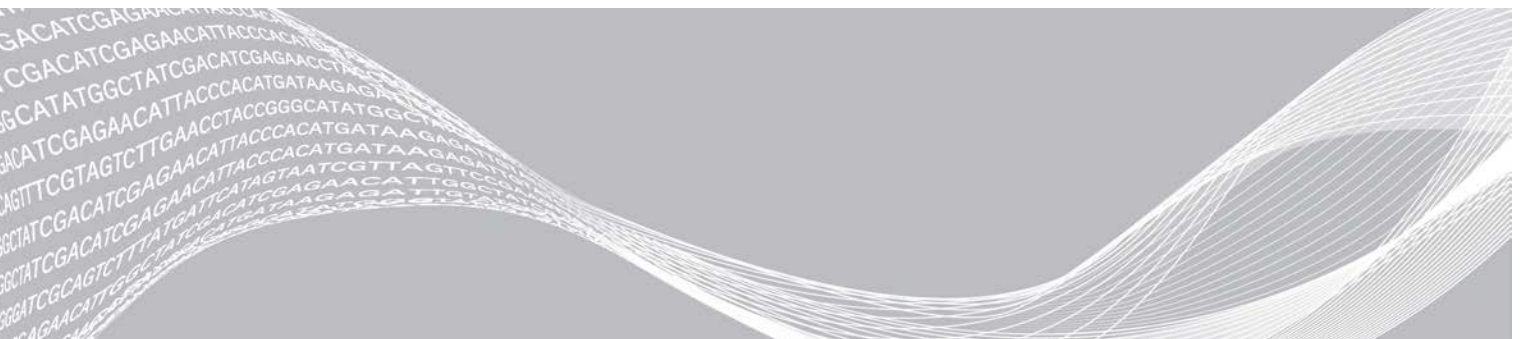


cBot 2

Guide du système



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

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

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

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

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Support n° 20015507 Document n° 15065681 v05	Mai 2020	Mise à jour des images des plaques de réactifs.
Support n° 20015507 Document n° 15065681 v04	Avril 2019	Mise à jour des images et des descriptions des plaques de réactifs.
Support n° 20015507 Document n° 15065681 v03	Janvier 2019	Mise à jour de la couleur de l'opercule d'aluminium du rouge au blanc pour la barrette de huit tubes HP5. Ajout d'informations de dénaturation et de dilution pour les librairies ADN Flex Nextera. Retrait des références aux trousseaux TruSeq v2 GA, car elles ne sont plus prises en charge. Retrait du numéro de support, car ce document n'est plus imprimé.
Support n° 20015507 Document n° 15065681 v02	Novembre 2016	Retrait de l'information sur l'orientation de la barrette de huit tubes contenant les primers pour la Flow Cell HiSeq Rapid. Ces primers sont chargés dans le système HiSeq. Correction du numéro de référence Illumina pour les barrettes de tubes avec code à barres cBot 2 (n° de référence 20005160).
Support n° 20004364 Document n° 15065681 v01	Janvier 2016	Mise à jour des descriptions du logiciel cBot v3.0, qui prend en charge la trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq 3000/4000. Ajout des renseignements suivants : <ul style="list-style-type: none"> • Formule et durée de la génération d'amplifiats pour la Flow Cell à lecture unique HiSeq 3000/4000. • Volumes de PhiX et de librairie à la procédure de substance de contrôle PhiX pour les librairies amplifiées sur une Flow Cell HiSeq 3000/4000. • Recommandation relative au service de maintenance préventive annuelle. Mise à jour des instructions concernant le déchargement des composants d'analyse pour y inclure des options de stockage de Flow Cell. Déplacement des renseignements relatifs au dépannage dans l'annexe A. Simplification des descriptions des logiciels au début du guide. Ajout du <i>Guide de configuration du système cBot (document n° 1000000005301)</i> dans les Ressources supplémentaires.
N° 15065681 Rév. A	Juillet 2015	Publication originale.

Table des matières

Chapitre 1 Présentation	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Composants du système cBot 2	2
Consommables Illumina	6
Plaques des réactifs cBot	7
Chapitre 2 Pour commencer	9
Démarrage du cBot 2	9
Compatibilité des versions des composants de l'analyse	10
Consommables fournis par l'utilisateur	11
Chapitre 3 Préparation des réactifs	12
Introduction	12
Flow Cell HiSeq X	12
Flow Cell HiSeq 3000/4000	16
Flow Cell HiSeq à débit élevé	20
Flow Cell HiSeq Rapid	21
Chapitre 4 Génération d'amplifiats avec suivi des échantillons	22
Introduction	22
Flux de travail de la génération d'amplifiats avec suivi des échantillons	23
Lavage avant analyse	23
Chargement des consommables	24
Chargement du collecteur	26
Sélection du protocole	28
Numérisation des consommables	28
Vérification avant analyse	29
Surveillance de l'analyse	29
Déchargement des composants de l'analyse	31
Lavage après analyse	32
Confirmation de la distribution des réactifs (facultatif)	32
Chapitre 5 Génération d'amplifiats sans suivi des échantillons	34
Introduction	34
Flux de travail de la génération d'amplifiats sans suivi des échantillons	34
Lavage avant analyse	35
Sélection du protocole	36
Chargement des consommables	36
Vérification avant analyse	40
Surveillance de l'analyse	40
Déchargement des composants de l'analyse	42
Lavage après analyse	43

Confirmation de la distribution des réactifs (facultatif)	43
Chapitre 6 Maintenance	45
Maintenance périodique	45
Lavage de maintenance mensuel	46
Changement de la plaque d'adaptateur	47
Mise à niveau du logiciel	48
Mise à niveau des formules	49
Arrêt du cBot 2	50
Annexe A Dépannage	52
Mise en pause ou annulation d'une analyse	52
Résolution du problème de l'échec de la vérification du flux	52
Résolution des problèmes d'analyse	54
Réinitialisation du lecteur de codes à barres externe	55
Modification des protocoles	56
Index	58
Assistance technique	62

Chapitre 1 Présentation

Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Composants du système cBot 2	2
Consommables Illumina	6
Plaques des réactifs cBot	7

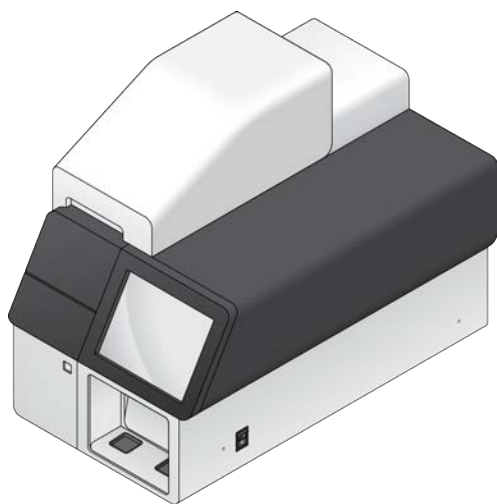
Introduction

Le système cBot 2 utilise une amplification afin de créer simultanément des centaines de millions de modèles d'ADN à molécule unique.

Le logiciel cBot distribue les réactifs et contrôle les délais de réaction, les débits des flux et les températures. La configuration et l'utilisation se déroulent sur instrument depuis l'interface logicielle à l'aide de l'écran tactile. Des lecteurs de codes à barres sur instrument enregistrent les réactifs, la Flow Cell et le modèle utilisés pour chaque expérience.

Une option de suivi positif des échantillons fournit une numérisation interne des codes à barres pour un meilleur contrôle des bibliothèques à séquencer sur le système HiSeq. Une fois les consommables chargés, le couvercle de l'instrument peut être fermé. Les lecteurs internes enregistrent l'identifiant de la plaque des réactifs, la Flow Cell et la barrette de huit tubes.

Figure 1 cBot 2



Plusieurs trousse d'amplifiats peuvent être utilisées sur le cBot. Choisissez une trousse compatible avec l'instrument de séquençage et le type d'analyse de séquençage à effectuer. Pour obtenir la liste de trousse offertes, consultez la section *Consommables Illumina* à la page 6.

Différences de flux de travail pour Illumina SeqLab

Si vous utilisez le système cBot 2 comme composant du SeqLab d'Illumina, votre flux de travail diffère de celui décrit dans ce guide. Les différences introduites par Clarity LIMS X Edition touchent toutes les étapes, de la préparation des bibliothèques jusqu'au séquençage. Consultez la page d'aide pour Illumina SeqLab sur le site Web d'Illumina afin de générer un guide du flux de travail personnalisé pour votre expérience.

Ressources supplémentaires

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

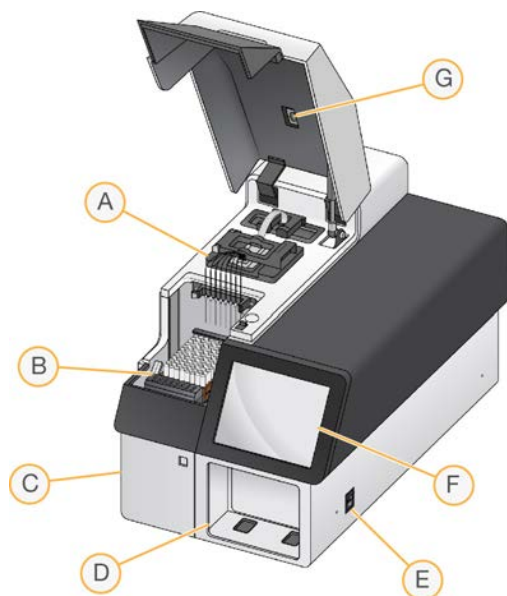
Ressource	Description
<i>Guide de préparation du site du système cBot (document n° 15053710)</i>	Fournit les spécifications relatives à l'espace de laboratoire, aux exigences électriques et aux considérations environnementales, ainsi que les instructions de configuration de l'instrument.
<i>Guide de sécurité et de conformité du système cBot 2 (document n° 15065643)</i>	Fournit des renseignements concernant l'étiquetage de l'instrument, les certifications de conformité et les questions de sécurité.
<i>Guide de dénaturation et de dilution de bibliothèques des systèmes HiSeq (document n° 15050107)</i>	Fournit des instructions pour la dénaturation et la dilution de bibliothèques préparées avant le séquençage ainsi que pour la préparation d'un contrôle PhiX. Cette étape s'applique à la plupart des types de bibliothèques et des Flow Cells.

Consultez la page d'aide du système cBot 2 sur le site Web d'Illumina pour accéder à la documentation, aux téléchargements de logiciels, à la formation en ligne et aux foires aux questions.

Composants du système cBot 2

Le système cBot 2 utilise des capteurs pour détecter la présence des composants de l'analyse et vous prévient si un composant est manquant ou installé incorrectement. La platine thermique et la platine des réactifs sont situées sous le couvercle de l'instrument. Un commutateur magnétique assure la fermeture du couvercle et un capteur permet de détecter son ouverture. Pour des raisons de sécurité, le logiciel de l'instrument vous invite à fermer le couvercle avant de continuer l'analyse.

Figure 2 Composants du système cBot 2



A Platine thermique : la platine thermique contient la Flow Cell et contrôle sa température au cours de l'analyse.

- B **Platine des réactifs** : la platine des réactifs contient la plaque des réactifs, les modèles de bibliothèques et les primers de spécialité du cBot. Pour les analyses avec suivi des échantillons, un lecteur de codes à barres situé derrière la platine des réactifs enregistre l'identifiant de la plaque des réactifs et de la barrette de huit tubes contenant le modèle.
- C **Compartiment du flacon à déchets** : le compartiment du flacon à déchets contient un flacon à déchets contrôlé par détecteur qui recueille les réactifs utilisés.
- D **Lecteur de codes à barres externe** : le lecteur de codes à barres externe enregistre l'identifiant unique de la plaque des réactifs et de la Flow Cell utilisées à chaque analyse qui n'inclut pas le suivi des échantillons.
- E **Interrupteur d'alimentation** : met en marche l'instrument. Le bouton de démarrage, situé sur la gauche du compartiment du flacon à déchets, démarre le logiciel de l'instrument.
- F **Écran tactile** : l'écran tactile permet de configurer une analyse sur instrument et d'obtenir un rapport visuel sur le processus de génération d'amplifiats.
- G **Lecteur de codes à barres de la Flow Cell** : le lecteur de codes à barres de la Flow Cell enregistre l'identifiant unique de la Flow Cell utilisée à chaque analyse avec suivi des échantillons.

Platine thermique

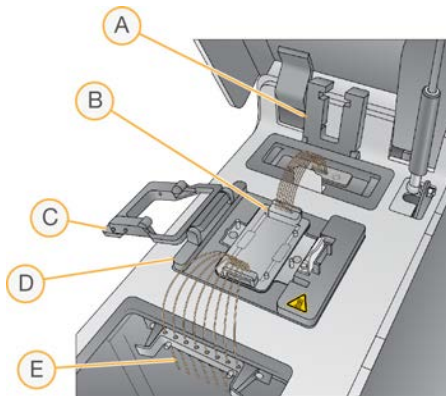
La platine thermique contient la Flow Cell ainsi que le collecteur placé au-dessus de la Flow Cell. La pince verrouille la Flow Cell et le collecteur en place.



AVERTISSEMENT

Ne touchez jamais au bloc thermique en aluminium situé sur la platine thermique. Tout contact avec le réchauffeur pendant son fonctionnement peut provoquer des brûlures graves. Pour en savoir plus sur la sécurité, consultez le *Guide de sécurité et de conformité du système cBot 2* (document n° 15065643).

Figure 3 Platine thermique



- A Pince de sortie
- B Plaque d'adaptateur de Flow Cell et collecteur
- C Pince de Flow Cell
- D Platine thermique
- E Peigne d'aspiration

Le collecteur est un composant à usage unique qui distribue les réactifs provenant de la plaque des réactifs à la Flow Cell. Les dispositifs d'aspiration du peigne percent les tubes de réactifs recouverts d'un opercule en aluminium qui se trouvent sur la plaque des réactifs. L'extrémité de sortie du collecteur transfère les déchets vers le contenant à déchets. La pince de sortie maintient l'extrémité de sortie du collecteur à sa place.

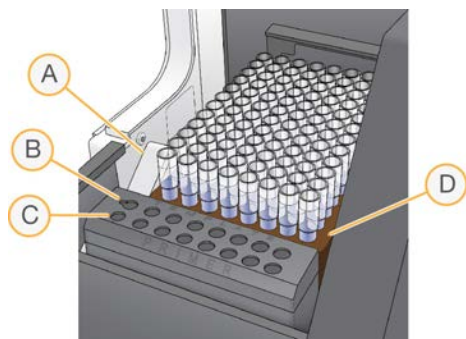
Plaques d'adaptateur de Flow Cell

Le système cBot effectue une génération d'amplifiats sur des Flow Cell HiSeq. Lors du passage d'un type de Flow Cell à un autre, changez la plaque d'adaptateur sur la platine de Flow Cell. Pour de plus amples renseignements, consultez la section *Changement de la plaque d'adaptateur à la page 47*.

Platine des réactifs

La platine des réactifs contient la plaque des réactifs cBot. La plaque des réactifs est maintenue en place par le levier de la plaque des réactifs. Deux supports de barrettes de huit tubes situés devant la plaque des réactifs contiennent les modèles de bibliothèques préparés ainsi que des primers supplémentaires. Le côté gauche de la rangée des modèles dispose d'une clé de polarisation afin d'assurer la bonne orientation de la barrette de huit tubes utilisée avec le flux de travail de suivi des échantillons.

Figure 4 Platine des réactifs cBot 2



- A Levier de la plaque des réactifs
- B Rangée du modèle
- C Rangée du primer
- D Plaque des réactifs cBot















Logiciel cBot

L'interface du logiciel cBot génère des invites destinées à configurer l'instrument et à surveiller la progression de la génération d'amplifiats. Durant une analyse de génération d'amplifiats, les écrans suivants sont utilisés : l'écran Start (Démarrer), les écrans Run Setup (Configuration de l'analyse), et l'écran Run Status (État de l'analyse).

À l'aide de l'interface du logiciel, vous pouvez configurer le suivi positif des échantillons, les exigences d'entrée, les préférences de lavage, les notifications par courriel et la surveillance à distance.

Icônes d'état des capteurs

En bas de l'écran, les icônes d'état des capteurs indiquent si un composant est correctement installé et prêt pour l'analyse.

Icône	Indication
	Plaque d'adaptateur de Flow Cell GAllx installée*.
	Plaque d'adaptateur de Flow Cell HiSeq installée.
	Type de plaque d'adaptateur de Flow Cell inconnu.
	Le couvercle de l'instrument est ouvert.
	Le couvercle de l'instrument est fermé.
	Le flacon à déchets est en place et prêt à l'emploi.
	Le flacon à déchets est plein.
	Le flacon à déchets est manquant.
	Le réfrigérant circule et le niveau de réfrigérant est bon.
	Avertissement : le réfrigérant circule, mais le niveau de réfrigérant est bas.
	Erreur : le réfrigérant ne circule pas, mais le niveau de réfrigérant est bon.
	Erreur : le réfrigérant ne circule pas et le niveau de réfrigérant est bas.
	Le collecteur est chargé et le peigne d'aspiration est en place.
	Le collecteur est manquant ou le peigne d'aspiration n'est pas en place.

* Cette option est visible, mais n'est plus prise en charge.

Configuration

À l'aide de l'interface du logiciel, vous pouvez configurer le suivi positif des échantillons, les paramètres du système, les exigences d'entrée et les préférences de lavage. En utilisant une connexion réseau, vous pouvez activer la surveillance à distance, les alertes par courriel et la prise en charge de LIMS. Vous pouvez modifier ces réglages au besoin, avant le début de chaque analyse.

Pour obtenir des instructions sur la configuration, consultez le *Guide de configuration du système cBot* (document n° 1000000005301).

Consommables Illumina

Les réactifs cBot sont fournis dans une plaque des réactifs qui les charge directement sur l'instrument après décongélation. Les plaques des réactifs cBot sont fournies dans les troussees d'Illumina ci-dessous.

La description du contenu des troussees et les autres documents relatifs aux troussees sont disponibles à [la page d'assistance du cBot 2](#) sur le site Web d'Illumina. Pour obtenir des instructions sur la préparation des réactifs, consultez la section *Préparation des réactifs à la page 12*.

Trousses d'amplifiats pour le HiSeq

Chaque trousse contient une Flow Cell HiSeq, un collecteur spécifique à celle-ci et les réactifs requis pour y générer des amplifiats dans le cBot.

Nom de la trousse	N° de référence de la trousse
Trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq 3000/4000	N° de référence GD-410-1001
Trousse d'amplifiats appariés HiSeq 3000/4000	N° de référence PE-410-1001
Trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq v4	N° de référence GD-401-4001
Trousse d'amplifiats appariés HiSeq v4	N° de référence PE-401-4001
Trousse d'amplifiats à lecture unique TruSeq v3 - HS	N° de référence GD-401-3001
Trousse d'amplifiats appariés TruSeq v3 - HS	N° de référence PE-401-3001
Trousse de chargement d'échantillon cBot double rapide HiSeq	N° de référence CT-403-2001

Trousses d'amplifiats pour le HiSeq X

Chaque trousse contient plusieurs Flow Cells HiSeq X, des collecteurs spécifiques à celles-ci et les réactifs requis pour générer des amplifiats sur chaque Flow Cell dans le cBot. Les troussees Single-pack contiennent des consommables pour la génération d'amplifiats sur deux Flow Cells et les troussees 10-pack contiennent des consommables pour la génération d'amplifiats sur 20 Flow Cells.

Nom de la trousse	N° de référence de la trousse
Trousse de réactifs HiSeq X Ten v2.5	N° de référence FC-501-2501
Trousse de réactifs HiSeq X Ten v2.5 (10-pack)	N° de référence FC-501-2521
Trousse de réactifs HiSeq X Five v2.5	N° de référence FC-502-2501
Trousse de réactifs HiSeq X Five v2.5 (10-pack)	N° de référence FC-502-2102

Trousses de réhybridation

Utilisez une trousse de réhybridation cBot pour effectuer une réhybridation du primer de la lecture 1 lors de la récupération d'une analyse ou après un stockage prolongé de la Flow Cell.

Nom de la trousse	N° de référence
Trousse de réhybridation multiprimers HiSeq X cBot v2	N° de référence GD-305-2001
Trousse de réhybridation multiprimers HiSeq 3000/4000 cBot	N° de référence GD-310-1001
Trousse de réhybridation multiprimers TruSeq cBot v2	N° de référence GD-304-2001
Trousse de réhybridation multiprimers HiSeq v4	N° de référence GD-403-4001

Pour plus de renseignements, consultez le guide de réhybridation pour votre Flow Cell :

- ▶ HiSeq X – réhybridation du primer de la lecture 1 sur une Flow Cell HiSeq X (document n° 15053711)
- ▶ HiSeq 3000/4000 – réhybridation du primer de la lecture 1 sur une Flow Cell HiSeq 3000/4000 (document n° 15058794)
- ▶ TruSeq v3 – réhybridation du primer de la lecture 1 sur une Flow Cell TruSeq v3 (document n° 15018149)

Primer de séquençage de la lecture 1 pour les bibliothèques Nextera

Le primer de séquençage de la lecture 1 (HP6) fourni dans les trousse suivantes n'est pas compatible avec les bibliothèques Nextera :

- ▶ Trousse d'amplifiats TruSeq v3 – HS

Si vous séquencez des bibliothèques Nextera, utilisez le primer de séquençage de la lecture 1 (HP10), quel que soit le type d'analyse que vous réalisez. Le primer HP10 est fourni dans la TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (boîte de primers de séquençage à index double TruSeq).

Nom de la trousse	N° de référence
Boîte de primers de séquençage à index double TruSeq, lecture unique	N° de référence FC-121-1003
Boîte de primers de séquençage à index double TruSeq, lecture appariée	N° de référence PE-121-1003

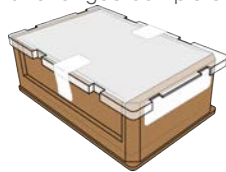
Toutes les autres trousse cBot comprennent le primer HP10, qui est compatible avec les bibliothèques TruSeq et Nextera.

Plaques des réactifs cBot

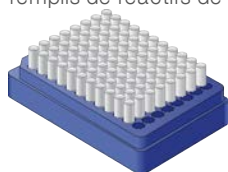
La configuration de la plaque des réactifs varie selon les types de trousse, y compris le nombre de rangées contenant les réactifs.

Chaque barrette de huit tubes porte une étiquette indiquant le nom du réactif suivi d'un numéro. Le numéro indique la rangée qu'occupe le réactif sur la plaque des réactifs. Si une barrette de huit tubes est délogée, utilisez le numéro de rangée inscrit sur l'étiquette pour remettre la barrette de tubes à la position appropriée.

Type de Flow Cell	Description de la plaque des réactifs
HiSeq X et HiSeq 3000/4000	Contient 12 rangées, chacune composée de huit puits profonds. Chaque réactif occupe une rangée complète de huit puits. Les rangées ne contiennent pas toutes des réactifs.
HiSeq à débit élevé (HiSeq v4)	Contient 12 rangées, chacune composée de huit puits profonds. Chaque réactif occupe une rangée complète de huit puits. Les rangées ne contiennent pas toutes des réactifs. Les rangées 9 à 12 sont vides.



Type de Flow Cell	Description de la plaque des réactifs
HiSeq à débit élevé (TruSeq v3)	Contient 11 rangées de barrettes de huit tubes recouverts d'un opercule en aluminium et remplis de réactifs de génération d'amplifiats. La rangée 12 est vide.
HiSeq Rapid	Contient 12 rangées, chacune composée de huit puits profonds. Les trois premières rangées contiennent des réactifs d'hybridation de modèle et de première extension. Les rangées 4 à 12 sont vides.



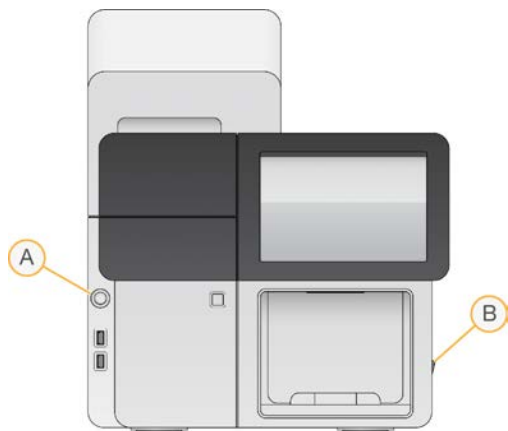
AVERTISSEMENT

À l'exception de la plaque des réactifs utilisée avec HiSeq Rapid, ces ensembles de réactifs contiennent du formamide, un amide aliphatique constituant probablement une toxine reproductive. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Mettez au rebut les contenants et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales en vigueur dans votre région. Pour plus de renseignements, consultez la fiche signalétique de cette trousse, mise à votre disposition sur support.illumina.com/sds.html.

Chapitre 2 Pour commencer

Démarrage du cBot 2	9
Compatibilité des versions des composants de l'analyse	10
Consommables fournis par l'utilisateur	11

Démarrage du cBot 2



- A Bouton de démarrage
- B Bouton d'alimentation

- 1 Mettez le bouton d'alimentation situé sur le côté droit de l'instrument en position ON (Marche).
- 2 Appuyez sur le bouton de démarrage situé à gauche du compartiment du flacon à déchets pour démarrer le logiciel.
Une fois la routine de démarrage terminée, l'écran Start (Démarrer) s'ouvre.

Compatibilité des versions des composants de l'analyse

Pour des performances et des résultats optimaux, utilisez toujours des versions compatibles du logiciel et des troussees cBot.

Version de la trousse	Version des formules	Version du logiciel
Trousse d'amplifiats HiSeq 3000/4000	Formules version 1.0	cBot v3.0.46 ou ultérieure (trousse à lecture unique) cBot v2.0.34 ou ultérieure (trousse à lecture appariée)
Trousse de réactifs HiSeq X Ten v2.5	Formules version 2.0	cBot v2.0.29 ou ultérieure
Trousse de réactifs HiSeq X Five v2.5	Formules version 2.0	cBot v2.0.29 ou ultérieure
Trousse d'amplifiats HiSeq v4	Formules version 9.0	cBot v2.0.16 ou ultérieure
Trousse de chargement d'échantillon cBot double rapide HiSeq	Formules version R	cBot v1.5 ou ultérieure
Boîte de primers de séquençage à index double TruSeq	Formules version 8.0 (HiSeq) Formules version 7.0 (GA)	cBot v1.4.36 ou ultérieure
Trousse d'amplifiats TruSeq v3 – HS	Formules version 8.0	cBot v1.4 ou ultérieure
Trousse d'amplifiats TruSeq v2 – GA*	Formules version 7.0	cBot v1.3 ou ultérieure

* Cette option est visible, mais n'est plus prise en charge.

Types de Flow Cell et de formules cBot

Flow Cell	Nom de la formule principale
Flow Cell HiSeq 3000/4000 structurée	HiSeq_3000_4000_SR_HD_Exclusion_Amp_v1.0 HiSeq_3000_4000_HD_Exclusion_Amp_v1.0
Flow Cell HiSeq X Ten v2.5 structurée	HiSeq_X_HD_Exclusion_Amp_v2.0
Flow Cell HiSeq X Five v2.5 structurée	HiSeq_X_HD_Exclusion_Amp_v2.0
Flow Cell HiSeq v4	SR_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0 PE_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0
Flow Cell TruSeq v3	SR_Amp_Lin_Block_TubeStripHyb_v8.0 PE_Amp_Lin_Block_TubeStripHyb_v8.0 SR_Amp_Lin_Block_Hyb_v8.0 PE_Amp_Lin_Block_Hyb_v8.0
Flow Cell HiSeq Rapid v2	RR_TemplateHyb_FirstExt_vR ¹

¹ Uniquement utilisé avec les troussees Rapid Duo.

Consommables fournis par l'utilisateur

Les consommables fournis par l'utilisateur suivants sont utilisés pour la préparation des réactifs de génération d'amplifiats fournis dans les troussees HiSeq X^{MD} a et HiSeq 3000/4000^{MD}. Assurez-vous d'utiliser les bonnes barrettes de huit tubes pour votre flux de travail.

Les troussees HiSeq X et HiSeq 3000/4000 nécessitent une étape de dénaturation avant la génération d'amplifiats sur le cBot 2. À l'aide de ces troussees, les librairies sont dénaturées dans la barrette de huit tubes avant l'ajout du mélange de réaction ExAmp.

Composant	Fournisseur	Utilisation
NaOH 1 N	Fournisseur de laboratoire général	Dénaturation de librairie
Barrettes de huit bouchons, plates	Fisher Scientific, n° de référence AB-0784	Bouchage des barrettes de huit tubes non étiquetées lorsqu'elles ne sont pas chargées dans le système cBot
Barrettes de huit tubes, 0,2 ml	Fisher Scientific, n° de référence AB-0264	Réaction ExAmp et mélange de librairies avec le système cBot (génération d'amplifiats sans flux de travail pour le suivi d'échantillon)
Barrettes de tubes avec code à barres cBot 2 (huit puits)	Illumina, n° de référence 20005160	Réaction ExAmp et mélange de librairies avec le système cBot (génération d'amplifiats avec flux de travail pour le suivi d'échantillon)
Eau de laboratoire	Millipore ou fournisseur de laboratoire général	Dénaturation de librairie
Microtubes à centrifugation, 1,5 ml	VWR, n° de référence 20170-038*	Préparation du mélange étalon de la réaction ExAmp

*ou équivalent

Chapitre 3 Préparation des réactifs

Introduction	12
Flow Cell HiSeq X	12
Flow Cell HiSeq 3000/4000	16
Flow Cell HiSeq à débit élevé	20
Flow Cell HiSeq Rapid	21

Introduction

Les instructions de préparation des réactifs dépendent de la trousse de réactifs que vous utilisez. Les instructions sont organisées par type et portent sur les Flow Cells HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq à débit élevé et HiSeq rapide.

Après la préparation, les réactifs de génération d'amplifiats sont prêts à être chargés sur l'instrument cBot à la demande du logiciel.

Pratiques exemplaires

- ▶ Portez une nouvelle paire de gants lors de la préparation des réactifs de génération d'amplifiats.
- ▶ Ne retirez pas le couvercle de protection en plastique transparent de la plaque des réactifs tant que vous n'êtes pas prêt à charger les réactifs sur le cBot. Veillez à ne jamais perforer les opercules en aluminium.
- ▶ Tenez les plaques de réactifs contenant des barrettes de huit tubes par la base de la plaque, afin d'éviter de déloger les tubes de réactifs. Vérifiez que les tubes sont bien en place dans la plaque des réactifs avant d'avoir mélangé les réactifs par agitateur vortex ou retourné la plaque des réactifs et après ces actions. Des tubes mobiles peuvent endommager le collecteur du cBot.
- ▶ Pour la génération d'amplifiats sur une Flow Cell HiSeq X ou HiSeq 3000/4000, préparez *toujours* du NaOH nouvellement dilué pour dénaturer les librairies. Cette étape est essentielle pour le processus de dénaturation. Pour éviter les petites erreurs de pipetage, préparez au moins 1 ml de NaOH 0,1 N nouvellement dilué.

Flow Cell HiSeq X

Préparez la Flow Cell structurée HiSeq X, puis les réactifs de génération d'amplifiats. Pour préparer les réactifs de génération d'amplifiats, décongelez la plaque des réactifs cBot et préparez le mélange principal ExAmp.

Si vous utilisez la trousse 10-pack, préparez quatre Flow Cells et décongelez quatre plaques des réactifs cBot. Veillez à ce que quatre instruments cBot soient disponibles. Les réactifs ne peuvent pas être stockés après la préparation.



REMARQUE

Les instructions de préparation des réactifs décrites dans ce guide ne s'appliquent pas au flux de travail automatisé utilisé pour Illumina SeqLab. Pour obtenir des instructions sur le flux de travail Illumina SeqLab, consultez le site support.illumina.com/custom-protocol-selector.html.

À propos des réactifs

- ▶ Les réactifs ExAmp sont visqueux, en particulier EPX2 et EPX3. Aspirez et distribuez les réactifs lentement pour assurer la précision du pipetage.
- ▶ Le réactif EPX3 ne bouge pas lorsqu'il est inversé en raison de sa viscosité.

- ▶ **N'agitez jamais** les réactifs ExAmp et ne les recongelez pas après les avoir décongelés.
- ▶ Le mélange principal ExAmp peut être trouble, ce qui est normal. Si la solution se sépare en une partie trouble et une partie transparente, pipettez-la lentement pour la mélanger.

Préparation de la Flow Cell

- 1 Sortez un nouvel emballage de Flow Cell du lieu de stockage à une température maintenue entre 2 et 8 °C.
- 2 Laissez l'emballage de la Flow Cell à température ambiante pendant au moins 30 minutes.



REMARQUE

Si l'emballage en papier aluminium est intact, la Flow Cell peut rester à température ambiante durant 12 heures. Vous pouvez remettre la Flow Cell emballée au stockage à 2 à 8 °C pour une utilisation ultérieure une seule fois. Évitez les modifications de température répétées de la Flow Cell.

- 3 Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc.
- 4 Retirez l'emballage en aluminium en partant de l'extrémité, à l'aide de l'opercule angulaire. Utilisez la Flow Cell dans les 4 heures suivant l'ouverture de l'emballage en aluminium.

Figure 5 Ouverture de l'emballage de la Flow Cell



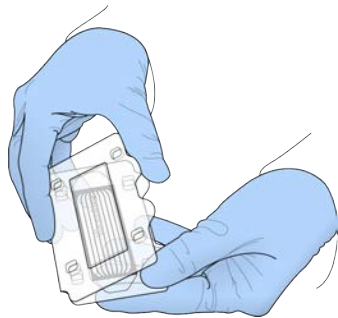
- 5 Sortez l'emballage double coque de son emballage en aluminium.

Figure 6 Retrait de l'emballage en aluminium



- 6 Ouvrez l'emballage double coque et sortez la Flow Cell.

Figure 7 Retrait de la Flow Cell de l'emballage double coque



- 7 Nettoyez la Flow Cell avec un chiffon non pelucheux imbibé d'alcool.
- 8 Séchez à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- 9 Réservez à température ambiante.

Décongélation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Retirez la plaque des réactifs du cBot de son lieu de stockage à une température entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19 °C à 25 °C) pendant au moins 60 minutes.
Les plaques des réactifs doivent être utilisées le jour même de leur décongélation.

Décongélation des réactifs EPX1, EPX2, EPX3 et RSB

- 1 Retirez un tube de chacun des réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C.
 - ▶ **Trousse single-pack** : EPX1, EPX2, EPX3 et RSB. Chaque tube contient suffisamment de réactifs pour une Flow Cell.
 - ▶ **Trousse 10-pack** : EPX1M, EPX2M, EPX3M et RSB. Chaque tube contient suffisamment de réactifs pour quatre Flow Cell.
- 2 Décongelez à température ambiante pendant 10 minutes.
- 3 Réservez sur de la glace.

Préparation d'une nouvelle dilution de NaOH

- 1 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse :
 - ▶ Eau de laboratoire (900 µl)
 - ▶ Stock de NaOH 1 N (100 µl)Ces volumes permettent d'obtenir 1 ml de NaOH 0,1 N.
- 2 Inversez pour mélanger.

Dénaturation des bibliothèques et ajout d'un contrôle PhiX facultatif

La concentration de chargement d'une bibliothèque dépend de la bibliothèque à séquencer. Les instructions suivantes s'appliquent aux bibliothèques d'ADN Nano TruSeq (350 pb) ou d'ADN sans PCR TruSeq (350 pb). Diluez à une concentration appropriée pour le type de bibliothèque.

- ▶ Une concentration de chargement d'ADN trop élevée entraîne une réduction du %PF.

- ▶ Une trop faible concentration de chargement d'ADN entraîne une réduction du %PF ainsi qu'un pourcentage élevé de doublons qui affecte négativement la profondeur de couverture.

Répétez les instructions suivantes pour chaque Flow Cell à séquencer.

- Diluez la librairie ou le groupement de librairies à la concentration appropriée :
 - ▶ **Librairies d'ADN Nano TruSeq** : diluez en une solution de 2–3 nmol dans le RSB.
 - ▶ **Librairies d'ADN sans PCR TruSeq** : diluez en une solution de 1–2 nmol dans le RSB.
- [Facultatif]** Préparez des librairies *non dénaturées* en y ajoutant une substance de contrôle PhiX d'Illumina *non dénaturée* dans un rapport de 1 % :
 - ▶ **Librairies d'ADN Nano TruSeq** : ajoutez 0,5 µl de contrôle PhiX à 2–3 nmol à 50 µl d'une librairie à 2–3 nmol.
 - ▶ **Librairies d'ADN sans PCR TruSeq** : ajoutez 0,5 µl de contrôle PhiX à 1-2 nmol à 50 µl d'une librairie à 1-2 nmol.
- Numérotez les tubes d'une barrette de huit tubes :
 - ▶ Pour générer des amplifiats avec suivi des échantillons : étiquetez les tubes du n° 8 au n° 1 en partant de l'extrémité où se trouve la clé.



- ▶ Pour générer des amplifiats sans suivi des échantillons : étiquetez les tubes du n° 1 au n° 8. Si vous préparez quatre Flow Cell, pensez à ajouter un autre identificateur sur la barrette de huit tubes pour un suivi adéquat.
- Dénaturez la librairie dans la barrette de huit tubes comme suit :
 - Ajoutez 5 µl de librairie *non dénaturée* au fond de chaque puits.
 - Ajoutez 5 µl de NaOH 0,1 N nouvellement dilué. Pipettez lentement pour mélanger.
 - Incubez à température ambiante pendant 8 minutes.
 - Ajoutez 5 µl de Tris-HCl 200 mmol, pH 8,0. Pipettez lentement pour mélanger.
 - Réservez sur la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à ajouter le mélange principal ExAmp.



ATTENTION

Préparez et ajoutez le mélange principal ExAmp dans un délai de **30 minutes**.

Préparation de la plaque des réactifs cBot

- Inversez pour mélanger.
- Agitez pour déloger les éventuelles bulles d'air piégées.
- Tapotez sur une surface dure pour recueillir les gouttelettes de réactif. Vous pouvez également passer la plaque à la centrifugeuse à impulsions.
- Réservez sur de la glace.

Préparation de la réaction ExAmp

Préparez le mélange principal de la réaction ExAmp immédiatement avant utilisation. Suivez les instructions appropriées pour le nombre de Flow Cell que vous préparez.

Réaction ExAmp pour une Flow Cell (trousse Single-pack)

- 1 Inversez les réactifs EPX1 et EPX2 pour les mélanger.
- 2 Centrifugez brièvement les réactifs EPX1, EPX2 et EPX3.
- 3 Préparez le mélange principal ExAmp dans un tube de 1,5 ml comme suit :
 - a Ajoutez 210 µl du réactif EPX1.
 - b Ajoutez 30 µl du réactif EPX2. Pipettez lentement pour mélanger.
 - c Ajoutez 110 µl du réactif EPX3. Pipettez lentement pour mélanger.
 - d Assurez-vous que le fond du tube est exempt de bulles.
- 4 Ajoutez 35 µl du mélange principal au fond de chaque puits de la barrette de huit tubes.
 - ▶ Pipettez lentement pour mélanger.
 - ▶ Changez les pointes entre les échantillons.
- 5 Centrifugez brièvement, puis réservez-la sur la glace pendant 15 minutes maximum, jusqu'à ce que vous soyez prêt à charger le cBot.

Réaction ExAmp pour quatre Flow Cells (trousse 10-pack)

- 1 Renversez le EPX1M et le EPX2M pour les mélanger.
- 2 Centrifugez brièvement les réactifs EPX1M, EPX2M et EPX3M.
- 3 Préparez le mélange principal ExAmp dans un tube de 1,5 ml comme suit :
 - a Ajoutez 756 µl du réactif EPX1M.
 - b Ajoutez 108 µl du réactif EPX2M. Pipettez lentement pour mélanger.
 - c Ajoutez 396 µl du réactif EPX3M. Pipettez lentement pour mélanger.
 - d Assurez-vous que le fond du tube est exempt de bulles.
- 4 Ajoutez 35 µl du mélange principal au fond de chaque puits des barrettes de huit tubes.
 - ▶ Pipettez lentement pour mélanger.
 - ▶ Changez les pointes entre les échantillons.
- 5 Centrifugez brièvement la barrette de huit tubes, puis réservez-la sur la glace pendant 15 minutes maximum, jusqu'à ce que vous soyez prêt à charger le cBot.

Flow Cell HiSeq 3000/4000

Préparez la Flow Cell structurée HiSeq 3000/4000, puis les réactifs de génération d'amplifiats. Pour préparer les réactifs de génération d'amplifiats, décongelez la plaque des réactifs cBot et préparez le mélange réactif principal ExAmp.

À propos des réactifs

- ▶ Les réactifs ExAmp sont visqueux, en particulier EPX2 et EPX3. Aspirez et distribuez les réactifs lentement pour assurer la précision du pipetage.
- ▶ Le réactif EPX3 ne bouge pas lorsqu'il est inversé en raison de sa viscosité.
- ▶ **N'agitez jamais** les réactifs ExAmp et ne les recongelez pas après les avoir décongelés.
- ▶ Le mélange principal ExAmp peut être trouble, ce qui est normal. Si la solution se sépare en une partie trouble et une partie transparente, pipettez-la lentement pour la mélanger.

Préparation de la Flow Cell

- 1 Sortez un nouvel emballage de Flow Cell du lieu de stockage à une température maintenue entre 2 et 8 °C.
- 2 Laissez l'emballage de la Flow Cell à température ambiante pendant au moins 30 minutes.



REMARQUE

Si l'emballage en papier aluminium est intact, la Flow Cell peut rester à température ambiante durant 12 heures. Vous pouvez remettre la Flow Cell emballée au stockage à 2 à 8 °C pour une utilisation ultérieure une seule fois. Évitez les modifications de température répétées de la Flow Cell.

- 3 Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc.
- 4 Retirez l'emballage en aluminium en partant de l'extrémité, à l'aide de l'opercule angulaire. Utilisez la Flow Cell dans les 4 heures suivant l'ouverture de l'emballage en aluminium.

Figure 8 Ouverture de l'emballage de la Flow Cell



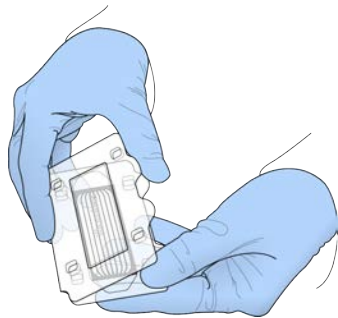
- 5 Sortez l'emballage double coque de son emballage en aluminium.

Figure 9 Retrait de l'emballage en aluminium



- 6 Ouvrez l'emballage double coque et sortez la Flow Cell.

Figure 10 Retrait de la Flow Cell de l'emballage double coque



- 7 Nettoyez la Flow Cell avec un chiffon non pelucheux imbibé d'alcool.
- 8 Séchez à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- 9 Réservez à température ambiante.

Décongélation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Retirez la plaque des réactifs du cBot de son lieu de stockage à une température entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19°C à 25 °C) pendant au moins 60 minutes.
Les plaques des réactifs doivent être utilisées le jour même de leur décongélation.

Décongélation des réactifs EPX1, EPX2, EPX3 et RSB

- 1 Retirez le EPX1, le EPX2, le EPX3 et le RSB de leur lieu de stockage entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez à température ambiante pendant 10 minutes.
- 3 Réservez sur de la glace.

Préparation d'une nouvelle dilution de NaOH

- 1 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse :
 - ▶ Eau de laboratoire (900 µl)
 - ▶ Stock de NaOH 1 N (100 µl)Ces volumes permettent d'obtenir 1 ml de NaOH 0,1 N.
- 2 Inversez pour mélanger.

Dénaturation des librairies et ajout d'un contrôle PhiX facultatif

La concentration de chargement d'une librairie dépend de la librairie à séquencer. Les instructions suivantes s'appliquent aux librairies d'Illumina prises en charge et sous-entendent une taille d'insert type pour le type de librairie associé. Assurez-vous de diluer à une concentration appropriée au type de librairie.

- ▶ Une concentration de chargement d'ADN trop élevée entraîne une réduction du %PF.
 - ▶ Une trop faible concentration de chargement d'ADN entraîne une réduction du %PF ainsi qu'un pourcentage élevé de doublons qui affecte négativement la profondeur de couverture.
- 1 Diluez la librairie ou le groupement de librairies à la concentration appropriée.

Type de librairie	Dilution
ADN sans PCR TruSeq	Diluez à 1 à 2 nmol dans le RSB.
ADN Flex Nextera	Diluez à 2 à 3 nmol dans le RSB.
TruSeq Nano DNA	Diluez à 2 à 3 nmol dans le RSB.
Nextera Rapid Capture Exome	
ARN total à brins TruSeq	
ARNm à brins TruSeq	

- 2 **[Facultatif]** Préparez des librairies *non dénaturées* en y ajoutant une substance de contrôle PhiX d'Illumina *non dénaturée* dans un rapport de 1 %.

Type de librairie	Substance de contrôle
ADN sans PCR TruSeq	Ajoutez 5 µl de contrôle PhiX de 100 à 200 pmol à 45 µl d'une librairie de 1 à 2 nmol.
ADN Flex Nextera	Diluez à 2 à 3 nmol dans le RSB.
TruSeq Nano DNA	Ajoutez 5 µl de contrôle PhiX de 200 à 300 pmol à 45 µl d'une librairie de 2 à 3 nmol.
Nextera Rapid Capture Exome	
ARN total à brins TruSeq	
ARNm à brins TruSeq	

- 3 Numérotez les tubes d'une barrette de huit tubes :
- ▶ Pour générer des amplifiats avec suivi des échantillons : étiquetez les tubes du n° 8 au n° 1 en partant de l'extrémité où se trouve la clé.



- ▶ Pour générer des amplifiats sans suivi des échantillons : étiquetez les tubes du n° 1 au n° 8.

- 4 Dénaturez la librairie dans la barrette de huit tubes comme suit :
- a Ajoutez 5 µl de librairie *non dénaturée* au fond de chaque puits.
 - b Ajoutez 5 µl de NaOH 0,1 N nouvellement dilué. Pipettez lentement pour mélanger.
 - c Incubez à température ambiante pendant 8 minutes.
 - d Ajoutez 5 µl de Tris-HCl 200 mmol, pH 8,0. Pipettez lentement pour mélanger.
- 5 Réservez sur la glace pendant 30 minutes maximum, jusqu'à ce que vous soyez prêt à ajouter le mélange principal ExAmp.

Préparation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Agitez pour déloger les éventuelles bulles d'air piégées.
- 3 Tapotez sur une surface dure pour recueillir les gouttelettes de réactif. Vous pouvez également passer la plaque à la centrifugeuse à impulsions.
- 4 Réservez sur de la glace.

Préparation de la réaction ExAmp

Préparez le mélange principal de la réaction ExAmp immédiatement avant utilisation.

- 1 Inversez les réactifs EPX1 et EPX2 pour les mélanger.
- 2 Centrifugez brièvement les réactifs EPX1, EPX2 et EPX3.
- 3 Préparez le mélange principal ExAmp dans un tube de 1,5 ml comme suit :
 - a Ajoutez 210 µl du réactif EPX1.
 - b Ajoutez 30 µl du réactif EPX2. Pipettez lentement pour mélanger.
 - c Ajoutez 110 µl du réactif EPX3. Pipettez lentement pour mélanger.
Assurez-vous que le fond du tube est exempt de bulles.
- 4 Ajoutez 35 µl du mélange principal au fond de chaque puits de la barrette de huit tubes.
 - ▶ Pipettez lentement pour mélanger.
 - ▶ Changez les pointes entre les échantillons.
- 5 Bouchez les tubes et centrifugez-les brièvement.
- 6 Réservez sur la glace pendant 15 minutes maximum, jusqu'à ce que vous soyez prêt à charger le cBot.

Flow Cell HiSeq à débit élevé

Pour préparer les réactifs, décongelez et inspectez la plaque des réactifs. Environ 60 minutes sont nécessaires pour décongeler la plaque des réactifs dans un bain d'eau à température ambiante. Vous pouvez également décongeler les réactifs entre 2 et 8 °C pendant une nuit entière, sans dépasser 16 heures.



REMARQUE

Lorsque vous agitez ou retournez la plaque des réactifs cBot, gardez une main sur le dessus de la plaque.

Décongélation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Retirez la plaque des réactifs du cBot de son lieu de stockage à une température entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19 °C à 25 °C) pendant au moins 60 minutes.
Les plaques des réactifs doivent être utilisées le jour même de leur décongélation.

Préparation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Agitez pour déloger les éventuelles bulles d'air piégées.
- 3 Tapotez sur une surface dure pour recueillir les gouttelettes de réactif. Vous pouvez également passer la plaque à la centrifugeuse à impulsions.
- 4 **Pour les réactifs TruSeq v3**, assurez-vous que les tubes ne contiennent pas de bulles d'air, qu'ils sont bien en place et qu'ils sont alignés conformément à leur numérotation.
- 5 Procédez immédiatement à la configuration du système cBot.
- 6 Si vous effectuez le séquençage des bibliothèques Nextera sur une Flow Cell TruSeq v3, passez à la section *Préparation du HP10 (TruSeq v3)* avant de configurer le cBot.

Préparation du HP10 (TruSeq v3)

Préparez le HP10 à utiliser sur le cBot uniquement lors de l'utilisation de bibliothèques Nextera sur une Flow Cell TruSeq v3. Le HP10 est également compatible avec d'autres types de bibliothèques d'Illumina.

- 1 Retirez le primer HP10 de son lieu de stockage à une température entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez-le dans un bécher contenant de l'eau désionisée à température ambiante pendant 20 minutes.
- 3 Ajoutez 150 µl de HP10 dans chacun des tubes d'une barrette de huit tubes.
- 4 Réservez sur de la glace.
- 5 Procédez immédiatement à la configuration du système cBot.

Flow Cell HiSeq Rapid

Pour préparer les réactifs, décongelez et inspectez la plaque des réactifs. Environ 60 minutes sont nécessaires pour décongeler la plaque des réactifs dans un bain d'eau à température ambiante. Vous pouvez également décongeler les réactifs entre 2 et 8 °C pendant une nuit entière, sans dépasser 16 heures.



REMARQUE

Lorsque vous agitez ou retournez la plaque des réactifs cBot, gardez une main sur le dessus de la plaque.

Décongélation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Retirez la plaque des réactifs du cBot de son lieu de stockage à une température entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19 °C à 25 °C) pendant au moins 60 minutes.
Les plaques des réactifs doivent être utilisées le jour même de leur décongélation.

Préparation de la plaque des réactifs cBot

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Agitez pour déloger les éventuelles bulles d'air piégées.
- 3 Tapotez sur une surface dure pour recueillir les gouttelettes de réactif. Vous pouvez également passer la plaque à la centrifugeuse à impulsions.
- 4 Procédez immédiatement à la configuration du système cBot.

Chapitre 4 Génération d'amplifiats avec suivi des échantillons

Introduction	22
Flux de travail de la génération d'amplifiats avec suivi des échantillons	23
Lavage avant analyse	23
Chargement des consommables	24
Chargement du collecteur	26
Sélection du protocole	28
Numérisation des consommables	28
Vérification avant analyse	29
Surveillance de l'analyse	29
Déchargement des composants de l'analyse	31
Lavage après analyse	32
Confirmation de la distribution des réactifs (facultatif)	32

Introduction

Il est possible de générer des amplifiats avec un suivi d'échantillons pour toutes les Flow Cells HiSeq. Toutes les étapes de génération d'amplifiats sont effectuées sur le système cBot, à l'exception de la préparation de bibliothèques pour le séquençage et de la préparation des réactifs. La génération d'amplifiats pour une Flow Cell HiSeq Rapid v2 consiste simplement en l'hybridation et en la première extension du modèle. Les étapes restantes sont effectuées sur le HiSeq.

La configuration du système cBot pour la génération d'amplifiats avec suivi des échantillons comprend des étapes de chargement des composants de l'analyse, de sélection d'un protocole et de numérisation des consommables. Les lecteurs internes enregistrent les entrées obligatoires, telles que les identifiants des réactifs et de la Flow Cell, après le chargement des consommables et la fermeture du couvercle de l'instrument. La saisie manuelle et l'entrée effectuées par le système sont affichées sur l'écran si nécessaire.

Pour plus de renseignements sur la configuration de votre cBot pour le suivi des échantillons, consultez le *Guide de configuration du système cBot (document n° 1000000005301)*.

Préparation des bibliothèques

Avant de configurer le système cBot pour la génération d'amplifiats, préparez les bibliothèques pour le séquençage. La procédure diffère selon le type de bibliothèque et le type de Flow Cell.

- ▶ La plupart des bibliothèques sur les Flow Cells TruSeq et HiSeq nécessitent une étape de dénaturation et de dilution. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de dénaturation et de dilution de bibliothèques des systèmes HiSeq (document n° 15050107)*.
- ▶ Le protocole de dénaturation diffère pour les Flow Cells structurées HiSeq X et HiSeq 3000/4000. Dénaturez les bibliothèques à utiliser avec ces types de Flow Cell **uniquement** comme décrit dans les instructions de préparation des réactifs pour votre type de Flow Cell. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Préparation des réactifs à la page 12*.

Flux de travail de la génération d'amplifiats avec suivi des échantillons



Préparez la plaque des réactifs et la Flow Cell. Consultez la section *Préparation des réactifs* à la page 12.



Préparez des bibliothèques pour le séquençage et chargez les bibliothèques dans une barrette de huit tubes portant un code à barres.



Réalisez un lavage avant analyse.



Chargez les consommables et le collecteur du cBot puis fermez le couvercle de l'instrument.



Sélectionnez un protocole et numérisez les consommables.



Sélectionnez **Pre-Run Check** (Vérification avant analyse) pour lancer la vérification avant analyse automatisée.



Sélectionnez **Start** (Démarrer). Surveillez la progression de l'analyse sur l'écran Run Status (État de l'analyse).



[Facultatif] Déchargez les composants de l'analyse et confirmez la distribution des réactifs.



Effectuez un lavage après analyse.

Lavage avant analyse

Il est recommandé d'effectuer un lavage avant de générer des amplifiats sur le cBot.

- 1 Sélectionnez **User Name** (Nom d'utilisateur).
- 2 À l'aide du clavier à l'écran, tapez votre nom, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Sélectionnez **Start** (Démarrer).
- 4 Si la case **Manifold removed** (Collecteur retiré) n'est pas cochée sur l'écran Wash (Lavage), retirez le collecteur.

- 5 Soulevez délicatement le couvercle de l'instrument par la découpe située à l'avant du couvercle.
- 6 Remplissez le réservoir de lavage avec environ 12 ml d'eau désionisée.
- 7 Fermez le couvercle de l'instrument.
- 8 Cochez la case **Reservoir filled with water** (Réservoir rempli d'eau).
- 9 Sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 10 Lorsque le lavage est terminé, épongez tout excès d'eau dans le réservoir de lavage avec un tissu non pelucheux.

Figure 11 Sécher le réservoir de lavage



- 11 Cochez la case **Wash reservoir dry** (Réservoir de lavage sec).
- 12 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Chargement des consommables

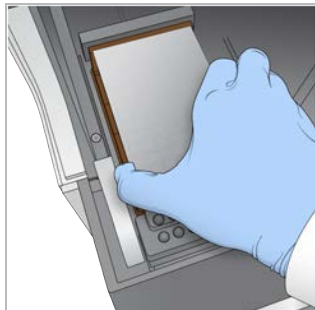
À partir de l'écran Load Consumables (Charger les consommables), suivez les instructions ci-dessous pour charger la plaque des réactifs cBot, la Flow Cell et la barrette de huit tubes avec l'étiquette du code à barres contenant les bibliothèques préparées. Selon le protocole que vous avez choisi, le logiciel peut vous inviter à charger une barrette de huit tubes contenant des primers supplémentaires.

Chargement de la plaque des réactifs

- 1 Retirez le couvercle en plastique transparent de la plaque des réactifs cBot.
- 2 Si la plaque des réactifs contient des barrettes de huit tubes, appuyez doucement sur les tubes afin de vous assurer qu'ils sont bien installés.
- 3 Soulevez le couvercle de l'instrument.
- 4 **[Pour les réactifs de TruSeq v3]** Retirez l'opercule en aluminium blanc comme suit.
 - a Maintenez chaque extrémité de la barrette de tubes de la rangée 10 et retirez l'opercule en aluminium blanc de la barrette de huit tubes. Éliminez l'opercule comme il convient.
 - b Cochez la case pour indiquer que l'opercule a été retiré.
- 5 Tirez le levier de la plaque des réactifs vers vous et placez la plaque des réactifs sur la platine des réactifs.
 - ▶ **HiSeq à débit élevé (TruSeq v3)** : disposez la plaque de sorte que la rangée 1 se trouve directement derrière les supports des barrettes de tubes. Le coin biseauté de la plaque est positionné dans le coin avant droit.

- ▶ **Toutes les plaques de réactifs, sauf les plaques HiSeq à débit élevé (TruSeq v3) :** disposez la plaque de sorte que l'étiquette code à barres soit orientée vers l'arrière de l'instrument. Les coins biseautés de la plaque sont positionnés directement derrière les supports des barrettes de tubes.

Figure 12 Positionner la plaque des réactifs



- 6 Libérez le levier pour fixer la plaque des réactifs.

Chargement de la Flow Cell

- 1 Soulevez la pince de Flow Cell.
- 2 Lavez la plaque d'adaptateur de la platine thermique avec une petite quantité d'eau désionisée.
- 3 Séchez à l'aide d'un tissu non pelucheux.
Ne laissez aucun liquide couler à l'intérieur de l'instrument.
- 4 Retirez la Flow Cell de son lieu de stockage :
 - ▶ **Toutes les Flow Cells, sauf HiSeq X et HiSeq 3000/4000 :** retirez la Flow Cell du tube de stockage à l'aide d'une pince en plastique. Rincez-la à l'eau désionisée, puis séchez-la en effectuant un mouvement de brossage avec un chiffon pour nettoyage de lentilles. Réservez le tube et le tampon pour un stockage ultérieur.
 - ▶ **Flow Cells HiSeq X et HiSeq 3000/4000 :** la Flow Cell structurée est prête à être utilisée après sa préparation.
- 5 Positionnez la Flow Cell sur la platine thermique, les orifices de ses ports orientés vers le *haut*. La ligne 1 se trouve du côté droit avec l'angle sectionné.

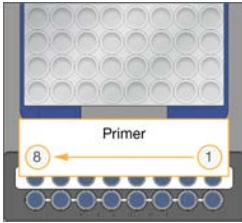
Chargement des modèles

- 1 Chargez la barrette de huit tubes contenant les librairies préparées dans la rangée Template (Modèle) du support de la barrette de tubes.
Assurez-vous qu'elle est bien en place.
- 2 Procédez comme suit :
 - ▶ Si vous utilisez des primers supplémentaires, consultez la section *Chargement des primers*.
 - ▶ Si vous n'utilisez pas de primers supplémentaires, cochez la case **Consumables Loaded** (Consommables chargés) et passez à la section *Chargement du collecteur à la page 26*.

Chargement des primers

L'écran Load Primers (Charger les primers) s'affiche pour les flux de travail autorisant des primers personnalisés ou nécessitant des primers supplémentaires. Pour séquencer des librairies Nextera sur une Flow Cell TruSeq v3, vous devez charger une barrette de huit tubes contenant du HP10.

- 1 Chargez la barrette de huit tubes contenant les primers dans la rangée de primers du support de la barrette de tubes.
Les tubes sont numérotés de droite à gauche pour être alignés sur l'orientation des lignes de la Flow Cell.



HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq v4
et TruSeq v3 (HiSeq)

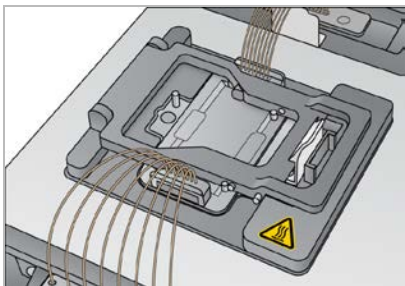
- 2 Cochez la case **Consumables Loaded** (Consommables chargés).
- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Chargement du collecteur

À l'écran Manifold (Collecteur), chargez le collecteur fourni dans la même trousse d'amplifiats que la Flow Cell.

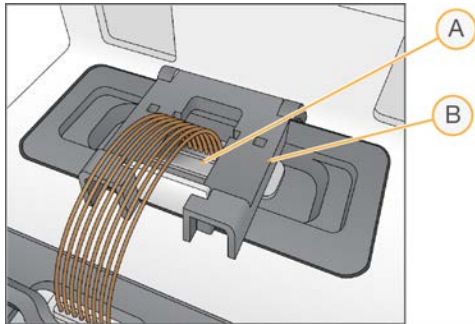
- 1 Inspectez les dispositifs d'aspiration du peigne d'aspiration pour déceler la présence de dommages. Assurez-vous que les joints en caoutchouc noir sont fixés uniformément.
- 2 Positionnez le collecteur au-dessus de la Flow Cell, le peigne d'aspiration orienté vers l'avant de l'instrument cBot.
- 3 Alignez le collecteur et les broches de guidage sur la platine thermique, puis placez le collecteur sur la Flow Cell.
Placez-le de manière uniforme afin de former un joint serré.
- 4 Cochez la case **Manifold seated over flow cell** (Collecteur placé au-dessus de la Flow Cell).
- 5 Fermez la pince de Flow Cell pour maintenir le collecteur.

Figure 13 Fermer la pince de Flow Cell



- 6 Cochez la case **Flow cell clamp closed** (Pince de Flow Cell fermée).
- 7 Connectez l'extrémité de sortie du collecteur au port de sortie du réservoir de lavage.
Assurez-vous que l'extrémité de sortie est connectée de manière uniforme.

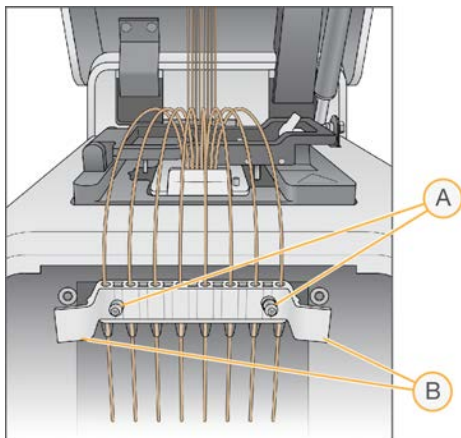
Figure 14 Sécuriser l'extrémité de sortie



- A Port de sortie
- B Pince de sortie

- 8 Maintenez la pince de sortie fermée afin de sécuriser l'extrémité de sortie du collecteur.
- 9 Cochez la case **Outlet clamp closed** (Pince de sortie fermée).
- 10 Alignez le peigne d'aspiration et les deux broches de guidage métalliques à l'avant de la platine thermique.

Figure 15 Sécuriser le peigne d'aspiration



- A Broches de guidage métalliques
- B Onglets en plastique

- 11 Maintenez le peigne d'aspiration en place à l'aide des onglets en plastique situés de part et d'autre du peigne.
- 12 Veillez à ce que les dispositifs d'aspiration soient droits et perpendiculaires à la plaque des réactifs et à ce que la case **Sipper comb in place** (Peigne d'aspiration en place) soit cochée.
- 13 Fermez le couvercle de l'instrument, puis sélectionnez **Next** (Suivant).



ATTENTION

Ne rouvrez pas le couvercle si le logiciel ne vous le propose pas. Si le couvercle est ouvert, chaque consommable doit être à nouveau numérisé et validé au cours de la vérification avant analyse. Si la validation échoue au cours de la vérification avant analyse, il faut alors annuler l'analyse.

Sélection du protocole

- 1 Sélectionnez **Experiment Name** (Nom de l'expérience).
- 2 À l'aide du clavier à l'écran, tapez le nom de votre expérience, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Sélectionnez la formule qui convient à votre expérience dans la liste des protocoles.
Faites défiler la liste pour voir tous les protocoles disponibles.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Numérisation des consommables

Des lecteurs de codes à barres internes numérisent et enregistrent les identifiants de tous les consommables. Pour chaque numérisation, le logiciel vous guide à travers une série d'écrans, en commençant par l'écran Reagents (Réactifs). Lorsque la numérisation est réussie, l'identifiant du consommable apparaît à l'écran.

- 1 Sélectionnez **Scan** (Numériser), puis **Next** (Suivant) pour chacun des écrans suivants :
 - ▶ **Reagents** (Réactifs) : enregistre l'identifiant de la trousse de réactifs.
 - ▶ **Flow Cell** : enregistre l'identifiant de la Flow Cell.
 - ▶ **Tube Strips** (Barrettes de tubes) : enregistre l'identifiant du modèle de bibliothèques.
- 2 Si vous utilisez des primers personnalisés ou supplémentaires, enregistrez le nom du primer comme suit :
 - a Sélectionnez **Enter Primer Name** (Saisir le nom du primer) à l'écran Primers.
 - b À l'aide du clavier à l'écran, tapez le nom du primer, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Sélectionnez **Pre Check** (Pré vérification).

Erreurs de numérisation

En cas d'échec d'une numérisation, suivez les étapes ci-dessous.

- 1 Ouvrez le couvercle de l'instrument et retirez le consommable concerné par l'erreur.
- 2 Essuyez le code à barres avec un tissu nettoyant non pelucheux.
- 3 Chargez à nouveau le consommable et fermez le couvercle.
- 4 Sélectionnez **Scan** (Numériser) pour recommencer la numérisation.
- 5 Si la numérisation échoue encore deux fois, suivez les étapes 6 à 8. Sinon, passez à la configuration de l'analyse.
- 6 Ouvrez le couvercle de l'instrument et retirez le consommable.
- 7 Sélectionnez **Scan** (Numériser) pour activer le lecteur de codes à barres externe, puis numérisez le code à barres du consommable. Vous pouvez également sélectionner l'icône du clavier, taper l'identifiant puis sélectionner **Enter** (Entrée).
Un bip signale que la numérisation a réussi et l'identifiant apparaît à l'écran.



REMARQUE

Un suivi positif des échantillons n'a lieu que pour les consommables numérisés en interne. Lorsque vous utilisez le lecteur de codes à barres externe ou le clavier à l'écran pour enregistrer l'identifiant d'un consommable, le suivi des échantillons s'arrête pour ce consommable.

- 8 Rechargez le consommable et fermez le couvercle pour passer à la configuration de l'analyse.

Vérification avant analyse

La vérification avant analyse lit les capteurs de l'instrument pour détecter si les composants de l'analyse sont installés correctement. Elle effectue ensuite une vérification du flux à l'aide de capteurs à bulles afin de détecter la présence d'air dans les tubes. Si le couvercle était ouvert après l'écran Manifold (Collecteur), la vérification avant analyse numérise à nouveau les consommables et vérifie que les identifiants des consommables correspondent à la numérisation initiale.

La vérification avant analyse dure approximativement 3 minutes.

- 1 Après avoir correctement effectué une vérification avant analyse, sélectionnez **Start** (Démarrer). L'écran Run Status (État de l'analyse) s'ouvre et l'analyse démarre.

Erreurs de composants de l'analyse

Si la vérification avant analyse échoue en raison d'erreurs liées aux composants de l'analyse ou au couvercle resté ouvert, suivez les étapes ci-dessous :

- 1 Vérifiez chaque composant de l'analyse associé à une erreur pour vous assurer de son existence et de son bon chargement.
- 2 Sélectionnez **Rerun Check** (Relancer la vérification) pour recommencer la vérification.
- 3 Si la vérification échoue à nouveau, sélectionnez **Cancel Run** (Annuler l'analyse) pour terminer l'analyse et en configurer une nouvelle.

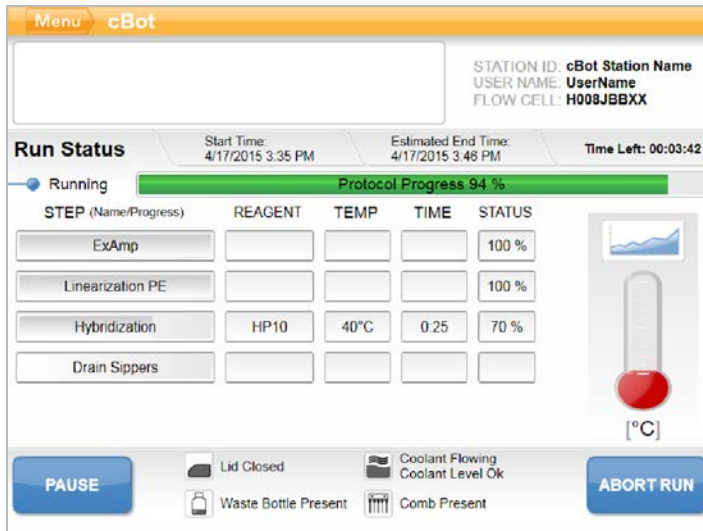
Échec de la vérification du flux

L'échec de la vérification du flux peut être provoqué par le mauvais chargement d'une Flow Cell, un collecteur défectueux ou une obstruction dans les lignes. Avant de contourner la vérification du flux, consultez la section *Résolution du problème de l'échec de la vérification du flux* à la page 52.

Surveillance de l'analyse

- 1 Utilisez l'écran Run Status (État de l'analyse) afin de surveiller l'analyse en cours. L'écran Run Status (État de l'analyse) vous communique l'état de l'analyse et les détails suivants :
 - ▶ Date et heure de début, date et heure de fin et temps restant
 - ▶ Étapes du protocole de génération d'amplifiats avec barre d'état pour chaque étape
 - ▶ Réactif actuellement en cours d'utilisation
 - ▶ Température actuelle (°C)
 - ▶ État de la commande à l'étape actuelle

Figure 16 Écran Run Status (État de l'analyse)



- 2 Attendez la fin de l'analyse :
 - ▶ HiSeq v4, HiSeq 3000/4000 PE ou HiSeq X : prévoyez environ 3 heures.
 - ▶ HiSeq 3000/4000 SR : prévoyez environ 4 heures.
 - ▶ HiSeq Rapid v2 : prévoyez environ 1 heure.
 - ▶ TruSeq v3 : prévoyez environ 5 heures.
- 3 Une fois l'analyse terminée, vous pouvez laisser la Flow Cell sur l'instrument pendant la nuit. Sinon, passez à la section *Déchargement des composants de l'analyse*. L'instrument cBot 2 maintient la Flow Cell à 20 °C.

Rapport sur les données de l'analyse

Le rapport sur les données de l'analyse fournit un résumé de l'analyse en cours. Il répertorie les renseignements suivants :

- ▶ Nom du protocole
- ▶ Identifiant de la Flow Cell
- ▶ Identifiant de réactif
- ▶ Nom du modèle
- ▶ Heure de démarrage et de fin

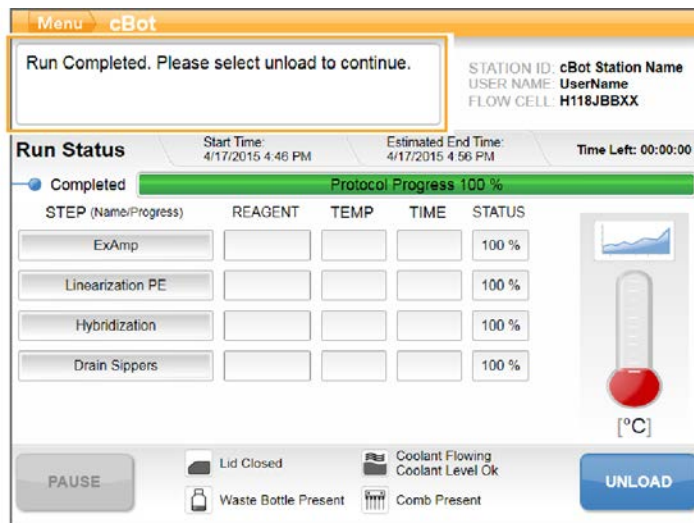
À la fin de l'analyse, le rapport sur les données de l'analyse s'ouvre automatiquement pour signaler que l'analyse est terminée.

- 1 Pour voir le rapport pendant l'analyse, sélectionnez **Menu** (Menu) | **Run Data** (Données de l'analyse).

Déchargement des composants de l'analyse

- 1 Lorsque l'analyse est terminée, sélectionnez **Unload** (Décharger) pour continuer.

Figure 17 Analyse terminée, décharger les composants



- 2 Soulevez le couvercle de l'instrument.
- 3 Relâchez la pince de sortie sécurisant l'extrémité de sortie du collecteur.
- 4 Déconnectez l'extrémité de sortie du collecteur du port de sortie du réservoir de lavage.
- 5 Retirez le peigne d'aspiration des broches de guidage métalliques à l'aide des onglets en plastique sur chaque côté du peigne d'aspiration.
- 6 Relâchez la pince de Flow Cell.
- 7 Retirez le collecteur.
Vérifiez que la Flow Cell se trouve toujours sur la platine thermique.
- 8 Soulevez la Flow Cell de la platine thermique.
- 9 Stockez la Flow Cell comme il convient :
 - ▶ **Flow Cell TruSeq v3 et HiSeq v4** : stockez dans un tampon de stockage dans le tube de Flow Cell à une température comprise entre 2 et 8 °C. La Flow Cell reste stable jusqu'à 10 jours après l'hybridation du primer lorsqu'elle est correctement stockée dans son tube.
 - ▶ **Flow Cell HiSeq Rapid v2** : effectuez l'analyse de séquençage le même jour que le chargement de la librairie.
 - ▶ **Flow Cell HiSeq X et HiSeq 3000/4000** : stockez dans un tampon de stockage pendant 48 heures maximum à une température de 2 à 8 °C.
- 10 Pour relâcher la plaque des réactifs, tirez son levier vers vous.
- 11 Retirez la plaque des réactifs de la platine des réactifs.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire, adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur.

Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

- 12 Retirez la barrette de huit tubes contenant les librairies.
- 13 Le cas échéant, retirez la barrette de huit tubes contenant les primers supplémentaires.
- 14 Cochez la case afin d'indiquer que vous avez déchargé les réactifs, les modèles et les primers.
- 15 Choisissez une option de lavage :
 - ▶ Sélectionnez **Wash** (Laver) afin de procéder au lavage après analyse.
 - ▶ Sélectionnez **Exit** (Quitter) pour contourner le lavage après analyse, si l'option de contournement est disponible.

Lavage après analyse

- 1 Lavez la plaque située sur la platine thermique avec de l'eau désionisée afin de retirer tout résidu salin.
- 2 Séchez à l'aide d'un tissu nettoyant non pelucheux.
- 3 Mettez dans le réservoir de lavage environ 12 ml d'eau désionisée et fermez le couvercle de l'instrument.
- 4 Cochez la case pour indiquer la présence de l'eau, puis sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 5 Lorsque le lavage est terminé, épongez tout excès d'eau dans le réservoir de lavage. Prenez soin de ne pas frotter les ports de sortie pour éviter que des fibres ne bouchent les orifices.
- 6 Cochez la case pour indiquer que le réservoir de lavage est sec, puis sélectionnez **Exit** (Quitter). L'écran Start (Démarrer) s'ouvre et le cBot 2 est prêt pour une autre analyse.

Confirmation de la distribution des réactifs (facultatif)

Vous pouvez confirmer la distribution de chaque réactif provenant de la plaque des réactifs fournie dans la trousse HiSeq à débit élevé (TruSeq v3).

- 1 Examinez les opercules en aluminium de chaque barrette de tubes pour vous assurer que tous sont percés.
- 2 Retirez chaque barrette de tubes de la base de la plaque des réactifs de la façon suivante :
 - a Tenez fermement la plaque des réactifs en plaçant le bout de vos doigts sous la base.
 - b Poussez délicatement vers le haut les tubes centraux de la barrette de tubes.
- 3 Inspectez chaque tube pour confirmer qu'il contient un volume similaire restant. Il est normal de constater de légères différences.

Figure 18 Exemple de distribution réussie des réactifs (Flow Cell à huit lignes)

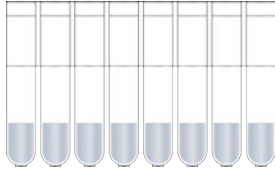
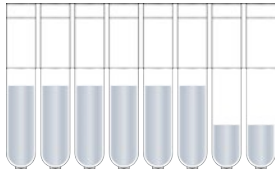


Figure 19 Exemple de distribution réussie des réactifs (Flow Cell à deux lignes)



- 4 Si la distribution des réactifs a échoué et que les opercules d'aluminium des tubes sont percés, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
- 5 Inspectez la barrette de huit tubes contenant le modèle de librairie.
- 6 Si vous avez utilisé des primers supplémentaires pour votre analyse, inspectez les barrettes de huit tubes les contenant.

Chapitre 5 Génération d'amplifiats sans suivi des échantillons

Introduction	34
Flux de travail de la génération d'amplifiats sans suivi des échantillons	34
Lavage avant analyse	35
Sélection du protocole	36
Chargement des consommables	36
Vérification avant analyse	40
Surveillance de l'analyse	40
Déchargement des composants de l'analyse	42
Lavage après analyse	43
Confirmation de la distribution des réactifs (facultatif)	43

Introduction

Toutes les étapes de génération d'amplifiats sont effectuées sur le système cBot, à l'exception de la préparation de bibliothèques pour le séquençage et de la préparation de la plaque des réactifs du cBot. La génération d'amplifiats pour une Flow Cell rapide consiste simplement en l'hybridation et en la première extension du modèle. Les étapes restantes sont effectuées sur l'appareil de séquençage.

La configuration du système cBot pour la génération d'amplifiats sans suivi des échantillons comprend la sélection d'un protocole, puis le chargement des consommables. Tous les consommables sont numérisés à l'aide du lecteur de code à barres externe ou saisis manuellement.

Préparation des bibliothèques

Avant de configurer le système cBot pour la génération d'amplifiats, préparez les bibliothèques pour le séquençage. La procédure diffère selon le type de bibliothèque et le type de Flow Cell.

- ▶ La plupart des bibliothèques sur les Flow Cells TruSeq et HiSeq nécessitent une étape de dénaturation et de dilution. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de dénaturation et de dilution de bibliothèques des systèmes HiSeq (document n° 15050107)*.
- ▶ Le protocole de dénaturation diffère pour les Flow Cells structurées HiSeq X et HiSeq 3000/4000. Dénaturez les bibliothèques à utiliser avec ces types de Flow Cell **uniquement** comme décrit dans les instructions de préparation des réactifs pour votre type de Flow Cell. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Préparation des réactifs à la page 12*.

Flux de travail de la génération d'amplifiats sans suivi des échantillons



Préparez la plaque des réactifs et la Flow Cell. Consultez la section *Préparation des réactifs à la page 12*.



Préparez des bibliothèques pour le séquençage et chargez les bibliothèques dans une barrette de huit tubes.



Réalisez un lavage avant analyse.



Sélectionnez un protocole, numérisiez et chargez les consommables, puis chargez les barrettes de tubes contenant les librairies préparées.



Sélectionnez **Pre-Run Check** (Vérification avant analyse) pour lancer la vérification avant analyse automatisée.



Sélectionnez **Start** (Démarrer). Surveillez la progression de l'analyse sur l'écran Run Status (État de l'analyse).



Déchargez les composants de l'analyse et vérifiez la distribution des réactifs.



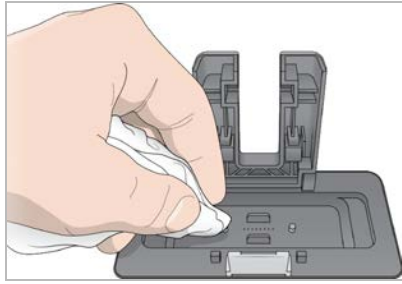
Effectuez un lavage après analyse.

Lavage avant analyse

Il est recommandé d'effectuer un lavage avant de générer des amplifiats sur le cBot.

- 1 Sélectionnez **User Name** (Nom d'utilisateur).
- 2 À l'aide du clavier à l'écran, tapez votre nom, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Sélectionnez **Start** (Démarrer).
- 4 Si la case **Manifold removed** (Collecteur retiré) n'est pas cochée sur l'écran Wash (Lavage), retirez le collecteur.
- 5 Soulevez délicatement le couvercle de l'instrument par la découpe située à l'avant du couvercle.
- 6 Remplissez le réservoir de lavage avec environ 12 ml d'eau désionisée.
- 7 Fermez le couvercle de l'instrument.
- 8 Cochez la case **Réservoir filled with water** (Réservoir rempli d'eau).
- 9 Sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 10 Lorsque le lavage est terminé, épongez tout excès d'eau dans le réservoir de lavage avec un tissu non pelucheux.

Figure 20 Sécher le réservoir de lavage



- 11 Cochez la case **Wash reservoir dry** (Réservoir de lavage sec).
- 12 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Sélection du protocole

- 1 Sélectionnez **Experiment Name** (Nom de l'expérience).
- 2 À l'aide du clavier à l'écran, tapez le nom de votre expérience, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Sélectionnez la formule qui convient à votre expérience dans la liste des protocoles.
Faites défiler la liste pour voir tous les protocoles disponibles.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Chargement des consommables

Le logiciel vous guide à travers les étapes de chargement de la plaque des réactifs du cBot, de la Flow Cell, du collecteur du cBot et des barrettes de huit tubes contenant les bibliothèques préparées. Selon le protocole de génération d'amplifiats que vous avez choisi, le logiciel peut vous inviter à charger une barrette de huit tubes contenant des primers supplémentaires.

Chargement de la plaque des réactifs

- 1 Retirez le couvercle en plastique transparent de la plaque des réactifs cBot.
- 2 Sélectionnez **Scan Reagent ID** (Numériser l'identifiant de réactif) pour activer le lecteur de codes à barres externe.
- 3 Soulevez délicatement le couvercle de l'instrument par la découpe située à l'avant du couvercle.
- 4 **[Pour les réactifs de TruSeq v3]** Retirez l'opercule en aluminium blanc comme suit.
 - a Maintenez chaque extrémité de la barrette de tubes de la rangée 10 et retirez l'opercule en aluminium blanc de la barrette de huit tubes. Éliminez l'opercule comme il convient.
 - b Cochez la case pour indiquer que l'opercule a été retiré.
- 5 Tirez le levier de la plaque des réactifs vers vous et placez la plaque des réactifs sur la platine des réactifs :
 - **HiSeq à débit élevé (TruSeq v3)** : disposez la plaque de sorte que la rangée 1 se trouve directement derrière les supports des barrettes de tubes. Le coin biseauté de la plaque est positionné dans le coin avant droit.

- ▶ **Toutes les plaques de réactifs, sauf les plaques HiSeq à débit élevé (TruSeq v3)** : disposez la plaque de sorte que l'étiquette code à barres soit orientée vers l'arrière de l'instrument. Les coins biseautés de la plaque sont positionnés directement derrière les supports des barrettes de tubes.

Figure 21 Positionner la plaque des réactifs



- 6 Libérez le levier pour fixer la plaque des réactifs.
- 7 Cochez la case pour indiquer que la plaque des réactifs est chargée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Chargement de la Flow Cell

- 1 Soulevez la pince de Flow Cell.
- 2 Lavez la plaque d'adaptateur de la platine thermique avec une petite quantité d'eau désionisée.
- 3 Séchez à l'aide d'un tissu nettoyant non pelucheux.
- 4 Retirez la Flow Cell de son lieu de stockage :
 - ▶ **Toutes les Flow Cells, sauf HiSeq X et HiSeq 3000/4000** : retirez la Flow Cell du tube de stockage à l'aide d'une pince en plastique. Rincez la Flow Cell avec de l'eau désionisée et séchez-la doucement avec un chiffon pour nettoyage de lentilles. Réservez le tube et le tampon pour un stockage ultérieur.
 - ▶ **Flow Cells HiSeq X et HiSeq 3000/4000** : la Flow Cell structurée est prête à être utilisée après sa préparation.
- 5 Sélectionnez **Scan Flow Cell ID** (Numériser l'identifiant de la Flow Cell) pour activer le lecteur de codes à barres externe .
- 6 Numériser l'identifiant de la Flow Cell en maintenant le tube ou l'emballage étiquetés de la Flow Cell à proximité du plateau du lecteur, le code à barres orienté vers l'instrument.
- 7 Positionnez la Flow Cell sur la platine thermique, les orifices de ses ports orientés vers le **haut**. La ligne 1 se trouve du côté droit avec l'angle sectionné.
- 8 Cochez la case pour indiquer que la Flow Cell est chargée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Chargement du collecteur

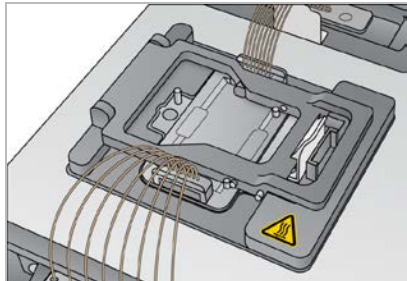
Utilisez le collecteur fourni dans la même trousse d'amplifiats que la Flow Cell.

- 1 Inspectez les dispositifs d'aspiration du peigne d'aspiration pour déceler la présence de dommages. Assurez-vous que les joints en caoutchouc noir sont fixés uniformément.
- 2 Positionnez le collecteur au-dessus de la Flow Cell, le peigne d'aspiration orienté vers l'avant de l'instrument cBot.
- 3 Aligned le collecteur et les broches de guidage sur la platine thermique, puis placez le collecteur sur la Flow Cell.

Placez-le de manière uniforme afin de former un joint serré.

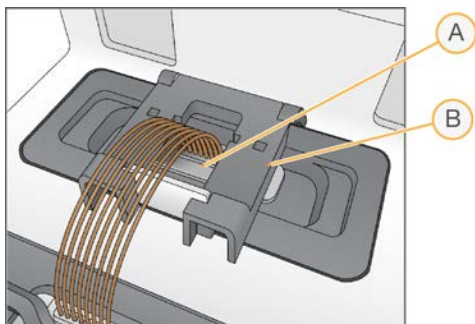
- 4 Cochez la case **Manifold seated over flow cell** (Collecteur placé au-dessus de la Flow Cell).
- 5 Fermez la pince de Flow Cell pour maintenir le collecteur.

Figure 22 Fermer la pince de Flow Cell



- 6 Cochez la case **Flow cell clamp closed** (Pince de Flow Cell fermée).
- 7 Connectez l'extrémité de sortie du collecteur au port de sortie du réservoir de lavage. Assurez-vous que l'extrémité de sortie est connectée de manière uniforme.

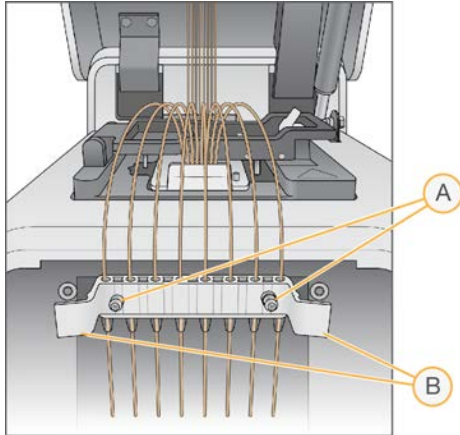
Figure 23 Sécuriser l'extrémité de sortie



- A Port de sortie
- B Pince de sortie

- 8 Maintenez la pince de sortie fermée afin de sécuriser l'extrémité de sortie du collecteur.
- 9 Cochez la case **Outlet clamp closed** (Pince de sortie fermée).
- 10 Alignez le peigne d'aspiration et les deux broches de guidage métalliques à l'avant de la platine thermique.

Figure 24 Sécuriser le peigne d'aspiration



- A Broches de guidage métalliques
- B Onglets en plastique

- 11 Maintenez le peigne d'aspiration en place à l'aide des ongles en plastique situés de part et d'autre du peigne.
Assurez-vous que les dispositifs d'aspiration sont droits et perpendiculaires à la plaque des réactifs.
- 12 Cochez la case (**Peigne d'aspiration en place**), puis sélectionnez **Next** (Suivant).

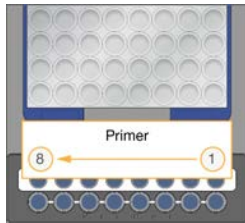
Chargement des modèles

- 1 Sélectionnez **Enter Template Name** (Saisir le nom du modèle).
- 2 À l'aide du clavier à l'écran, tapez l'identifiant du modèle, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Chargez la barrette de huit tubes contenant les bibliothèques préparées dans la rangée des modèles.
- 4 Cochez la case pour indiquer que les modèles sont chargés.
- 5 Si vous utilisez des primers supplémentaires, consultez la section *Chargement des primers*. Dans le cas contraire, fermez le couvercle du cBot et sélectionnez **Next** (Suivant), puis passez à la section *Vérification avant analyse à la page 40*.

Chargement des primers

L'écran Load Primers (Charger les primers) s'affiche pour les flux de travail autorisant des primers personnalisés ou nécessitant des primers supplémentaires. Pour séquencer des bibliothèques Nextera sur une Flow Cell TruSeq v3, vous devez charger une barrette de huit tubes contenant du HP10.

- 1 Sélectionnez **Enter Primer Name** (Saisir le nom du primer).
- 2 À l'aide du clavier à l'écran, tapez le nom du primer, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 Chargez la barrette de huit tubes contenant les primers dans la rangée des primers.
Assurez-vous que l'ordre des tubes numérotés correspond à l'orientation des lignes de la Flow Cell : Les tubes sont numérotés de gauche à droite.



HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq v4 et TruSeq v3 (HiSeq)

- 4 Cochez la case pour indiquer que les primers sont chargés.
- 5 Fermez le couvercle de l'instrument.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérification avant analyse

La vérification avant analyse lit les capteurs de l'instrument pour détecter si les composants de l'analyse sont installés correctement. Elle effectue ensuite une vérification du flux à l'aide de capteurs à bulles afin de détecter la présence d'air dans les tubes. La vérification avant analyse dure approximativement 3 minutes.

- 1 Après avoir correctement effectué une vérification avant analyse, sélectionnez **Start** (Démarrer). L'écran Run Status (État de l'analyse) s'ouvre et l'analyse démarre.

Erreurs de composants de l'analyse

Si la vérification avant analyse échoue en raison d'erreurs liées aux composants de l'analyse, suivez les étapes ci-dessous :

- 1 Vérifiez chaque composant de l'analyse associé à une erreur pour vous assurer de son existence et de son bon chargement.
- 2 Sélectionnez **Rerun Check** (Relancer la vérification) pour recommencer la vérification par capteurs.
- 3 Si la vérification échoue à nouveau, sélectionnez **Cancel Run** (Annuler l'analyse) pour terminer l'analyse et en configurer une nouvelle.

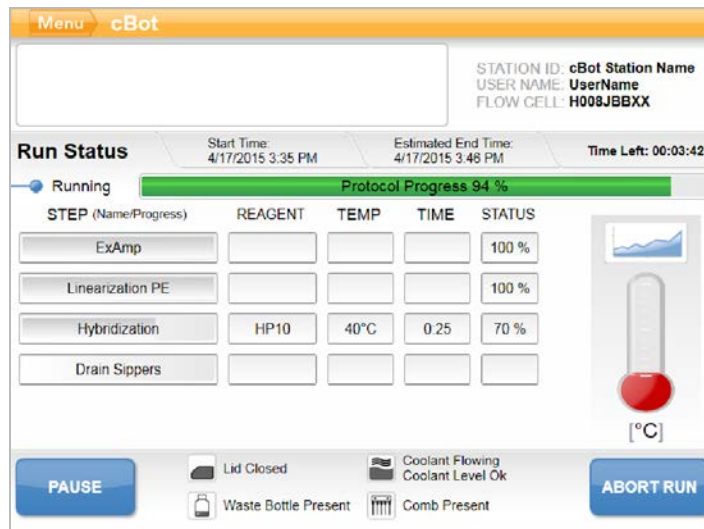
Échec de la vérification du flux

L'échec de la vérification du flux peut être provoqué par le mauvais chargement d'une Flow Cell, un collecteur défectueux ou une obstruction dans les lignes. Avant de contourner la vérification du flux, consultez la section *Résolution du problème de l'échec de la vérification du flux* à la page 52.

Surveillance de l'analyse

- 1 Utilisez l'écran Run Status (État de l'analyse) afin de surveiller l'analyse en cours. L'écran Run Status (État de l'analyse) vous communique l'état de l'analyse et les détails suivants :
 - ▶ Date et heure de début, date et heure de fin et temps restant
 - ▶ Étapes du protocole de génération d'amplifiats avec barre d'état pour chaque étape
 - ▶ Réactif actuellement en cours d'utilisation
 - ▶ Température actuelle (°C)
 - ▶ État de la commande à l'étape actuelle

Figure 25 Écran Run Status (État de l'analyse)



- 2 Attendez la fin de l'analyse :
 - ▶ HiSeq v4, HiSeq 3000/4000 PE ou HiSeq X : prévoyez environ 3 heures.
 - ▶ HiSeq 3000/4000 SR : prévoyez environ 4 heures.
 - ▶ HiSeq Rapid v2 : prévoyez environ 1 heure.
 - ▶ TruSeq v3 : prévoyez environ 5 heures.
- 3 Une fois l'analyse terminée, vous pouvez laisser la Flow Cell sur l'instrument pendant la nuit. Sinon, passez à la section *Déchargement des composants de l'analyse*. L'instrument maintient la Flow Cell à 20 °C.

Rapport sur les données de l'analyse

Le rapport sur les données de l'analyse fournit un résumé de l'analyse en cours. Il répertorie les renseignements suivants :

- ▶ Nom du protocole
- ▶ Identifiant de la Flow Cell
- ▶ Identifiant de réactif
- ▶ Nom du modèle
- ▶ Heure de démarrage et de fin

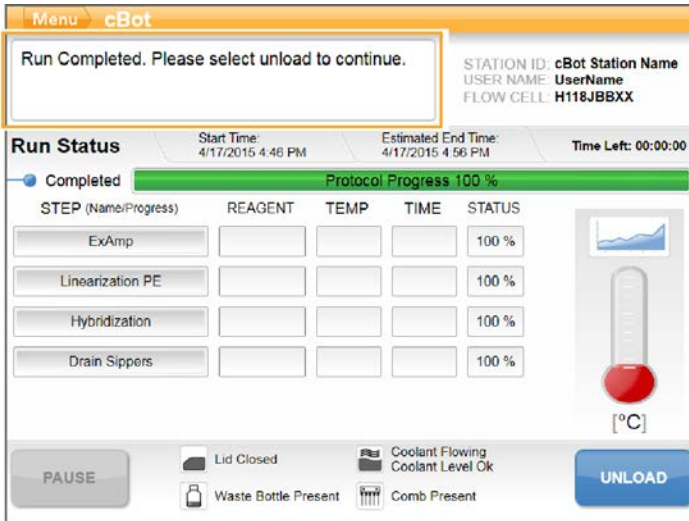
À la fin de l'analyse, le rapport sur les données de l'analyse s'ouvre automatiquement pour signaler que l'analyse est terminée.

- 1 Pour voir le rapport pendant l'analyse, sélectionnez **Menu** (Menu) | **Run Data** (Données de l'analyse).

Déchargement des composants de l'analyse

- 1 Lorsque l'analyse est terminée, sélectionnez **Unload** (Décharger) pour continuer.

Figure 26 Analyse terminée, décharger les composants



- 2 Soulevez le couvercle de l'instrument.
- 3 Relâchez la pince de sortie sécurisant l'extrémité de sortie du collecteur.
- 4 Déconnectez l'extrémité de sortie du collecteur du port de sortie du réservoir de lavage.
- 5 Retirez le peigne d'aspiration des broches de guidage métalliques à l'aide des onglets en plastique sur chaque côté du peigne d'aspiration.
- 6 Relâchez la pince de Flow Cell.
- 7 Retirez le collecteur.
Vérifiez que la Flow Cell se trouve toujours sur la platine thermique.
- 8 Soulevez la Flow Cell de la platine thermique.
- 9 Stockez la Flow Cell comme il convient :
 - ▶ **Flow Cell TruSeq v3 et HiSeq v4** : stockez dans un tampon de stockage dans le tube de Flow Cell à une température comprise entre 2 et 8 °C. La Flow Cell reste stable jusqu'à 10 jours après l'hybridation du primer lorsqu'elle est correctement stockée dans son tube.
 - ▶ **Flow Cell HiSeq Rapid v2** : effectuez l'analyse de séquençage le même jour que le chargement de la librairie.
 - ▶ **Flow Cell HiSeq X et HiSeq 3000/4000** : stockez dans un tampon de stockage pendant 48 heures maximum à une température de 2 à 8 °C.
- 10 Pour relâcher la plaque des réactifs, tirez son levier vers vous.
- 11 Retirez la plaque des réactifs de la platine des réactifs.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire, adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur.

Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

- 12 Retirez la barrette de huit tubes contenant les librairies.
- 13 Le cas échéant, retirez la barrette de huit tubes contenant les primers supplémentaires.
- 14 Cochez la case afin d'indiquer que vous avez déchargé les réactifs, les modèles et les primers.
- 15 Choisissez une option de lavage :
 - ▶ Sélectionnez **Wash** (Laver) afin de procéder au lavage après analyse.
 - ▶ Sélectionnez **Exit** (Quitter) pour contourner le lavage après analyse, si l'option de contournement est disponible.

Lavage après analyse

- 1 Lavez la plaque située sur la platine thermique avec de l'eau désionisée afin de retirer tout résidu salin.
- 2 Séchez à l'aide d'un tissu nettoyant non pelucheux.
- 3 Mettez dans le réservoir de lavage environ 12 ml d'eau désionisée et fermez le couvercle de l'instrument.
- 4 Cochez la case pour indiquer la présence de l'eau, puis sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 5 Lorsque le lavage est terminé, épongez tout excès d'eau dans le réservoir de lavage. Prenez soin de ne pas frotter les ports de sortie pour éviter que des fibres ne bouchent les orifices.
- 6 Cochez la case pour indiquer que le réservoir de lavage est sec, puis sélectionnez **Exit** (Quitter). L'écran Start (Démarrer) s'ouvre et le cBot 2 est prêt pour une autre analyse.

Confirmation de la distribution des réactifs (facultatif)

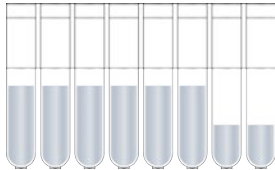
Vous pouvez confirmer la distribution de chaque réactif provenant de la plaque des réactifs fournie dans la trousse HiSeq à débit élevé (TruSeq v3).

- 1 Examinez les opercules en aluminium de chaque barrette de tubes pour vous assurer que tous sont percés.
- 2 Retirez chaque barrette de tubes de la base de la plaque des réactifs de la façon suivante :
 - a Tenez fermement la plaque des réactifs en plaçant le bout de vos doigts sous la base.
 - b Poussez délicatement vers le haut les tubes centraux de la barrette de tubes.
- 3 Inspectez chaque tube pour confirmer qu'il contient un volume similaire restant. Il est normal de constater de légères différences.

Figure 27 Exemple de distribution réussie des réactifs (Flow Cell à huit lignes)



Figure 28 Exemple de distribution réussie des réactifs (Flow Cell à deux lignes)



- 4 Si la distribution des réactifs a échoué et que les opercules d'aluminium des tubes sont percés, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
- 5 Inspectez la barrette de huit tubes contenant le modèle de librairie.
- 6 Si vous avez utilisé des primers supplémentaires pour votre analyse, inspectez les barrettes de huit tubes les contenant.

Chapitre 6 Maintenance

Maintenance périodique	45
Lavage de maintenance mensuel	46
Changement de la plaque d'adaptateur	47
Mise à niveau du logiciel	48
Mise à niveau des formules	49
Arrêt du cBot 2	50

Maintenance périodique

Effectuez les étapes de maintenance de base décrites dans cette section pour garantir les performances optimales de l'instrument.

Maintenance	Fréquence	Description
Lavage de l'instrument	Après chaque analyse et si l'instrument est inactif pendant plus d'une journée.	Effectuez toujours un lavage de l'instrument après chaque analyse pour éliminer les résidus salins et les enzymes du matériel et pour éviter la formation de bouchons. Si l'instrument n'a pas été utilisé pendant plus de 24 heures, un lavage avant analyse est recommandé. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section <i>Lavage avant analyse</i> à la page 35.
Vidage du flacon à déchets	Après chaque analyse.	Pour vous assurer que votre analyse ne soit pas interrompue, videz le flacon à déchets entre les analyses.
Nettoyage des surfaces	Une fois par semaine.	Utilisez de l'eau désionisée et un tissu nettoyant non pelucheux pour nettoyer la surface de la platine thermique et de la platine des réactifs. Nettoyez la surface des supports des barrettes de tubes contenant le modèle et le primer.
Nettoyage des vitres du lecteur de codes à barres externe et de la Flow Cell	Une fois par semaine.	Utilisez de l'eau désionisée et un tissu nettoyant non pelucheux pour nettoyer les vitres du lecteur de codes à barres externe et de la Flow Cell.
Lavage de maintenance	Une fois par mois.	Utilisez une solution de DECON à 5 % (ou 100 mmol de NaOH) pour enlever les traces de réactifs sur les composants internes du cBot et pour empêcher la prolifération de microorganismes. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section <i>Lavage de maintenance mensuel</i> à la page 46.
Vérification du niveau de réfrigérant	Tous les 3 mois.	Assurez-vous que le réfrigérant vert est visible à travers la vitre du réfrigérant, située sur le panneau arrière de l'instrument. Si nécessaire, utilisez un miroir pour voir la vitre du réfrigérant. Si le niveau de réfrigérant est bas, utilisez une grande pièce de monnaie ou un tournevis standard pour retirer le bouchon du réservoir de réfrigérant et remplissez le réservoir jusqu'en dessous du bouchon du réservoir. Utilisez uniquement le réfrigérant d'Illumina (référence no 1003709). Si vous avez besoin de réfrigérant supplémentaire, communiquez avec votre scientifique d'application sur le terrain (FAS) ou votre technicien d'assistance sur le terrain (FSE) d'Illumina.

Maintenance préventive

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

Lavage de maintenance mensuel

Effectuez un lavage de maintenance mensuel en utilisant une solution de DECON à 5 % pour enlever les traces de réactifs sur les composants internes du cBot et pour empêcher la prolifération microbienne. Si une solution de DECON n'est pas disponible, remplacez-la par une solution de NaOH 100 mmol.

Le lavage de maintenance nécessite environ 10 minutes de manipulation et comprend quatre étapes de lavage : un lavage initial à l'eau, un lavage au DECON ou NaOH et enfin deux lavages à l'eau.

Lavage à l'eau

- 1 Confirmez que tous les composants de l'analyse sont retirés.
- 2 À partir de l'écran Start (Démarrer), sélectionnez **Menu** (Menu), puis **Manual Commands** (Commandes manuelles) afin d'ouvrir l'écran Manual Commands (Commandes manuelles).
- 3 Sélectionnez **Commands** (Commandes) pour ouvrir l'onglet Commands (Commandes).
- 4 Remplissez le réservoir de lavage avec environ 12 ml d'eau désionisée.
- 5 Sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 6 Lorsque le lavage est terminé, épongez tout excès d'eau dans le réservoir de lavage avec un tissu non pelucheux.
Prenez soin de ne pas frotter les ports de sortie pour éviter que des fibres ne bouchent les orifices.

Lavage au DECON (ou au NaOH)

- 1 Remplissez le réservoir de lavage avec 10 ml de DECON à 5 % ou 100 mmol de NaOH.
- 2 Sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 3 Une fois le lavage terminé, enfiler une nouvelle paire de gants.
- 4 Épongez le DECON à 5 % restant dans le réservoir de lavage à l'aide d'un tissu non pelucheux. Évitez les ports de sortie.



ATTENTION

Le DECON est hautement alcalin.

- 5 Procédez *immédiatement* au lavage à l'eau pour éviter que le DECON ne sèche et ne bouche les orifices du réservoir de lavage.

Lavage à l'eau (premier rinçage)

- 1 Remplissez le réservoir de lavage avec environ 12 ml d'eau désionisée.
- 2 Sélectionnez **Wash** (Lavage).
- 3 Lorsque le lavage est terminé, épongez tout excès d'eau dans le réservoir de lavage avec un tissu non pelucheux. Évitez les ports de sortie.

Lavage à l'eau (dernier rinçage)

- 1 Remplissez le réservoir de lavage avec environ 12 ml d'eau désionisée.
- 2 Sélectionnez **Wash** (Lavage).

- 3 Lorsque le lavage est terminé, épongez l'eau restante dans le réservoir de lavage avec un tissu non pelucheux. Évitez les ports de sortie.
- 4 Fermez le couvercle de l'instrument.
- 5 Videz le flacon à déchets.
Votre cBot est prêt pour la prochaine analyse de génération d'amplifiats.

Changement de la plaque d'adaptateur

Vous pouvez utiliser une Flow Cell HiSeq sur le cBot. Chaque type de Flow Cell nécessite l'installation d'une plaque d'adaptateur spécifique. Les icônes sur l'écran Start (Démarrer) indiquent quelle plaque d'adaptateur est installée.

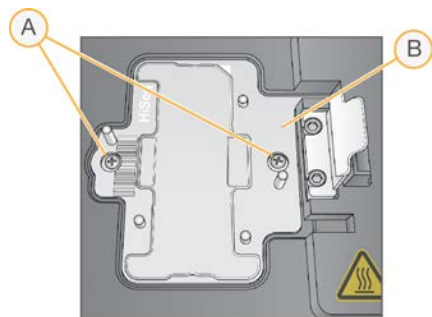


REMARQUE

L'instrument cBot vous est livré avec la plaque d'adaptateur HiSeq déjà installée.

- 1 Soulevez délicatement le couvercle de l'instrument par les découpes situées sur l'avant du couvercle.
- 2 Soulevez la pince de Flow Cell.
- 3 Dévissez les deux vis imperdables à tête cruciforme qui maintiennent la plaque d'adaptateur.

Figure 29 Plaque d'adaptateur de Flow Cell

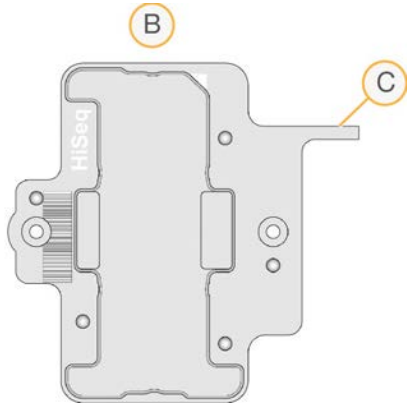


A Vis imperdables

B Plaque d'adaptateur

- 4 Soulevez la plaque d'adaptateur actuelle, retirez-la de la platine thermique et mettez-la de côté.
- 5 Si vous constatez la présence de sels sur la platine thermique, essuyez avec un tissu nettoyant non pelucheux légèrement imbibé d'eau.
- 6 Positionnez la nouvelle plaque d'adaptateur sur la platine thermique. Alignez le bras du capteur sur la fente qui lui correspond du côté droit de la platine thermique.

Figure 30 Emplacement de l'élément détecteur



- A Plaque d'adaptateur HiSeq
- B Élément détecteur de la plaque d'adaptateur

- 7 Vissez les deux vis pour fixer la plaque d'adaptateur.
Pour un transfert de chaleur optimal, assurez-vous que la plaque d'adaptateur est à plat et que les vis sont uniformément serrées.
- 8 Essuyez la plaque d'adaptateur installée avec un tissu nettoyant non pelucheux imbibé d'eau. Séchez à l'aide d'un tissu propre.

Mise à niveau du logiciel

Si vous utilisez le logiciel cBot v1.3 ou une version ultérieure, vous pouvez mettre à niveau le logiciel de l'instrument avec une clé USB.

- 1 Insérez la clé USB contenant le programme d'installation de la nouvelle version du logiciel (par exemple cBotSetupX86_1.3.1.0.exe) dans l'un des ports USB situés à l'avant de l'instrument.
Le programme d'installation doit être enregistré dans le répertoire racine de la clé USB, pas dans un dossier.



ATTENTION

Laissez la clé USB dans le port USB pendant la mise à niveau. N'interagissez pas avec l'instrument pendant la mise à niveau.

- 2 Sélectionnez **Menu** (Menu) dans le coin supérieur gauche de l'écran Start (Démarrer), puis sélectionnez **Configure** (Configurer).

Figure 31 Menu de l'écran Start (Démarrer)



- 3 Utilisez le clavier à l'écran pour saisir le mot de passe par défaut, **admin**, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 4 Sélectionnez **Menu** (Menu), puis sélectionnez **Upgrade** (Mettre à niveau).
- 5 Une boîte de dialogue s'ouvre et affiche un message concernant la version logicielle :

Message	Action
The software installer version is greater than the version currently installed on the cBot (La version du programme d'installation du logiciel est supérieure à la version actuellement installée sur le cBot)	Sélectionnez OK pour passer à l'installation de la nouvelle version.
cBot cannot find a valid software installer (cBot ne trouve pas de programme d'installation valide du logiciel)	Vous pouvez soit insérer une mise à niveau valide de cBot et sélectionner OK pour réessayer, soit sélectionner Cancel (Annuler) pour annuler la mise à niveau.
The software installer version is equal or lower than the version currently installed on the cBot (La version du programme d'installation du logiciel est inférieure ou identique à la version actuellement installée sur le cBot)	Sélectionnez Cancel (Annuler) pour annuler la mise à niveau ou OK pour passer à l'installation d'une version antérieure.

- 6 Vous pouvez retirer la clé USB dès que la mise à niveau est terminée et que l'instrument redémarre.
- 7 Si une erreur BOOTMGR s'affiche, branchez un clavier et une souris au cBot et appuyez sur les touches **Ctrl+Alt+Suppr** pour redémarrer l'instrument.

Mise à niveau des formules

Vous pouvez mettre à niveau les versions des formules indépendamment des mises à niveau du logiciel à l'aide d'une clé USB contenant le programme d'installation de formules.

- 1 Insérez la clé USB contenant le programme d'installation des nouvelles formules dans l'un des ports USB situés à l'avant de l'instrument.
Le programme d'installation doit être enregistré dans le répertoire racine de la clé USB, pas dans un dossier.
- 2 Sélectionnez **Menu** (Menu) dans le coin supérieur gauche de l'écran Start (Démarrer), puis sélectionnez **Configure** (Configurer).

Figure 32 Menu de l'écran Start (Démarrer)



- 3 Utilisez le clavier à l'écran pour saisir le mot de passe par défaut, **admin**, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 4 Sélectionnez **Menu** (Menu), puis sélectionnez **Upgrade Recipes** (Mettre à niveau les formules). Le cBot redémarre automatiquement une fois la mise à niveau effectuée. Le processus de redémarrage prend environ 10 minutes.



ATTENTION

Laissez la clé USB dans le port USB pendant la mise à niveau. N'interagissez pas avec l'instrument pendant la mise à niveau.

- 5 Vous pouvez retirer la clé USB dès que le redémarrage est terminé et que l'écran de connexion apparaît.

Arrêt du cBot 2

L'instrument cBot 2 est conçu pour fonctionner en état de veille à partir de l'écran Start (Démarrer); il n'est donc pas nécessaire de l'éteindre entre les analyses.

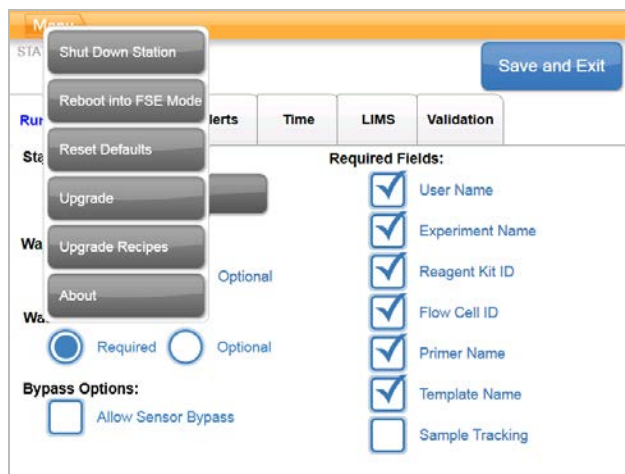
- 1 Sélectionnez **Menu** (Menu) dans le coin supérieur gauche de l'écran Start (Démarrer), puis sélectionnez **Configure** (Configurer).

Figure 33 Menu de l'écran Start (Démarrer)



- 2 Utilisez le clavier à l'écran pour saisir le mot de passe par défaut, **admin**, puis appuyez sur la touche **Enter** (Entrée).
- 3 À partir de l'écran de configuration, sélectionnez **Menu** (Menu), puis sélectionnez **Shut Down Station** (Arrêter la station).
Le logiciel cBot s'arrête.

Figure 34 Shut Down Station (Arrêter la station)



- 4 Après l'arrêt du logiciel, mettez le bouton d'alimentation en position OFF (Arrêt).

Redémarrage en mode FSE

L'option de redémarrage en mode FSE ne doit être utilisée que par un scientifique spécialiste en application sur le terrain (FAS) ou un technicien d'assistance sur le terrain (FSE) d'Illumina formé pour la mise à jour du logiciel ou la maintenance de l'instrument.

Annexe A Dépannage

Mise en pause ou annulation d'une analyse	52
Résolution du problème de l'échec de la vérification du flux	52
Résolution des problèmes d'analyse	54
Réinitialisation du lecteur de codes à barres externe	55
Modification des protocoles	56

Mise en pause ou annulation d'une analyse

Utilisez les commandes de l'écran Run Status (État de l'analyse) pour mettre l'analyse en pause ou l'annuler.

- ▶ **Pause** (Pause) : termine la commande actuelle du protocole, puis interrompt l'analyse. Attendez quelques minutes avant que l'analyse se mette en pause. Lorsque c'est le cas, les dispositifs d'aspiration sont soulevés des tubes de réactifs, la platine des réactifs revient à la position d'origine et le bouton Pause se change en bouton Resume (Reprendre).
 - ▶ Lorsque l'analyse est active, sélectionnez **Pause** (Pause) pour interrompre l'analyse.
 - ▶ Lorsque l'analyse est en pause, sélectionnez **Resume** (Reprendre) pour reprendre l'analyse.
- ▶ **Abort Run** (Annuler l'analyse) : arrête l'analyse sans possibilité de la reprendre. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger les composants de l'analyse.

Résolution du problème de l'échec de la vérification du flux

Effectuez la procédure suivante pour déterminer le problème en cas d'échec de la vérification du flux. Ne sélectionnez pas l'option de contournement de la vérification du flux avant d'avoir terminé cette procédure, afin de déterminer les conditions suivantes :

- ▶ La Flow Cell est correctement positionnée sur l'instrument.
- ▶ Le collecteur et le matériel fonctionnent correctement.



ATTENTION

Contourner la vérification du flux peut entraîner l'échec de la génération d'amplifiats de certaines lignes.

Puisque des types de Flow Cell différents utilisent des vérifications de flux différentes, assurez-vous que vous utilisez la bonne association de formule, collecteur et Flow Cell.

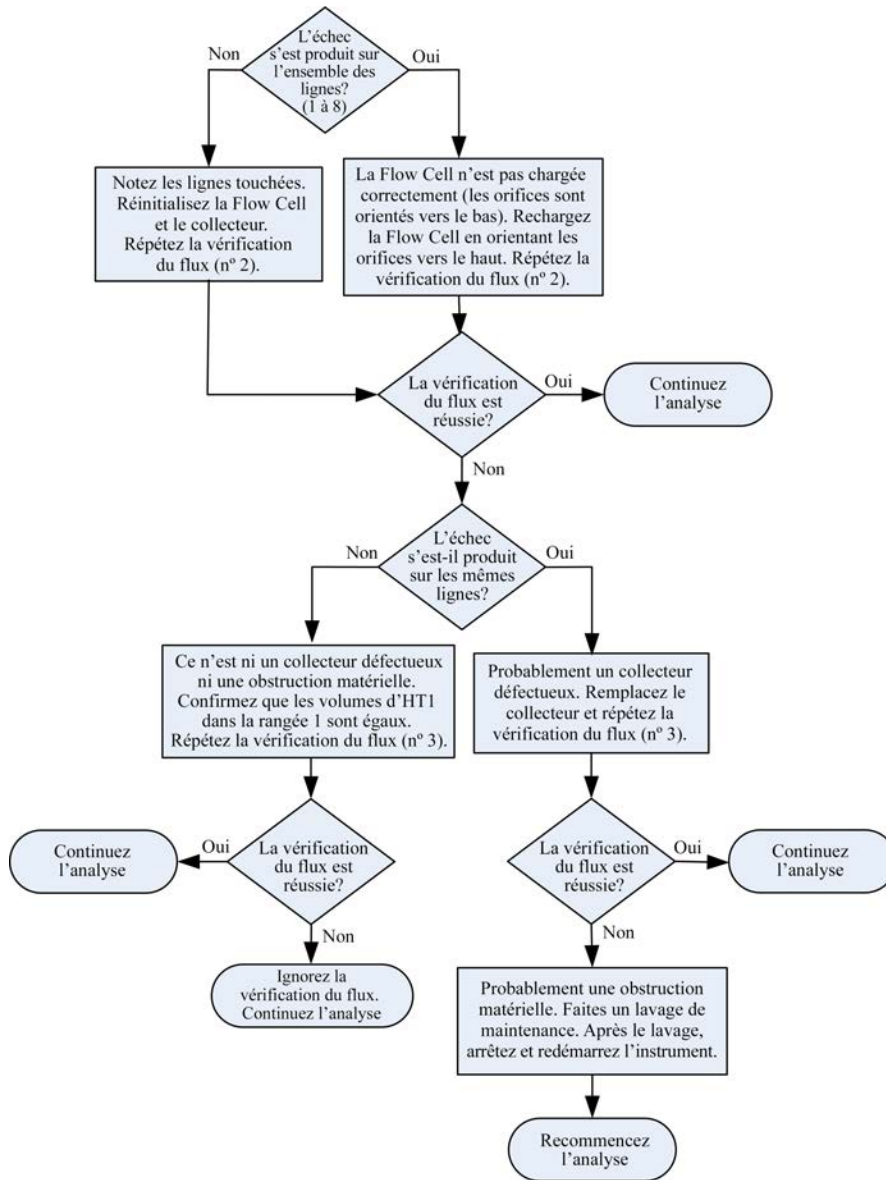
- 1 Assurez-vous que la quantité d'HT1 dans la rangée 1 de la plaque des réactifs est suffisante et réapprovisionnez-la au besoin.
- 2 Notez les lignes concernées par l'échec de vérification du flux. Vous trouverez ce renseignement dans le coin supérieur gauche de l'écran d'interface.
 - ▶ Si l'échec s'est produit sur l'ensemble des huit lignes, cela signifie probablement que la Flow Cell n'est pas chargée correctement. Retirez le collecteur. Vérifiez que les orifices de la Flow Cell sont orientés vers le haut et que l'orientation de la Flow Cell est correcte.
 - ▶ Si seules quelques lignes ont échoué, la Flow Cell n'est probablement pas bien en place. Retirez le collecteur, remplacez la Flow Cell et réinstallez le collecteur.
- 3 Sélectionnez **Rerun Check** (Relancer la vérification) pour recommencer la vérification du flux.
- 4 Si la vérification du flux échoue une deuxième fois, observez quelles sont les lignes concernées et effectuez l'une des actions suivantes :
 - ▶ Votre collecteur est vraisemblablement défectueux si l'échec s'est produit sur l'ensemble des huit lignes. Remplacez-le par un nouveau collecteur.

- ▶ Si l'échec porte sur des lignes différentes, votre collecteur n'est probablement pas défectueux. Inspectez les volumes d'HT1 de la rangée 1 afin de vous assurer que les quantités dans les tubes sont égales.
- 5 Sélectionnez **Rerun Check** (Relancer la vérification) pour recommencer une troisième fois la vérification du flux.
- ▶ Si la vérification du flux échoue après le remplacement du collecteur, rendez-vous à l'étape 6.
 - ▶ Si la vérification échoue et que vous n'aviez pas besoin de remplacer le collecteur, rendez-vous à l'étape 7.
- 6 Si la vérification du flux échoue une troisième fois après le remplacement du collecteur, il est possible qu'un bouchon se soit formé à l'intérieur du matériel.
- a Inspectez les volumes d'HT1 de la rangée 1 afin de vous assurer que les quantités dans les tubes sont égales. Des volumes plus élevés dans les tubes correspondant aux lignes concernées à plusieurs reprises par un échec de la vérification du flux indiquent un bouchon à l'intérieur du matériel.
 - b Déchargez les composants de l'analyse et effectuez un lavage de maintenance.
 - c Une fois le lavage terminé, mettez l'instrument hors tension au moyen du bouton d'alimentation. Après quelques secondes, appuyez sur le bouton d'alimentation puis sur le bouton de démarrage pour redémarrer le logiciel. La mise hors tension de l'instrument réinitialise le nombre autorisé de tentatives de vérification avant analyse.
 - d Suivez les invites du logiciel pour recharger les composants de l'analyse et pour configurer celle-ci.
- 7 Si la vérification du flux échoue une troisième fois, vous pouvez contourner en toute sécurité la vérification du flux :
- a Sélectionnez **Bypass Flow Check** (Ignorer la vérification du flux) pour continuer l'analyse.
 - b Après l'analyse, vérifiez la distribution des réactifs depuis tous les tubes.

Organigramme de dépannage

L'organigramme suivant illustre la procédure de dépannage. Les étapes indiquant de procéder à une nouvelle vérification du flux portent un numéro montrant le nombre de tentatives autorisées de vérification de flux effectuées à ce moment de la procédure.

Figure 35 Organigramme de dépannage



Résolution des problèmes d'analyse

Utilisez le tableau suivant pour résoudre les problèmes rencontrés au cours d'une analyse de génération d'amplifiats.

Problème	Cause possible	Action
La température est hors de la plage.	Indique souvent que le cBot n'a pas atteint la température de consigne dans l'intervalle de temps alloué. Peut également indiquer une éventuelle panne du tableau de commande.	Envoyez un courriel à l'assistance technique d'Illumina.
Le réfrigérant circule et le niveau de réfrigérant est bas.	Le réfrigérant s'est lentement évaporé jusqu'à atteindre un niveau bas.	Ajoutez du réfrigérant Illumina (n° référence 1003709) dans le réservoir de réfrigérant.
Le réfrigérant ne circule pas et le niveau de réfrigérant est bas.	Le niveau de réfrigérant est peut-être trop bas pour permettre sa circulation.	Ajoutez du réfrigérant Illumina (n° référence 1003709) dans le réservoir de réfrigérant.
Le réfrigérant ne circule pas et le niveau de réfrigérant n'est pas bas.	Possible panne de la pompe à réfrigérant.	Envoyez un courriel à l'assistance technique d'Illumina.
L'instrument est verrouillé.	Possible erreur logicielle.	Envoyez un courriel à l'assistance technique d'Illumina.

Réinitialisation du lecteur de codes à barres externe

Le lecteur de codes à barres externe est prêt à l'emploi à la réception de votre cBot. Si le lecteur est réinitialisé d'après une configuration incorrecte, utilisez les instructions suivantes pour le restaurer d'après sa configuration par défaut.

- 1 Imprimez le code à barres.

Figure 36 Restaurer le code à barres par défaut



- 2 À l'écran Start (Démarrer), sélectionnez **Menu** (Menu), puis sélectionnez **Manual Commands** (Commandes manuelles).
- 3 Sélectionnez l'onglet **General** (Général) pour accéder aux entrées pour le contrôle manuel du lecteur de codes à barres.

Figure 37 Manual Commands (Commandes manuelles), onglet General (Général)



- 4 Sélectionnez **Turn Off** (Désactiver), puis **Turn On** (Activer) pour activer le lecteur de codes à barres. La raie laser doit être visible sur la plaque du lecteur, sous l'écran LCD.
- 5 Placez le code à barres sous le lecteur de codes à barres externe.
- 6 Sélectionnez **Turn Off** (Désactiver), puis **Turn On** (Activer) pour lire le code à barres. Un bip sonore indique une lecture réussie.

Modification des protocoles

Utilisez la fonction de modification des protocoles pour modifier les protocoles selon vos besoins. Par exemple, vous pouvez répéter les étapes d'un protocole ou modifier le nombre de cycles d'amplification dans la section Chemistry (Chimie).

Chaque protocole comprend deux sections principales :

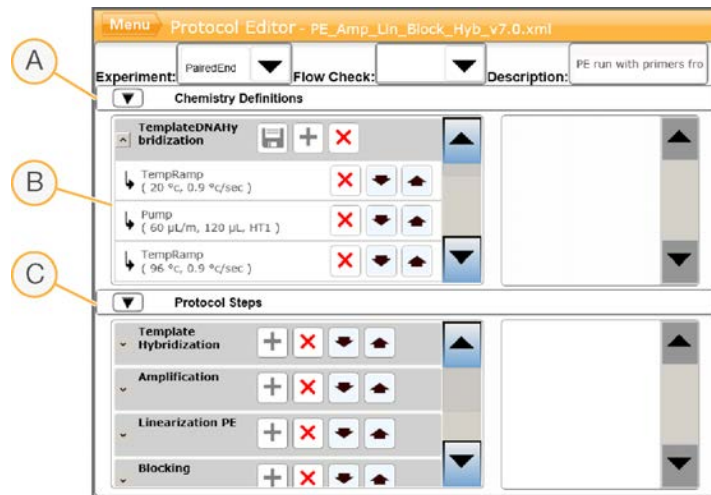
- ▶ **La section Chemistry (Chimie)** : elle contient les instructions sur le pompage des réactifs, les modifications des températures et les temps d'attente. Cette section apparaît dans la partie supérieure de l'écran Protocol Editor (Modification des protocoles).
- ▶ **La section Protocol (Protocole)** : elle contient une série d'étapes constituées de définitions chimiques. Cette section apparaît dans la partie inférieure de l'écran Protocol Editor (Modification des protocoles).

Si vous modifiez un protocole existant, veillez à le renommer.

Protocol Editor (Modification des protocoles)






- 1 À l'écran Start (Démarrer), sélectionnez **Menu** (Menu), puis sélectionnez **Protocol Editor** (Modification des protocoles).
- 2 À partir de Protocol Editor (Modification des protocoles), sélectionnez **Menu** (Menu), puis sélectionnez la commande appropriée :
 - ▶ Sélectionnez **Open** (Ouvrir) pour ouvrir un protocole existant.
 - ▶ Sélectionnez **Load from Library** (Charger à partir de la librairie) pour charger une définition chimique existante ou une étape du protocole stockée dans la librairie cBot.
 - ▶ Sélectionnez **New Chemistry Definition** (Nouvelle définition chimique) ou **New Protocol Step** (Nouvelle étape du protocole) pour créer une nouvelle définition ou étape et la stocker dans la librairie cBot.
- 3 Utilisez la flèche vers le bas située à gauche de l'étape pour développer les commandes de celle-ci. Utilisez la flèche vers le haut pour réduire les commandes.
- 4 Pour modifier une étape dans une définition chimique, mettez-la en surbrillance. Les sélections permettant de modifier les commandes relatives à la pompe, à la rampe de température ou à l'attente apparaissent dans le panneau de droite.
- 5 Pour modifier une étape dans un protocole, mettez-la en surbrillance. Les sélections permettant de modifier le nombre de cycles de la définition chimique sélectionnée apparaissent dans le panneau de droite.
- 6 Utilisez les icônes de Protocol Editor (Modification des protocoles) à droite du nom de l'étape pour réorganiser, supprimer ou copier des étapes et des commandes.

Figure 38 Protocol Editor (Modification des protocoles), étapes développées



- A Section Chemistry (Chimie)
- B Section développée Chemistry (Chimie)
- C Section Protocol (Protocole)

Icônes de Protocol Editor (Modification des protocoles)

Icône	Description
	Déplace l'étape en surbrillance sous l'étape suivante du protocole.
	Déplace l'étape en surbrillance au-dessus de l'étape précédente du protocole.
	Supprime l'étape en surbrillance.
	Répète l'étape en surbrillance.
	Enregistre les modifications apportées à la librairie de protocoles.

Index

A

- activation du lecteur externe 28
- aide
 - documentation 2
- aide, technique 62
- aluminium non percé 33, 44
- analyse
 - démarrage 40
- arrêt 50
- assistance clientèle 62
- assistance technique 62

C

- capteurs 2
- chargement des bibliothèques 25
- Clarity LIMS X Edition 1
- collecteur
 - peigne d'aspiration 3, 27, 38
 - pince de sortie 27, 38
- collecteurs 26, 37
- commandes manuelles 46
- compatibilité de la version
 - consommables 10
 - logiciel 10
- composants 2
- configuration 4-5
- configuration du suivi des échantillons 22
- configuration, aide 22
- consommables
 - compatibilité de la version 10
 - déchargement 31, 42
- consommables fournis par l'utilisateur
 - préparation des réactifs 11
- contourner la vérification du flux 52

D

- DECON 46
- DECON à 5 % 46
- décongélation de la plaque des réactifs 14, 18
- dénaturation 22, 34
- dénaturation de bibliothèque 14, 18
- dépannage
 - échec de la vérification du flux 52
- dilution 22, 34
- distribution des réactifs, échec 33, 44
- documentation 2, 62

- documents relatifs aux trousseaux 6
- durée de la génération d'amplifiats 30, 41
- durée du lavage de maintenance 46

E

- échec de la numérisation 28
- échec de la vérification avant analyse 29
- échec de la vérification du flux 54
 - dépannage 54
- écran Run Status (État de l'analyse) 29, 40
- erreur de numérisation du code à barres 28
- erreurs de composants de l'analyse 40
- erreurs de logiciel 54
- étapes de génération d'amplifiats 29, 40
- état de veille 50
- état du capteur
 - icônes 5
- état du système 5
- exigences d'analyse
 - configuration 5

F

- fin d'une analyse 52
- flacon à déchets 45
- Flow Cell
 - compatibilité du suivi des échantillons 22
 - emballage 13, 17
 - formules compatibles 10
 - nettoyage 13, 17
 - numérisation des codes à barres 28
 - plaques d'adaptateur 47
 - préparation 13, 17
 - préparation du chargement 25, 37
 - stockage 30, 41
- Flow Cells
 - positionnement 25, 37
- formules
 - liste de 10
 - mise à niveau 49

H

- HP10, préparation 21

I

icônes d'état des capteurs 5
interruption d'une analyse 52

L

lavage
 plaques d'adaptateur 25, 37
lavage après analyse 45
lavage avant analyse 45
lavage de l'instrument 32, 43
lavages 23, 35
 fréquence 45
lecteur de codes à barres externe
 nettoyage 45
 réinitialisation 55
lecteurs 2
librairie
 chargement 39
 concentration de chargement 14, 18
 dénaturation 14, 18
 dilution 14, 18
librairies
 chargement 25
logiciel
 compatibilité de la version 10
 mise à niveau 48

M

maintenance 32, 43, 46, 51
 entretien périodique 45
maintenance préventive 45
maintenance, préventive 45
mélange principal ExAmp 20
messages d'erreur 54
mise hors tension 50
mode FSE 51
modèles
 chargement 39
modification des protocoles 56

N

NaOH 46
nettoyage
 lecteur de codes à barres externe 45
niveau du réfrigérant 45
numéro de référence du réfrigérant 54

numéros de référence
 réfrigérant 54

O

opercule en aluminium blanc 24, 36
opercule, aluminium blanc 24, 36
opercules non percé 33, 44

P

PhiX
 % de substance de contrôle 14, 18
 ajout 14, 18
plage de température 54
plaque des réactifs 4
 configurations 7
 décongélation 14, 18, 20-21
 positionnement 24, 36
 préparation 15, 19
plaque des réactifs cBot 7
plaque des réactifs, débit élevé
 préparation 20
plaque des réactifs, rapide
 préparation 21
plaques d'adaptateur 47
 lavage 25, 37
platine des réactifs 4
platine thermique 3
 lavage 32, 43
positionnement des Flow Cells 25, 37
pratiques exemplaires
 préparation des réactifs 12
préparation des réactifs
 consommables fournis par l'utilisateur 11
 pratiques exemplaires 12
primers
 chargement 39
 nom, saisie 28, 39
 orientation de la barrette de tubes 39
 personnaliser 39
problèmes de collecteur 54
problèmes de réfrigérant 54
procédures après analyse 31, 42
progression de l'analyse 29, 40
Protocol Editor (Modification des protocoles) 56
 icônes 57
protocole
 sélection 28, 36
protocoles de chimie 56
protocoles, modification 56

R

- rangée des modèles 25
- rapport sur les données de l'analyse 30, 41
- réactifs
 - numérisation des codes à barres 28
- réactifs de génération d'amplifiats
 - préparation 12
- réactifs ExAmp
 - à propos 12, 16
 - décongélation 14, 18
 - préparation 20
 - préparation, quatre Flow Cells 16
 - préparation, une Flow Cell 16
- réactifs, préparation
 - débit élevé 20
 - Flow Cell HiSeq X 12
 - HiSeq 3000/4000 16
 - rapide 21
- réaction ExAmp
 - préparation, quatre Flow Cells 16
 - préparation, une Flow Cell 16
- réinitialisation
 - lecteur de codes à barres externe 55
- relancement de la vérification par capteurs 29
- reprise d'une analyse 52
- réservoir de lavage 23, 35
- résidus salins, retrait 32, 43
- résumé d'analyse 30, 41
- retrait des barrettes de huit tubes 32, 43

S

- SeqLab d'Illumina 1
- stockage des Flow Cell 25, 31, 37, 42
- stockage des Flow Cells 30, 41
- stocker des Flow Cell 31, 42
- substitut DECON 46
- suivi des échantillons
 - à propos 1
 - compatibilité de la Flow Cell 22
 - configuration 22

T

- température hors plage 54

V

- vérification avant analyse
 - erreurs 40
 - réalisation 40
- vérification du flux 40
 - dépannage en cas d'échec 52
- volumes distribués 32, 43
- vue d'ensemble
 - flux de travail de la génération d'amplifiats 34
 - flux de travail pour le suivi des échantillons 23

Assistance technique

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

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

Numéros de téléphone de l'assistance clientèle d'Illumina

Région	Sans frais	Regional (Régional)
Amérique du Nord	+1 800 809-4566	
Allemagne	+49 8001014940	+49 8938035677
Australie	+1 800 775-688	
Autriche	+43 800006249	+43 19286540
Belgique	+32 80077160	+32 34002973
Chine	400 066 5835	
Corée du Sud	+82 80 234 5300	
Danemark	+45 80820183	+45 89871156
Espagne	+34 911899417	+34 800300143
Finlande	+358 800918363	+358 974790110
France	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong, Chine	800960230	
Irlande	+353 1800936608	+353 016950506
Italie	+39 800985513	+39 236003759
Japon	0800 111 5011	
Norvège	+47 800 16836	+47 21939693
Nouvelle-Zélande	0800 451 650	
Pays-Bas	+31 8000222493	+31 207132960
Royaume-Uni	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapour	+1 800 579 2745	
Suède	+46 850619671	+46 200883979
Suisse	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, Chine	00806651752	
Autres pays	+44 1799 534 000	

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

Documentation sur les produits : disponible en téléchargement sur le site support.illumina.com.

