

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Support n° 20006818 Document n° 15046563 v07	Octobre 2021	Ajout des 3 filtres à air de rechange dans la section Remplacer le filtre à air Inclusion des nouvelles cartouches et des cartouches d'origine pour le mode manuel
Support n° 20006818 Document n° 15046563 v06	Juin 2019	Ajout de renseignements sur les groupes de travail pour BaseSpace Sequence Hub au cours de la configuration de l'analyse. Ajout de renseignements sur le chemin UNC pour le dossier de sortie. Ajout du dépannage pour les erreurs de stockage réseau. Clarification sur le fait que les instructions du filtre à air sont destinées aux instruments munis d'un filtre accessible depuis le panneau arrière. Mise à jour de l'emplacement des fichiers situés dans le dossier racine pour exécuter des dossiers spécifiques du dossier de sortie.

Document	Date	Description des modifications
<p>Support n° 20006818 Document n° 15046563 v05</p>	<p>Décembre 2018</p>	<p>Mise à jour de la description du logiciel, des écrans et du flux de travail pour le logiciel NextSeq Control Software (NCS) 4.0. Mise à jour des renseignements additionnels suivants pour le NCS 4.0.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout de renseignements sur le logiciel Local Run Manager. • Modification du nom BaseSpace pour BaseSpace Sequence Hub. L'onglet Prep (Préparation) de BaseSpace et BaseSpace Onsite ne sont plus disponibles. • Ajout des directives sur la sélection du mode Local Run Manager ou du mode manuel. Le mode manuel remplace le mode autonome et comporte quelques modifications. • Ajout de l'option de vérification des mises à jour logicielles dans BaseSpace Sequence Hub. • Ajout de Local Run Manager, Universal Copy Service et du contrôleur d'accès direct à la mémoire (DMA) à la description de la suite logicielle regroupée du système. Retrait de BaseSpace Broker et SAV. • Run Copy Service devient Universal Copy Service. • Ajout de l'option d'activer les formules personnalisées lors du chargement de la cartouche de réactifs. • Retrait de la description de l'image de la Flow Cell lors de la surveillance de la progression de l'analyse. • Retrait de l'option de démarrage pour le mode kiosque et le mode Windows. • Ajout de directives de maintenance pour les instruments munis d'un filtre à air. • Ajout des nouvelles icônes d'avertissement, d'information et de réduction du NCS. • Mise à jour des directives pour personnaliser les paramètres de l'analyse et du système. • Mise à jour de l'option d'envoi des données sur la performance de l'instrument. • Mise à jour des icônes de transfert des données. • Clarification sur le fait qu'il n'y a pas de limite de temps pour le balayage lors de la mise en attente des fichiers en vue d'un transfert. • Remplacement de la référence à « BSM » par « mécanisme de conduite des tampons » dans les renseignements portant sur la vérification des mouvements. <p>Ajout du méthanol ou de l'alcool isopropylique (99 %) de qualité réactif ou spectrophotométrique pour la maintenance de l'instrument.</p>

Document	Date	Description des modifications
Support n° 20006818 Document n° 15046563 v04	Mai 2018	Ajout d'information sur les réactifs NextSeq v2.5. Mise à jour des renseignements sur le stockage et la livraison concernant les trousse de réactifs NextSeq v2.5 pour préciser que les Flow Cell sont livrées à température ambiante. Les exigences de stockage déterminées antérieurement sont encore valides pour les Flow Cell NextSeq v2.5. Ajout d'information pour préciser que les trousse de réactifs NextSeq v2.5 nécessitent la version 2.2 du logiciel. Ajout d'une remarque sur la concentration de chargement de la trousse à débit moyen. Ajout d'une remarque sur la préservation des Flow Cell. Ajout d'une remarque recommandant d'utiliser des Flow Cell à débit élevé pour les vérifications du système.
Support n° 20006818 Document n° 15046563 v03	Mars 2018	Retrait du nom d'utilisateur et du mot de passe par défaut nécessaires pour la connexion au système d'exploitation. Illumina recommande l'utilisation d'identifiants spécifiques au site. Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Définir une configuration BaseSpace. Mise à jour de la référence au logiciel RTA v2 pour la remplacer par RTA2.
Support n° 20006818 Document n° 15046563 v02	Mars 2016	Ajout de la section intitulée « Considérations relatives à l'indexage ». Suppression des étapes d'inspection de la Flow Cell. Spécification du volume et de la concentration de chargement à l'étape intitulée Charger les bibliothèques sur la cartouche des réactifs.
Support n° 20001879 Document n° 15046563 v01	Octobre 2015	Spécification selon laquelle le consommable qui remplace celui du fournisseur de NaOCl recommandé doit être un produit de catégorie laboratoire. Ajout de recommandations relatives au service de maintenance préventive annuelle. Réorganisation des renseignements dans les chapitres Présentation et Premiers pas. Ajout d'instructions de personnalisation des paramètres du système. Retrait des instructions d'aide en direct du chapitre Dépannage. Cette option a été supprimée du logiciel de commande.
Référence n° 15046563, rév. I	Mai 2015	Correction de la description des réservoirs réservés de la cartouche de réactifs.
Référence n° 15046563, rév. H	Mai 2015	Correction du volume de Tween 20 présent dans la solution de lavage utilisée pour les lavages manuels. Restructuration des renseignements concernant les options de configuration du système. Déplacement des renseignements concernant le logiciel Real-Time Analysis vers l'annexe A.

Document	Date	Description des modifications
<p>Référence n° 15046563, rév. G</p>	<p>Février 2015</p>	<p>Mise à jour des descriptions du logiciel NextSeq Control Software v1.4.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout d'options de lavage manuel : Quick Wash (Lavage rapide) et Manual Post-Run Wash (Lavage manuel après analyse). • Ajout de la description des fonctionnalités de personnalisation de l'analyse afin d'éliminer les consommables à la fin de l'analyse et d'ignorer la confirmation de la vérification avant analyse. • Ajout d'option permettant d'annuler et de redémarrer une vérification avant analyse. • Ajout d'option permettant d'activer le suivi de l'analyse en mode autonome. • Suppression des descriptions des fichiers de décalage et de mise en phase, qui ne sont plus écrits dans le dossier d'analyse. • Mise à jour de l'image du diagramme de dispersion afin d'afficher des définitions de base réparties de façon plus uniforme lors de l'utilisation de la version 1.4 du logiciel du système. • Ajout de la description du service de copie d'analyse. • Ajout d'une option permettant d'utiliser un primer d'index 2 personnalisé, possible avec la trousse NextSeq 500 v2. Pour obtenir plus de renseignements, consultez le <i>Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)</i>. <p>Mise à jour des instructions de préparation des réactifs pour l'utilisation de la trousse NextSeq 500 v2 : retrait des étapes manuelles de chargement de l'hypochlorite de sodium et des primers à indexage double sur la cartouche de réactifs. Ces réactifs sont pré-chargés dans la cartouche de réactifs v2. Pour plus de renseignements, consultez le <i>Guide de référence des trousseaux du système NextSeq 500/550 v2 (document n° 15058065)</i>.</p> <p>Ajout de la section Consommables pour le séquençage qui répertorie les versions des trousseaux, les versions du NCS compatibles, ainsi que le nom et la référence du guide de référence de la trousse associée.</p> <p>Mise à jour des consommables fournis par l'utilisateur pour inclure l'utilisation du NaOCl pour les options de lavage manuel introduites dans le NCS v1.4.</p> <p>Correction des exigences relatives aux amplifiats passant le filtre afin de ne pas dépasser une définition des bases en dessous de la valeur de pureté dans les 25 premiers cycles.</p> <p>Ajout de 120 ml d'eau de laboratoire aux instructions de vérification du système.</p>
<p>Référence n° 15046563, rév. F</p>	<p>Septembre 2014</p>	<p>Correction des descriptions des fonctionnalités du logiciel NextSeq Control Software v1.3.</p> <p>Mise à jour de l'URL pour les fiches signalétiques (SDS) : support.illumina.com/sds.html.</p> <p>Mise à jour des marquages des produits NextSeq de MC à MD.</p>

Document	Date	Description des modifications
<p>Référence n° 15046563, rév. E</p>	<p>Août 2014</p>	<p>Mise à jour des descriptions du logiciel NextSeq Control Software v1.3 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mises à jour des descriptions des commandes de personnalisation du système et des mises à jour du logiciel sur l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument). • Mise à jour de la description de l'écran Pre-Run Check (Vérification avant analyse), qui groupe les éléments vérifiés en quatre catégories extensibles. • Mise à jour des instructions de l'aide en direct pour un accès à l'aide en direct à partir de l'URL. L'icône s'affichant sur l'écran d'accueil n'est pas disponible dans le NCS v1.3. • Ajout de la procédure de réhybridation sur instrument pour la réhybridation du primer de lecture 1. L'option de réhybridation d'une Flow Cell est compatible avec le NCS version 1.3 ou ultérieure et nécessite une nouvelle cartouche de réactifs et une nouvelle cartouche de tampon. <p>Ajout du <i>Guide des primers personnalisés NextSeq</i> (document n° 15057456) à la liste des ressources supplémentaires.</p>
<p>Référence n° 15046563, rév. D</p>	<p>Juin 2014</p>	<p>Ajout des instructions de chargement du BP13 en position n° 18 de la cartouche de réactifs lors de la réalisation d'analyses à index double.</p> <p>Correction du cycle auquel apparaissent les données métriques de densité des amplifiats, qui est le cycle 25.</p> <p>Correction des positions de la cartouche de réactifs pour les primers personnalisés en positions n° 7 (lecture 1), n° 8 (lecture 2) et n° 9 (index 1).</p> <p>Ajout d'une remarque concernant les dommages potentiels lors du changement de l'emplacement de l'instrument après installation : « Communiquez toujours avec votre représentant d'Illumina avant de déplacer l'instrument. »</p> <p>Mise à jour de l'URL des fiches signalétiques : support.illumina.com/sds.ilmn.</p>

Document	Date	Description des modifications
Référence n° 15046563, rév. C	Avril 2014	<p>Mise à jour des descriptions de logiciel, qui sont passées au logiciel NextSeq Control Software v1.2 et au RTA v2.1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout du nom de la formule NextSeq Mid à utiliser avec la trousse de débit moyen NextSeq 500. • Suppression des instructions invitant à ajouter du NaOCl à la cartouche de lavage du tampon pour un lavage manuel. • Correction du volume de NaOCl qui passe à 3 ml pour la position 28 de la cartouche de réactifs pour le lavage automatique après analyse. • Mention de l’affichage des noms d’analyses longs dans un champ de défilement sur l’écran Run Setup (Configuration de l’analyse). • Indication selon laquelle RTA v2 n’applique pas de corrections de la mise en phase et en préphase aux lectures d’index. • Ajout de la description des fichiers journaux aux listes de fichiers utilisés pour le dépannage. • Ajout d’instructions pour vider un réservoir à réactifs usagés plein au cours d’une analyse. • Ajout de la description de dossiers de formules, notamment l’emplacement de formules personnalisées. • Ajout de la description des vérifications thermiques des ventilateurs et des sondes thermiques.

Document	Date	Description des modifications
<p>Référence n° 15046563, rév. B</p>	<p>Février 2014</p>	<p>Mise à jour des descriptions du logiciel NextSeq Control Software v1.1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout de la fonction de recherche sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse) pour le filtrage des analyses disponibles. • Ajout des formules disponibles, incluant NextSeq High ou NextSeq Mid, en fonction du type de Flow Cell. • Note indiquant que les mises à jour du logiciel comprennent l'accord de licence, les notes de mise à jour et la liste des logiciels à mettre à jour. • Ajout de la description du message d'erreur RAID. • Note indiquant qu'un bouton Exit (Quitter) ferme NSS et redémarre NCS automatiquement à la fin d'un contrôle du système. <p>Ajout d'une durée de stockage des réactifs allant jusqu'à une semaine à 4 °C.</p> <p>Nouvelle étiquette sur la cartouche de réactifs pour le réservoir n° 10 : Load Library Here (Charger la librairie ici).</p> <p>Mise à jour de la liste des consommables fournis par l'utilisateur pour préciser que la concentration de l'hypochlorite de sodium est de 3 à 6 % et ajout du numéro de référence du fournisseur.</p> <p>Mise à jour des instructions de préparation de la solution de NaOCl diluée à 0,06 % pour les lavages de l'instrument : réduction de volume à 2 ml et concentration de démarrage de 3 à 6 %.</p> <p>Ajout d'illustrations pour montrer la bonne et la mauvaise position de l'attache sur la Flow Cell.</p> <p>Mise à jour du chapitre sur Real-Time Analysis afin d'inclure une présentation de RTA v2, la structure du dossier de sortie et la procédure de définition des bases.</p> <p>Mise à jour du chapitre sur le dépannage afin d'inclure les erreurs RTA v2 et d'ajouter les fichiers RunParameters.xml dans la liste des fichiers de dépannage.</p>
<p>Référence n° 15046563, rév. A</p>	<p>Janvier 2014</p>	<p>Publication originale.</p>

Table des matières

Chapitre 1 Vue d'ensemble	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	1
Composants de l'instrument	2
Présentation des consommables pour le séquençage	5
Chapitre 2 Pour commencer	10
Démarrage de l'instrument	10
Personnaliser les paramètres du système	11
Personnaliser les paramètres de l'analyse	12
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	13
Chapitre 3 Séquençage	15
Introduction	15
Créer une analyse dans Local Run Manager	16
Créer une analyse avec le NCS	16
Préparer la cartouche de réactifs	16
Préparer la Flow Cell	17
Préparer des bibliothèques pour le séquençage	18
Configurer une analyse de séquençage	19
Surveiller la progression de l'analyse	26
Lavage automatique après analyse	27
Chapitre 4 Maintenance	29
Introduction	29
Effectuer un lavage manuel	29
Remplacer le filtre à air	32
Mises à jour logicielles	33
Arrêter l'instrument	35
Annexe A Dépannage	36
Introduction	36
Fichiers de dépannage	36
Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques	37
Réservoir à réactifs usagés plein	38
Flux de travail de réhybridation	39
Formules personnalisées et dossiers de formules	41
Vérification du système	41
Message d'erreur RAID	43
Erreur de stockage réseau	44
Configurer les paramètres du système	44
Annexe B Real-Time Analysis	47

Présentation de Real-Time Analysis	47
Flux de travail de Real-Time Analysis	48
Fichiers de sortie de séquençage	52
Plaques de la Flow Cell	52
Structure du dossier de sortie	55
Index	57
Assistance technique	60

Chapitre 1 Vue d'ensemble

Introduction	1
Ressources supplémentaires	1
Composants de l'instrument	2
Présentation des consommables pour le séquençage	5

Introduction

Le système NextSeq^{MC} 500 d'Illumina^{MD} allie la puissance du séquençage à débit élevé à la simplicité d'un instrument de séquençage de bureau.

Fonctionnalités

- ▶ **Séquençage à débit élevé** : l'instrument NextSeq 500 permet le séquençage des exomes, des génomes entiers et des transcriptomes. Il prend en charge les bibliothèques TruSeq^{MC}, TruSight^{MC} et Nextera^{MC}.
- ▶ **Types de Flow Cell** : les Flow Cell sont disponibles dans des configurations pour débit moyen et débit élevé. Chaque type de Flow Cell est doté d'une cartouche de réactifs compatible préremplie.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : ce logiciel d'analyse intégré exécute l'analyse des données sur instrument, ce qui comprend l'analyse d'images et la définition des bases. Le système NextSeq utilise une version de RTA appelée RTA2, qui comporte d'importants changements en matière d'architecture et de fonctionnalités. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, à la page 47.
- ▶ **Analyse infonuagique avec BaseSpace Sequence Hub^{MC}** : le flux de travail de séquençage est intégré à BaseSpace Sequence Hub, l'environnement infonuagique de génomique d'Illumina consacré au suivi des analyses de séquençage, à l'analyse des données, à leur stockage et à leur partage. Au cours de l'analyse de séquençage, les fichiers de sortie sont transférés en temps réel vers BaseSpace Sequence Hub pour l'analyse.
- ▶ **Analyse des données sur instrument** : le logiciel Local Run Manager analyse les données de séquençage selon le module d'analyse spécifié pour l'analyse de séquençage.

Ressources supplémentaires

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

Ressource	Description
<i>Guide de préparation des sites du système NextSeq (document n° 15045113)</i>	Fournit les spécifications relatives à l'espace du laboratoire, les exigences électriques et les considérations environnementales.
<i>Guide de sécurité et de conformité du système NextSeq (document n° 15046564)</i>	Fournit des renseignements concernant les questions de sécurité, les déclarations de conformité et l'étiquetage de l'instrument.
<i>Guide de l'utilisateur du lecteur RFID – modèle TR-001-44 (document n° 15041950)</i>	Fournit des renseignements sur le lecteur RFID de l'instrument, les certificats de conformité et les questions de sécurité.
<i>Dénaturation et dilution de bibliothèques pour le système NextSeq (document n° 15048776)</i>	Fournit des instructions pour la dénaturation et la dilution de bibliothèques préparées en vue d'une analyse de séquençage, et pour la préparation d'un contrôle PhiX facultatif. Cette étape s'applique à la plupart des types de bibliothèques.

Ressource	Description
<i>Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)</i>	Fournit des renseignements sur l'utilisation de primers de séquençage personnalisés à la place des primers de séquençage d'Illumina.
<i>Aide de BaseSpace</i>	Fournit des renseignements concernant l'utilisation de BaseSpace ^{MC} Sequence Hub et les options d'analyse disponibles.
<i>Guide du logiciel Local Run Manager (document n° 100000002702)</i>	Fournit un aperçu du logiciel Local Run Manager et des directives d'utilisation de ses fonctions.

Consultez la [page d'aide du système NextSeq 500](#) sur le site Web d'Illumina pour accéder à la documentation, aux téléchargements de logiciels, à la formation en ligne et aux foires aux questions.

Composants de l'instrument

Le système NextSeq 500 comprend un moniteur tactile, une barre d'état et quatre compartiments.

Figure 1 Composants de l'instrument



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

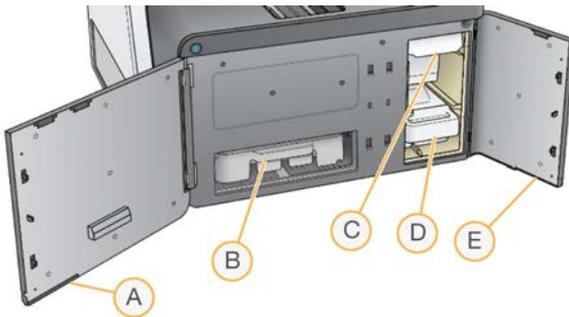
Compartiment d'imagerie

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

Compartiments des réactifs et du tampon

Pour paramétrer une analyse de séquençage sur NextSeq 500, vous devez accéder au compartiment des réactifs et au compartiment du tampon pour charger les consommables de l'analyse et vider le réservoir à réactifs usagés.

Figure 2 Compartiments des réactifs et du tampon



- A **Porte du compartiment de réactifs** : elle ferme le compartiment des réactifs à l'aide d'un verrou qui se trouve sous le coin inférieur droit de la porte. Le compartiment des réactifs contient la cartouche de réactifs. Les réactifs sont pompés par les dispositifs d'aspiration, le système fluide et la Flow Cell.
- B **Cartouche de réactifs** : la cartouche de réactifs est un consommable à usage unique prérempli.
- C **Cartouche du tampon** : la cartouche du tampon est un consommable à usage unique prérempli.
- D **Réservoir à réactifs usagés** : les réactifs usagés sont recueillis pour leur mise au rebut après chaque analyse.
- E **Porte du compartiment du tampon** : elle ferme le compartiment du tampon à l'aide d'un verrou qui se trouve sous le coin inférieur gauche de la porte.

Compartiment du filtre à air

Le compartiment du filtre à air contient le filtre à air pour les instruments avec un filtre accessible depuis le panneau arrière. Remplacez le filtre à air tous les 90 jours. Pour obtenir de l'information sur le remplacement du filtre, consultez la section *Remplacer le filtre à air*, à la page 32.

Logiciel NextSeq

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

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** : ce logiciel contrôle le fonctionnement de l'instrument et vous accompagne à chaque étape de configuration d'une analyse de séquençage.
 - ▶ Le logiciel est préinstallé sur l'instrument NextSeq et est exécuté sur l'instrument. Le NCS exécute l'analyse selon les paramètres indiqués dans le module du logiciel Local Run Manager ou dans le NCS.
 - ▶ Avant de lancer l'analyse de séquençage, vous devez sélectionner une analyse que vous avez créée avec le module Local Run Manager ou dans le NCS. L'interface du NCS vous guide tout au long des étapes de chargement de la Flow Cell et des réactifs.

- ▶ Au cours de l'analyse, le logiciel actionne la platine de Flow Cell, distribue les réactifs, contrôle le système fluide, règle les températures, capture les images des amplifiats sur la Flow Cell et présente un récapitulatif visuel des statistiques de qualité. Vous pouvez surveiller l'analyse dans le NCS ou dans Local Run Manager.
- ▶ Pendant l'analyse, que vous pouvez surveiller dans NCS ou dans Local Run Manager, le NCS exécute les fonctions suivantes :
 - ▶ Fonctionnement de la platine de Flow Cell
 - ▶ Distribution des réactifs
 - ▶ Contrôle de la fluide
 - ▶ Réglage de la température
 - ▶ Capture des images des amplifiats sur la Flow Cell
 - ▶ Présentation d'un récapitulatif visuel des statistiques de qualité
- ▶ **Logiciel Local Run Manager** : solution logicielle intégrée servant à la création des analyses et à l'analyse des résultats (analyse secondaire). Le logiciel permet aussi le suivi des échantillons et peut contrôler les autorisations des utilisateurs.
- ▶ **Logiciel Real-Time Analysis (RTA)** : RTA effectue l'analyse d'images et la définition des bases lors de l'analyse. NextSeq 500 utilise RTA2, qui diffère grandement des versions antérieures en matière de fonctionnalités et d'architecture. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, à la page 47.
- ▶ **Universal Copy Service** : ce logiciel copie, dans le dossier de sortie et dans BaseSpace Sequence Hub (s'il y a lieu), les fichiers de sortie de séquençage se trouvant dans le dossier d'analyse.

Real-Time Analysis (RTA) et Universal Copy Service exécutent leurs processus en arrière-plan seulement.

Icônes d'état

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

Icône d'état	Nom de l'état	Description
	Status OK (État OK)	Le système est normal.
	Processing (Traitement)	Le système est en cours de traitement.
	Warning (Avertissement)	Un avertissement a eu lieu. Les avertissements n'interrompent pas l'analyse et ne nécessitent pas d'intervention pour la poursuite de l'analyse.
	Error (Erreur)	Une erreur a eu lieu. Les erreurs nécessitent une intervention avant la poursuite de l'analyse.
	Attention	Un avis a été généré et nécessite une attention. Reportez-vous au message pour avoir des renseignements supplémentaires.
	Information	Il s'agit d'un message à titre informatif seulement. Aucune autre action n'est requise.

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

Icône de la barre de navigation

L'icône de réduction du NCS se trouve dans le coin supérieur droit de l'interface du logiciel de commande.

Icône d'accès	Nom de l'icône	Description
	Minimize NCS (Réduire le NCS)	Pour réduire le NCS afin d'accéder aux applications et aux dossiers de Windows.

Bouton d'alimentation

Le bouton d'alimentation situé sur la partie avant du NextSeq met sous tension l'instrument et l'ordinateur de l'instrument. Il réalise les actions suivantes en fonction de l'état de l'alimentation de l'instrument.

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



REMARQUE

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

Exigences en matière de mots de passe Windows

Le système d'exploitation requiert que le mot de passe Windows soit modifié tous les 180 jours. Modifiez le mot de passe Windows lorsque vous y êtes invité. Si vous utilisez Local Run Manager pour l'analyse, modifiez aussi le mot de passe pour le compte Windows dans Local Run Manager. Consultez la section Spécifier les paramètres du compte de service dans le *Guide du logiciel Local Run Manager (document n° 1000000002702)*.

Présentation des consommables pour le séquençage

Contenu et stockage

Les consommables de séquençage nécessaires au fonctionnement de l'instrument NextSeq sont fournis séparément, dans une trousse à usage unique. Chaque trousse comprend une Flow Cell, une cartouche de réactifs, une cartouche de tampon et un tampon de dilution de librairie. À la réception de la trousse NextSeq 500 :

- ▶ N'ouvrez pas l'emballage en aluminium de la Flow Cell avant d'en recevoir la directive.
- ▶ Rangez rapidement les composants à la température indiquée afin de garantir leur performance.

- Rangez les cartouches en les positionnant de façon à ce que les étiquettes de l’emballage soient face vers le haut.

Consommable	Quantité	Température de stockage	Description
cartouche de réactifs	1	de -25 °C à -15 °C	Contient les réactifs de génération d’amplifiats et de séquençage
cartouche de tampon	1	de 15 °C à 30 °C	Contient le tampon et la solution de lavage
HT1	1	de -25 °C à -15 °C	Tampon d’hybridation
Flow Cell	1	de 2 °C à 8 °C*	Flow Cell à usage unique

* Trousses de réactifs NextSeq v2.5 livrées à température ambiante

Les réactifs sont sensibles à la lumière. Conservez la cartouche de réactifs et la cartouche de tampon dans un endroit sombre, à l’abri de la lumière.

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

Toutes les autres trousse comprennent une cartouche préremplie de primers de séquençage à double index et de NaOCl. Aucune étape supplémentaire n’est requise.



ATTENTION

Les trousse de réactifs NextSeq v2.5 requièrent la version 2.2 du NCS ou une version plus récente. Assurez-vous que les mises à jour sont terminées avant de préparer les échantillons et les consommables.

Compatibilité et étiquetage de la trousse

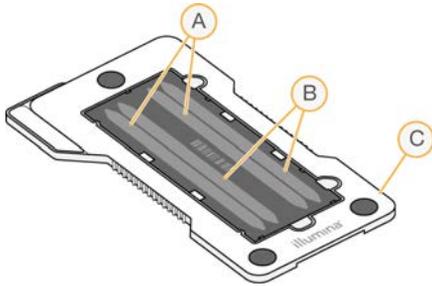
Des codes de couleurs figurent sur les composants de la trousse, afin d’indiquer la compatibilité des Flow Cell avec les cartouches de réactifs. Utilisez toujours une cartouche de réactifs et une Flow Cell compatibles. La cartouche de tampon est universelle.

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

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

Présentation de la Flow Cell

Figure 3 Cartouche de Flow Cell



- A Paire de lignes A : lignes un et trois
- B Paire de lignes B : lignes deux et quatre
- C Châssis de la cartouche de Flow Cell

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

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

- ▶ Les lignes un et trois (paire de lignes A) sont imagées simultanément.
- ▶ Les lignes deux et quatre (paire de lignes B) sont imagées lorsque l'imagerie de la paire de lignes A est terminée.

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

Chaque ligne est imagée par petites zones d'imagerie appelées plaques. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Plaques de la Flow Cell*, à la page 52.

Présentation de la cartouche de réactifs

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

Figure 4 Cartouche de réactifs



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

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

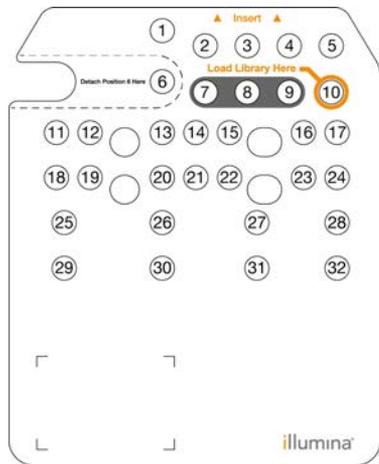


AVERTISSEMENT

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

Réservoirs réservés

Figure 5 Réservoirs numérotés



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

Pour obtenir plus de renseignements sur les primers personnalisés, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq* (document n° 15057456).

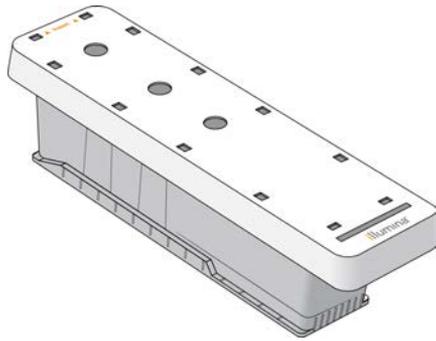
Réservoir amovible en position n° 6

La cartouche de réactifs préremplie comprend un réactif de dénaturation en position n° 6 qui contient du formamide. Pour faciliter la mise au rebut sécuritaire de tout réactif non utilisé après l'analyse de séquençage, le réservoir en position n° 6 est amovible. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Retirer le réservoir usagé de la position n° 6*, à la page 24.

Présentation de la cartouche de tampon

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

Figure 6 Cartouche de tampon



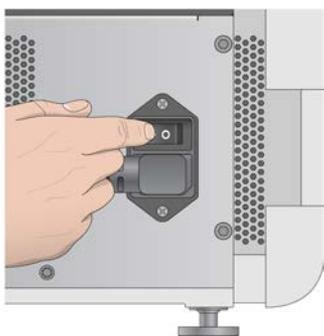
Chapitre 2 Pour commencer

Démarrage de l'instrument	10
Personnaliser les paramètres du système	11
Personnaliser les paramètres de l'analyse	12
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	13

Démarrage de l'instrument

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

Figure 7 Interrupteur d'alimentation situé à l'arrière de l'instrument



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

Figure 8 Bouton d'alimentation situé à l'avant de l'instrument



- 2 Attendez le chargement complet du système d'exploitation.
Le NextSeq Control Software (NCS) démarre et initialise automatiquement le système. À la fin de l'étape d'initialisation, l'écran d'accueil s'ouvre.
- 3 Si la configuration du système nécessite des identifiants de connexion, attendez que le système soit chargé, puis ouvrez une session du système d'exploitation. Si nécessaire, consultez l'administrateur de votre établissement pour obtenir le nom d'utilisateur et le mot de passe.

Personnaliser les paramètres du système

Le logiciel de commande comprend des paramètres de système personnalisables pour les éléments suivants. Pour changer les paramètres de configuration du réseau, consultez la section *Configurer les paramètres du système*, à la page 44.

- ▶ Personnaliser l'identification de l'instrument (avatar et surnom)
- ▶ Configurer l'option de clavier et l'indicateur sonore
- ▶ Configurer l'option de formules personnalisées
- ▶ Configurer la vérification des mises à jour logicielles de l'instrument à partir de BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Configurer l'option d'envoyer les données sur la performance de l'instrument

Personnaliser l'avatar et le surnom de l'instrument

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

Configurer l'option de clavier et l'indicateur sonore

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 3 Cochez la case **Use on-screen keyboard** (Utiliser le clavier à l'écran) afin d'activer le clavier à l'écran pour saisir des renseignements à communiquer à l'instrument.
- 4 Cochez la case **Play audio** (Lire les sons) pour activer les indicateurs audio pour les événements suivants :
 - ▶ lors de l'initialisation de l'instrument;
 - ▶ au démarrage d'une analyse;
 - ▶ lors de certaines erreurs;
 - ▶ lorsqu'une interaction avec l'utilisateur est nécessaire;
 - ▶ à la fin d'une analyse.
- 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer l'option de formules personnalisées

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 3 Cochez la case **Enable Custom Recipes** (Activation des formules personnalisées) pour activer la fonction de sélection d'une formule personnalisée lors du chargement d'une cartouche de réactifs. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Formules personnalisées et dossiers de formules*, à la page 41.
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer la vérification des mises à jour logicielles de l'instrument à partir de BaseSpace

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 3 Cochez la case **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Vérifier automatiquement les nouvelles mises à jour logicielles sur BaseSpace) pour activer les vérifications automatiques des mises à jour pour BaseSpace Sequence Hub.
La recherche automatique de mises à jour est réalisée toutes les 24 heures. Lorsqu'une mise à jour est disponible, une notification s'affiche aux endroits suivants :
 - ▶ sur l'écran **Manage Instrument** (Gérer l'instrument), à l'icône **Software Update** (Mise à jour logicielle);
 - ▶ au bouton **Manage Instrument** (Gérer l'instrument) de l'écran d'accueil.
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer l'option d'envoyer les données sur la performance de l'instrument

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 3 Sélectionnez **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Envoyer les données sur la performance de l'instrument à Illumina) pour activer le service de surveillance Illumina Proactive. Le nom du paramètre affiché dans l'interface du logiciel pourrait être différent du nom indiqué dans le présent guide, selon la version NCS utilisée.
Lorsque ce paramètre est activé, les données relatives à la performance de l'instrument sont transmises à Illumina. Ces données facilitent le dépannage par Illumina et lui permettent de détecter les pannes potentielles, d'exécuter une maintenance proactive et d'optimiser le temps d'utilisation de l'instrument. Pour obtenir plus de renseignements sur les avantages de ce service, consultez la *note technique d'Illumina Proactive (document n° 1000000052503)*.
Ce service :
 - ▶ Ne transmet pas de données de séquençage.
 - ▶ Nécessite la connexion de l'instrument à un réseau ayant accès à Internet.
 - ▶ Est activé par défaut. Pour choisir de ne pas utiliser ce service, désactivez le paramètre **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Envoyer les données sur la performance de l'instrument à Illumina).
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Personnaliser les paramètres de l'analyse

Le logiciel de commande contient des paramètres personnalisables pour les préférences de configuration de l'analyse et l'élimination des réactifs inutilisés.

Configurer les options de configuration de l'analyse

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).

- 3 Cochez la case **Use Advanced Load Consumables** (Utiliser les consommables de chargement avancé) pour activer l'option permettant de charger tous les consommables de l'analyse à partir d'un écran unique.
- 4 Cochez la case **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Ignorer la confirmation de la vérification avant analyse) pour démarrer automatiquement le séquençage après une vérification automatique réussie.
- 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer l'option d'élimination automatique

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



REMARQUE

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

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

Consommables et équipement fournis par l'utilisateur

Les consommables et l'équipement suivants sont utilisés sur NextSeq 500.

Consommables pour le séquençage

Consommable	Fournisseur	Utilisation
NaOH 1 N (hydroxyde de sodium)	Fournisseur de laboratoire général	Dénaturation de la librairie, diluée à 0,2 N
Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714 (ou équivalent) Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage de la Flow Cell et usage général
Tissu de laboratoire non pelucheux	VWR, n° de référence 21905-026 (ou équivalent)	Nettoyage de la Flow Cell

Consommables pour la maintenance et le dépannage

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

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Méthanol ou alcool isopropylique (99 %) de qualité réactif ou spectrophotométrique, flacon de 100 ml	Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage périodique des composants optiques et support de la cartouche de nettoyage de l'objectif
Filtre à air	Illumina, n° de référence 20022240	Pour instruments avec un filtre à air accessible depuis le panneau arrière. Nettoyage de l'air utilisé par l'instrument pour le refroidissement.

Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

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

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

Équipement

Élément	Source	Utilisation
Congélateur, de -15 °C à -25 °C, sans givre	Fournisseur de laboratoire général	Stockage de la cartouche
Seau d'eau glacé	Fournisseur de laboratoire général	Mise de côté des librairies
Réfrigérateur, de 2 °C à 8 °C	Fournisseur de laboratoire général	Stockage de la Flow Cell

Chapitre 3 Séquençage

Introduction	15
Créer une analyse dans Local Run Manager	16
Créer une analyse avec le NCS	16
Préparer la cartouche de réactifs	16
Préparer la Flow Cell	17
Préparer des bibliothèques pour le séquençage	18
Configurer une analyse de séquençage	19
Surveiller la progression de l'analyse	26
Lavage automatique après analyse	27

Introduction

Pour effectuer une analyse de séquençage sur l'instrument NextSeq 500, préparez une cartouche de réactifs et une Flow Cell. Suivez ensuite les invites du logiciel pour configurer et démarrer l'analyse. La génération d'amplifiats et le séquençage sont effectués sur instrument. Après l'analyse, le lavage de l'instrument commence automatiquement à l'aide des composants déjà chargés dans l'instrument.

Génération d'amplifiats

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

Séquençage

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

Surveillez la progression de l'analyse et les statistiques aux emplacements suivants :

- ▶ l'interface du NCS;
- ▶ BaseSpace Sequence Hub;
- ▶ Local Run Manager;
- ▶ un ordinateur en réseau utilisant le logiciel Sequencing Analysis Viewer (SAV). Consultez la section *Sequencing Analysis Viewer*, à la page 27.

Analyse

Pendant la progression de l'analyse, le logiciel de commande transfère automatiquement les fichiers de définition des bases (BCL) vers BaseSpace Sequence Hub, Local Run Manager ou un autre emplacement de sortie indiqué pour l'analyse secondaire.

Plusieurs méthodes d'analyse sont disponibles en fonction de votre application. Pour obtenir plus de renseignements, consultez l'*aide de BaseSpace* ou le *Guide du logiciel Local Run Manager* (document n° 100000002702).

Durée de l'analyse de séquençage

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

Pour connaître les prévisions de durée et autres spécifications du système, consultez la [page des spécifications de NextSeq 500](#) sur le site Web d'Illumina.

Nombre de cycles d'une lecture

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

Créer une analyse dans Local Run Manager

Le processus de configuration des paramètres de l'analyse de séquençage et de l'analyse des données dans Local Run Manager varie en fonction du module de flux de travail d'analyse utilisé. Reportez-vous au guide du module de Local Run Manager pour obtenir les directives sur la façon de créer une analyse.

- 1 À l'écran d'accueil, sélectionnez **Edit Runs** (Modifier les analyses).
- 2 Sélectionnez **Create Run** (Créer l'analyse) dans le tableau de bord de Local Run Manager, puis choisissez un module d'analyse.
- 3 Entrez le nom de l'analyse et les échantillons de l'analyse, et au besoin, importez les fichiers de manifeste.
- 4 Enregistrez l'analyse et fermez la fenêtre du tableau de bord de Local Run Manager.

Pour créer une analyse dans le NCS sans l'aide du logiciel Local Run Manager, utilisez le mode d'analyse manuel. Consultez les sections *Créer une analyse avec le NCS*, à la page 16 et *Modes d'analyse*, à la page 19.

Créer une analyse avec le NCS

Si vous créez une analyse avec le NCS (mode d'analyse manuel), les paramètres de l'analyse de séquençage et de l'analyse des données sont saisis immédiatement avant le chargement de la Flow Cell.

- 1 Revoyez les paramètres requis de l'analyse de séquençage et de l'analyse des données à la section *Saisir les paramètres de l'analyse de séquençage et de l'analyse des données dans le NCS (mode d'analyse manuel)*, à la page 21.
- 2 Déterminez immédiatement les paramètres de l'analyse de séquençage et de l'analyse des données pour éviter tout délai lorsque vous débuterez l'analyse de séquençage.

Préparer la cartouche de réactifs

- 1 Retirez la cartouche de réactifs de son lieu de stockage entre -25 et -15 °C.
- 2 Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (environ 60 minutes). N'immergez pas la cartouche.

- 3 Tapotez doucement sur la paillasse pour éliminer l'eau de la base, puis séchez la base.
[Autre méthode] Décongelez les réactifs pendant la nuit à une température maintenue entre 2 °C et 8 °C. Il faut un minimum de 18 heures pour les décongeler. À cette température, les réactifs sont stables pendant une durée allant jusqu'à une semaine.
- 4 Retournez la cartouche cinq fois pour mélanger les réactifs.
- 5 Inspectez les positions 29, 30, 31 et 32 pour vérifier que les réactifs sont décongelés.
- 6 Tapotez doucement sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.



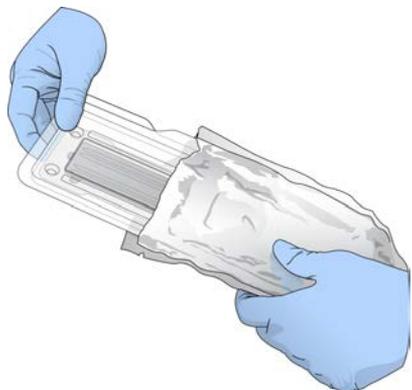
AVERTISSEMENT

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

Préparer la Flow Cell

- 1 Sortez un nouvel emballage de Flow Cell du lieu de stockage à une température maintenue entre 2 et 8 °C.
- 2 Sortez la Flow Cell de son emballage en aluminium.

Figure 9 Retirer de l'emballage en aluminium



- 3 Laissez l'emballage de la Flow Cell ouvert à température ambiante pendant 30 minutes.



REMARQUE

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

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

Figure 10 Retirer de l'emballage double coque



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

Préparer des bibliothèques pour le séquençage

Le volume et la concentration de chargement de la bibliothèque varient en fonction de la version du NCS utilisée.

Version du logiciel de commande	Volume de la bibliothèque	Concentration de la bibliothèque
NCS v1.3 ou ultérieure	1,3 ml	1,8 pmol
NCS v1.2 ou antérieure	3 ml	3 pmol

Dénaturer et diluer des bibliothèques

Dénaturez et diluez les bibliothèques au volume et à la concentration de chargement suivants :

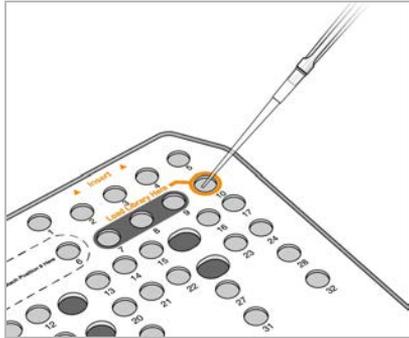
Type de trousse	Volume de chargement	Concentration de chargement
Débit élevé	1,3 ml	1,8 pmol
Débit moyen	1,3 ml	1,5 pmol

En pratique, la concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation et de quantification des bibliothèques. Pour connaître les instructions, consultez le *Guide de dénaturation et de dilution des bibliothèques pour le système NextSeq* (document n° 15048776).

Chargement des bibliothèques sur la cartouche de réactifs

- Nettoyez l'opercule en aluminium recouvrant le réservoir n° 10 étiqueté **Load Library Here** (Charger la bibliothèque ici) à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- Percez l'opercule avec une pointe de pipette propre de 1 ml.
- Chargez 1,3 ml de bibliothèque préparée à 1,8 pmol dans le réservoir n° 10 étiqueté **Load Library Here** (Charger la bibliothèque ici). Évitez de toucher l'opercule en aluminium pendant le transfert du produit.

Figure 11 Charger les bibliothèques



Configurer une analyse de séquençage

- 1 À l'écran d'accueil, sélectionnez **Experiment** (Expérience).
- 2 À l'écran Select Assay (Sélectionner le test), sélectionnez **Sequence** (Séquence).
La commande Sequence (Séquence) ouvre la porte du compartiment d'imagerie, libère les consommables utilisés lors d'une analyse précédente et ouvre une série d'écrans de configuration de l'analyse. Un court délai est normal.

Modes d'analyse

Lors de la configuration d'une analyse de séquençage, sélectionnez un des modes d'analyse suivants pour déterminer l'endroit où saisir les paramètres de l'analyse de séquençage et la façon d'analyser les données.

Mode d'analyse	Information sur l'analyse	Analyse des données*
Local Run Manager	Paramètres saisis dans Local Run Manager.	Le logiciel enregistre les données dans le dossier de sortie précisé pour l'analyse automatique dans Local Run Manager.
Mode manuel	Paramètres saisis dans le NCS.	Le logiciel enregistre les données dans le dossier de sortie précisé en vue d'une analyse ultérieure, hors instrument.

* Pour les besoins de l'analyse, BaseSpace Sequence Hub peut être utilisé avec les deux modes. Lorsque le mode Local Run Manager est utilisé et que BaseSpace Sequence Hub est configuré, les deux logiciels analysent les données.

Local Run Manager est le mode d'analyse par défaut; il procure le flux de travail le plus simplifié. Vous créez et enregistrez les analyses dans Local Run Manager. L'information est alors envoyée au logiciel de commande; vous y sélectionnez une analyse et poursuivez la configuration de l'analyse. Après le séquençage, le logiciel Local Run Manager effectue automatiquement l'analyse des données. Des feuilles d'échantillons et des applications d'analyse distinctes ne sont pas nécessaires.



REMARQUE

Local Run Manager n'est pas une fonction du logiciel de commande. C'est un logiciel intégré servant à l'enregistrement des échantillons pour le séquençage, à la précision des paramètres d'analyse et à l'analyse des données.

BaseSpace Sequence Hub (facultatif)

Lors de la configuration d'une analyse de séquençage, vous pouvez sélectionner une des options suivantes de BaseSpace Sequence Hub :

Option	Description et exigences
Run Monitoring and Storage (Surveillance de l'analyse et stockage)	Envoyer les fichiers InterOp, les fichiers journaux et les données d'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour la surveillance et l'analyse à distance. Requiert un compte BaseSpace Sequence Hub, une connexion Internet et une feuille d'échantillons.
Run Monitoring Only (Surveillance de l'analyse seulement)	Envoyer les fichiers InterOp et les fichiers journaux à BaseSpace Sequence Hub pour la surveillance à distance de l'analyse. C'est l'option par défaut. Requiert un compte BaseSpace Sequence Hub et une connexion Internet.

Sélectionnez le mode d'analyse et BaseSpace Sequence Hub

- 1 Sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), sélectionnez un des modes d'analyse suivants :
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Mode manuel
- 2 **[Facultatif]** Sélectionnez **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Utiliser les paramètres de BaseSpace Sequence Hub) et sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Surveillance de l'analyse et stockage)
 - ▶ Run Monitoring Only (Surveillance de l'analyse seulement)

Saisissez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe BaseSpace Sequence Hub.
Si vous y êtes invité, sélectionnez un groupe de travail sur lequel télécharger les données d'analyse. Vous y serez invité seulement si vous faites partie de plusieurs groupes de travail.
- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Sélectionner l'analyse (mode d'analyse Local Run Manager)

- 1 Sélectionnez le nom d'une analyse dans la liste des analyses disponibles.
Utilisez les flèches haut et bas pour faire défiler la liste ou saisissez le nom d'une analyse dans le champ de recherche.
- 2 Confirmez les paramètres de l'analyse.
 - ▶ **Run Name** (Nom de l'analyse) : le nom de l'analyse tel qu'attribué dans Local Run Manager.
 - ▶ **Library ID** (Identifiant de librairie) : le nom des librairies groupées tel qu'attribué dans Local Run Manager.
 - ▶ **Recipe** (Formule) : le nom de la formule, **NextSeq High** ou **NextSeq Mid**, en fonction de la cartouche de réactifs utilisée pour l'analyse.
 - ▶ **Read Type** (Type de lecture) : lecture unique ou appariée.
 - ▶ **Read Length** (Longueur de la lecture) : le nombre de cycles par lecture.
 - ▶ **[Facultatif]** Primers personnalisés, le cas échéant.
- 3 **[Facultatif]** Sélectionnez l'icône **Edit** (Modifier) pour modifier les paramètres de l'analyse. Lorsque vous avez terminé, sélectionnez **Save** (Enregistrer).
 - ▶ **Run parameters** (Paramètres d'analyse) : modifier le nombre de lectures ou le nombre de cycles par lecture.
 - ▶ **Custom primers** (Primers personnalisés) : modifiez les réglages des primers personnalisés. Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)*.

- ▶ **Purge consommables for this run** (Éliminer les consommables pour cette analyse) : modifiez ce paramètre pour que les consommables soient automatiquement éliminés après l'analyse en cours.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Saisir les paramètres de l'analyse de séquençage et de l'analyse des données dans le NCS (mode d'analyse manuel)

- 1 Saisissez un nom d'analyse de votre choix.
- 2 **[Facultatif]** Saisissez l'identifiant de librairie de votre choix.
- 3 Sélectionnez une formule dans la liste déroulante **Recipe (Formule)**. Seules les formules compatibles sont répertoriées.
- 4 Sélectionnez un type de lecture, soit **lecture unique** ou **lecture appariée**.
- 5 Indiquez le nombre de cycles pour chaque lecture de l'analyse de séquençage.
 - ▶ **Read 1** (Lecture 1) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles.
 - ▶ **Read 2** (Lecture 2) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles. Cette valeur est généralement identique au nombre de cycles de la lecture 1.
 - ▶ **Index 1** : saisissez le nombre de cycles nécessaire pour le primer d'index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** : saisissez le nombre de cycles nécessaire pour le primer d'index 2 (i5).

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

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

Pour obtenir des renseignements relatifs aux exigences du dossier de sortie, consultez la section *Définir l'emplacement du dossier de sortie*, à la page 46.
- 8 Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour sélectionner une feuille d'échantillons.

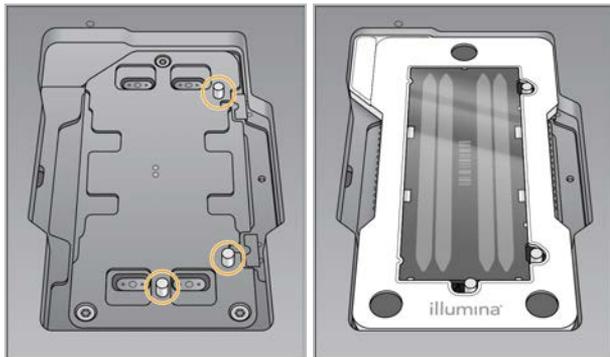
Une feuille d'échantillons est requise lorsque le système est configuré en mode manuel avec la surveillance d'analyse et le stockage dans BaseSpace Sequence Hub.
- 9 Sélectionnez **Purge consommables for this run** (Purger les consommables pour cette analyse).

Le système purge automatiquement les consommables après l'analyse en cours.
- 10 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 11 **[Facultatif]** Sélectionnez l'icône **Edit (Modifier)** pour modifier les paramètres de l'analyse.
- 12 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Chargement de la Flow Cell

- 1 Retirez la Flow Cell de l'analyse précédente.
- 2 Alignez la Flow Cell sur les broches d'alignement et placez-la sur la platine.

Figure 12 Chargement de la Flow Cell



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

Vider le réservoir à réactifs usagés

- 1 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez son contenu conformément aux normes en vigueur.

Figure 13 Retirer le réservoir à réactifs usagés



REMARQUE

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

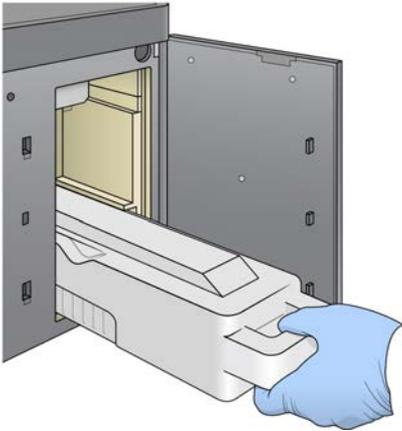


AVERTISSEMENT

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

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

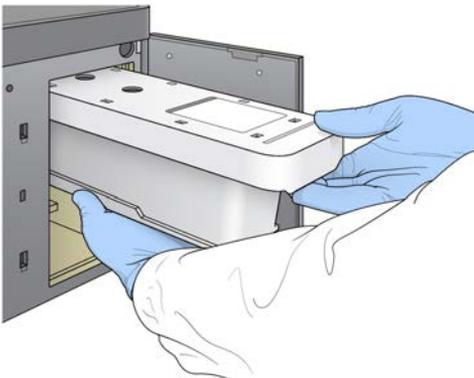
Figure 14 Charger le réservoir à réactifs usagés vide



Charger la cartouche de tampon

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

Figure 15 Charger la cartouche de tampon



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

Charger la cartouche de réactifs

- 1 Retirez la cartouche de réactifs usagée du compartiment de réactifs. Mettez les contenus inutilisés au rebut conformément aux normes en vigueur.



AVERTISSEMENT

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

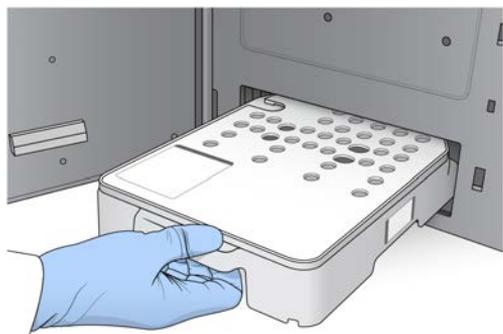


REMARQUE

Le réservoir à la position 6 est amovible pour faciliter la mise au rebut en toute sécurité des réactifs inutilisés. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Retirer le réservoir usagé de la position n°6*, à la page 24.

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

Figure 16 Charger la cartouche de réactifs

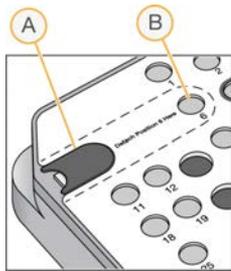


- 3 Sélectionnez **Load** (Charger).
Le logiciel positionne automatiquement la cartouche (environ 30 secondes), l'identifiant de la cartouche de réactifs s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Retirer le réservoir usagé de la position n° 6

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

Figure 17 Position n° 6 amovible



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

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

Passer en revue la vérification automatique

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

- ▶ **Crochet** **gris** : la vérification n'a pas été encore effectuée.
- ▶ **icône** **de progression** : la vérification est en cours.
- ▶ **Crochet** **vert** : la vérification a réussi.
- ▶ **✘ rouge** : la vérification a échoué. Pour tous les éléments qui n'ont pas réussi la vérification, une action est nécessaire avant que vous puissiez continuer. Consultez la section *Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques*, à la page 37.

Pour interrompre une vérification automatisée en cours, sélectionnez l'icône , située dans le coin inférieur droit. Pour redémarrer la vérification, sélectionnez l'icône . La vérification reprend à la première vérification incomplète ou non conforme.

Pour afficher les résultats de chaque vérification dans une catégorie, cliquez sur l'icône de déploiement de la catégorie.

REMARQUE

Lorsque vous effectuez la première analyse de séquençage avec NCS v4.0 ou une version ultérieure, il est normal que l'enregistrement de la Flow Cell prenne plus de 15 minutes pendant la vérification automatique du système.

Démarrer l'analyse

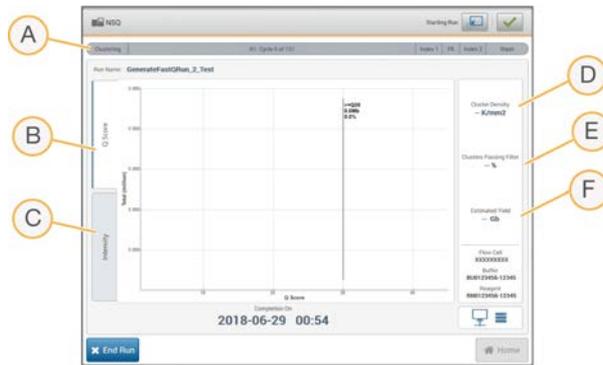
Une fois la vérification automatique terminée, sélectionnez **Start** (Démarrer). L'analyse de séquençage commence.

Pour configurer le système afin de démarrer automatiquement l'analyse après une vérification réussie, consultez la section *Configurer les options de configuration de l'analyse*, à la page 12.

Surveiller la progression de l'analyse

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

Figure 18 Progression et indicateurs de l'analyse de séquençage



- A **Run progress** (Progression de l'analyse) : indique l'étape en cours et le nombre de cycles réalisés pour chaque lecture. La barre de progression n'est pas proportionnelle à la durée d'analyse de chaque étape. Utilisez le temps restant dans le coin supérieur droit pour déterminer la durée exacte.
- B **Q-Score** (Score de qualité) : indique la répartition des scores de qualité. Consultez la section *Notation de la qualité*, à la page 51.
- C **Intensity** (Intensité) : indique la valeur des intensités d'amplifiats du 90^e percentile pour chaque plaque. Les couleurs du tracé indiquent chaque base : A est rouge, C vert, G bleu et T noir. Les couleurs correspondent aux indicateurs de base dans le logiciel Sequencing Analysis Software (SAV).
- D **Cluster Density (K/mm²)** (Densité des amplifiats [K/mm²]) : indique le nombre d'amplifiats détectés pour l'analyse.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Amplifiats passant le filtre [%]) : indique le pourcentage d'amplifiats passant le filtre. Consultez la section *Amplifiats passant le filtre*, à la page 50.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Estimation de rendement [Gb]) : indique le nombre de bases prévues pour l'analyse.



REMARQUE

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

Cycles des indicateurs de l'analyse

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

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

Transfert des données

Selon la configuration d'analyse sélectionnée, une icône apparaît sur l'écran pendant l'analyse pour indiquer l'état du transfert des données.

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

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

Universal Copy Service

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

Sequencing Analysis Viewer

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

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

Lavage automatique après analyse

Lorsque l'analyse de séquençage est terminée, le logiciel lance un lavage automatique après analyse. Le lavage après analyse utilise une solution contenue dans la cartouche de tampon et du NaOCl contenu dans la cartouche de réactifs.

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

Après le lavage

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

Chapitre 4 Maintenance

Introduction	29
Effectuer un lavage manuel	29
Remplacer le filtre à air	32
Mises à jour logicielles	33
Arrêter l'instrument	35

Introduction

Les procédures d'entretien comprennent des lavages manuels de l'instrument, le remplacement du filtre à air, ainsi que les éventuelles mises à jour des logiciels du système.

- ▶ **Lavages de l'instrument** : un lavage automatique après chaque analyse de séquençage permet d'optimiser les performances de l'instrument. Toutefois, il est nécessaire d'effectuer régulièrement un lavage manuel dans certaines conditions. Consultez la section *Effectuer un lavage manuel*, à la page 29.
- ▶ **Mises à jour logicielles** : lorsqu'une nouvelle version du logiciel du système est disponible, vous pouvez l'installer automatiquement à l'aide de l'une des deux méthodes suivantes :
 - ▶ en vous connectant à BaseSpace Sequence Hub;
 - ▶ manuellement, après avoir téléchargé le programme d'installation disponible sur le site Web d'Illumina. Consultez la section *Mises à jour logicielles*, à la page 33.
- ▶ **Remplacement du filtre à air** : le remplacement régulier du filtre à air accessible depuis le panneau arrière assure une bonne circulation de l'air dans l'instrument muni d'un tel filtre.

Maintenance préventive

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

Effectuer un lavage manuel

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

Types de lavage	Description
Quick Wash (Lavage rapide) Durée : 20 minutes	Rince le système avec une solution de lavage fournie par l'utilisateur composée d'eau de laboratoire et de Tween 20 (cartouche de lavage du tampon). Doit être effectué tous les 14 jours si l'instrument est inutilisé ou après un arrêt.
Manual Post-Run Wash (Lavage manuel après analyse) Durée : 90 minutes	Rince le système avec une solution de lavage fournie par l'utilisateur composée d'eau de laboratoire, de Tween 20 (cartouche de lavage du tampon) et d'hypochlorite de sodium à 0,12 % (cartouche de lavage des réactifs). Nécessaire lorsque le lavage automatique après analyse n'a pas été effectué.

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

Figure 19 Cartouche de lavage des réactifs et cartouche de lavage du tampon d'origine.

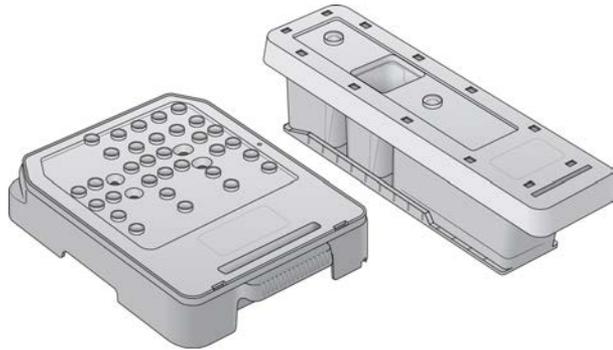
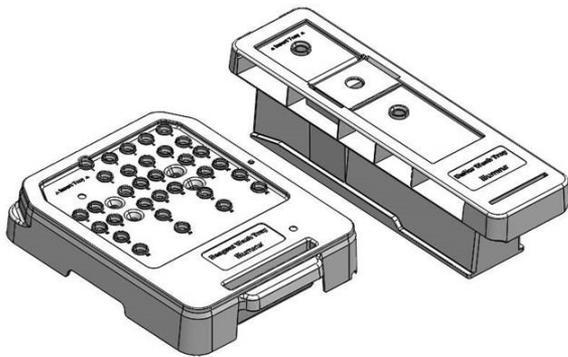


Figure 20 Nouvelle cartouche de lavage des réactifs et nouvelle cartouche de lavage du tampon.



Préparer un lavage manuel après analyse

Consommables fournis par l'utilisateur	Volume et description
<ul style="list-style-type: none"> • NaOCl 	1 ml, dilution à 0,12 % Chargé dans la cartouche de lavage de réactifs (position n° 28)
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 à 100 % • Eau de laboratoire 	Utilisée pour préparer une solution de lavage Tween 20 à 0,05 % de 125 ml Chargée dans la cartouche de lavage du tampon (réservoir central)

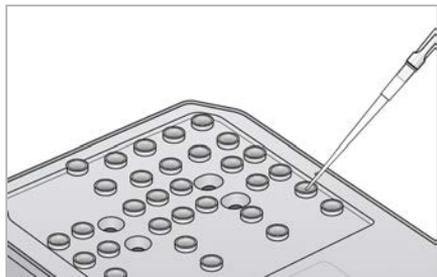


REMARQUE

Utilisez toujours une nouvelle dilution de NaOCl préparée au cours des **24 dernières heures**. Si vous préparez un volume supérieur à 1 ml, stockez la dilution restante entre 2 et 8 °C pour une utilisation dans les 24 heures suivantes. Sinon, jetez la dilution de NaOCl restante.

- Mélangez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour obtenir une solution de 1 ml de NaOCl à 0,12 % :
 - ▶ NaOCl à 5 % (24 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (976 µl)
- Retournez le tube pour mélanger.
- Ajoutez 1 ml de NaOCl à 0,12 % à la cartouche de lavage des réactifs. Le réservoir approprié est équivalent à la position n° 28 de la cartouche préremplie.

Figure 21 Charger le NaOCl



- 4 Combinez les volumes suivants afin d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,05 % :
 Cartouche de lavage du tampon d'origine
 - ▶ Tween 20 à 100 % (62 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (125 ml)
 - ▶ Ajoutez 125 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
 Nouvelle cartouche de lavage du tampon
 - ▶ Tween 20 à 100 % (75 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (150 ml)
 - ▶ Ajoutez 150 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
- 5 Sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage), puis sélectionnez **Manual Post-Run Wash** (Lavage manuel après analyse).

Préparer un lavage rapide

Consommables fournis par l'utilisateur	Volume et description
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 à 100 % • Eau de laboratoire 	Utilisée pour préparer une solution de lavage Tween 20 à 0,05 % de 40 ml Chargée dans la cartouche de lavage du tampon (réservoir central)

- 1 Combinez les volumes suivants afin d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,05 % :
 - ▶ Tween 20 à 100 % (20 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (40 ml)
- 2 Ajoutez 40 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
- 3 Sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage), puis sélectionnez **Quick Wash** (Lavage rapide).

Charger une Flow Cell usagée et les cartouches de lavage

- 1 En l'absence de Flow Cell usagée, chargez une Flow Cell usagée. Sélectionnez **Load** (Charger), puis **Next** (Suivant).

- 2 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez son contenu conformément aux normes en vigueur.



AVERTISSEMENT

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

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

Démarrer le lavage

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

Après le lavage

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

Remplacer le filtre à air

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

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

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

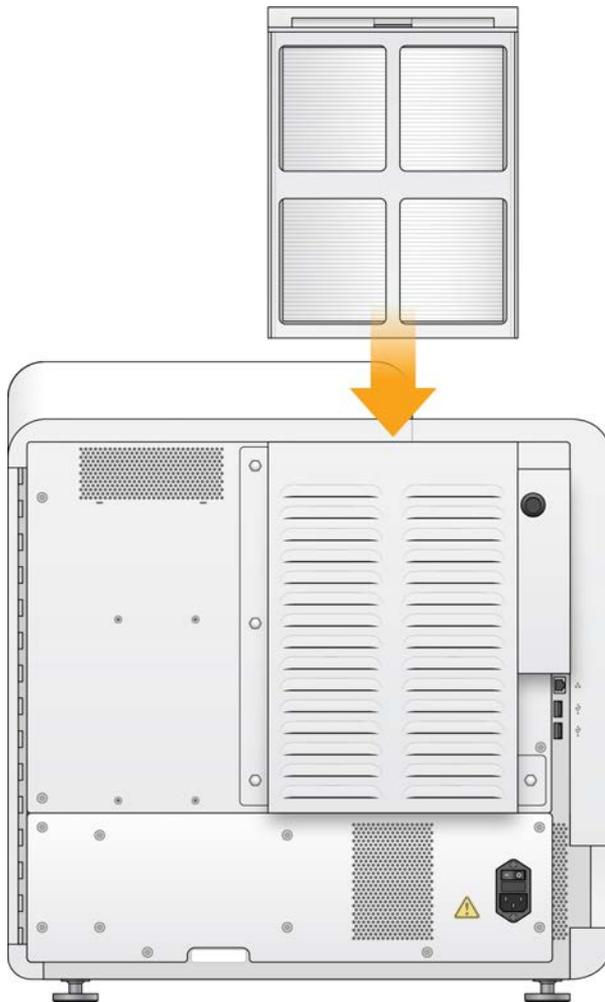


REMARQUE

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

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

Figure 22 Insertion du filtre à air



Mises à jour logicielles

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

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Formules du système NextSeq
- ▶ Logiciel Local Run Manager
- ▶ RTA2

- ▶ Logiciel de service NextSeq (NSS)
- ▶ Universal Copy Service
- ▶ Contrôleur d'accès direct à la mémoire (DMA)

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

- ▶ **Mises à jour automatiques** : si l'instrument est connecté à un réseau doté d'un accès à Internet, une icône d'alerte  s'affiche sur le bouton Manage Instrument (Gérer l'instrument) situé à l'écran d'accueil lorsqu'une mise à jour est disponible.
- ▶ **Mises à jour manuelles** : téléchargez le programme d'installation System Suite à la [page d'assistance de NextSeq 500](#), sur le site Web d'Illumina. Si vous prévoyez effectuer une mise à jour manuelle, assurez-vous de la compléter avant de préparer les échantillons et les consommables pour l'analyse de séquençage.

Mise à jour automatique des logiciels

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

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



REMARQUE

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

Mise à jour manuelle des logiciels

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

- 6 Suivez les invites de l'assistant d'installation :
 - a Acceptez l'accord de licence.
 - b Lisez les notes de mise à jour.
 - c Consultez la liste des logiciels inclus dans la mise à jour.

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



REMARQUE

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

Arrêter l'instrument

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Shutdown Options** (Options d'arrêt).
- 3 Sélectionnez **Shutdown** (Arrêter).

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



ATTENTION

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

Annexe A Dépannage

Introduction	36
Fichiers de dépannage	36
Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques	37
Réservoir à réactifs usagés plein	38
Flux de travail de réhybridation	39
Formules personnalisées et dossiers de formules	41
Vérification du système	41
Message d'erreur RAID	43
Erreur de stockage réseau	44
Configurer les paramètres du système	44

Introduction

En cas de questions techniques, consultez les pages d'assistance de NextSeq 500 sur le site Web d'Illumina. Les pages d'assistance fournissent un accès à la documentation, aux téléchargements et aux foires aux questions.

Connectez-vous à votre compte MyIllumina pour accéder aux bulletins d'assistance.

En cas de problème de qualité d'analyse ou de performances, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina. Consultez la section *Assistance technique*, à la page 60.

Il est possible de partager un lien vers le résumé d'analyse dans BaseSpace Sequence Hub avec l'assistance technique d'Illumina pour faciliter le dépannage. Vous pouvez aussi aider au dépannage lorsque le service de surveillance Illumina Proactive est activé. Pour obtenir plus de renseignements sur ce service, consultez la section *Configurer l'option d'envoyer les données sur la performance de l'instrument*, à la page 12.

Fichiers de dépannage

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

Fichier clé	Sous-fichier	Description
Fichier de renseignements sur l'analyse (RunInfo.xml)	<Run folder name>	Comprend les renseignements suivants : <ul style="list-style-type: none">• Nom de l'analyse• Nombre de cycles de l'analyse• Nombre de cycles dans chaque lecture• Lecture indexée ou non• Nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell
Fichier des paramètres de l'analyse (RunParameters.xml)	<Run folder name>	Contient des renseignements concernant les paramètres et les composants des analyses. Parmi les renseignements figurent la RFID, le numéro de série, la référence et la date de péremption.
Fichiers de configuration RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Comprend les paramètres de configuration RTA pour l'analyse. Le fichier RTAConfiguration.xml est créé au début de l'analyse.

Fichier clé	Sous-fichier	Description
Fichiers InterOp (*.bin)	InterOp	Les fichiers binaires sont utilisés pour le logiciel Sequencing Analysis Viewer. Les fichiers InterOp sont mis à jour tout au long de l'analyse.
Fichiers journaux	Journaux	Les fichiers journaux décrivent chaque étape effectuée par l'instrument au cours de chaque cycle et répertorient les versions de logiciels et de progiciels utilisées lors de l'analyse. Le fichier nommé [NomInstrument]_CurrentHardware.csv répertorie les numéros de série des composants de l'instrument.
Fichiers journaux des erreurs (*ErrorLog*.txt)	Journaux RTA	Journal des erreurs RTA. Les fichiers journaux des erreurs sont mis à jour à chaque fois qu'une erreur se produit.
Fichiers journaux globaux (*GlobalLog*.tsv)	Journaux RTA	Journal de tous les événements RTA. Les fichiers journaux globaux sont mis à jour tout au long de l'analyse.
Fichiers journaux des lignes (*LaneLog*.txt)	Journaux RTA	Journal des événements RTA en cours. Les fichiers journaux des lignes sont mis à jour tout au long de l'analyse.

Erreurs RTA

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

Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques

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

Cependant, les RFID de la cartouche de tampon, de la cartouche de réactifs et de la Flow Cell seront verrouillées durant l'initialisation du logiciel de commande, ce qui pourrait être nécessaire pour résoudre une erreur. L'utilisateur doit retirer la Flow Cell, la cartouche de réactifs et la cartouche de tampon de l'instrument avant le redémarrage du système. De plus, les RFID des consommables sont verrouillées une fois que les opercules en aluminium sont percés.

Vérifications du système	Action recommandée
Doors Closed (Portes fermées)	Assurez-vous que les portes des compartiments sont fermées.
Consumables Loaded (Consommables chargés)	Les capteurs des consommables n'enregistrent rien. Assurez-vous que chaque consommable est correctement chargé. Sur les écrans de configuration de l'analyse, sélectionnez Back (Retour) pour retourner à l'étape de chargement, puis recommencez la configuration de l'analyse.
Required Software (Logiciel requis)	Des composants essentiels du logiciel sont manquants. Effectuez une mise à jour manuelle pour restaurer tous les composants du logiciel.
Instrument Disk Space (Espace disque de l'instrument)	Le disque dur de l'instrument n'a pas assez d'espace disponible pour réaliser l'analyse. Il est possible que les données provenant d'une analyse précédente n'aient pas été transférées. Effacez les données de l'analyse du disque dur de l'instrument.

Vérifications du système	Action recommandée
Network Connection (Connexion réseau)	La connexion réseau a été interrompue. Vérifiez l'état du réseau et la connexion au réseau physique.
Network Disk Space (Espace disque réseau)	Soit le compte BaseSpace est plein, soit le serveur réseau est plein.
Température	Action recommandée
Temperature (Température)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Temperature Sensors (Capteurs de température)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Fans (Ventilateurs)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Système d'imagerie	Action recommandée
Imaging Limits (Limites de l'imagerie)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Z Steps-and-Settle (Étapes et installation Z)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Bit Error Rate (Taux d'erreur binaire)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Flow Cell Registration (Enregistrement de la Flow Cell)	<p>Il est possible que la Flow Cell ne soit pas correctement positionnée.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), sélectionnez Back (Retour) pour retourner à l'étape de la Flow Cell. La porte du compartiment d'imagerie s'ouvre. • Déchargez et rechargez la Flow Cell pour vous assurer qu'elle est correctement positionnée.
Distribution des réactifs	Action recommandée
Valve Response (Réponse de la valve)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Pump (Pompe)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Buffer Mechanism (Mécanisme du tampon)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Spent Reagents Empty (Réactifs usagés vides)	Videz le réservoir à réactifs usagés et rechargez le réservoir vide.

Réservoir à réactifs usagés plein

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

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

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

Vider le réservoir des réactifs usagés

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

Flux de travail de réhybridation

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



REMARQUE

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

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

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

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

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

À quel moment arrêter une analyse pour réhybridation

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

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

Consommables requis

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

Arrêter l'analyse en cours

- 1 Sélectionnez **End Run** (Terminer l'analyse). Lorsque vous êtes invité à confirmer la commande, sélectionnez **Yes** (Oui).
- 2 Lorsque vous êtes invité à enregistrer la Flow Cell, sélectionnez **Yes** (Oui). L'enregistrement de la Flow Cell ne garantit pas que l'analyse en cours soit récupérable. Notez la date de péremption pour la réhybridation.
- 3 Retirez la Flow Cell enregistrée et placez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse de réhybridation.



REMARQUE

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

Effectuer un lavage manuel

- 1 À l'écran d'accueil, sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage).
- 2 Sur l'écran Wash Selection (Sélection du lavage), sélectionnez **Manual Post-Run Wash** (Lavage manuel après analyse). Consultez la section *Effectuer un lavage manuel*, à la page 29.



REMARQUE

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

Configurer une nouvelle analyse dans BaseSpace Sequence Hub

- 1 Si BaseSpace Sequence Hub est en cours d'utilisation, configurez une nouvelle analyse en utilisant les mêmes paramètres que ceux de l'analyse d'origine.



EMBOUT

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

Configurer une analyse sur l'instrument

- 1 Préparez une nouvelle cartouche de réactifs.
- 2 Si la Flow Cell enregistrée a été stockée, placez-la de façon à ce qu'elle atteigne la température ambiante (15 à 30 minutes).
- 3 Nettoyez et chargez la Flow Cell enregistrée.
- 4 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez le contenu de façon appropriée, puis rechargez le flacon vide.

- 5 Sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), sélectionnez un des modes d'analyse suivants :
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Mode manuel
- 6 **[Facultatif]** Sélectionnez **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Utiliser les paramètres de BaseSpace Sequence Hub) et sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Surveillance de l'analyse et stockage)
 - ▶ Run Monitoring Only (Surveillance de l'analyse seulement)Saisissez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe BaseSpace Sequence Hub.
- 7 Chargez la nouvelle cartouche de tampon et la nouvelle cartouche de réactifs.
- 8 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour effectuer une vérification avant analyse, puis démarrez l'analyse.

Formules personnalisées et dossiers de formules

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

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

Custom

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

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

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

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

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

Vérification du système

Une vérification du système n'est pas nécessaire lors du fonctionnement normal ou de l'entretien de l'instrument. Toutefois, un représentant de l'assistance technique d'Illumina peut vous demander de réaliser une vérification automatique du système à des fins de dépannage.



REMARQUE

Si un lavage de l'instrument doit être effectué, effectuez le lavage avant de commencer la vérification du système.

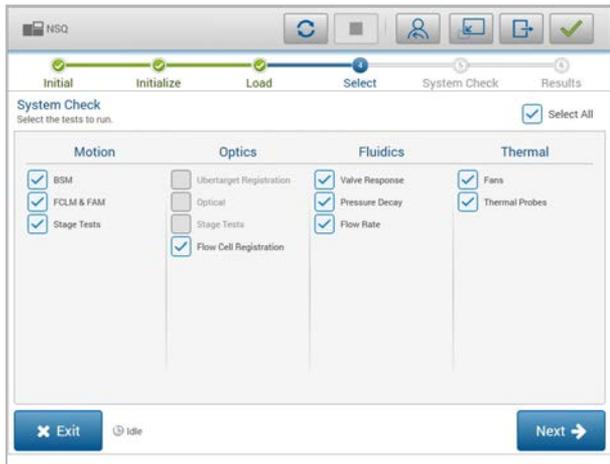
Le démarrage d'une vérification du système ferme automatiquement le logiciel de commande et lance le logiciel de service NextSeq (NSS). Le logiciel de service se lance et ouvre une page de connexion. Utilisez un nom d'utilisateur et un mot de passe Local Run Manager (niveau utilisateur ou administrateur) pour accéder à NSS. Après l'authentification, NSS s'ouvre sur l'écran Load (Charger), qui est configuré pour une utilisation de l'option de chargement avancé.



REMARQUE

Vous devez utiliser les identifiants de l'utilisateur administrateur de Local Run Manager avant l'affichage de l'écran Load (Charger) pour vous connecter au logiciel de service.

Figure 23 Vérifications du système disponibles



Les cases non cochées de l'écran Select (Sélectionner) indiquent les tests qui nécessitent l'assistance d'un représentant de terrain d'Illumina.

Réaliser une vérification du système

- 1 À l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Check** (Vérification du système). Lorsque vous êtes invité à fermer le logiciel de commande, sélectionnez **Yes** (Oui).
- 2 Chargez les consommables comme suit :

- a Si une Flow Cell usagée ne se trouve pas déjà sur l'instrument, chargez une Flow Cell usagée.



REMARQUE

Illumina recommande l'utilisation d'une Flow Cell à débit élevé pour les vérifications du système.

- b Videz le réservoir de réactifs usagés et repositionnez-le sur l'instrument.
 - c Chargez la cartouche de lavage du tampon contenant 120 ml d'eau de laboratoire dans le réservoir central.
 - d Chargez la cartouche de lavage des réactifs. Vérifiez que la cartouche de lavage des réactifs est vide et propre.
- 3 Sélectionnez **Load** (Charger). Le logiciel positionne la Flow Cell et la cartouche de lavage des réactifs. Sélectionnez **Next** (Suivant).
 - 4 Sélectionnez **Next** (Suivant). La vérification du système commence.
 - 5 **[Facultatif]** Lorsque la vérification du système est terminée, sélectionnez **View** (Afficher) à côté du nom de la vérification afin de visualiser les valeurs associées à chaque vérification.
 - 6 Sélectionnez **Next** (Suivant). Le rapport de vérification du système s'ouvre.
 - 7 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer le rapport dans un fichier comprimé. Naviguez vers un emplacement sur le réseau pour enregistrer le fichier.
 - 8 Lorsque vous avez terminé, sélectionnez **Exit** (Quitter).
 - 9 Lorsque vous êtes invité à fermer le logiciel d'entretien et à redémarrer le logiciel de commande, sélectionnez **Yes** (Oui). Le logiciel de commande redémarre automatiquement.

Vérification des mouvements

Vérification du système	Description
BSM	Vérifie le gain et la distance du mécanisme de conduite des tampons (BSM) afin de confirmer que le module fonctionne correctement.
FCLM et FAM	Vérifie le gain et la distance du mécanisme de chargement de la Flow Cell (FCLM) et du module d'automatisation des liquides (FAM) pour confirmer que les modules fonctionnent correctement.
Tests de la platine	Vérifie les limites de parcours et les performances de la platine XY et des six platines Z, une pour chaque caméra.

Vérification des composants optiques

Vérification du système	Description
Flow Cell Registration (Enregistrement de la Flow Cell)	Mesure l'inclinaison de la lame sur un plan optique, teste les fonctionnalités de la caméra, teste le module d'imagerie et vérifie l'enregistrement de la Flow Cell dans la position correcte d'imagerie.

Vérification de la fluidique

Vérification du système	Description
Valve Response (Réponse de la valve)	Vérifie la précision des mouvements de la vanne et de la pompe ainsi que l'amplitude de mouvement de la seringue de la pompe.
Pressure Decay (Chute de pression)	Vérifie le taux de fuite d'un système fluidique étanche afin de confirmer que la Flow Cell est insérée correctement en position de séquençage.
Flow Rate (Débit)	Vérifie la fonctionnalité des capteurs à bulles, qui servent à détecter la présence d'air dans les lignes de réactifs. Mesure les débits pour vérifier la présence d'occlusions ou de fuites.

Vérification thermique

Vérification du système	Description
Fans (Ventilateurs)	Vérifie la vitesse des ventilateurs du système en impulsions par minute (imp/min) pour confirmer que les ventilateurs fonctionnent. Les ventilateurs qui ne fonctionnent pas renvoient une valeur négative.
Thermal Probes (Sondes thermiques)	Vérifie la température moyenne de chaque capteur thermique. Les capteurs thermiques qui ne fonctionnent pas renvoient une valeur négative.

Message d'erreur RAID

L'ordinateur NextSeq est équipé de deux disques durs. Si l'un des disques durs cesse de fonctionner, le système génère un message d'erreur RAID et vous suggère de prendre contact avec l'assistance technique d'Illumina. Un remplacement du disque dur est généralement nécessaire.

Vous pouvez continuer la procédure de configuration de l'analyse et les opérations normales. Le but de ce message est de pouvoir planifier à l'avance une visite de service pour éviter des interruptions durant le fonctionnement normal de l'instrument. Pour continuer, sélectionnez **Acknowledge** (Accepter), puis **Close** (Fermer).

Erreur de stockage réseau

Les erreurs de stockage réseau sont dues à l'une des raisons suivantes :

- ▶ **Espace de stockage insuffisant pour le dossier de sortie** : augmentez la quantité d'espace disponible sur le périphérique de stockage ou déplacez le dossier de sortie vers un emplacement disposant de suffisamment d'espace de stockage.
- ▶ **Impossible de se connecter au stockage réseau** : vérifiez le chemin d'accès au dossier de sortie. Consultez la section *Définir l'emplacement du dossier de sortie*, à la page 46.
- ▶ **Le système ne peut pas écrire sur le stockage réseau** : consultez votre administrateur informatique pour vérifier les autorisations. Le compte Windows sur le système d'exploitation de l'instrument requiert l'autorisation de lire et d'écrire dans le dossier de sortie.

Le compte Windows dans Local Run Manager requiert également l'autorisation de lire et d'écrire dans le dossier de sortie. Consultez la section Spécifier les paramètres du compte de service dans le *Guide du logiciel Local Run Manager* (document n° 1000000002702).

Configurer les paramètres du système

La configuration du système a lieu lors de l'installation. Toutefois, si un changement est nécessaire ou si le système doit être reconfiguré, utilisez les options de configuration du système.

- ▶ **Network Configuration** (Configuration du réseau) : fournit des options de configuration des paramètres de l'adresse IP, de l'adresse du serveur de noms de domaine (DNS), du nom de l'ordinateur et du nom de domaine.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub** : fournit des options d'emplacement où envoyer les données pour le stockage et l'analyse, si BaseSpace Sequence Hub est en cours d'utilisation.
- ▶ **Output Folder Location** (Emplacement du dossier de sortie) : fournit des options de chemin d'accès au dossier de sortie.

Définir la configuration réseau

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



REMARQUE

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

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

- ▶ Entrez l'adresse IP. L'adresse IP est une série de quatre chiffres séparés par un point. Par exemple, 168.62.20.37.
- ▶ Entrez le masque de sous-réseau, qui est une subdivision du réseau IP.
- ▶ Entrez l'adresse de la passerelle par défaut, c'est-à-dire le routeur du réseau qui se connecte à Internet.

- 4 Sélectionnez **Obtain a DNS server address automatically** (Obtenir une adresse de serveur DNS automatiquement) pour connecter l'instrument au serveur de noms de domaine associé à l'adresse IP. Vous pouvez également sélectionner **Use the following DNS server addresses** (Utiliser les adresses des serveurs DNS suivantes) pour connecter manuellement l'instrument au serveur de noms de domaine comme suit.
 - ▶ Entrez les adresses DNS à privilégier. L'adresse DNS est le nom du serveur utilisé pour traduire les noms de domaine en adresses IP.
 - ▶ Entrez l'adresse DNS secondaire. L'adresse secondaire est utilisée si l'adresse DNS à privilégier ne peut pas traduire un nom de domaine particulier en adresse IP.
- 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour passer à l'écran Computer (Ordinateur).



REMARQUE

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

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

Définir une configuration BaseSpace

- 1 À partir de l'écran d'accueil, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **System Configuration** (Configuration du système).
- 3 Sélectionnez **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Configuration de BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Sélectionnez l'une des options suivantes afin de définir l'emplacement où les données seront envoyées pour l'analyse.
 - ▶ Dans la liste Hosting Location (Lieu d'hébergement), sélectionnez l'emplacement du serveur où les données sont téléversées.
 - ▶ Si vous avez un abonnement Entreprise, cochez la case **Private Domain** (Domaine privé) et saisissez le nom du domaine (URL) utilisé pour l'ouverture de session propre à BaseSpace Sequence Hub. Par exemple : <https://votrelabo.basespace.illumina.com>.
- 5 Sélectionnez **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Envoyer les données sur la performance de l'instrument à Illumina) pour activer le service de surveillance Illumina Proactive. Le nom du paramètre affiché dans l'interface du logiciel pourrait être différent du nom indiqué dans le présent guide, selon la version NCS utilisée.

Lorsque ce paramètre est activé, les données relatives à la performance de l'instrument sont transmises à Illumina. Ces données facilitent le dépannage par Illumina et lui permettent de détecter les pannes potentielles, d'exécuter une maintenance proactive et d'optimiser le temps d'utilisation de l'instrument. Pour obtenir plus de renseignements sur les avantages de ce service, consultez la *note technique d'Illumina Proactive (document n° 1000000052503)*.

Ce service :

- ▶ Ne transmet pas de données de séquençage.
- ▶ Nécessite la connexion de l'instrument à un réseau ayant accès à Internet.
- ▶ Est activé par défaut. Pour choisir de ne pas utiliser ce service, désactivez le paramètre **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Envoyer les données sur la performance de l'instrument à Illumina).

6 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Définir l'emplacement du dossier de sortie

Le système NextSeq nécessite un dossier de sortie pour toutes les analyses. Utilisez le chemin Universal Naming Convention (UNC) complet vers le dossier de sortie. Un chemin UNC comprend deux barres obliques inverses, le nom du serveur et le nom du répertoire. Il ne comprend **pas** la lettre servant à identifier le lecteur réseau mappé.

- ▶ Les chemins d'accès d'un niveau vers le dossier de sortie nécessitent une barre oblique inverse de fin.
 - ▶ Exemple de chemin UNC : \\servername\directory1\
- ▶ Les chemins d'accès de deux niveaux ou plus vers le dossier de sortie ne nécessitent pas de barre oblique inverse de fin.
 - ▶ Exemple de chemin UNC : \\servername\directory1\directory2
- ▶ Les chemins d'accès vers un lecteur réseau mappé provoquent des erreurs. **Ne pas utiliser.**
 - ▶ Exemple d'un chemin de lecteur réseau mappé : T:\sbsfiles

Pour le mode d'analyse de Local Run Manager, définissez l'emplacement du dossier de sortie dans le logiciel Local Run Manager. Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *Guide du logiciel Local Run Manager* (document n° 1000000002702).

Annexe B Real-Time Analysis

Présentation de Real-Time Analysis	47
Flux de travail de Real-Time Analysis	48
Fichiers de sortie de séquençage	52
Plaques de la Flow Cell	52
Structure du dossier de sortie	55

Présentation de Real-Time Analysis

L'instrument NextSeq 500 utilise une version du logiciel Real-Time Analysis (RTA) appelée RTA2. RTA2 fonctionne sur l'ordinateur de l'instrument et extrait les intensités des images, effectue les définitions des bases et associe un score de qualité aux définitions des bases. RTA2 et le logiciel de commande communiquent par le biais d'une interface Web HTTP et de fichiers mémoire partagés. Si RTA2 est arrêté, le traitement ne reprend pas et les données de l'analyse ne sont pas enregistrées.



REMARQUE

Les performances de démultiplexage ne sont pas calculées. L'onglet Index de Sequencing Analysis Viewer (SAV) n'est donc pas rempli.

Entrées dans RTA2

RTA2 nécessite les entrées suivantes pour le traitement :

- ▶ Les images des plaques contenues dans la mémoire locale du système.
- ▶ **RunInfo.xml**, qui est généré automatiquement au début de chaque analyse. Le fichier contient les données suivantes :
 - ▶ Nom de l'analyse
 - ▶ Nombre de cycles
 - ▶ Indexation ou non de la lecture
 - ▶ Nombre de plaques sur la Flow Cell
- ▶ **RTA.exe.config**, qui est un fichier de configuration logicielle au format XML.

RTA2 reçoit des commandes du logiciel de commande indiquant l'emplacement du fichier **RunInfo.xml** et précisant si un dossier de sortie facultatif est spécifié.

Fichiers de sortie RTA2

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

Type de fichiers	Description
Fichiers de définition des bases (*.bcl)	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier regroupant les définitions des bases pour chaque ligne et chaque cycle. Le fichier cumulé de définition des bases contient la définition des bases ainsi que le score de qualité associé à chaque amplifiat dans cette ligne.
Fichiers filtres (*.filter)	Chaque plaque produit des renseignements sur le filtre qui sont rassemblés dans un fichier de filtrage par ligne. Le fichier de filtrage spécifie si un amplifiat a franchi les filtres.

Type de fichiers	Description
Fichiers d'emplacement des amplifiats (*.locs)	Les fichiers d'emplacement des amplifiats contiennent les coordonnées X et Y de chaque amplifiat dans une plaque. Lors de la génération du modèle, un fichier d'emplacement des amplifiats est créé pour chaque ligne.
Fichiers d'index de définition des bases (*.bci)	Afin de préserver les renseignements d'origine sur les plaques, un fichier d'index de définition des bases est produit pour chaque ligne. Le fichier d'index contient une paire de valeurs pour chaque plaque, qui sont respectivement le numéro de cette plaque et le nombre d'amplifiats qu'elle contient.

Les fichiers de sortie sont utilisés pour une analyse en aval dans BaseSpace. Vous pouvez aussi utiliser le logiciel de conversion bcl2fastq pour la conversion FASTQ, ainsi que des solutions d'analyse tierces. Les fichiers NextSeq nécessitent bcl2fastq v2.0 ou une version ultérieure. Pour obtenir la dernière version de bcl2fastq, veuillez consulter la [page de téléchargement du système NextSeq](#) sur le site Web d'Illumina.

RTA2 fournit des indicateurs en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockés dans des fichiers InterOp. Les fichiers InterOp sont des fichiers de sortie binaires contenant des indicateurs relatifs aux plaques, aux cycles et au niveau de lecture nécessaires pour afficher des indicateurs en temps réel en utilisant le logiciel Sequencing Analysis Viewer (SAV). Pour la dernière version du logiciel SAV, consultez la [page de téléchargement du logiciel SAV](#) sur le site Web d'Illumina.

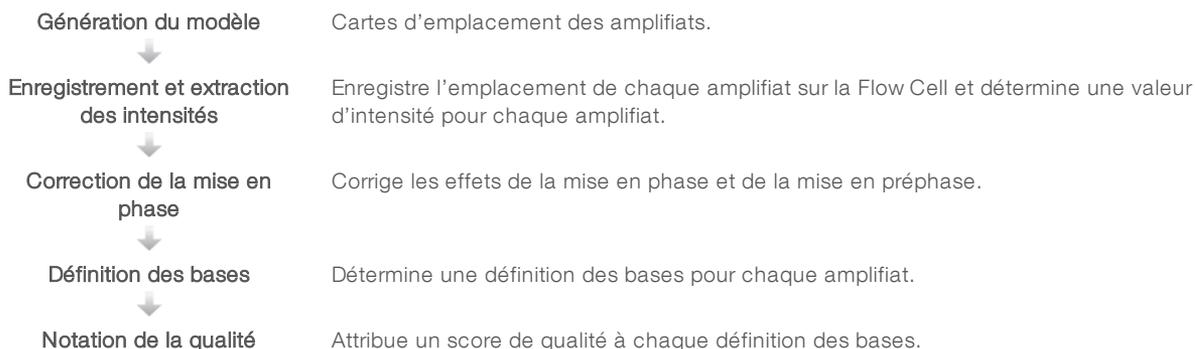
Gestion des erreurs

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

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

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

Flux de travail de Real-Time Analysis



Génération du modèle

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

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



REMARQUE

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

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

Enregistrement et extraction des intensités

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

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

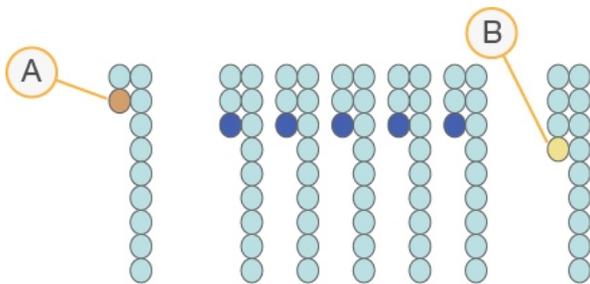
S'il y a échec d'enregistrement de l'image d'un cycle, quelle qu'elle soit, aucune définition des bases ne sera générée pour cette plaque dans ce cycle. Utilisez le logiciel Sequencing Analysis Viewer (SAV) pour examiner les vignettes et trouver les images dont l'enregistrement a échoué.

Correction de la mise en phase

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

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

Figure 24 Mise en phase et en préphase



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

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

Définition des bases

La définition des bases détermine une base (A, C, G ou T) pour chaque amplifiat d'une plaque donnée d'un cycle spécifique. L'instrument NextSeq 500 utilise un séquençage à deux canaux, qui ne nécessite que deux images pour encoder les données de quatre bases d'ADN, l'une provenant du canal rouge et l'autre, du canal vert.

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

Figure 25 Visualisation de l'intensité des amplifiats

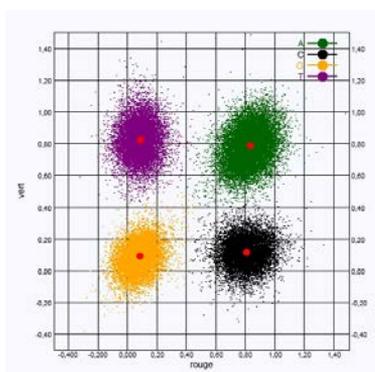


Tableau 1 Définition des bases dans le séquençage à deux canaux

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

Amplifiats passant le filtre

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

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

Considérations relatives à l'indexage

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

Une lecture d'index doit contenir au moins une base autre que G dans l'un des deux premiers cycles.

Si deux bases G sont définies au début d'une lecture d'index, aucune intensité de signal n'est générée.

Il faut obtenir un signal dans l'un des deux premiers cycles pour assurer la performance de démultiplexage.

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

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

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

Notation de la qualité

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

Le score de qualité est un moyen simple d'indiquer la probabilité de petites erreurs. $Q(X)$ représente les scores de qualité, où X est le score. Le tableau suivant montre la relation entre le score de qualité et la probabilité d'une erreur :

Score de qualité $Q(X)$	probabilité d'une erreur
Q40	0,0001 (1 sur 10 000)
Q30	0,001 (1 sur 1 000)
Q20	0,01 (1 sur 100)
Q10	0,1 (1 sur 10)



REMARQUE

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

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

Une fois le score de qualité établi, les résultats sont enregistrés dans les fichiers de définition des bases.

Fichiers de sortie de séquençage

Type de fichiers	Description, emplacement et nom des fichiers
Fichiers de définition des bases	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier de définition des bases; ces fichiers sont rassemblés dans un fichier pour chaque ligne de chaque cycle. Le fichier cumulé contient la définition des bases ainsi que le score de qualité codé associé à chaque amplifiat de cette ligne. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. [Cycle].bcl.bgzf , où [Cycle] représente le numéro à quatre chiffres du cycle. Les fichiers de définition des bases sont compressés à l'aide du logiciel de compression gzip.
Fichier index de définition des bases	Pour chaque ligne, un fichier index binaire indique les renseignements sur la plaque d'origine dans une paire de valeurs pour chaque plaque, qui sont le numéro et le nombre d'amplifiats de la plaque. Les fichiers d'index de définition des bases sont créés la première fois qu'un fichier de définition des bases est créé pour une ligne. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. s_[Ligne].bci
Fichiers d'emplacement des amplifiats	Pour chaque plaque, les coordonnées XY de chaque amplifiat sont rassemblées dans un fichier d'emplacement des amplifiats pour chaque ligne. Les fichiers d'emplacement des amplifiats sont le résultat de la génération du modèle. Data\Intensities\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. s_[ligne].locs
Fichiers de filtrage	Les fichiers de filtrage spécifient si les amplifiats ont franchi les filtres. Les renseignements de filtrage sont rassemblés dans un seul fichier de filtrage pour chaque ligne et chaque lecture. Les fichiers de filtrage sont générés au cycle 26 et portent sur 25 cycles de données. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. s_[ligne].filter
Fichiers InterOp	Fichiers de compte rendu binaire nécessaires pour le logiciel Sequencing Analysis Viewer (SAV). Les fichiers InterOp sont mis à jour tout au long de l'analyse. Dossier InterOp
Fichier de configuration RTA	Créé au début de l'analyse, le fichier de configuration RTA indique les paramètres de l'analyse. <Run folder Name>, RTAConfiguration.xml
Fichier de renseignements sur l'analyse	Indique le nom de l'analyse, le nombre de cycles à chaque lecture, si la lecture est une lecture indexée et le nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell. Le fichier de renseignements sur l'analyse est créé au début de l'analyse. <Run folder Name>, RunInfo.xml
Fichiers des vignettes	Une vignette pour chaque canal de couleur (rouge et vert) pour les plaques 1, 6 et 12 depuis toutes les caméras, les surfaces hautes et basses à chaque cycle au cours de l'imagerie. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] (Vignettes\L00[X]\C[X.1]) : les fichiers sont stockés dans un seul dossier pour chaque ligne et un sous-dossier pour chaque cycle. s_[ligne]_[plaque]_[canal].jpg : dans le nom du fichier, la plaque est représentée par un numéro à cinq chiffres qui indique la surface, le témoin, la caméra et la plaque. Pour obtenir plus de renseignements, consultez les sections <i>Numérotation des plaques</i> , à la page 54, et <i>Nommage des vignettes</i> , à la page 55.

Plaques de la Flow Cell

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

- ▶ Les Flow Cell à débit élevé comportent 864 plaques au total.
- ▶ Les Flow Cell à débit moyen comportent 288 plaques au total.

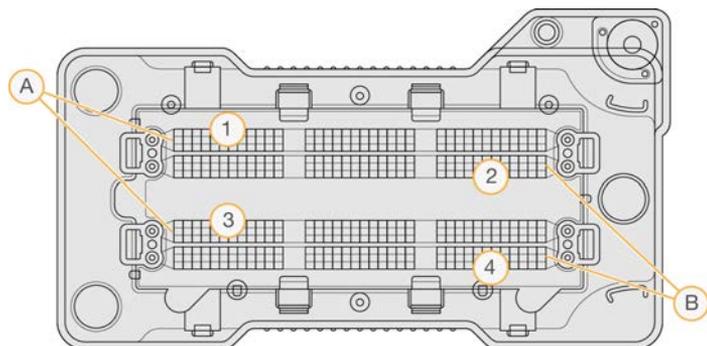
Tableau 2 Plaques de la Flow Cell

Composant de la Flow Cell	Débit élevé	Débit moyen	Description
Lignes	4	4	Une ligne est un canal physique possédant des ports d'entrée et de sortie dédiés.
Surfaces	2	2	La Flow Cell est imagée sur deux surfaces : les surfaces inférieure et supérieure. Le système image le dessus d'une plaque, puis le dessous de la même plaque avant de passer à la plaque suivante.
Témoins par ligne	3	1	Un témoin est une colonne de plaques sur une ligne.
Segments de caméra	3	3	L'instrument utilise six caméras pour imager la Flow Cell en trois segments pour chaque ligne.
Plaques par témoin par segment de caméra	12	12	La plaque est la zone de la Flow Cell qui constitue pour la caméra une unité d'image.
Nombre total de plaques imagées	864	288	Le nombre total de plaques est égal aux lignes x surfaces x témoins x segments de caméra x plaques par témoin par segment.

Numérotation des lignes

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

Figure 26 Numérotation des lignes

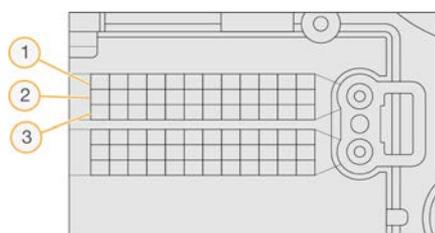


- A Paire de lignes A : lignes 1 et 3
- B Paire de lignes B : lignes 2 et 4

Numérotation des témoins

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

Figure 27 Numérotation des témoins

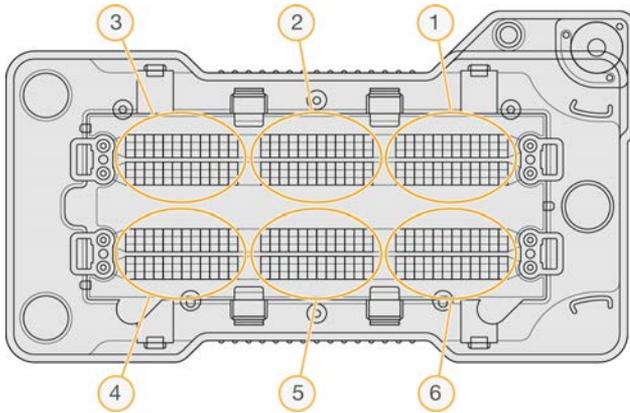


Numérotation des caméras

L'instrument NextSeq 500 utilise six caméras pour l'imagerie de la Flow Cell.

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

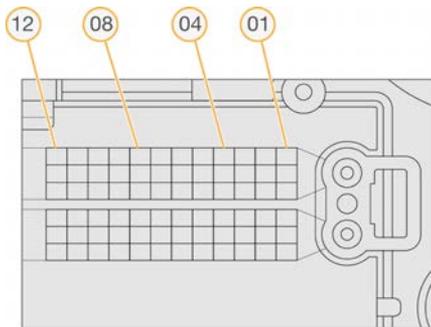
Figure 28 Numérotation des caméras et des segments (Flow Cell à débit élevé illustrée)



Numérotation des plaques

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

Figure 29 Numérotation des plaques



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

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

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

Le numéro complet à cinq chiffres de la plaque est utilisé dans le nom des vignettes et des fichiers de mise en phase empirique. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, à la page 52.

Nommage des vignettes

Une vignette pour chaque canal de couleur (rouge et vert) pour les plaques 1, 6 et 12 est générée depuis toutes les caméras, les surfaces hautes et basses à chaque cycle au cours de l'imagerie. Les fichiers de vignettes sont générés au format JPG.

Chaque nom d'image commence toujours par **s_** et reçoit ensuite les éléments que prévoit la convention de dénomination suivante :

- ▶ **Ligne** : 1, 2, 3 ou 4
- ▶ **Plaque** : numéro de la plaque à cinq chiffres, correspondant à la surface, au témoin, à la caméra et à la plaque
- ▶ **Canal** : rouge ou vert

Exemple : `s_3_12512_green.jpg` (`s_3_12512_vert.jpg`) correspond à la ligne 3, à la surface supérieure, au témoin 2, à la caméra 5, à la plaque 12 et au canal vert.

Structure du dossier de sortie

Le logiciel de commande génère automatiquement le nom du dossier de sortie.

Data (Données)

Intensities (Intensités)

BaseCalls (Appels de bases)

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

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

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

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

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

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

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

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

Images

Focus (Mise au point)

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

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

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

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

 **InterOp** : fichiers binaires utilisés par le logiciel Sequencing Analysis Viewer (SAV).

 **Logs** : fichiers journaux décrivant les étapes de fonctionnement.

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

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

 **Thumbnail_Images** : vignettes pour les plaques 1, 6 et 12 dans chaque témoin de chaque cycle.

 RTAComplete.xml

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

Index

A

- aide
 - documentation 1
- aide, technique 60
- alertes d'état 4
- algorithme Phred 51
- amplifiats passant le filtre 50
- analyse
 - créer 16
 - fichiers de sortie 52
 - options 19-20
- analyse, primaire
 - pureté du signal 50
- analyses
 - créer 16
- arrêt de l'instrument 35
- assistance clientèle 60
- assistance technique 60

B

- barre d'état 2
- BaseSpace Sequence Hub 1, 20
 - configuration 45
 - connexion 20, 41
 - icônes de transfert 27
- bouton d'alimentation 5, 10

C

- cartouche de réactifs
 - préparation 16
 - présentation 7
 - réservoir n° 28 30
- cartouche de tampon 9, 23
- compartiment d'imagerie 2-3
- compartiment de réactifs 2
- compartiment du filtre à air 2-3
- compartiment du tampon 2
- compatibilité
 - suivi RFID 7
- composants
 - barre d'état 2
 - compartiment d'imagerie 2-3
 - compartiment de réactifs 2
 - compartiment du filtre à air 2
 - compartiment du tampon 2
- configuration de l'analyse, option avancée 12

- considérations relatives à l'indexage 50
- consommables
 - analyses de séquençage 13
 - cartouche de réactifs 7
 - cartouche de tampon 9
 - consommables de lavage 29-30
 - eau de laboratoire 14
 - Flow Cell 7
 - maintenance de l'instrument 13
- consommables fournis par l'utilisateur 13
- créer une analyse 16
- cycles d'une lecture 16

D

- définition des bases 50
 - considérations relatives à l'indexage 50
- dépannage
 - fichiers propres à une analyse 36
 - indicateurs de faible qualité 39
 - options pour communiquer avec nous 36
 - réservoir de réactifs usagés 38
 - vérification avant analyse 37
 - vérification du système 41
- directives à propos de l'eau de laboratoire 14
- documentation 1, 60
- dossier de sortie 19
- durée de l'analyse 16

E

- éliminer les consommables 13
- emplacement des amplifiats
 - fichiers 52
 - génération du modèle 49
- emplacement du dossier 21
- erreur de stockage réseau 44
- erreurs
 - probabilité 51
- erreurs et avertissements 4
- erreurs lors de la vérification avant analyse 37

F

- fichiers de définition des bases 52
- fichiers de filtrage 52
- fichiers de sortie 52
- fichiers InterOp 36, 52
- fichiers locs 52

- filtre à air 32
- filtre de pureté 50
- flow cell
 - réhybridation 39
- Flow Cell
 - broches d'alignement 22
 - emballage 17
 - imagerie 54
 - nettoyage 17
 - nommage des fichiers d'image 55
 - numéro de témoin 53
 - numérotation des lignes 53
 - numérotation des plaques 54
 - paires de lignes 7
 - plaques 52
 - présentation 7
 - types 1
- flux de travail
 - cartouche de réactifs 16, 24
 - cartouche de tampon 23
 - connexion à BaseSpace Sequence Hub 20, 41
 - considérations relatives à l'indexage 50
 - durée de l'analyse 16
 - Flow Cell 22
 - hypochlorite de sodium 30
 - indicateurs de l'analyse 26
 - Local Run Manager 20
 - mode Local Run Manager 20
 - mode manuel 21
 - NCS 20
 - option de chargement avancé 12
 - porte du compartiment de Flow Cell 19
 - préparation de la Flow Cell 17
 - réactifs usagés 22
 - séquençage 48
 - vérification avant analyse 25
- flux de travail de séquençage 48
- formamide, position 6 24
- formation en ligne 1

G

- génération du modèle 49
- gérer l'instrument
 - arrêter 35

H

- hypochlorite de sodium, lavage 30

I

- icônes
 - erreurs et avertissements 4
 - état 4
 - réduire le NCS 5
- imagerie, séquençage à deux canaux 50
- indicateurs
 - cycles d'intensité 26
 - cycles de densité des amplifiats 26
 - définition des bases 50
- indicateurs de l'analyse 26
- instrument
 - bouton d'alimentation 5
 - démarrage 10
 - paramètres de configuration 44
- intensités 50
- interrupteur 10

L

- lavage
 - automatique 27
 - composants du lavage 29
 - consommables fournis par l'utilisateur 29
 - lavage manuel 29
- lavage après analyse 27
- lavage de l'instrument 29
- Local Run Manager 20
 - créer une analyse 16
 - modules 19
- logiciel
 - créer une analyse 16
 - durée de l'analyse 16
 - initialisation 10
 - mise à jour automatique 34
 - mise à jour manuelle 34
 - paramètres de configuration 44
- logiciel de commande 3
- logiciel Real-Time Analysis 1
 - résultats 52
- logiciels
 - analyse d'image, définition des bases 3
 - sur instrument 3
- longueur de lecture 16

M

- maintenance de l'instrument
 - consommables 13

- maintenance préventive 29
- maintenance, préventive 29
- message d'erreur RAID 43
- mise à jour du logiciel 33
- mise en phase 49
- mise en préphase 49
- mode d'analyse
 - Local Run Manager 20
 - manuel 20-21
- mode manuel
 - créer une analyse 16
- modules, Local Run Manager 19

N

- nom d'utilisateur et mot de passe 10
- nom d'utilisateur et mot de passe du système 10
- numérotation des caméras 54
- numérotation des lignes 53
- numérotation des plaques 54
- numérotation des témoins 53

O

- option de chargement avancé 12

P

- paires de lignes 53
- paramètres d'analyse
 - mode Local Run Manager 20
 - mode manuel 21
 - modifier les paramètres 20
- paramètres de configuration 44
- passant le filtre (PF) 50
- porte du compartiment de Flow Cell 19

R

- réactifs
 - mise au rebut adéquate 24
- réactifs usagés
 - mise au rebut 22, 31
 - réservoir plein 38
- Real-Time Analysis 3
- réhybridation de primer 39
- réhybridation, lecture 1 39
- RTA2
 - arrêt 47
 - présentation 47

- RunInfo.xml 36, 52

S

- scores de qualité 51
- séquençage
 - consommables fournis par l'utilisateur 13
- séquençage, fichiers de sortie 52
- Sequencing Analysis Viewer 15
- Service de surveillance Illumina Proactive 12, 45

T

- tableaux de qualité 51
- transfert des données
 - icônes d'activité 27
 - Universal Copy Service 27

U

- Universal Copy Service 27

V

- vérification avant analyse 25
- vérification du système 41
- vignettes 52

W

- Windows
 - accès 5
 - mot de passe 5

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
Taïwan, Chine	00806651752	
Autres pays	+ (44) 1799 534 000	

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Californie 92122 États-Unis

+ (1) 800 809 ILMN (4566)

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

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2021 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina[®]