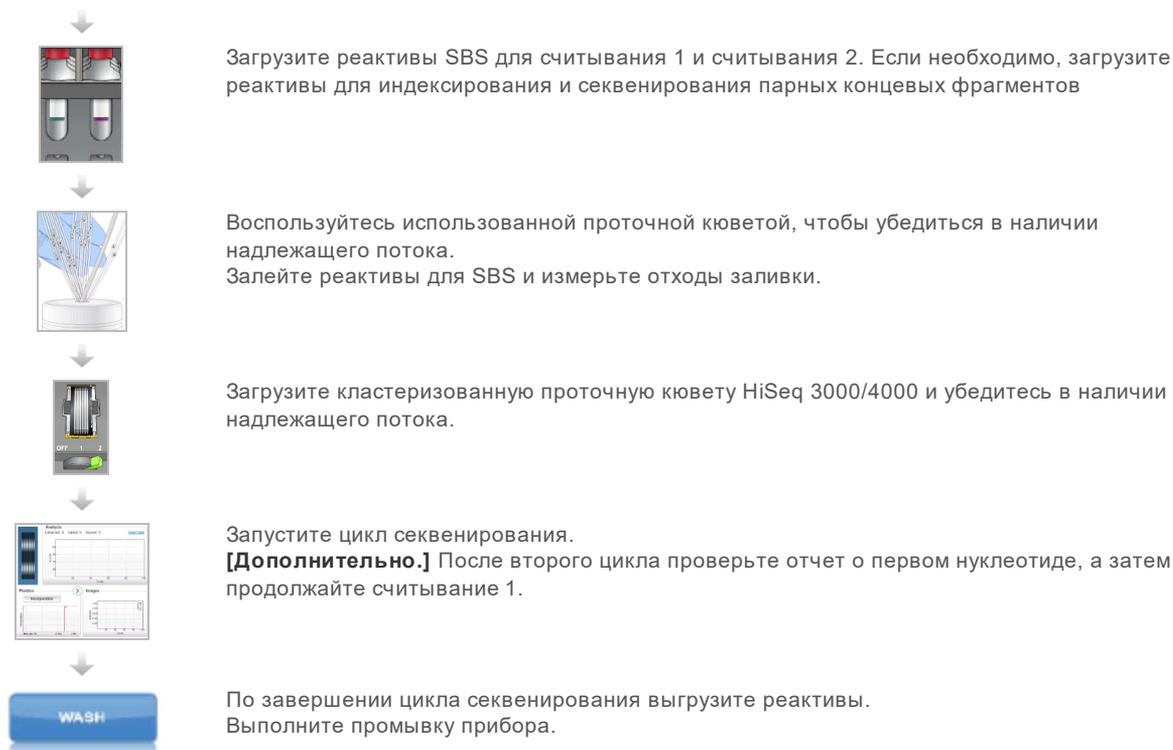
Рабочий процесс секвенирования



Подготовьте проточную кювету и реактивы для цикла.



Следуя запросам в интерфейсе управляющего программного обеспечения, введите параметры цикла секвенирования.



Ввод параметров цикла

Начните настройку цикла, введя параметры цикла на ряде экранов вкладки Run Configuration (Настройка цикла). Экраны программного обеспечения будут переключаться для указания возможности подключения к BaseSpace Sequence Hub, ввода идентификационных номеров расходных материалов, выбора опций индексирования и регистрации других параметров.

Экран хранилища

- 1 На экране приветствия выберите **Sequence** (Секвенирование), чтобы открыть экран хранилища.
- 2 **[Дополнительно.]** Установите соединение с BaseSpace Sequence Hub или BaseSpace Onsite Sequence Hub следующим образом.
 - a Выберите опцию **Connect to BaseSpace** (Подключение к BaseSpace).
 - b Выберите **BaseSpace** или **BaseSpace Onsite**.
 - c Если вы выбрали среду BaseSpace, выберите дальнейшие действия.
 - ▶ **Storage and Analysis** (Хранение и анализ) — отправка данных цикла секвенирования в BaseSpace Sequence Hub для дистанционного мониторинга и анализа данных. Для этой опции необходимо иметь форму протокола анализа.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Только мониторинг цикла) — отправка в BaseSpace Sequence Hub только файлов InterOp, что позволяет дистанционно отслеживать ход выполнения цикла.
 - d Войдите в BaseSpace Sequence Hub или BaseSpace Onsite Sequence Hub, используя электронную почту и пароль учетной записи Myllumina.
- 3 Нажмите кнопку **Browse** (Обзор), чтобы перейти к нужной папке выходных данных.

- 4 Подтвердите, что для миниатюры задан параметр **Save All Thumbnails** (Сохранять все миниатюры).
Программное обеспечение автоматически сохраняет все миниатюрные изображения. Миниатюра — это выборка изображений по многим плиткам в каждом столбце плиток или полосе, собранных в одном изображении.

- 5 Нажмите **Next** (Далее).

Экран настройки проточной кюветы

Экран настройки проточной кюветы служит для записи данных о проточной кювете, используемой для цикла секвенирования. Все поля обязательны для заполнения.

- 1 Отсканируйте или введите идентификационный номер проточной кюветы (номер на штрихкоде), в которой будет выполнено секвенирование.
- 2 Выберите тип проточной кюветы: **HiSeq 3000/4000 PE** или **HiSeq 3000/4000 SR**.
- 3 Введите название эксперимента, которое отображается на каждой странице экрана и помогает определить, какой цикл секвенирования выполняется.
- 4 Введите имя пользователя.
- 5 Нажмите **Next** (Далее).

Экран дополнительных возможностей

- 1 **[Дополнительно.]** Выберите опцию **Confirm First Base** (Подтвердить первый нуклеотид). Отчет о первом нуклеотиде создается автоматически в каждом цикле секвенирования после цикла 2 и помещается в корневую папку цикла секвенирования. Выбор этой опции позволяет подтвердить первый отчет о нуклеотидах до того, как будет продолжено выполнение цикла. В противном случае цикл продолжится без отображения диалогового окна подтверждения.
- 2 **[Дополнительно.]** Выберите на изображении проточной кюветы дорожки, которые нужно исключить из цикла секвенирования.
По умолчанию все дорожки включены. Выравнивание PhiX выполняется автоматически для всех дорожек.
- 3 Нажмите **Next** (Далее).

Экран набора параметров

Набор параметров генерируется автоматически из информации, введенной на экране набора параметров.

- 1 Выберите опцию Index Type (Тип индексирования).
 - ▶ **No Index** (Без индексирования) служит для выполнения цикла секвенирования парных концевых фрагментов или цикла с одним считыванием без индексирования.
 - ▶ **Single Index** (Однократное индексирование) служит для выполнения цикла секвенирования парных концевых фрагментов или цикла одного считывания с однократным считыванием индекса.
 - ▶ **Dual Index** (Двукратное индексирование) служит для выполнения цикла секвенирования парных концевых фрагментов или цикла одного считывания с двукратным считыванием индекса.

- ▶ **Custom** (Пользовательские настройки) служит для выполнения считывания парных концевых фрагментов или цикла одного считывания с указываемым оператором количеством циклов считываний индекса.
- 2 Введите число циклов в поля Read 1 (Считывание 1) и Read 2 (Считывание 2), если это предусмотрено.



ПРИМЕЧАНИЕ

Количество циклов, выполненных в одном считывании, превышает количество проанализированных циклов на 1. Например, чтобы выполнить 125 циклов для считывания 1, введите 126.

- 3 Если вы выбрали опцию индексирования **Custom** (Пользовательские настройки), укажите количество циклов для каждого считывания индекса.



ПРИМЕЧАНИЕ

Длительность считывания необязательно должна совпадать.

- 4 Подтвердите следующие настройки химической реакции, заполняемые автоматически.
 - ▶ **SBS: комплект HiSeq 3000/4000 SBS** — показывает, какие химические реакции SBS используют для считываний 1 и 2.
 - ▶ **Index (Индекс): праймер для секвенирования HiSeq 3000/4000** или **праймер для секвенирования HiSeq 3000/4000 Dual Index** — показывает химические реакции, используемые для считываний индекса.
 - ▶ **PE turnaround (Обработка ПКФ): HiSeq 3000/4000 PE** или **HiSeq 3000/4000 PE Dual Index** — показывает химические реакции, используемые для ресинтеза парных концевых фрагментов.
- 5 **[Дополнительно.]** Выберите опцию **Use Existing Recipe** (Использовать существующий набор параметров), чтобы использовать пользовательский набор параметров.

Экран протокола анализа

Использовать форму протокола анализа необязательно в случаях, когда для выполнения анализа данных не используется BaseSpace Sequence Hub.

- 1 Нажмите **Browse** (Обзор), чтобы указать путь к протоколу анализа.
- 2 Нажмите **Next** (Далее).

Экран реактивов

На экране реактивов регистрируется информация о комплекте реактивов, используемом во время цикла.

- 1 Просканируйте или введите вручную идентификационный штрихкод комплекта реактивов SBS.
- 2 Для циклов с чтением ПКФ — просканируйте или введите идентификационный номер кластерного комплекта.
- 3 Выберите комплект реактивов SBS для цикла.
 - ▶ Выберите **300 Cycles** (300 циклов) для 300-циклового комплекта. По умолчанию оставшееся количество циклов будет задано равным 325.
 - ▶ Выберите **150 Cycles** (150 циклов) для 150-циклового комплекта. По умолчанию оставшееся количество циклов будет задано равным 174.

- ▶ Выберите **50 Cycles** (50 циклов) для 50-циклового комплекта. По умолчанию оставшееся количество циклов будет задано равным 74.
- ▶ Выберите **Custom** (Пользовательские настройки) для частичного комплекта или для нескольких 50-циклового комплектов. В поле **Cycles Remaining** (Оставшиеся циклы) введите количество циклов SBS, на которое, как предполагается, должно хватить загруженных реактивов.



ПРИМЕЧАНИЕ

Поле **Cycles Remaining** (Оставшиеся циклы) заполняется автоматически с учетом идентификационного номера комплекта реактивов SBS. Программа ведет обратный отсчет введенного количества циклов. Когда остается небольшое количество циклов, программное обеспечение выдает сообщение о том, что нужно загрузить новые реактивы.

- 4 Чтобы выполнить заливку реактивов, выберите опцию **Prime SBS Reagents** (Заливка реактивов SBS).
- 5 Нажмите **Next** (Далее).

Экран проверки

- 1 Просматривать параметры цикла можно на экране проверки.
- 2 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы продолжить работу, или **Back** (Назад), чтобы изменить параметры.

Загрузка и заливка реактивов

После ввода параметров цикла секвенирования, загрузки реактивов SBS, реактивов для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов для цикла залейте реактивы через системы струйной автоматики. Программа поэтапно проведет пользователя через ряд экранов вкладки предварительных настроек цикла секвенирования.

Загрузка реактивов для SBS

- 1 Переверните каждую бутылку несколько раз для перемешивания содержимого.



ОСТОРОЖНО!

Во избежание перекрестного загрязнения смешайте и загрузите HCM последним, после того как будут загружены все остальные реактивы. Каждый раз после работы с реактивом HCM утилизируйте перчатки и надевайте новые.

- 2 Вместо обычного колпачка на каждую бутылку наденьте колпачок-воронку.
- 3 Откройте дверцу отсека с реактивами.
- 4 Поднимите сипперные трубки в направлении штативов с реактивами SBS следующим образом.
 - а Потяните рукоятку сипперов на себя, а потом поднимите ее.
 - б Введите рукоятку в отверстие в верхнем конце желоба. Убедитесь в том, что рукоятка надежно установлена в отверстии.
- 5 Выдвиньте штатив с реактивами из отсека для реактивов, используя рукоятку штатива.
- 6 Поместите все бутылки в штатив в соответствии с порядковыми номерами. Убедитесь в том, что коническое дно бутылки упирается в углубление в основании штатива.

Таблица 1. Положения для реактивов для SBS

Место	Реактив	Описание
1	HIM	Смесь для встраивания НТ
2	PW1	25 мл PW1 или воды лабораторного класса
3	HSM	Смесь для сканирования НТ
4	HB1	Буфер 1 для НТ SBS
5	HB2	Буфер 2 для НТ SBS
6	HB2	Буфер 2 для НТ SBS
7	HCM	Смесь для расщепления НТ
8	HB2	Буфер 2 для НТ SBS

- 7 Наденьте новую пару неопудренных латексных перчаток.
- 8 Задвиньте штатив в отсек для реактивов, совмещая штатив с выступающей направляющей на полу отсека.
- 9 Опустите сипперы в бутылки с реактивами SBS следующим образом.
 - а Потяните рукоятку сипперов на себя, а потом опустите ее.
 - б Осмотрите сипперы и убедитесь, что они не сгибаются при введении в воронки-крышки.
 - в Введите рукоятку в отверстие в нижнем конце желоба.

Загрузка реактивов для индексирования и секвенирования парных концевых фрагментов

- 1 Переверните каждую бутылку несколько раз для перемешивания содержимого.
- 2 Поднимите сипперные трубки в направлении штативов с реактивами СПКФ следующим образом.
 - а Потяните рукоятку на себя и приподнимите ее.
 - б Введите рукоятку в отверстие в верхнем конце желоба. Убедитесь в том, что рукоятка надежно установлена в отверстии.
- 3 Выдвиньте штатив из отсека для реактивов, используя рукоятку штатива.
- 4 Если проводится цикл одного считывания без индексирования, пропустите этап 5 и установите в каждое положение коническую пробирку объемом 15 мл, заполненную 10 мл реактива PW1 или воды лабораторного класса.
- 5 Снимите колпачки с трубок для реактивов и поместите каждую трубку в штатив в соответствии с номером положения или цветовой меткой.

Таблица 2. Проточная кювета для считывания ПКФ

Место	Реактив	Описание
10	HRM	Смесь НТ для повторного синтеза
11	HLM2	Смесь НТ 2 для структурированной линейаризации
12	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
13	HAM	Смесь НТ для амплификации
14	HPM	Премикс НТ для амплификации

Место	Реактив	Описание
15	HDR	Смесь НТ для денатурирования (содержит формамид)
16	HP11	Смесь праймера, считывание 2
17	HP14 *	Смесь индексирующих праймеров
18	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
19	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса

* HP14 требуется только для индексируемых циклов. Если HP14 не используется, установите в соответствующее положение коническую пробирку объемом 15 мл с 10 мл PW1 или воды лабораторного класса.

Таблица 3. Проточная кювета для одного считывания

Место	Реактив	Описание
10	HRM *	Смесь НТ для повторного синтеза
11	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
12	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
13	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
14	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
15	HDR	Смесь НТ для денатурирования (содержит формамид)
16	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
17	HP14	Смесь праймеров индекса 1
18	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса
19	PW1	10 мл PW1 или воды лабораторного класса

* Реактив HRM требуется только для циклов с двойным индексированием. Если реактив HRM не используется, установите в соответствующее положение коническую пробирку объемом 15 мл с 10 мл реактива PW1 или воды лабораторного класса.

- 6 Задвиньте штатив в отсек, совмещая штатив с выступающей направляющей на полу отсека.
- 7 Опустите сипперы в пробирки с реактивами для секвенирования парных концевых фрагментов следующим образом.
 - a Потяните рукоятку на себя и опустите ее.
 - b Осмотрите сипперы и убедитесь, что они не сгибаются при опускании в пробирки.
 - c Введите рукоятку в отверстие в нижнем конце желоба.
- 8 Выберите опцию **PW1 [25 ml] loaded** (PW1 [25 мл] загружен) в поле **Position 2** (Положение 2), а затем выберите **Next** (Далее).

Заливка реактивов

Этапы заливки реактивов включают загрузку заливочной проточной кюветы, подтверждение надлежащего потока и запуск заливки.



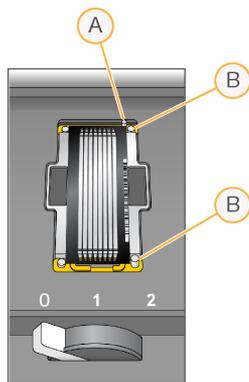
ОСТОРОЖНО!

Обязательно применяйте **использованную** проточную кювету для заливки реактивов. Проточную кювету, оставшуюся после предыдущего цикла, можно использовать для заливки реактивов для следующего цикла секвенирования или для послещикловой промывки.

Загрузка заливочной проточной кюветы

- 1 Отсканируйте или введите идентификационный номер заливочной проточной кюветы (номер на штрихкоде).
- 2 Промойте заливочную проточную кювету водой лабораторного класса. Высушите тканью для чистки оптических стекол или безворсовой тканью.
- 3 Очистите спиртовыми салфетками и тканью для чистки оптических стекол.
- 4 Поместите в держатель проточной кюветы входными и выходными отверстиями **вниз** и штрихкодом вправо. Убедитесь, что стрелка на левой стороне проточной кюветы, указывающая направление потока, направлена на прибор.
- 5 Аккуратно надвиньте проточную кювету на верхний и правый направляющие штифты до остановки.

Рисунок 7. Расположение проточной кюветы относительно верхнего и правого направляющих штифтов



- A Верхний направляющий штифт
- B Правые направляющие штифты

- 6 Уберите руку от проточной кюветы во избежание смещения по отношению к оси выравнивания.
- 7 Медленно переведите рычаг проточной кюветы в положение 1 для подачи вакуума и фиксации проточной кюветы.
Если рычаг проточной кюветы мигает зеленым, идет подача вакуума. Если рычаг не зеленый, см. раздел [Возможные проблемы при настройке цикла на стр. 37](#).
- 8 Подождите примерно пять секунд и медленно переведите рычаг проточной кюветы в положение 2.
Если рычаг проточной кюветы зеленый, это значит, что коллекторы в правильном положении и проточная кювета готова.
- 9 Убедитесь в том, что в поле **Vacuum Engaged** (Подача вакуума) установлена отметка, и выберите **Next** (Далее).

Подтверждение надлежащего потока

При проверке на надлежащий поток подтверждают правильную установку проточной кюветы и прокладок и подключение коллектора.

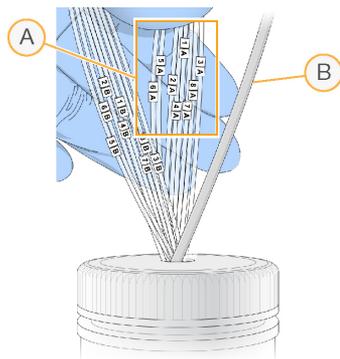
- 1 Выберите положение **2** из выпадающего списка.

- 2 Введите следующие значения, принятые по умолчанию.
 - ▶ Объем: **125**
 - ▶ Скорость аспирации: **250**
 - ▶ Скорость разлива: **2000**
- 3 Выберите опцию **Pump** (Насос).
- 4 Осмотрите проточную кювету на предмет пузырьков, проходящих через дорожки, и утечек вблизи коллекторов.
- 5 При большом количестве пузырьков выполните следующие действия.
 - a Убедитесь в отсутствии закупорок в прокладках.
 - b Снизьте скорость аспирации до 100.
 - c Закачайте еще 125 мкл воды в проточную кювету.
 - d При сохранении проблемы удалите проточную кювету, повторите этапы чистки и повторно загрузите проточную кювету.
- 6 Нажмите **Next** (Далее).

Размещение трубок и начало заливки

- 1 Извлеките восемь трубок для отходов соответствующей проточной кюветы из контейнера для отходов.

Рисунок 8. Размещение трубок



- A Трубки для отходов проточной кюветы для мест реактивов 1–8
B Трубка конденсата из насоса

- 2 Поместите каждую трубку для отходов в отдельную пустую пробирку емкостью 15 мл. По завершении заливки происходит сбор и измерение отходов.
- 3 Выберите опцию **Start Prime** (Начать заливку). Процесс заливки отслеживается на соответствующем экране заливки.
- 4 По завершении заливки измерьте объем собранных отходов и убедитесь, что объем в каждой пробирке составляет 1,75 мл, а общий объем — 14 мл. Общий объем вычисляется следующим образом.
 - ▶ 250 мкл на каждое место для реактивов SBS, кроме места 2 ($250 \times 7 = 1,75$ мл)
 - ▶ 1,75 мл на каждую дорожку ($1,75 \times 8 = 14$ мл)
- 5 Верните трубки для отходов в контейнер для отходов.

6 Нажмите **Next** (Далее).

Загрузка проточной кюветы секвенирования

Процесс загрузки проточной кюветы для секвенирования включает в себя извлечение заливочной проточной кюветы, очистку держателя проточной кюветы, загрузку кластеризованной проточной кюветы и подтверждение правильных параметров потока.

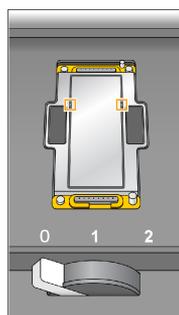
Извлечение использованной проточной кюветы

- 1 Медленно переведите рычаг проточной кюветы в положение 1 для отсоединения коллекторов.
- 2 Медленно переведите рычаг проточной кюветы в положение 0 для отсоединения вакуумного уплотнителя и высвобождения проточной кюветы.
- 3 Снимите использованную проточную кювету с держателя проточной кюветы.

Очистка держателя проточной кюветы

- 1 Наденьте новую пару неопудренных латексных перчаток.
- 2 Протрите поверхность держателя проточной кюветы безворсовой тканью, смоченной водой лабораторного класса, чтобы удалить соли.
- 3 С помощью спиртовой салфетки или безворсовой ткани, смоченной этанолом или изопропанолом, протрите поверхность держателя проточной кюветы. Не допускайте, чтобы спирт попал в вакуумные отверстия или на участки вокруг коллекторов.
- 4 При необходимости высушите площадку низковорсной лабораторной салфеткой.
- 5 Осмотрите держатель проточной кюветы, чтобы убедиться, что на нем нет ворса, а вакуумные отверстия не засорены.

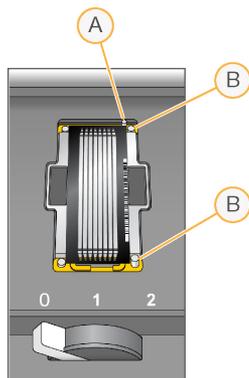
Рисунок 9. Осмотрите вакуумные отверстия



Загрузка проточной кюветы секвенирования

- 1 Поместите проточную кювету в держатель проточной кюветы входными и выходными отверстиями **вниз** и штрихкодом вправо. Убедитесь, что стрелка на левой стороне проточной кюветы, указывающая направление потока, направлена на прибор.
- 2 Аккуратно надвиньте проточную кювету на верхний и правый направляющие штифты до остановки.

Рисунок 10. Расположение проточной кюветы относительно верхнего и правого направляющих штифтов



- A Верхний направляющий штифт
- B Правые направляющие штифты

- 3 Уберите руку с проточной кюветы во избежание смещения по отношению к оси выравнивания с течением времени.
- 4 Медленно переведите рычаг проточной кюветы в положение 1 для подачи вакуума и фиксации проточной кюветы.
Если рычаг проточной кюветы мигает зеленым, идет подача вакуума. Если рычаг не зеленый, см. раздел [Возможные проблемы при настройке цикла на стр. 37](#).
- 5 Подождите примерно пять секунд и медленно переведите рычаг проточной кюветы в положение 2.
Если рычаг проточной кюветы зеленый, это значит, что коллекторы в правильном положении и проточная кювета готова к работе.
- 6 Убедитесь в том, что в поле **Vacuum Engaged** (Подача вакуума) установлена отметка, и выберите **Next** (Далее).

Подтверждение надлежащего потока

При проверке на надлежащий поток подтверждают правильную установку проточной кюветы и прокладок и подключение коллектора.

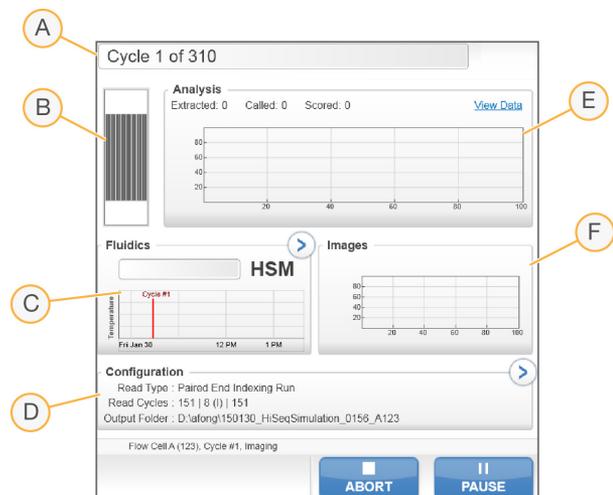
- 1 Выберите положение **5** из выпадающего списка.
- 2 Введите следующие значения по умолчанию.
 - ▶ Объем: **250**
 - ▶ Скорость аспирации: **250**
 - ▶ Скорость разлива: **2000**
- 3 Выберите опцию **Pump** (Насос).
- 4 Осмотрите проточную кювету на предмет пузырьков, проходящих через дорожки, или утечек вблизи коллекторов.
- 5 При большом количестве пузырьков выполните следующие действия.
 - a Убедитесь в отсутствии закупорок в прокладках коллектора.
 - b Повторите процесс в положении 6 таким образом, чтобы не опустошить положение 5.

- c Снизьте скорость аспирации до 100.
 - d Закачайте еще 250 мкл в проточную кювету.
- 6 Нажмите **Next** (Далее).
 - 7 Убедитесь, что рычаг проточной кюветы зеленый, и закройте дверцу отсека проточной кюветы.
 - 8 Удостоверьтесь в том, что опции **Vacuum Engaged** (Вакуум подключен) и **Door Closed** (Дверца закрыта) отмечены, а затем нажмите на клавишу **Next** (Далее).
 - 9 Выберите **Start** (Пуск) и запустите цикл секвенирования.

Мониторинг цикла

- 1 Следите за выполнением цикла на экране Run overview (Обзор цикла).

Рисунок 11. Экран обзора цикла



- A **Индикатор хода выполнения** — отслеживание числа выполненных циклов.
- B **Изображение проточной кюветы** — отслеживание изображенных дорожек.
- C **График проточной системы** — открытие раздела струйной автоматки для мониторинга этапов химической реакции.
- D **Конфигурация цикла** — просмотр параметров текущего цикла.
- E **График анализа** — отслеживание показателей качества по циклам.
- F **График изображений** — отслеживание интенсивности по циклам. Для каждой сканированной полосы отображается одно миниатюрное изображение. Никакие другие изображения в программном интерфейсе не появляются.

Отчет о первом нуклеотиде

Если выбрана опция подтверждения первого нуклеотида в ходе настройки цикла секвенирования, после окончания визуализации второго цикла автоматически откроется диалоговое окно подтверждения первого нуклеотида. На этом этапе цикл приостанавливается.

- 1 Проверьте отчет о первом нуклеотиде в диалоговом окне подтверждения.
- 2 Если результаты удовлетворительные, выберите опцию **Continue** (Продолжить).

Просмотр числовых показателей цикла

При наличии числовых показателей цикла программа просмотра анализов секвенирования Sequencing Analysis Viewer (SAV) откроется автоматически и отобразит их. Показатели представлены в виде схем, графиков и таблиц. Для получения подробной информации см. *Руководство пользователя программы просмотра анализа секвенирования (документ № 15020619)*.

- 1 Чтобы посмотреть обновленные числовые показатели во время цикла, нажмите **Refresh** (Обновить).

Выгрузка реактивов

- 1 Когда цикл завершен, откройте дверцу отсека для реактивов.
- 2 Поднимите сипперы соответствующего штатива для реактивов SBS и штатива для СПКФ, как указано ниже.
 - a Потяните рукоятку сипперов наружу.
 - b Поднимите рукоятку сипперов, вытягивая ее наружу.
 - c Отпустите сипперную рукоятку, чтобы она вошла в отверстие в верхнем конце желоба. Убедитесь в том, что сипперная рукоятка надежно установлена в отверстии.
- 3 Выдвиньте каждый штатив с реактивами из отсека для реактивов, используя рукоятки штативов.
- 4 Извлеките каждую бутылку из каждого штатива для реактивов.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

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

Выполнение водной промывки

Водная промывка требуется после каждого цикла секвенирования, чтобы промыть систему и проверить струйную автоматику. Профилактическая промывка является альтернативой послецикловой водной промывке. Инструкции см. в разделе **Выполнение профилактической промывки на стр. 30**. Инструкции см. в Руководстве по работе с системой HiSeq 4000 (документ № 15066496).

Если прибор находился в холостом режиме в течение одного дня или более, перед новым циклом секвенирования необходимо выполнить его водную промывку.

- 1 На экране приветствия выберите опции **Wash | Water** (Промывка | Водой).
- 2 Выберите **Yes** (Да) для промывки положений реактивов для секвенирования парных концевых фрагментов, а затем выберите опцию **Next** (Далее).

- 3 Налейте в прибор воду лабораторного класса.
 - a Налейте в восемь флаконов SBS по 250 мл воды лабораторного класса.
 - b Налейте в 10 пробирок ПКФ по 12 мл воды лабораторного класса.



ПРИМЕЧАНИЕ

Как правило, бутылки и пробирки для промывания необходимо менять каждые шесть месяцев, а воду — приблизительно каждую неделю.

- 4 Убедитесь, что использованная проточная кювета загружена. При необходимости загрузите использованную проточную кювету.
- 5 Нажмите **Next** (Далее).
- 6 Выполните проверку струйной автоматки.
 - a Выберите раствор 2 из выпадающего списка.
 - b Примите значения насоса по умолчанию.
 - c Выберите опцию **Pump** (Насос).
 - d Осмотрите проточную кювету на предмет пузырьков, проходящих через дорожки, и утечек вблизи коллекторов.
- 7 Извлеките трубки для отходов соответствующей проточной кюветы из контейнера для отходов.
- 8 Соедините трубки для отходов пленкой Parafilm. Равномерно распределите все концы.
- 9 Поместите соединенные концы трубок в бутылку емкостью 250 мл.
- 10 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы начать водную промывку.

Положения	Приблизительное время цикла
Восемь мест для реактивов для SBS	20 минут
Восемь мест для реактивов для SBS и десять мест для реактивов для секвенирования ПКФ.	60 минут

- 11 После завершения промывки измерьте задаваемый объем.

Положения	Общий задаваемый объем	Задаваемый объем на дорожку
Восемь мест для реактивов для SBS	32 мл	4 мл
Восемь мест для реактивов для SBS и десять мест для реактивов для секвенирования ПКФ.	72 мл	9 мл

- 12 Разверните трубки для отходов и подключите их к бутылки для отходов.

Быстрое форматирование диска выходных данных и временного диска

По завершении передачи данных выполните быстрое форматирование диска выходных данных (O:\) и временного диска (S:\). Быстрое форматирование очищает диск для последующего цикла без удаления важных для системы или обслуживания прибора файлов.

Для запуска цикла требуется не менее 2 ТБ свободного места для длины цикла 2 x 151. Если во время выполнения цикла свободное пространство на дисках сокращается до небезопасного уровня, программное обеспечение приостанавливает выполнение цикла и переводит проточную кювету в безопасное состояние. Когда пространство на диске освободилось, выполнение цикла секвенирования возобновляется автоматически.



ПРИМЕЧАНИЕ

Журналы обслуживания прибора хранятся на диске C:\. Таким образом, быстрое форматирование дисков O:\ и S:\ при выполнении промывки прибора является безопасным.

- 1 В Windows зайдите в «Компьютер» для просмотра списка дисков на компьютере.
- 2 Нажмите правой кнопкой на диск O:\ и выберите **Format** (Форматировать).
- 3 В диалоговом окне форматирования отметьте **Quick Format** (Быстрое форматирование).
- 4 Нажмите **Start** (Пуск).
- 5 Повторите действия 1–4, чтобы очистить диск S:\.

Глава 5. Техническое обслуживание

Введение	30
Выполнение профилактической промывки	30
Работа прибора в холостом режиме	35
Выключение прибора	36

Введение

Процедуры технического обслуживания обеспечивают неизменность эксплуатационных характеристик прибора.

- ▶ Выключайте питание или переводите прибор в холостой режим, если он не используется.
- ▶ В дополнение к водной промывке, выполняемой в конце цикла, проводите регулярные профилактические промывки с целью технического обслуживания системы струйной автоматике.
Регулярная промывка обеспечивает продолжительную работу прибора за счет промывания системы струйной автоматике и предотвращения накопления солей и перекрестного загрязнения реактивов.

Профилактическое техническое обслуживание

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

Выполнение профилактической промывки

Проводите профилактическую промывку при появлении запроса программного обеспечения каждые 10 дней или (по выбору) после цикла. Профилактическая промывка занимает около 90 минут и проводится с использованием одного из двух рабочих процессов, в зависимости от доступности ProClin 300.

- ▶ **Промывка раствором, состоящим из Tween 20 и ProClin 300** — промывка системы приготовленным пользователем раствором, состоящим из Tween 20 и ProClin 300. См. пункт [Профилактическая промывка раствором, состоящим из Tween 20 и ProClin 300 на стр. 31](#).
- ▶ **Промывка раствором Tween 20** — промывка системы приготовленным пользователем раствором Tween 20; может потребовать промывки водой. См. пункт [Профилактическая промывка раствором Tween 20 на стр. 33](#).

Если перед профилактической промывкой появляется экран Load Gasket (Загрузите прокладку), необходимо заменить прокладки в переднем и заднем коллекторах, прежде чем начинать промывку.

Профилактическая промывка раствором, состоящим из Tween 20 и ProClin 300

Приготовление раствора для профилактической промывки

Приготовьте 5 литров раствора для профилактической промывки для применения на одном приборе. Раствор можно хранить до 30 дней при комнатной температуре и использовать в течение этого периода до трех раз.

Промывочный раствор нужно утилизировать в соответствии с государственными стандартами безопасности, принятыми в вашей стране.

- 1 Соедините следующие объемы, чтобы разбавить Tween 20 (воду добавляйте первой):
 - ▶ вода лабораторного класса (225 мл);
 - ▶ Tween 20 (25 мл).Вы получите раствор Tween 20 концентрацией примерно 10 %.
- 2 Положите магнитную мешалку в стеклянную бутылку объемом не менее 6 литров.
- 3 Влейте следующие объемы в бутылку (воду добавляйте первой):
 - ▶ вода лабораторного класса (750 мл);
 - ▶ 10%-ный Tween 20 (250 мл);
 - ▶ ProClin 300 (1,5 мл).В результате вы получите раствор, содержащий приблизительно 2,5 % Tween 20 и 0,15 % ProClin 300.
- 4 Тщательно перемешайте с помощью магнитной мешалки.
- 5 Прибавьте 4 литра воды лабораторного класса.
В результате вы получите раствор, содержащий приблизительно 0,5 % Tween 20 и 0,03 % ProClin 300.
- 6 Перемешивайте до тех пор, пока вся смесь не будет тщательно перемешана.
- 7 Отставьте раствор в сторону; держите его в закрытом контейнере при комнатной температуре.

Промывка раствором, состоящим из Tween 20 и ProClin 300

- 1 На экране приветствия выберите опции **Wash | Maintenance** (Промывка | Профилактическая).
- 2 Если вы используете свежий раствор для профилактической промывки, залейте раствор в прибор, как описано ниже.
 - a Заполните восемь флаконов SBS 250 мл свежего промывочного раствора.
 - b Заполните 10 пробирок ПКФ 12 мл свежего промывочного раствора.
 - c Вставьте бутылки и пробирки в соответствующие положения на штативе для реактивов. Сохраняйте это положение при каждой последующей промывке, чтобы предупредить перекрестное загрязнение реактивами, оставшимися на сипперах.
- 3 Если вы сохранили раствор для профилактической промывки от предыдущего цикла, залейте раствор в прибор, как описано ниже.
 - a Пополните запас сохраненного раствора и перемешайте его. Пополнять раствор разрешается не более двух раз после первоначального использования.

- b Вставьте бутылки и трубки в соответствующие положения на штативе с реактивами.

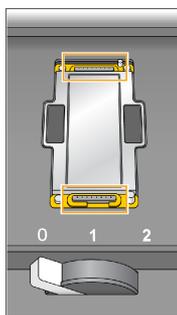


ПРИМЕЧАНИЕ

Как правило, достаточно менять бутылки и пробирки для промывания ежемесячно.

- 4 Слейте отходы из бутылки.
- 5 Нажмите **Next** (Далее).
- 6 Снимите проточную кювету с площадки проточной кюветы и поместите ее отдельно.
- 7 Наденьте новую пару неопудренных латексных перчаток.
- 8 Слегка надавите на одну сторону передней прокладки так, чтобы поднялась другая сторона. Захватите и удалите прокладку пинцетом. Повторите процедуру с задней прокладкой.

Рисунок 12. Удалите использованные прокладки коллектора



- 9 Поместите по новой прокладке в каждую щель с переднего и заднего конца держателя проточной кюветы. Слегка надавите, чтобы зафиксировать.
- 10 Установите проточную кювету, снятую для установки новых прокладок, на место.
- 11 Убедитесь в том, что в поле **Vacuum Engaged** (Подача вакуума) установлена отметка, и выберите **Next** (Далее).
- 12 Выполните проверку струйной системы с использованием заданных по умолчанию параметров насосов.
 - a Выберите раствор 2 из выпадающего списка.
 - b Выберите опцию **Pump** (Насос).
 - c Осмотрите проточную кювету на предмет пузырьков, проходящих через дорожки, и утечек вблизи коллекторов.
 - d При наличии постоянного потока пузырьков замените прокладку и повторите проверку струйной автоматике.
- 13 Извлеките трубки для отходов соответствующей проточной кюветы из контейнера для отходов.
- 14 Соедините восемь трубок для отходов пленкой Parafilm. Распределите концы трубок равномерно.
- 15 Поместите соединенные концы трубок в бутылку объемом 250 мл.
- 16 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы начать промывку.
- 17 По окончании промывки нажмите на кнопку **Return to Start** (Вернуться к началу).
- 18 Измерьте задаваемый объем.

Положения	Фактический объем
Восемь мест для реактивов для SBS	74 мл
10 положений для реактивов для секвенирования ПКФ	52 мл
Все положения	15,75 мл на дорожку



ПРИМЕЧАНИЕ

Все бутылки и трубки следует заполнять полностью, чтобы обеспечить промывку сипперов. Тем не менее задаваемый объем различается для каждого положения, поэтому по завершении промывки бутылки и трубки содержат разный объем.

19 Разверните трубки для отходов и подключите их к контейнеру для отходов.

Профилактическая промывка раствором Tween 20

Приготовление раствора для профилактической промывки

Для профилактической промывки раствором Tween 20 всегда следует готовить свежий промывочный раствор. Приготовьте 5 литров раствора для профилактической промывки. Этого объема достаточно для промывки одного прибора с обеих сторон.

Промывочный раствор необходимо утилизировать в соответствии с государственными стандартами безопасности, принятыми в вашей стране.

- 1 Соедините следующие объемы, чтобы разбавить Tween 20 (воду добавляйте первой):
 - ▶ вода лабораторного класса (225 мл);
 - ▶ Tween 20 (25 мл).

Вы получите раствор Tween 20 концентрацией примерно 10 %.

- 2 Положите магнитную мешалку в стеклянную бутылку объемом не менее 6 литров.

- 3 Влейте следующие объемы в бутылку (воду добавляйте первой):

- ▶ вода лабораторного класса (750 мл);
- ▶ 10%-ный Tween 20 (250 мл).

В результате вы получите раствор, содержащий приблизительно 2,5 % Tween 20.

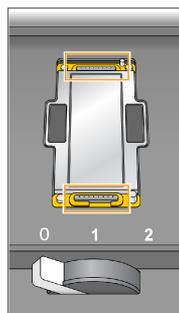
- 4 Тщательно перемешайте с помощью магнитной мешалки.
- 5 Добавьте 4 литра воды лабораторного класса, чтобы получить раствор, содержащий приблизительно 0,5 % Tween 20.
- 6 Перемешивайте до тех пор, пока вся смесь не будет тщательно перемешана.
- 7 Немедленно приступайте к настройке промывки.

Промывка раствором Tween 20

- 1 На экране приветствия выберите опции **Wash | Maintenance** (Промывка | Профилактическая).
- 2 Залейте в прибор свежий раствор для профилактической промывки следующим образом.
 - a Заполните восемь флаконов SBS 250 мл свежего промывочного раствора.
 - b Заполните 10 пробирок ПКФ 12 мл свежего промывочного раствора.
- 3 Слейте отходы из бутылки.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

- 5 Снимите проточную кювету с площадки проточной кюветы и поместите ее отдельно.
- 6 Наденьте новую пару неопудренных латексных перчаток.
- 7 Слегка надавите на одну сторону передней прокладки так, чтобы поднялась другая сторона. Захватите и удалите прокладку пинцетом. Повторите процедуру с задней прокладкой.

Рисунок 13. Удалите использованные прокладки коллектора



- 8 Поместите по новой прокладке в каждую щель с переднего и заднего конца держателя проточной кюветы. Слегка надавите, чтобы зафиксировать.
- 9 Установите проточную кювету, снятую для установки новых прокладок, на место.
- 10 Убедитесь в том, что в поле **Vacuum Engaged** (Подача вакуума) установлена отметка, и выберите **Next** (Далее).
- 11 Выполните проверку струйной системы с использованием заданных по умолчанию параметров насосов.
 - a Выберите раствор 2 из выпадающего списка.
 - b Выберите опцию **Pump** (Насос).
 - c Осмотрите проточную кювету на предмет пузырьков, проходящих через дорожки, и утечек вблизи коллекторов.
 - d При наличии постоянного потока пузырьков замените прокладку и повторите проверку струйной автоматике.
- 12 Извлеките трубки для отходов соответствующей проточной кюветы из контейнера для отходов.
- 13 Соедините восемь трубок для отходов пленкой Parafilm. Распределите концы трубок равномерно.
- 14 Поместите соединенные концы трубок в бутылку объемом 250 мл.
- 15 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы начать промывку.
- 16 По окончании промывки нажмите на кнопку **Return to Start** (Вернуться к началу).
- 17 Измерьте задаваемый объем.

Положения	Фактический объем
Восемь мест для реактивов для SBS	74 мл
10 положений для реактивов для секвенирования ПКФ	52 мл
Все положения	15,75 мл на дорожку

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Все бутылки и трубки следует заполнять полностью, чтобы обеспечить промывку сипперов. Тем не менее задаваемый объем различается для каждого положения, поэтому по завершении промывки бутылки и трубки содержат разный объем.

18 Разверните трубки для отходов и подключите их к контейнеру для отходов.

Водная промывка

Если прибор будет находиться в холостом режиме в течение более пяти дней после промывки раствором Tween 20, выполните водную промывку. В результате водной промывки раствор Tween 20 вымывается из системы струйной автоматики.

- 1 На экране приветствия выберите опции **Wash | Water Wash** (Промывка | Водная промывка).
- 2 Налейте в прибор воду лабораторного класса следующим образом:
 - a Залейте в восемь флаконов SBS не менее 20 мл воды лабораторного класса.
 - b Налейте в 10 пробирок ПКФ по 10 мл воды лабораторного класса.

**ОСТОРОЖНО!**

Не используйте повторно воду, бутылки или трубки, использованные для промывки раствором Tween 20. Вода может быть загрязнена реактивами, содержащимися в сипперах.

- 3 Загрузите бутылки и пробирки в соответствующие штативы для реактивов прибора.
- 4 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы начать промывку.
- 5 После завершения промывки измерьте задаваемый объем.

Положения	Фактический объем
Восемь мест для реактивов для SBS	32 мл
Восемь мест для реактивов для SBS и десять мест для реактивов для секвенирования ПКФ.	72 мл

6 Разверните трубки для отходов и подключите их к контейнеру для отходов.

Работа прибора в холостом режиме

При подготовке прибора к работе в холостом режиме сроком до 10 дней необходимо соблюдать приведенные ниже инструкции. Если предполагаемая продолжительность простоя составит более 10 дней, вместо использования холостого режима отключите прибор полностью.

- 1 Произведите профилактическую промывку системы.
- 2 Оставьте проточную кювету на площадке проточной кюветы; при этом рычаг проточной кюветы должен оставаться в положении 2. Оставьте коллекторы в поднятом положении.
- 3 Залейте 10 мл воды лабораторного класса в каждое положение в соответствующих штативах для реактивов, затем опустите сипперы.
- 4 Прежде чем запустить прибор, выполните водную промывку.

Выключение прибора

Для безопасной подготовки струйной автоматики и останова системы необходимо следовать изложенной ниже процедуре. Выключать прибор следует только в том случае, если его не планируется использовать в течение следующих 10 дней или более. Если вы не планируете использовать прибор в течение следующих 10 дней, переведите его в холостой режим.

- 1 Произведите профилактическую промывку системы.
- 2 Снимите проточную кювету с площадки проточной кюветы.
- 3 Протрите поверхность держателя проточной кюветы спиртовой салфеткой или безворсовой тканью, смоченной этанолом или изопропанолом.



ОСТОРОЖНО!

Не допускайте, чтобы спирт попал в вакуумные отверстия или на участки вокруг коллекторов. При необходимости используйте низковорсные лабораторные салфетки для протирки стола насухо.

- 4 Залейте 10 мл воды лабораторного класса в каждое положение в соответствующих штативах для реактивов, затем опустите сипперы.
- 5 Выключите питание прибора.
- 6 Для перезапуска прибора сделайте следующее.
 - a Залейте воду во все положения для реактивов.
 - b Включите прибор.
 - c Выполните водную промывку.

Приложение А. Поиск и устранение неисправностей

Файл журнала	37
Возможные проблемы при настройке цикла	37
Выполнение проверки струйной автоматике	38
Приостановка или окончание цикла HiSeq 4000	39
Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В	40
Возможность проведения регбридизации праймера для считывания 1	40

Файл журнала

В файле журнала перечислены все ошибки, возникавшие в управляющем программном обеспечении. Файл журнала можно использовать для поиска и устранения неполадок.

Для доступа к файлу журнала выберите **Menu | Tools | Show Log** (Меню | Инструменты | Показать журнал) на экране приветствия.

Возможные проблемы при настройке цикла

Проблема	Возможная причина	Действие
Программное обеспечение не инициализируется.	Программное обеспечение не смогло инициализировать внутренние аппаратные устройства.	Закройте окно с сообщением об ошибке и перезапустите программное обеспечение прибора. Если проблема не исчезнет, перезагрузите компьютер прибора. Перед тем как перезагрузить компьютер, выключите прибор, чтобы обеспечить правильное распознавание диска DoNotEject. Если проблема не исчезнет после перезагрузки компьютера прибора, выключите прибор, подождите 60 секунд, а затем перезапустите прибор.
Рычаг проточной кюветы оранжевого цвета.	Проточная кювета установлена неправильно. Вакуумное уплотнение не сработало. Коллектор не поднялся.	Выньте проточную кювету и повторите все этапы чистки. Убедитесь, что уплотнительные прокладки на месте и правильно установлены. Еще раз загрузите проточную кювету. Если предыдущие действия не принесут результата, попробуйте заменить прокладки, а затем заново загрузите проточную кювету.
Рычаг проточной кюветы мигает оранжевым.	Вакуум создается, но он недостаточен.	Выньте проточную кювету и повторите все этапы чистки. Убедитесь, что уплотнительные прокладки на месте и правильно установлены. Еще раз загрузите проточную кювету. Если предыдущие действия не принесут результата, попробуйте заменить прокладки, а затем заново загрузите проточную кювету.
Рычаг проточной кюветы мигает зеленым.	Хорошее давление вакуума.	Переведите рычаг проточной кюветы в положение 2.

Проблема	Возможная причина	Действие
Плохо подается жидкость.	В системе могут присутствовать пузырьки.	Переставьте проточную кювету и убедитесь, что отверстия направлены вниз . Осмотрите прокладки — нет ли вокруг них белого налета. Если налет есть, замените прокладки. Прокладки нужно менять перед каждой профилактической промывкой прибора. Убедитесь, что модули сипперных трубок полностью опущены и что каждый сиппер контактирует с реактивами.
Потеря регистрации при считывании 1 характеризуется отсутствием интенсивностей и числом кластеров, проходящих фильтр, равным 0 % в доле проточной кюветы. Процент кластеров, проходящих фильтр, резко падает с плитки 1 (на входе) по плитку 28 (на выходе).	Проточная кювета установлена неправильно.	Если в ходе цикла обработка парных концевых фрагментов не завершилась, остановите цикл и выполните регидридизацию проточной кюветы. Перед возобновлением цикла необходимо проверить правильность установки проточной кюветы. Для этого обратитесь к разделу Загрузка проточной кюветы секвенирования на стр. 24 . Если в ходе цикла обработка парных концевых фрагментов завершилась, настройте новый цикл с новой проточной кюветой.

Выполнение проверки струйной автоматике

Выполняйте проверку струйной автоматике во время установки прибора и при поиске и устранении неисправностей в соответствующей системе.

- 1 Выберите опцию **Check** (Проверить) на экране приветствия.
- 2 Отсканируйте или введите идентификационный номер промывной проточной кюветы (номер на штрихкоде), нанесенный на заливочную проточную кювету. Убедитесь в применении на этом этапе **использованной** проточной кюветы.
- 3 Загрузите в прибор использованную проточную кювету.
- 4 Загрузите восемь бутылей SBS с раствором PW1 или водой лабораторного класса в соответствующий штатив для реактивов SBS.
- 5 Выберите раствор 2 из выпадающего списка.
- 6 Введите следующие значения, принятые по умолчанию.
 - ▶ Объем: **250**
 - ▶ Скорость аспирации: **250**
 - ▶ Скорость разлива: **2000**
- 7 Выберите опцию **Pump** (Насос).
- 8 Осмотрите проточную кювету на предмет пузырьков, проходящих через дорожки, и утечек вблизи коллекторов.
- 9 При наличии чрезмерного количества пузырьков выполните следующие действия.
 - a Убедитесь в отсутствии закупорок в прокладках коллектора.
 - b Снизьте скорость аспирации до 100.
 - c Закачайте еще 250 мкл воды в проточную кювету.

Приостановка или окончание цикла HiSeq 4000

Окончание цикла не дает возможности сохранить данные или возобновить цикл. Приостановка цикла может потребоваться для проверки составляющих цикла или настройки цикла для смежной проточной кюветы.

Приостановка цикла

Приостановите выполнение цикла для того, чтобы по мере надобности проверить компоненты цикла, такие как объемы реактивов. В ходе обычной работы приостановка цикла не требуется.

Программное обеспечение RTA2 автоматически возобновляет работу после того, как возобновится приостановленный ранее цикл, поэтому цикл возобновляется без потери данных. Дополнительную информацию см. в разделе [Анализ в реальном времени на стр. 41](#).

- 1 На экране Run Overview (Обзор цикла) выберите опцию **Pause | Normal Pause** (Приостановка | Нормальная приостановка).
- 2 Выберите опцию **Yes** (Да) для подтверждения команды. Программа завершит текущую команду химической реакции или визуализации и переведет проточную кювету в безопасное состояние.
- 3 Выберите опцию **Resume** (Возобновить), чтобы возобновить цикл.

Замена реактивов во время цикла

Если цикл секвенирования начался с неполным комплектом реактивов, для приостановки цикла и пополнения запаса реактивов можно воспользоваться функцией Change Reagents (Замена реактивов).



ПРИМЕЧАНИЕ

Заливка не требуется.

- 1 На экране обзора цикла выберите **Pause** (Пауза), чтобы открыть меню приостановки.
- 2 Выберите опцию **Change Reagents** (Заменить реактивы).
- 3 Выберите опцию **Yes** (Да) для приостановки команды. Программа завершит текущую команду химической реакции или визуализации, переведет проточную кювету в безопасное состояние и откроет экран реактивов.
- 4 Введите значения следующих параметров.
 - ▶ Идентификационный номер комплекта реактивов для новых реактивов.
 - ▶ Количество циклов, в течение которых предполагается использовать данные реактивы.
- 5 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы продолжить загрузку реактивов.

Окончание цикла

Если остановить работу RTA2, обработка образца не возобновляется и данные цикла не сохраняются. Следовательно, нельзя возобновить цикл, если он был остановлен.



ОСТОРОЖНО!

Если прибор HiSeq 4000 завершает цикл, это **окончательно**.

- 1 Чтобы завершить цикл, выберите команду **Abort** (Прервать). После чего подтвердите или отмените команду.
- 2 После подтверждения команды открывается экран приветствия.
- 3 Переходите к послецикловым процедурам.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если цикл остановится во время 1 считывания, сохраняется возможность выполнения регибридизации праймера с помощью cBot. После регибридизации праймера запустите на устройстве HiSeq 4000 новый цикл и секвенируйте проточную кювету.

Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В

- 1 Выберите в меню опцию **Pause | Normal Pause** (Приостановка | Обычная приостановка).
- 2 Дождитесь, пока программное обеспечение завершит текущий этап химической реакции или визуализации.
Система автоматически перейдет в безопасное состояние.
- 3 Подтвердите, что выполнение цикла приостановлено безопасным образом.
Если цикл приостановлен, появится кнопка **Resume** (Возобновить).
- 4 Настройте новый цикл.
- 5 Загрузив новую проточную кювету для нового цикла, закройте дверцу отсека.
- 6 Нажмите **Start** (Пуск), чтобы запустить новый цикл секвенирования.
- 7 Нажмите **Resume** (Возобновить) для соседней проточной кюветы, чтобы возобновить приостановленный цикл.
Программное обеспечение будет автоматически управлять процессами химической реакции и визуализации для обеих проточных кювет.

Возможность проведения регибридизации праймера для считывания 1

Если показатели считывания 1 указывают на малое число кластеров, низкие значения интенсивности или другие проблемы, вы можете выполнить повторную гибридизацию праймера для считывания 1, чтобы спасти поврежденные данные проточной кюветы. Регибридизация праймера для считывания 1 выполняется на устройстве cBot и не повредит кластерам на проточной кювете.

Для проведения гибридизации праймера 1 считывания на структурированной проточной кювете прибора HiSeq 4000 необходимы следующие расходные материалы Illumina.

- ▶ Комплект для повторной гибридизации HiSeq 3000/4000 cBot Multi-Primer (№ по каталогу: GD-305-2001)
- ▶ Коллектор HiSeq cBot (№ по каталогу: SY-401-2015).

Для получения более подробной информации см. документ *Регибридизация праймера считывания 1 в проточной кювете HiSeq 3000/4000 (документ № 15058794)*.

Приложение В. Анализ в реальном времени

Обзор анализа в реальном времени (RTA)	41
Рабочий процесс анализа в реальном времени	43

Обзор анализа в реальном времени (RTA)

В системе HiSeq 4000 используется программное обеспечение для проведения анализа в реальном времени (RTA) в модификации RTA2. Программное обеспечение RTA2 работает на компьютере прибора и извлекает значения интенсивности из изображений, выполняет распознавание оснований и присваивает каждому распознаванию баллы качества. RTA2 и управляющее программное обеспечение обмениваются информацией через веб-интерфейс HTTP и через общие файлы памяти. Если прекратить работу программы RTA2, обработка не восстановится и данные цикла не будут сохранены.



ПРИМЕЧАНИЕ

Расчеты по выполнению демультимплексирования не выполняются, поэтому вкладка Index (Индекс) в службе просмотра результатов секвенирования (SAV) не заполняется.

Файлы входных данных

Для работы программы RTA2 необходимы следующие файлы входных данных.

- ▶ Изображения плиток, хранящиеся в локальной памяти системы.
- ▶ Файл RunInfo.xml, автоматически создаваемый управляющим программным обеспечением в начале цикла секвенирования. Из этого файла RTA2 считывает название цикла секвенирования, количество циклов, выполняется ли индексирование прочтений, а также число плиток на проточной кювете.
- ▶ RTA.exe.config, файл конфигурации программного обеспечения в формате XML.

RTA2 получает команды от управляющего программного обеспечения, в том числе информацию о месте расположения RunInfo.xml и о том, указано ли иное расположение папки выходных данных.

Файлы выходных данных

Изображения по каждому каналу переносятся в память для RTA2 по плиткам. Из этих изображений средствами RTA2 создаются первичные выводимые данные, представляющие собой файлы распознавания оснований с оценкой качества и файлы фильтра. Прочие файлы способствуют созданию первичных выходных файлов.

- ▶ **Файлы распознавания оснований.** Каждая проанализированная плитка включается в объединенные файлы распознавания оснований (*.bcl) для каждой плитки и каждого цикла. Файл распознанных оснований содержит информацию о распознанном основании и соответствующей оценке качества распознавания.
- ▶ **Файлы фильтра.** Каждая плитка генерирует информацию фильтра, собираемую в течение всего цикла в объединенный файл фильтра (*.filter) для каждой плитки. Файлы фильтра определяют кластеры, прошедшие через фильтр.
- ▶ **Файлы расположения кластера** — один файл расположения кластера (s.locs) содержит координаты X, Y для каждого кластера в проточной кювете.

Первичные выходные файлы используются для последующего анализа данных. Для демультимплексирования и преобразования FASTQ используйте программное обеспечение преобразования данных bcl2fastq. Чтобы конвертировать данные из системы HiSeq 4000, воспользуйтесь программой bcl2fastqv2.16 или более поздней версией. Чтобы узнать текущую версию программного обеспечения и получить информацию о скачивании, зайдите на страницу поддержки системы HiSeq 4000 на веб-сайте компании Illumina.

RTA2 в режиме реального времени предоставляет числовые показатели для оценки качества цикла, они сохраняются как файлы InterOp. Файлы InterOp представляют собой двоичные файлы, содержащие числовые показатели уровня плитки, цикла и считывания. Они необходимы для просмотра числовых показателей в приложении просмотра анализов секвенирования Sequencing Analysis Viewer. Для просмотра числовых показателей, сгенерированных RTA2, используйте SAV версии 1.10.2 или более поздней.

Подробную информацию о каждом выходном файле можно найти в разделе [Выходные файлы секвенирования на стр. 47](#).

Обработка ошибок

Программное обеспечение RTA2 создает файлы журнала и записывает их в папку RTALogs. Ошибки регистрируются в файле ошибок в формате *.tsv.

В конце обработки в окончательное место расположения выходных данных переносятся следующие файлы журнала и ошибок.

- ▶ *GlobalLog*.tsv содержит сводку важных событий в цикле.
- ▶ *LaneNLog*.tsv содержит события обработки для каждой дорожки.
- ▶ *Error*.tsv содержит список ошибок, возникших в ходе цикла.
- ▶ *WarningLog*.tsv содержит предупреждения, выданные в ходе цикла.

Передача данных

На протяжении цикла программное обеспечение RTA2 требует передачи данных из службы копирования циклов — программного обеспечения, которое осуществляет передачу данных в указанную выходную папку. При использовании BaseSpace Sequence Hub средство BaseSpace Broker управляет передачей данных на BaseSpace Sequence Hub. Если сетевое соединение прервется, RTA2 продолжит обработку данных и будет записывать данные на локальном компьютере. Передача данных возобновляется после восстановления соединения.



ПРИМЕЧАНИЕ

Убедитесь, что сетевое подключение соответствует минимальным требованиям для передачи данных о цикле на BaseSpace Sequence Hub. Для получения более подробной информации см. руководство по подготовке рабочего места.

После того как обработка завершится, программа RTA2 создает маркерный файл, который называется RTAComplete.txt. Передача данных завершается после того, как будет создан этот файл. Индикатор датчика в нижней части экрана показывает состояние передачи. Подробнее об этом см. в разделе [Индикаторы операций и датчиков на стр. 5](#).

Рабочий процесс анализа в реальном времени

Создание шаблона	Разметка расположения кластеров.
↓	
Регистрация и определение интенсивности	Запись расположения каждого кластера на структурированной проточной кювете и определение значения интенсивности для каждого кластера.
↓	
Корректировка цветовой матрицы	Исправление взаимных помех между каналами.
↓	
Коррекция фактического фазирования	Коррекция влияний фазирования и предварительного фазирования.
↓	
Распознавание оснований	Определение распознавания основания в каждом кластере.
↓	
Оценка качества	Назначение оценки качества каждому распознаванию основания.

Создание шаблона

При создании шаблона положение каждого кластера задается координатами X и Y. Шаблон используется как эталон на последующих этапах регистрации и определения интенсивности.

Из-за матрицы на структурированной проточной кювете положения кластеров предопределяются на основании количества строк и столбцов, а также расстояния между нанолунками.

Дополнительную информацию см. в разделе [Структурированная проточная кювета на стр. 8](#).

Положения кластеров записываются в объединенный файл расположения кластеров (*.locs) для всего цикла.

Регистрация и определение интенсивности

Регистрация и определение интенсивности начинаются после создания шаблона размещения кластеров.

- ▶ Регистрация переводит расположение кластеров на шаблоне в расположение на изображении по каждому из четырех цветочных каналов.
- ▶ Определение интенсивности позволяет измерить значение интенсивности для каждого кластера в шаблоне для данного изображения.

Если происходит ошибка регистрации для любого изображения в цикле, для этой плитки в данном цикле распознавание оснований не производится. Воспользуйтесь программой SAV, чтобы просмотреть миниатюрные изображения и найти изображения, регистрация которых завершилась неудачей.

Корректировка цветовой матрицы

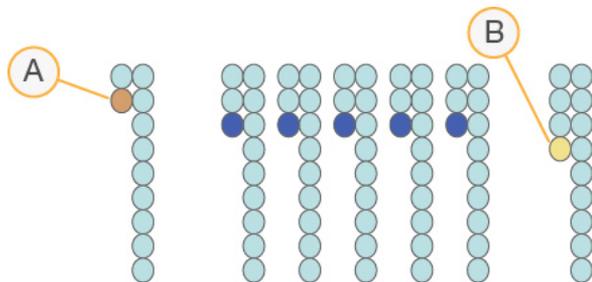
По окончании регистрации и определения интенсивности программа RTA2 исправляет взаимные помехи между каналами. Взаимные помехи возникают, если кластер демонстрирует определенную интенсивность в канале основания C и в то же время, например, в канале основания A. С помощью цветовой матрицы 4 x 4 программа RTA2 создает значения интенсивности с поправкой на матрицу и с сокращением или устранением взаимных помех, а также уравнивает различия в общей интенсивности между цветовыми каналами.

Коррекция фактического фазирования

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

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

Рисунок 14. Фазирование и предварительное фазирование



A Считывание с основанием в случае фазирования

B Считывание с основанием в случае предварительного фазирования

Программное обеспечение RTA2 корректирует влияние фазирования и предварительного фазирования, используя алгоритм коррекции фактического фазирования, который позволяет добиться максимального качества данных по каждому циклу во время секвенирования.

Распознавание оснований

После коррекции исходных интенсивностей на предмет взаимных помех, фазирования и предварительного фазирования канал с самой яркой интенсивностью определяет распознанное основание для данного кластера в данном цикле. Распознавание оснований на приборе HiSeq 4000 с использованием RTA2 начинается после цикла 3.

Распознавание оснований определяет основание (A, C, G или T) для каждого кластера данной плитки в указанном цикле. Распознанные основания сохраняются в файлы распознанных оснований (*.bcl). Это двоичные файлы, содержащие 1 байт для каждого основания и оценки качества. Файлы распознанных оснований содержат распознанные основания и баллы качества распознавания основания. Чтобы попасть на этап распознавания основания, кластеры должны сначала пройти фильтр чистоты. Кластеры, которые не проходят через фильтр или не могут быть распознаны, поскольку находятся за пределами изображения или потому что не произошла регистрация изображения, определяют в категорию нераспознанных. Нераспознанные основания обозначают (N).

Кластеры, проходящие фильтр

Во время первых 25 циклов Read 1 (Считывание 1) фильтр чистоты убирает кластеры низкого качества из результатов анализа. Кластеры проходят фильтр в том случае, если не более одного распознавания оснований в первых 25 циклах имеет значение чистоты ниже 0,6. Этот показатель (иногда называемый чистотой) определяется как отношение интенсивности самого яркого

основания к сумме интенсивностей самого яркого и следующего за ним по яркости основания. Процентная доля кластеров, проходящих через фильтр, отражается в отчетах по анализам в виде показателя %PF.

Структурированная проточная кювета HiSeq 4000 имеет упорядоченную матрицу кластеров. Пустые лунки без кластеров и поликлональные лунки, в которых существует более одной последовательности, включаются в число исходных кластеров, но не проходят через фильтр. Поэтому упорядоченная решетка структурированной проточной кюветы дает относительно низкую долю кластеров, проходящих через фильтр.

Рисунок 15. Пустые и поликлональные лунки (включенные в число исходных кластеров)

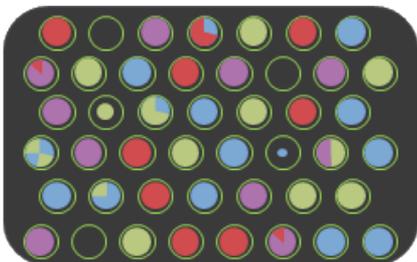
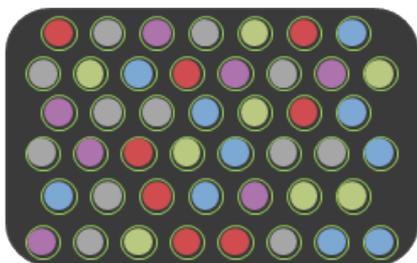


Рисунок 16. Лунки с кластерами, не прошедшими через фильтр (показаны серым)



Оценка качества

Оценка качества, или Q-score, является прогнозом вероятности неточного распознавания основания. Чем выше балл Q-score, тем выше качество распознавания основания и тем вероятнее, что основание будет распознано правильно.

Величина Q-score представляет собой компактный способ описания низких вероятностей ошибки. Q(X) означает баллы по качеству, где X — это оценка в баллах. В приведенной ниже таблице показана связь между показателем качества и вероятностью ошибки.

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



ПРИМЕЧАНИЕ

Оценка качества основана на модифицированной версии алгоритма Phred.

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

После определения баллов Q-score результаты регистрируются в файлах распознавания оснований.

Сортировка Q-Score

Программное обеспечение RTA2 группирует баллы показателей качества в определенные диапазоны или позиции и каждому диапазону присваивает определенное значение. Сортировка Q-score значительно снижает требования к необходимому пространству для хранения, не влияя на точность или эффективность последующих этапов применения баллов.

Сортировка Q-score повышает эффективность процессов анализа и позволяет удовлетворять требования, связанные с высокой производительностью системы HiSeq 4000, в отношении передачи данных. Создаваемый файл *.bcl имеет меньший размер, поскольку алгоритмы сжатия могут более эффективно сжимать файл. Файл копируется быстрее, так как в память компьютера прибора записывается меньше данных и меньше данных передается в сетевое хранилище.

Приложение С. Файлы выходных данных

Выходные файлы секвенирования	47
Структура папки выходных данных	47
Нумерация плиток	48

Выходные файлы секвенирования

Тип файла	Описание, место расположения и название файла
Файлы распознанных оснований	Каждая проанализированная плитка включается в файл распознанных оснований, содержащий результат распознавания основания и закодированную оценку качества распознавания. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — файлы для каждой дорожки сохраняются в папках циклов. s_[Lane]_[Tile].bcl.gz , где Lane — это однозначный номер дорожки, а Tile — четырехзначный номер плитки. Файлы распознанных оснований сжимаются с использованием алгоритма сжатия gzip.
Файлы расположения кластера	Для каждой плитки один файл расположения кластера содержит координаты XY каждого кластера. Файлы расположения кластера являются результатом генерирования шаблона. Data\Intensities — один файл для каждого цикла секвенирования находится в папке Intensities (Интенсивность). s.locs
Файлы фильтра	Файлы фильтра определяют кластеры, прошедшие через фильтры. Файлы фильтра создаются на 26 цикле с использованием данных 25 циклов. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — файлы сохраняются в одной папке для каждой дорожки и плитки. s_[дорожка]_[плитка].filter
Файлы InterOp	Бинарные файлы отчета, используемые программой Sequencing Analysis Viewer. Файлы InterOp обновляются по мере выполнения цикла. Папка InterOp
Файл конфигурации анализа в реальном времени (RTA)	В создаваемом в начале цикла секвенирования файле конфигурации анализа в реальном времени перечислены настройки для цикла секвенирования. [Корневой каталог] RTAConfiguration.xml
Файл с информацией о цикле	Содержат название цикла секвенирования, количество циклов для каждого считывания, указывают, когда считывание является индексированным, а также число полос и плиток проточной кюветы. Файлы сведений о цикле секвенирования создаются в начале секвенирования. [Корневой каталог] RunInfo.xml
Файлы миниатюр	Изображение-миниатюра для каждого канала и плитки в каждой полосе каждого цикла в ходе визуализации. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] — файлы сохраняются в одной папке по каждой дорожке, со вложенными папками по каждому циклу. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg — плитка обозначена четырехзначным номером, определяющим поверхность, полосу и плитку. См. раздел Нумерация плиток на стр. 48 .

Структура папки выходных данных

-  **Config** — настройки конфигурации цикла.
-  **Data**
 -  **Intensities**
 -  **BaseCalls**

 **L00[X]** — файлы распознавания оснований для каждой дорожки, данные собираются в один файл за цикл.

 s.locs

 **Images**

 **Focus**

 **L00[X]** — изображения фокуса для каждой дорожки.

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

 **Logs** — файлы журналов, описывающие события в рамках эксплуатации.

 **Recipe** — специфический для цикла секвенирования файл с набором параметров и идентификационным номером картриджа с реактивами.

 **RTALogs** — файлы журналов, описывающие события RTA2.

 **Thumbnail_Images** — миниатюрные изображения девяти местоположений из поднабора плиток, созданных для каждого цикла и нуклеотида.

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

Название и путь папки цикла

Папка цикла — это корневая папка, в которую помещаются данные из цикла секвенирования. Во время настройки цикла программное обеспечение запрашивает ввод пути для папки цикла. По умолчанию название папки представлено в следующем формате.

ГГММДД_<Наименование компьютера>_<Номер цикла>_<Сторона проточной кюветы>><Идентификационный номер проточной кюветы>

Пример: 110114_SN106_0716_A90095ACXX

При выполнении каждого цикла секвенирования в приборе к номеру цикла добавляется один. Сторона проточной кюветы (A или B) и идентификационный номер кюветы, введенные на этапах настройки цикла, добавляются к названию папки цикла.

Папка цикла записывается по адресу расположения выходных данных, который вы указали при настройке цикла. Временная папка цикла для проточной кюветы A записывается на диск D:, а временная папка цикла для проточной кюветы B записывается на диск E:.

Нумерация плиток

Для визуализации структурированной проточной кюветы HiSeq 3000/4000 используются 112 плиток на каждой дорожке, верхней и нижней, для каждого цикла. Каждая из восьми дорожек содержит две полосы, в каждой из которых по 28 плиток. Плитки пронумерованы в соответствии с их положением.



ПРИМЕЧАНИЕ

Полоса представляет собой столбец плиток в пределах одной дорожки проточной кюветы.

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

- ▶ Первая цифра указывает на поверхность.

- ▶ 1 для верхней поверхности
- ▶ 2 для нижней поверхности
- ▶ Вторая цифра указывает на полосу.
 - ▶ 1 для первой полосы
 - ▶ 2 для второй полосы
- ▶ Последние две цифры обозначают плитку (от 01 до 28). Нумерация начинается с 01 на выходном конце проточной кюветы и заканчивается 28 на входном конце.

Рисунок 17. Нумерация плиток



Этот пример расшифровывается следующим образом: верхняя поверхность проточной кюветы, вторая полоса, плитка номер семь.

Алфавитный указатель

В

BaseSpace Broker 42
BaseSpace Enterprise 11
BaseSpace Onsite Sequence Hub
интеграция 1
конфигурирование домена 11
установка соединения с циклом 16
BaseSpace Sequence Hub 6
значки 6
конфигурирование домена 11
передача данных 42
установка соединения с циклом 16
формы протокола анализа 18
BaseSpace® Sequence Hub
интеграция 1
bcl2fastq, версия 42

Н

HCS 4
журнал ошибок 37
опции просмотра 10
открытие 9

L

LIMS
настройки 10
сервер 10

P

PF % 44

R

RTA 4
RTA2
завершение цикла 39
прекращение 41
файлы входных данных 41

S

SAV 4
версия 42
вкладка Index (Индекс) 41
документация 27
файлы InterOp 47

A

алгоритм Phred 45

Б

баллы качества
мониторинг 26
безопасность 2

В

вакуумная система 3
взаимные помехи 43
включение прибора 9
водные промывки
поданные объемы 28
продолжительность и частота 27
временные папки 48
временный диск 29
встраивание первого нуклеотида 26
выравнивание PhiX 17
выравнивание по PhiX 17

Д

данные
Illumina Proactive 11
конвертирование 42
отправка в Illumina 11
сжатие 46
датчики 5
демультиплексирование 41-42
диск выходных данных 29
документация 2, 54
домен, конфигурирование 11
дорожки
проточная кювета 17, 48

Е

емкость хранилища
оптимизация 46

Ж

журнал ошибок 42
журналы ошибок 37

З

заливка
дополнительная настройка 18
заливка отходов 23
заливка проточной кюветы 21
замена реактивов в середине цикла 39
значения интенсивностей 43
значки 5
статус передачи данных 6
значки службы копирования циклов 6

И

индикаторы датчика
BaseSpace Sequence Hub 6
индикаторы датчиков
служба копирования циклов 6
инициализация программного обеспечения 9
инициализация программного обеспечения,
поиск и устранение неисправностей 37
интенсивности, мониторинг 26

К

кабели USB, подключение 9
качество кластеров 44
количество циклов
соотношение выполненных и
введенных 18
колпачки-воронки 19
комплекты SBS 7
конверсия FASTQ 42
конвертирование данных 42

М

маркерные файлы 42
матрица кластера 45

местоположение кластеров 43
местоположение папки цикла 48
местоположения кластера 8
местоположения папки 47
местоположения папок 10, 48
местоположения папок, принятые по
умолчанию 10
местоположения файлов 47
мигающий рычаг проточной кюветы 37
миниатюрные изображения, сохранение 17
миниатюры 47

Н

наборы параметров, пользовательские 18
название эксперимента 17
наименование
папки цикла 10, 48
плитки 48
наладка лаборатории 2, 42
наноунки 8
направляющие штыри 22, 24
настройка цикла
заливка реактивов 18
оставшееся количество циклов 18
настройки химической реакции 18
настройки, программное обеспечение 10
нераспознанные основания (N) 44
номера по каталогу
коллекторы 40
комплекты Illumina для
регибридизации 40
расходные материалы, приобретаемые
пользователем 12

О

ожидаемые объемы
водные промывки 28
заливка 23
профилактические промывки 32, 34
окно опций меню 10
онлайн-поддержка 2
определение местоположения кластеров 43
оптический модуль 2
опции индексирования 17
опции приостановки 39
опция приостановки 40
оранжевый рычаг проточной кюветы 37
отсеки 2
отчет о первом нуклеотиде 17

отчеты, встраивание первого нуклеотида 26
 оценки Q-score 45
 очистка пространства на диске 29
 ошибки 42
 вероятность 45

П

папки выводимых данных
 местоположения 16
 папки выходных данных 47
 местоположения 10
 папки циклов, временные 48
 параметры цикла, просмотр 19
 передача данных 29, 42
 перезапуск прибора 36
 перекрестное загрязнение,
 предотвращение 31
 плитки 48
 файлы памяти 41
 повторное использование растворов для
 профилактической промывки 31
 поданные объемы
 водные промывки 28
 заливка 23
 профилактические промывки 32, 34
 подготовка площадки 2, 42
 поддержка клиентов 54
 подключение кабелей USB 9
 поиск и устранение неисправностей в цикле
 считывания 1 40
 поиск и устранение неисправностей
 считывания 1 38
 поликлональные лунки 45
 положения для реактивов
 штатив SBS 19
 положения реактивов SBS 19
 положения, реактивы
 SBS 19
 полосы 17, 48
 пользовательские наборы параметров 18
 помощь, техническая 54
 послещикловая промывка 27
 потеря данных 39, 41
 потеря регистрации 38
 потеря регистрации, считывание 1 38
 предупреждения
 описания 5
 разрешение ситуаций 5
 приложения, установленные 4

программное обеспечение
 поиск и устранение неисправностей 37
 установленные приложения 4
 характеристики 1
 прокладки 30
 поиск и устранение неисправностей 38
 промывки
 водная и профилактическая 30
 польза 30
 раствор для профилактической
 промывки 31, 33
 системные требования 27, 30
 проточная кювета
 идентификационный номер проточной
 кюветы 17
 матрица кластера 45
 осмотр 23, 25
 расположение 3
 структурированная 8
 проточные кюветы
 визуализация 48
 заливка 21
 кластерная матрица 43
 расположение 22, 24
 профилактические промывки 30
 повторное использование растворов 31,
 33
 поданные объемы 32, 34
 частота 30
 профилактическое техническое
 обслуживание 30
 пузырьки 23, 25

Р

расположение проточных кювет 22, 24
 раствор для профилактической
 промывки 31, 33
 расходные материалы
 комплекты для секвенирования Illumina 7
 приобретаемые пользователем 12
 расходные материалы для
 секвенирования 7, 13
 реактивы
 замена в середине цикла 39
 запись идентификационного номера
 комплекта 18
 подготовка 13
 послещикловые действия 27
 секвенирование 13
 регбридизация 40

регистрация
поиск и устранение неисправностей 43
рычаг проточной кюветы 3
мигающий 37
оранжевый 37

С

свободное пространство на диске 29
сетевое соединение 42
система струйной автоматки 3
доступ 3
поиск и устранение неисправностей 38
техническое обслуживание 27, 30
служба копирования цикла 42
служба копирования циклов 6
Служба мониторинга Illumina Proactive 11
соблюдение норм и правил 2
соседние циклы 40
состояние передачи данных
служба копирования циклов 6
сохранение миниатюрных изображений 17
справка
SAV 27
документация 2
кластеризация 13
регибридизация праймера 40
статус передачи данных 6
сторона проточной кюветы 3, 48
страницы поддержки 2
структура папки 47
структурированная проточная кювета 1, 8,
43
схема индексирования 18

Т

таблицы качества 45
температура, холодильник для реактивов 4
техническая поддержка 54
техническое обслуживание,
профилактическое 30
требуемое пространство на диске 29
трубки для отходов 32, 34
подготовка к заливке 23

У

удаленный мониторинг 16

установка, проверка струйной
автоматики 38
утечки 23, 25

Ф

фазирование
предварительное фазирование 44
файл конфигурации 47
файл с информацией о цикле 47
файлы InterOp 42, 47
файлы журнала 47
файлы памяти 41
файлы распознанных оснований 44
фильтр чистоты 44
формы протокола анализа, требуемые 18

Х

характеристики оборудования 1
холодильник для реактивов, температура 4
холостой режим, допустимая
длительность 35
хранение раствора для профилактической
промывки 31, 33

Ц

цвет строки состояния 3
цвет, строка состояния 3

Ч

числовые показатели цикла 26, 42

Ш

штативы для реактивов 3
штативы, реактивы 3

Э

экран Run Overview (Обзор цикла) 26
экран настройки проточной кюветы 17
экран реактивов 18
этапы секвенирования, обзор 15
RTA 43
этапы химической реакции, мониторинг 26

Техническая помощь

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

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

Номера телефонов службы поддержки клиентов Illumina

Регион	Бесплатный звонок	Региональные отделения
Северная Америка	+1 800 809-45-66	
Австралия	+1 800 775-688	
Австрия	+43 800 00-62-49	+43 1928-65-40
Бельгия	+32 8007-71-60	+32 3400-29-73
Великобритания	+44 800 012-60-19	+44 207 305-71-97
Германия	+49 800 101-49-40	+49 893 803-56-77
Гонконг	800 96-02-30	
Дания	+45 8082-01-83	+45 8987-11-56
Ирландия	+353 180 093-66-08	+353 016 95-05-06
Испания	+34 911 89-94-17	+34 800 30-01-43
Италия	+39 800 98-55-13	+39 236 00-37-59
Китай	400 066-58-35	
Нидерланды	+31 800 022-24-93	+31 207 13-29-60
Новая Зеландия	0800 45-16-50	
Норвегия	+47 800 168-36	+47 219 396-93
Сингапур	+1 800 579-27-45	
Тайвань	008 0665-17-52	
Финляндия	+358 800 91-83-63	+358 974 79-01-10
Франция	+33 805 10-21-93	+33 170 77-04-46
Швейцария	+41 565 80-00-00	+41 800 20-04-42
Швеция	+46 850 61-96-71	+46 200 88-39-79
Япония	0800 111-50-11	
Другие страны	+44 1799-534-000	

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

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



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U. S. A. (США)
+1 800-809-ILMN (4566)
+1 858 202-45-66 (за пределами Северной Америки)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

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

© 2018 Illumina, Inc. Все права защищены.

illumina®