

NovaSeq 6000

Guide du système de séquençage



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

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

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

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

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v14	Septembre 2020	Mise à jour des numéros de référence des trousse pour refléter les disponibilités actuelles des trousse de réactifs v1.0 et v1.5.
Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v13	Juillet 2020	Ajout de renseignements relatifs à la trousse NovaSeq 6000 Reagent Kit v1.5 et au logiciel v1.7 permettant l'affichage d'indicateurs par ligne pour certains champs d'indicateurs d'analyse.
Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v12	Février 2020	Déplacement des renseignements relatifs à la dénaturation et à la dilution au nouveau Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351).
Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v11	Février 2019	Mise à jour du tableau de plexité du groupement de librairies pour le flux de travail Xp.
Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v10	Janvier 2019	Ajout de renseignements sur la Flow Cell SP. Mise à jour des tableaux de plexité recommandée du groupement de librairies pour les flux de travail Standard et Xp.
Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v09	Novembre 2018	Correction du lien vers la page d'aide du NovaSeq 6000. Correction de l'alerte manquante.
Support n° 20020483 Document n° 1000000019358 v08	Septembre 2018	Ajout de renseignements sur la trousse NovaSeq 6000 S4 Kit (200 cycles). Ajout de renseignements le compte de l'utilisateur. Ajout des concentrations de chargement de Single Cell. Mise à jour des directives relatives au démarrage échelonné d'analyses. Mise à jours des directives pour se connecter à BaseSpace. Mise à jours des directives relatives aux vérifications avant analyse. Ajout de notes sur l'exigence de confirmer l'arrêt ou le redémarrage. Ajout d'une note sur le lavage après analyse non terminé. Clarification des renseignements relatifs au lavage de maintenance. Clarification des renseignements relatifs à la mise à jour logicielle.

Document	Date	Description des modifications
<p>Support n° 20020483 Document n° 1000000019358 v07</p>	<p>Avril 2018</p>	<p>Clarification des directives relatives à l'utilisation du tube de bibliothèques pour mélanger les réactifs à l'étape d'amplification avant le séquençage.</p> <p>Ajout d'un tableau descriptif de symboles expliquant les symboles présents sur les consommables ou leur emballage.</p> <p>Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Setup Modes (Modes de configuration).</p> <p>Ajout de renseignements relatifs à l'API LIMS NovaSeq.</p> <p>Mise à jour des descriptions de logiciel pour la version 1.4.0 du logiciel de commande NovaSeq.</p> <p>Mise à jour des nombres type de lectures passant le filtre pour les Flow Cell S2.</p> <p>Mise à jour des concentrations de chargement recommandées pour le flux de travail NovaSeq Xp.</p> <p>Mise à jour des directives pour ouvrir l'emballage de Flow Cell.</p> <p>Clarification des procédures de chargement des bibliothèques sur la Flow Cell.</p> <p>Ajout d'une note concernant la disponibilité de l'instrument pour démarrer un lavage de maintenance.</p> <p>Ajout de renseignements sur la minuterie décroissante du démarrage échelonné.</p> <p>Mise à jour des directives pour ajouter ou supprimer des règles de la stratégie de restriction logicielle.</p>

Document	Date	Description des modifications
Document n° 1000000019358 v06	Février 2018	<p>Ajout d'une note dans la section Flow Cell pour indiquer l'exigence relative à l'utilisation de la version logicielle 1.3.1 avec la Flow Cell S1.</p> <p>Mise à jour des descriptions et du volume standard dans le tableau de la section <i>Méthodes de chargement de librairies</i>.</p> <p>Ajout d'une remarque dans la section <i>Composants des trousse de réactifs</i>.</p> <p>Ajout de tubes de 0,5 ml et de 1,5 ml et de pointes de pipettes pour pipettes de 20, 200 et 1 000 µl au tableau sur les consommables. Ajout d'un cylindre gradué au tableau sur l'équipement.</p> <p>Ajout de la section <i>Préparer la Flow Cell</i> aux chapitres quatre et cinq et déplacement des étapes du chapitre six à ces sections.</p> <p>Mise à jour du volume total pour la Flow Cell S1 au chapitre quatre.</p> <p>Ajout d'un tableau sur la plexité recommandée de groupement de librairies à la section <i>Créer un groupement de librairies normalisées</i> au chapitre quatre.</p> <p>Mise à jours des étapes <i>Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification</i> aux chapitres quatre et cinq.</p> <p>Clarification des directives de décongélation dans la section <i>Préparer la Flow Cell</i>.</p> <p>Mise à jour des renseignements relatifs à la décongélation dans la section <i>Concentrations de chargement recommandées pour le flux de travail NovaSeq Xp</i>.</p> <p>Mise à jour du tableau sur la plexité recommandée de groupement de librairies à la section <i>Créer un groupement de librairies normalisées</i> au chapitre cinq.</p> <p>Ajout de renseignements indiquant que les Flow Cell doivent être utilisées dans les 12 heures suivant leur extraction de l'emballage dans les sections <i>Résumé du flux de travail NovaSeq Xp</i> et <i>Préparer la Flow Cell</i>.</p>
Document n° 1000000019358 v05	Décembre 2017	<p>Ajout de clarifications relatives au tube de librairies vide pour Xp dans le diagramme du flux de travail de séquençage.</p> <p>Mise à jour des volumes de Tris-HCl dans le tableau pour l'étape cinq dans les étapes de dénaturation de la librairie et l'option de contrôle PhiX pour le flux de travail standard.</p> <p>Ajout d'une note après l'étape quatre pour indiquer qu'il est nécessaire d'agiter le tube pour de meilleurs résultats à l'étape de préparation du mélange principal ExAmp pour le flux de travail NovaSeq Xp.</p> <p>Ajout du rappel de charger les librairies lentement après l'étape trois, à l'étape de chargement des librairies sur la Flow Cell pour le flux de travail NovaSeq Xp.</p>

Document	Date	Description des modifications
<p>Support n° 20023471 Document n° 1000000019358 v04</p>	<p>Octobre 2017</p>	<p>Ajout du chargement de lignes individuelles à la liste des fonctionnalités de l'instrument. Consommables : ajout de la trousse à deux lignes NovaSeq Xp 2-Lane Kit et de la trousse à quatre lignes NovaSeq Xp 4-Lane kit. Ajout du lot de collecteurs à deux lignes NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack et du lot de collecteurs à quatre lignes NovaSeq Xp 4-Lane Manifold Pack. Équipement : ajout du dock de Flow Cell NovaSeq Xp et de la pipette P200 pour le flux de travail NovaSeq Xp. Ajout du chapitre relatif à la préparation des consommables pour le flux de travail NovaSeq Xp. Déplacement des directives sur comment vider les flacons de réactifs usagés du chapitre relatif au séquençage au début des chapitres sur le flux de travail NovaSeq standard et le flux de travail NovaSeq Xp. Mise à jour du tableau sur la concentration de librairies groupées et du tableau sur la concentration de chargement recommandée pour le flux de travail standard.</p>
<p>Support n° 20020483 Document n° 1000000019358 v03</p>	<p>Septembre 2017</p>	<p>Mise à jour des descriptions du logiciel de commande. NovaSeq Control Software v1.2, comprenant la prise en charge des Flow Cell S1 et S4. Ajout d'exigences d'espace disque pour une analyse avec double Flow Cell pour Flow Cell S1 et S4. Spécification d'exigences d'attribution de nom pour certains fichiers *.json. Réorganisation des informations d'aperçu de trousse dans un chapitre sur les <i>Trousses et accessoires</i>. Ce chapitre couvre les configurations, les composants et les étiquettes de compatibilité des trousse de réactifs et de chargement de librairies. Ajout de la trousse de réactifs NovaSeq 6000 dans la liste de consommables fournis par l'utilisateur. Mise à jour des instructions de librairies dénaturées et regroupées afin d'inclure les Flow Cell S1 et S4. Mise à jour des instructions de dégel des cartouches de réactifs afin d'ajouter un bain de deux heures dans de l'eau pour les Flow Cell S1 et S2, et un bain de quatre heures dans de l'eau pour les Flow Cell S4. Mise à jour des descriptions du tube de librairies, des cartouches de réactifs et des Flow Cell afin d'inclure les composants S4. Ajout d'une section sur les mises à jour de logiciel automatiques dans le chapitre Entretien. Remplacement du document de référence <i>Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint (Réduction de l'espace de stockage de données pan-génomiques)</i> (Pub. n° 970-2012-013) par le document <i>NovaSeq Series and HiSeq X Ten Data Quality Comparison (Comparaison de qualité des données de dix instruments NovaSeq série et HiSeq X)</i> (Pub. n° 770-2017-010). Ajout de l'étape trois dans la section <i>Entrer les paramètres d'analyse</i> dans le chapitre six. Mise à jour de la section <i>Plaques de Flow Cell</i>, afin d'inclure des informations sur les plaques des composants S1 et S4.</p>

Document	Date	Description des modifications
<p>Support n° 20018871 Document n° 1000000019358 v02</p>	<p>Avril 2017</p>	<p>Ajout des renseignements suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Consommables fournis par Illumina et requis pour les analyses. • Conditions de stockage des composants des trousse de réactifs. • Recommandations sur les concentrations de chargement des librairies. • Dilution du NaOH pour deux Flow Cell. • Étapes servant à amener la Flow Cell à la température ambiante avant le chargement. • Étape de changement des gants après la vidange des flacons de réactifs usagés. • Configuration des sorties LIMS pour les systèmes LIMS de tierces parties. • Convention de nomenclature des feuilles d'échantillons. • Icônes et procédures de dépannage de l'écran Process Management (Gestion du processus). • Annexe présentant les caractéristiques de sécurité Windows et les instructions de configuration. • Coordonnées de l'assistance technique. <p>Prolongement de la période de décongélation des cartouches de réactifs, qui passe à quatre heures.</p> <p>Mise à jour des instructions relatives à la substance de contrôle PhiX; on recommande maintenant d'ajouter 0,9 µl de contrôle PhiX à 1 % et d'utiliser 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5 pour diluer le contrôle PhiX à 10 nM.</p> <p>Mise à jour des instructions qui recommandent maintenant de laver la Flow Cell et la platine de Flow Cell uniquement lorsque des particules sont visibles.</p> <p>Mise à jour de la fréquence du lavage de maintenance qui est maintenant à tous les 14 jours.</p> <p>Réorganisation et regroupement des instructions sur la préparation des consommables de façon à améliorer l'enchaînement.</p> <p>Changement de nom des portes à deux battants qui sont maintenant appelées les « portes du compartiment des liquides ».</p>
<p>Support n° 20018406 Document n° 1000000019358 v01</p>	<p>Mars 2017</p>	<p>Correction du nom d'une colonne de l'écran Process Management (Gestion du processus) pour la renommer Sequencing (Séquençage).</p>
<p>Support n° 20015871 Document n° 1000000019358 v00</p>	<p>Février 2017</p>	<p>Publication originale.</p>

Table des matières

Chapitre 1 Vue d'ensemble	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Présentation du séquençage	2
Flux de travail de séquençage	3
Composants de l'instrument	5
Chapitre 2 Trousses et accessoires	11
Aperçu des trousse	11
Composants de la trousse de réactifs	12
Composants des trousse NovaSeq Xp	16
Dock de Flow Cell NovaSeq Xp	17
Légende des symboles	18
Chapitre 3 Pour commencer	19
Démarrer l'instrument	19
Configurer les paramètres	20
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	26
Chapitre 4 Flux de travail standard : préparation des consommables	29
Méthodes	29
Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification	29
Vider les flacons de réactifs usagés	30
Préparer la Flow Cell	32
Regrouper et dénaturer les librairies aux fins du séquençage	32
Chapitre 5 Flux de travail NovaSeq Xp : préparation des consommables	34
Résumé du flux de travail NovaSeq Xp	34
Méthodes	35
Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification	36
Vider les flacons de réactifs usagés	37
Préparer la Flow Cell	38
Décongeler les réactifs ExAmp	38
Regrouper, dénaturer et charger les librairies aux fins du séquençage	39
Chapitre 6 Séquençage	44
Configurer une analyse de séquençage	44
Surveiller la progression de l'analyse	51
Démarrage échelonné d'analyses	52
Supprimer l'analyse	53
Détacher la position n° 30	53
Lavage automatique après analyse	54

Chapitre 7 Maintenance	55
Maintenance préventive	55
Réaliser un lavage de maintenance	55
Mises à jour logicielles	59
Annexe A Dépannage	61
Ressources de dépannage	61
Fichiers de dépannage	61
Erreurs lors de la vérification avant analyse	61
Dépannage des problèmes de gestion du processus	62
Échec de l'analyse avant la génération d'amplifiats	63
Arrêt d'une analyse	64
Arrêt de l'instrument	64
Annexe B Real-Time Analysis	66
Présentation de Real-Time Analysis	66
Flux de travail de Real-Time Analysis	68
Annexe C Dossiers et fichiers de sortie	71
Structure des dossiers de sortie de séquençage	71
Fichiers de sortie de séquençage	72
Annexe D Sécurité Windows	73
Configuration de sécurité	73
Exigences relatives aux mots de passe	73
Pare-feu Windows	73
Trousse à outils EMET	73
Stratégies de restriction logicielle	74
Index	77
Assistance technique	81

Chapitre 1 Vue d'ensemble

Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Présentation du séquençage	2
Flux de travail de séquençage	3
Composants de l'instrument	5

Introduction

Le système de séquençage NovaSeq^{MC} 6000 d'Illumina^{MD} allie un débit modulable et une technologie de séquençage flexible dans une plateforme à échelle de production offrant l'efficacité et la rentabilité des systèmes de paillasse.

Fonctionnalités

- ▶ **Séquençage modulable** : le débit de séquençage du NovaSeq 6000 est modulable et peut atteindre une production à grande échelle tout en générant des données de qualité pour un vaste éventail d'applications.
- ▶ **Résultats réglables** : le NovaSeq 6000 est un système à double Flow Cell dont la plage de résultats est très large. Il permet de séquencer une Flow Cell unique ou deux Flow Cell avec des longueurs de séquences différentes simultanément. Vous pouvez mélanger et combiner quatre types de Flow Cell et différentes longueurs de lecture.
- ▶ **Flow Cell structurée** : la Flow Cell structurée génère des amplifiats faiblement espacés. L'espace étroit entre les nanopuits augmente la densité des amplifiats et les données de sortie.
- ▶ **Mélange d'ExAmp sur instrument** : le NovaSeq 6000 mélange les réactifs ExAmp avec la librairie, amplifie la librairie et génère les amplifiats, pour simplifier le flux de travail de séquençage.
- ▶ **Individual lane loading** (Chargement de lignes individuelles) : le dock de la Flow Cell NovaSeq Xp permet de précharger les librairies dans les lignes individuelles de la Flow Cell et réduit le volume de chargement des librairies.
- ▶ **Balayage en ligne à débit élevé** : le NovaSeq 6000 est doté d'une caméra avec technologie de balayage bidirectionnel pour une imagerie rapide de la Flow Cell en deux canaux de couleur, produits simultanément.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : le NovaSeq 6000 utilise une version du logiciel Real-Time Analysis appelée RTA3. Ce logiciel intégré analyse des images et définit des bases.
- ▶ **Intégration de BaseSpace^{MD} Sequence Hub** : le flux de travail de séquençage est intégré à BaseSpace Sequence Hub, l'environnement informatique consacré à la génomique d'Illumina pour l'analyse des données, leur stockage et leur partage. Pendant la progression de l'analyse, les fichiers de sortie sont transférés dans l'environnement, en temps réel.
- ▶ **Appareil prêt pour l'utilisation de BaseSpace Clarity LIMS** : améliorez l'efficacité opérationnelle grâce au suivi des échantillons et des réactifs, du début à la fin, aux flux de travail automatisés et au fonctionnement intégré des instruments.

Ressources supplémentaires

Les [pages d'assistance du système de séquençage NovaSeq 6000](#) sur le site Web d'Illumina comprennent des ressources additionnelles concernant le système. Ces ressources comprennent des logiciels, des documents de formation, les produits compatibles et les documents ci-dessous. Consultez régulièrement les pages d'assistance pour voir la plus récente version de ces documents.

Ressource	Description
Custom Protocol Selector	Assistant pour la génération de la documentation personnalisée dans son intégralité en fonction de la méthode de préparation des bibliothèques, des paramètres d'analyse et de la méthode d'analyse utilisée pour le séquençage.
<i>Guide de préparation du site de la série NovaSeq (document n° 1000000019360)</i>	Spécifications relatives à l'espace du laboratoire, aux exigences électriques et aux considérations relatives à l'environnement et au réseau.
<i>Guide de sécurité et de conformité de la série NovaSeq (document n° 1000000019357)</i>	Document contenant des renseignements concernant les questions de sécurité, les déclarations de conformité et l'étiquetage de l'instrument.
<i>Guide de conformité du lecteur RFID (document n° 1000000002699)</i>	Document contenant des renseignements sur le lecteur RFID de l'instrument, y compris les certificats de conformité et les questions de sécurité.
<i>Guide des primers personnalisés de la série NovaSeq (document n° 1000000022266)</i>	Fournit des renseignements sur le remplacement des primers de séquençage d'Illumina par des primers de séquençage personnalisés.
<i>Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351)</i>	Fournit des instructions pour la dénaturation et la dilution de bibliothèques préparées en vue d'une analyse de séquençage et pour la préparation du contrôle PhiX facultatif.

Présentation du séquençage

Génération d'amplifiats

Durant la génération d'amplifiats, les molécules d'ADN uniques sont ensuite liées à la surface de la Flow Cell, puis amplifiées simultanément de façon à former des amplifiats. Pour le flux de travail standard, le mélange principal ExAmp est ajouté aux bibliothèques sur l'instrument avant la génération d'amplifiats. Pour le flux de travail NovaSeq Xp, les réactifs ExAmp et les bibliothèques sont mélangés et livrés à la Flow Cell à l'extérieur de l'instrument. Les volumes varient en fonction du flux de travail et du type de Flow Cell.

Séquençage

L'imagerie des amplifiats est réalisée par balayage bidirectionnel et par chimie de séquençage à deux canaux. La caméra utilise des capteurs qui détectent les lumières rouges et vertes pour effectuer l'imagerie de chaque témoin et générer simultanément des images rouges et vertes du témoin entier. Après l'imagerie, une définition des bases est réalisée pour les amplifiats à l'intérieur de chaque plaque, selon la proportion de signaux rouges/verts pour chaque amplifiat, en fonction de l'emplacement déterminé par la Flow Cell structurée. Ce processus se répète pour chaque cycle de séquençage.

Analyse

Pendant la progression de l'analyse, le logiciel de commande NovaSeq (NVCS) transfère automatiquement les fichiers de définition des bases (*.cbcl) vers l'emplacement du dossier de sortie indiqué pour l'analyse des données.

Plusieurs méthodes d'analyse sont disponibles en fonction de votre application. Pour obtenir plus de renseignements, visitez la [page d'assistance BaseSpace Sequence Hub sur le site Web d'Illumina](#).

Flux de travail de séquençage



Décongelez les cartouches SBS et de réactif d'amplifiat.



Regroupez et dénaturez les bibliothèques. Pour le flux de travail standard, ajoutez les bibliothèques au tube de bibliothèques. Pour le flux de travail NovaSeq Xp, chargez le mélange ExAmp/bibliothèque sur la Flow Cell. Pour les deux flux de travail, chargez le tube de bibliothèques dans la cartouche d'amplifiat décongelée. Pour plus de renseignements, consultez le Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351)



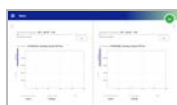
Dans l'interface logicielle, sélectionnez **Sequence** (Séquencer) et indiquez s'il s'agit d'une analyse à Flow Cell double ou unique.



Déchargez les consommables de l'analyse précédente et chargez les nouveaux consommables pour l'analyse en cours.



Indiquez les paramètres de l'analyse à l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse). Si BaseSpace Sequence Hub est configuré, ouvrez une session à l'écran Log In (Ouverture de session). Une fois les vérifications avant analyse terminées, l'analyse démarre automatiquement.



Surveillez l'analyse à l'écran Sequence (Séquencer), depuis BaseSpace Sequence Hub si la surveillance d'analyse est activée ou depuis un ordinateur en réseau utilisant le logiciel Sequencing Analysis Viewer. Les données sont transférées dans le dossier de sortie spécifié.



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

Méthodes de chargement de bibliothèques

Les bibliothèques sont chargées sur une Flow Cell NovaSeq 6000 à l'aide de l'une des deux méthodes suivantes, en fonction du flux de travail sélectionné. La configuration d'une analyse de séquençage change en fonction du flux de travail. Assurez-vous de toujours suivre les instructions pour la méthode sélectionnée. Consultez la section *Flux de travail standard : préparation des consommables*, page 29 et la section *Flux de travail NovaSeq Xp : préparation des consommables*, page 34.

Tableau 1 Méthodes de chargement de librairies

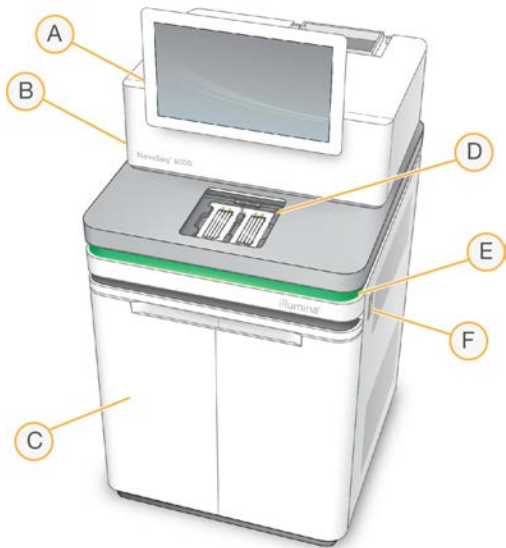
Flux de travail	Chargement du regroupement de librairies et méthode de mélange ExAmp	Capacité d'adressage de lignes individuelles et analyse de données	Volume de chargement * modes SP/S1–S2–S4 (µl)
Standard	Un groupement de librairies unique est chargé dans le tube de librairies, mélangé dans le tube de librairies avec les réactifs ExAmp et automatiquement livré à la Flow Cell pour la génération d'amplifiats et le séquençage. Une étape d'amplification avant le séquençage utilise des réactifs dans la cartouche d'amplifiats et le tube de librairies pour créer un mélange de conditionnement qui renforce l'efficacité de génération d'amplifiats.	Un groupement de librairies unique est distribué et séquençé à travers toutes les lignes de la Flow Cell. Les lectures de toutes les lignes sont analysées en agrégat.	150–225–465 µl (Flow Cell entière)
NovaSeq Xp	Une ou plusieurs librairies (le nombre correspond au nombre de lignes de Flow Cell) sont manuellement mélangées avec les réactifs ExAmp à l'extérieur de l'instrument et directement chargés dans les lignes individuelles de la Flow Cell à l'aide du dock de la Flow Cell NovaSeq Xp. La Flow Cell remplie est ensuite chargée sur l'instrument pour la génération d'amplifiats et le séquençage. Une étape d'amplification avant le séquençage utilise le tube de librairies vide pour mélanger des réactifs à partir de la cartouche d'amplifiats pour créer un mélange de conditionnement qui renforce l'efficacité de génération d'amplifiats.	Chaque librairie est chargée sur une ligne séparée de la Flow Cell, qui est ensuite séquençée. Différents groupements, des aliquots du même groupement ou des combinaisons choisies peuvent être utilisés. Les lectures de différentes lignes sont analysées individuellement ou en groupe, en conséquence.	27–33–45 µl (ligne individuelle)

* Le flux de travail NovaSeq Xp nécessite 25 à 50 % moins de concentration de librairies dénaturées en comparaison au flux de travail standard.

Composants de l'instrument

Le système de séquençage NovaSeq 6000 comprend un écran tactile, une barre d'état, un bouton d'alimentation avec port USB adjacents et trois compartiments.

Figure 1 Composants externes



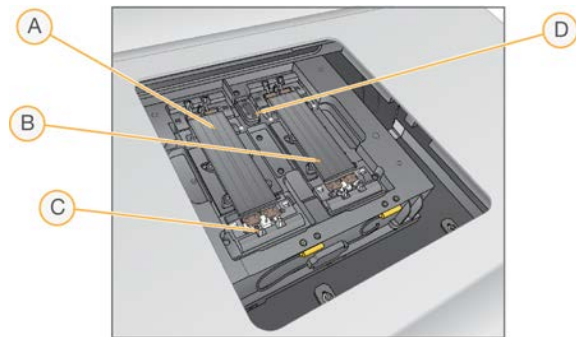
- A **Écran tactile** : affiche l'interface du NVCS pour la configuration du système et des analyses ainsi que la surveillance.
- B **Compartiment des composants optiques** : contient les composants optiques qui permettent l'imagerie à double surface des Flow Cell.
- C **Compartiment des liquides** : contient les cartouches de réactifs et de tampon ainsi que les flacons de réactifs usagés.
- D **Compartiment de Flow Cell** : contient les Flow Cell.
- E **Barre d'état** : indique que la Flow Cell est prête pour le séquençage (vert), en traitement (bleu) ou qu'elle nécessite une intervention (orange).
- F **Bouton d'alimentation et ports USB** : accès au bouton d'alimentation et aux connexions USB pour les composants périphériques.

Compartiment de Flow Cell

Le compartiment de Flow Cell contient la platine de Flow Cell, qui maintient en place la Flow Cell A à gauche et la Flow Cell B à droite. Il y a de chaque côté quatre pinces qui positionnent et maintiennent en place automatiquement la Flow Cell.

Une cible d'alignement optique, fixée sur la platine de Flow Cell, détecte et corrige les problèmes de lecteur optique. À la demande du NVCS, la cible d'alignement optique réaligne le système et fait la mise au point de la caméra pour améliorer les résultats de séquençage.

Figure 2 Platine de Flow Cell



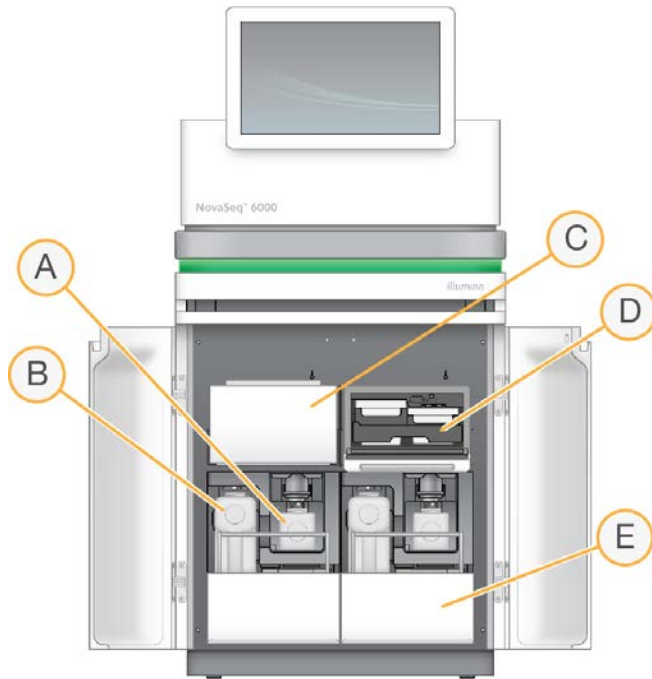
- A Portoir de Flow Cell A
- B Portoir de Flow Cell B
- C Pince de Flow Cell (une de quatre par côté)
- D Cible d'alignement optique

Le logiciel commande l'ouverture et la fermeture de la porte du compartiment de Flow Cell. La porte s'ouvre automatiquement pour le chargement de la Flow Cell avant une analyse ou un lavage de maintenance. Après le chargement, le logiciel referme la porte du compartiment, met en place la Flow Cell, puis active les pinces et le joint de décompression. Les capteurs vérifient la présence et la compatibilité de la Flow Cell.

Compartiment des liquides

Pour préparer l'analyse, il faut accéder au compartiment des liquides afin de charger les réactifs, le tampon et les flacons vides dans lesquels seront versés les réactifs usagés. Le compartiment des liquides est doté d'une porte à deux battants et est divisé en deux sections semblables, de chaque côté, où se trouvent la Flow Cell A et la Flow Cell B.

Figure 3 Composants du compartiment des liquides



- A **Petit flacon de réactifs usagés** : contient les réactifs usagés provenant de la cartouche d'amplification; il comporte un porte-bouchon pour faciliter le stockage du bouchon.
- B **Grand flacon de réactifs usagés** : contient les réactifs usagés provenant de la cartouche SBS et de la cartouche de tampon; il comporte un porte-bouchon pour faciliter le stockage du bouchon.
- C **Réfrigérant pour réactifs** : réfrigère la cartouche SBS et la cartouche d'amplification.
- D **Tiroir du réfrigérant pour réactifs** : les positions à code de couleurs abritent la cartouche SBS à gauche (étiquette grise) et la cartouche d'amplification à droite (étiquette orange).
- E **Tiroir de tampon** : contient le grand flacon de réactifs usagés à gauche et la cartouche de tampon à droite.

Réactifs usagés

Le système fluide est conçu de façon à évacuer les réactifs de la cartouche d'amplification, qui sont potentiellement dangereux, dans le petit flacon de réactifs usagés. Les réactifs de la cartouche SBS et de la cartouche de tampon sont acheminés dans le grand flacon de réactifs usagés. Il peut toutefois y avoir une contamination croisée entre les flux de réactifs usagés. Pour des raisons de sécurité, considérez que les deux flacons de réactifs usagés contiennent des déchets potentiellement dangereux. La fiche signalétique (SDS) comporte toutes les précisions utiles sur les éléments chimiques.

**REMARQUE**

Si le système est configuré de façon à évacuer les réactifs usagés à l'extérieur de l'appareil, le flux se rendant normalement vers le grand flacon de réactifs usagés est dirigé à l'extérieur de l'appareil. Les réactifs de la cartouche d'amplification sont toujours évacués dans le petit flacon de réactifs usagés.

Logiciels du système

La suite logicielle de l'instrument comprend des applications intégrées qui exécutent des analyses de séquençage, des analyses sur instrument et des fonctions connexes.

- ▶ **NovaSeq Control Software (NVCS)** : le logiciel de commande vous guide tout au long des étapes de configuration d'une analyse de séquençage, commande les opérations de l'instrument et affiche des statistiques à mesure que l'analyse avance. Pendant la configuration de l'analyse, NVCS fait jouer des vidéos didactiques montrant la bonne façon de décharger et de charger les consommables.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : ce logiciel effectue l'analyse des images et la définition des bases pendant l'analyse. Le système NovaSeq 6000 utilise la version RTA3, dont l'architecture, la sécurité et les autres caractéristiques améliorées optimisent la performance. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, page 66.
- ▶ **Universal Copy Service (UCS)** : ce logiciel copie les fichiers de sortie de RTA3 et de NVCS dans le dossier de sortie, tout au long de l'analyse. S'il y a lieu, il envoie aussi les données à BaseSpace Sequence Hub. Si le service de copie universel est interrompu durant une analyse, le service fait plusieurs tentatives de reconnexion et reprend automatiquement le transfert de données dès que possible.

Icônes d'état

Dans l'interface du NVCS, l'icône d'état indique l'état de l'analyse. Les chiffres affichés sur l'icône indiquent le nombre de points à signaler dans chaque cas.

Lorsque l'état de l'analyse change, l'icône clignote pour vous en avertir. Sélectionnez l'icône pour afficher une description de la situation. Sélectionnez **Acknowledge** (Accepter) pour effacer le message, puis **Close** (Fermer) pour fermer la boîte de dialogue.

Tableau 2 Icônes d'état de NVCS







Icône d'état	Nom de l'état	Description
	État correct	Le système est normal.
	Traitement	Le système est en cours de traitement.
	Avertissement	Un avertissement a été généré et nécessite l'attention de l'utilisateur. Les avertissements n'interrompent pas l'analyse et ne nécessitent pas d'intervention pour la poursuite de l'analyse.
	Erreur	Une erreur a eu lieu. Les erreurs nécessitent une intervention avant la poursuite de l'analyse.

Gestion du processus

L'écran Process Management (Gestion du processus) donne accès au moteur de calcul (Compute Engine ou CE) et au disque dur (lecteur C:\). Servez-vous de cet écran pour surveiller la progression de l'analyse, supprimer une analyse ou gérer l'espace disque. Ne supprimez jamais de fichiers ou de dossiers directement sur le lecteur C:\.

L'écran Process Management (Gestion du processus) affiche l'espace libre sur le disque dur, l'espace utilisé sur le moteur de calcul et le lecteur C:, ainsi que l'état des analyses qui utilisent de l'espace disque. Les colonnes Run Date (Date de l'analyse) et Name (Nom) permettent d'identifier chaque analyse. Les colonnes Run Status (État de l'analyse), BaseSpace et Network (Réseau) indiquent l'état de chaque processus de l'analyse.

Tableau 3 Icônes d'état de l'écran Process Management (Gestion du processus)

Processus	Icône	Description
Run Status (État de l'analyse)	 Running	L'analyse est en cours.
	 Complete	Le séquençage est terminé pour l'analyse.
Réseau	 Copying	Les fichiers sont en train d'être copiés dans le dossier de sortie sur le réseau.
	 Complete	Tous les fichiers ont été copiés dans le dossier de sortie sur le réseau.
	N/A	Sans objet. Soit l'analyse n'est pas configurée de façon à ce que les fichiers soient copiés dans un dossier de sortie sur le réseau, soit l'état du téléversement n'est pas connu. Pour voir les instructions de dépannage, consultez la section <i>Dépannage des problèmes de gestion du processus</i> , page 62.
BaseSpace	 Uploading	Les fichiers sont en train d'être téléversés dans BaseSpace Sequence Hub.
	 Complete	Tous les fichiers ont été téléversés dans BaseSpace Sequence Hub.
	N/A	Sans objet. Soit l'analyse n'est pas configurée de façon à ce que les fichiers soient téléversés dans BaseSpace Sequence Hub, soit l'état du téléversement n'est pas connu. Pour voir les instructions de dépannage, consultez la section <i>Dépannage des problèmes de gestion du processus</i> , page 62.

Avant que l'analyse d'une Flow Cell puisse commencer, les exigences d'espace minimal pour le CE et l'unité de disque C:\ doivent être respectées.



REMARQUE

Pour les analyses à Flow Cell unique, les exigences d'espace minimal correspondent à la moitié de celles indiquées dans le tableau suivant.

Tableau 4 Exigences relatives à l'espace pour le CE et l'unité de disque C:\ Fou les analyses de double Flow Cell

Flow Cell	Espace CE par cycle	Espace de disque C:\ par paire de Flow Cell
SP	0,5 Gb	5 Gb
S1	1,35 Gb	20 Gb
S2	2,7 Gb	20 Gb
S4	4,3 Gb	40 Gb

Pour calculer l'espace total nécessaire dans le CE pour l'analyse, multipliez la valeur sous 'CE Space per cycle' (Exigence relative à l'espace par cycle pour le CE) par la somme des valeurs de la longueur de la lecture 1, la lecture 2, l'index 1 et l'index 2 (consultez la section *Saisir les paramètres de l'analyse*, page 48). Par exemple, pour une analyse à lecture appariée d'une double Flow Cell S4 de 150 cycles avec les deux index longs de huit bases, l'espace nécessaire sur le CE est $(151 * 2 + 8 * 2) * 4,3 = 1,37$ Tb.

Pour plus d'information sur le nettoyage de l'espace disque, consultez la section *Supprimer l'analyse*, page 53.

Chapitre 2 Trousses et accessoires

Aperçu des trousse	11
Composants de la trousse de réactifs	12
Composants des trousse NovaSeq Xp	16
Dock de Flow Cell NovaSeq Xp	17
Légende des symboles	18

Aperçu des trousse

Pour réaliser une analyse sur le système NovaSeq 6000, il faut une trousse de réactifs NovaSeq 6000. Le flux de travail NovaSeq nécessite aussi une trousse NovaSeq Xp. Ces trousse sont disponibles dans les configurations suivantes.

Sélectionnez la taille de trousse appropriée pour la conception votre expérience. Illumina recommande l'utilisation des trousse de 500 cycles uniquement pour des longueurs d'analyses de plus de 300 cycles.

Pour voir la liste des articles requis pour réaliser une analyse, consultez la section *Consommables et équipement fournis par l'utilisateur*, page 26.

Tableau 5 Configurations de la trousse





Nom de la trousse	Réactifs v1.0, n° de référence Illumina	Réactifs v1.5, n° de référence Illumina
Trousse NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles), 40 boîtes	20039236	S. O.
Trousse NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles), 20 boîtes	20039234	S. O.
Trousse NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles), 10 boîtes	20039233	S. O.
Trousse de réactifs NovaSeq 6000 S4 (300 cycles)	20012866	20028312
Trousse NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (200 cycles)	20027466	20028313
Trousse NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (35 cycles)	S. O.	20044417
Trousse de réactifs NovaSeq 6000 S2 (300 cycles)	20012860	20028314
Trousse NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (200 cycles)	20012861	20028315
Trousse NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (100 cycles)	20012862	20028316
Trousse de réactifs NovaSeq 6000 S1 (300 cycles)	20012863	20028317
Trousse NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (200 cycles)	20012864	20028318
Trousse NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (100 cycles)	20012865	20028319
Trousse NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles)	20029137	20028402
Trousse NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (300 cycles)	20027465	20028400
Trousse NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (200 cycles)	20040326	20040719
Trousse NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (100 cycles)	20027464	20028401
Trousse à 2 lignes NovaSeq Xp	20021664	20043130
Trousse à 4 lignes NovaSeq Xp	20021665	20043131

Étiquetage de compatibilité

Pour identifier les composants de trousse compatibles, les Flow Cell et les cartouches affichent des symboles indiquant le mode de la trousse : **SP**, **S1**, **S2** ou **S4**. Les conduits NovaSeq Xp prennent en charge plusieurs modes et sont marqués d'une étiquette à deux lignes (pour les Flow Cell SP, S1 et S2) ou à quatre lignes (pour les Flow Cell S4).

Les composants avec différents modes ne peuvent être utilisés dans la même analyse. Par exemple, il ne faut pas jumeler des cartouches S1 avec une Flow Cell S2.

Il est interdit de mélanger les cartouches SBS/CPE v1.0 et les cartouches v1.5; les mélanger produira un message d'erreur.

Mode de la trousse	Marquage sur l'étiquette	Description
Composants de trousse SP		Une Flow Cell SP génère 650 à 800 millions de lectures uniques passant le filtre, avec un rendement jusqu'à 250 Gb à 2 x 150 pb et un rendement jusqu'à 400 Gb à 2 x 250 pb.
Composants de trousse S1		Une Flow Cell S1 génère jusqu'à 1,6 milliard de lectures uniques passant le filtre avec un rendement jusqu'à 500 Gb à 2 x 150 pb. La trousse S1 permet de réaliser un séquençage rapide de moins d'échantillons pour la plupart des applications à débit élevé.
Composants de trousse S2		Une Flow Cell S2 génère jusqu'à 4,1 milliards de lectures uniques passant le filtre avec un rendement jusqu'à 1 250 Gb à 2 x 150 pb. La trousse S2 permet de réaliser un séquençage rapide pour la plupart des applications à débit élevé, avec un plus grand nombre de lectures qu'une Flow Cell S1 pour un rendement de séquençage supérieur.
Composants de trousse S4		Une Flow Cell S4 génère jusqu'à 10 milliards de lectures uniques passant le filtre avec un rendement jusqu'à 3 000 Gb à 2 x 150 pb. C'est une version à quatre lignes de la Flow Cell conçue pour un rendement maximal. Elle permet le séquençage économique du génome entier pour un éventail d'espèces et de profondeurs de lecture.

La [page du produit des trousse de réactifs NovaSeq](#) sur le site Web d'Illumina fournit des spécifications détaillées sur chaque mode.

Composants de la trousse de réactifs

Chaque trousse de réactifs NovaSeq 6000 contient les composants suivants. Chaque composant utilise l'identification par radiofréquence (RFID) qui permet le suivi précis de ces consommables et la vérification de la compatibilité.

Lorsque vous recevez votre trousse, stockez rapidement ses composants à la température indiquée afin de garantir leurs performances.

Tableau 6 Composants de la trousse

Quantité	Composant de la trousse	Température de stockage
1	Tube de bibliothèques	De 15 à 30 °C
1	Flow Cell	De 2 à 8 °C
1	Cartouche de tampon	De 15 à 30 °C
1	Cartouche d'amplification	De -15 à -25 °C
1	Cartouche SBS	De -15 à -25 °C



ATTENTION

Évitez de faire tomber les cartouches. Une chute peut causer des blessures. La fuite de réactifs des cartouches peut causer une irritation cutanée. Inspectez les cartouches pour fissures avant utilisation.

Tube de bibliothèques

Le tube de bibliothèques NovaSeq 6000 est un tube de 16 mm qui s'insère dans la position n°8 de la cartouche d'amplification. La position n°8 est étiquetée **Library Tube** (Tube de bibliothèques) et est entourée en orange pour faciliter son identification. Le tube possède un bouchon fileté permettant le stockage des bibliothèques, au besoin, que le bouchon a été retiré avant de charger dans la cartouche d'amplification

Figure 4 Tube de bibliothèques



Le tube de bibliothèques est utilisé d'une des deux façons suivantes, en fonction du flux de travail :

- ▶ **Standard** : les bibliothèques groupées et dénaturées sont ajoutées dans le tube de bibliothèques, qui est ensuite chargé, sans son bouchon, dans la cartouche d'amplification. Après le lancement de l'analyse, l'instrument mélange les bibliothèques avec les réactifs ExAmp dans le tube de bibliothèques, qui sont ensuite transférées automatiquement dans la Flow Cell.
- ▶ **NovaSeq Xp** : le tube de bibliothèques vide, sans son bouchon, est chargé dans la cartouche d'amplification. Au cours de l'analyse, les réactifs sont mélangés dans le tube de bibliothèques avant d'être distribués dans la Flow Cell.

Flow Cell

La Flow Cell NovaSeq 6000 est une Flow Cell structurée enchâssée dans une cartouche. La Flow Cell est un substrat de verre contenant des milliards de nanopuits arrangés de façon ordonnée, ce qui améliore le nombre de lectures de sortie et les données de séquençage. Les amplifiats sont générés dans les nanopuits, dans lesquels le séquençage est effectué.

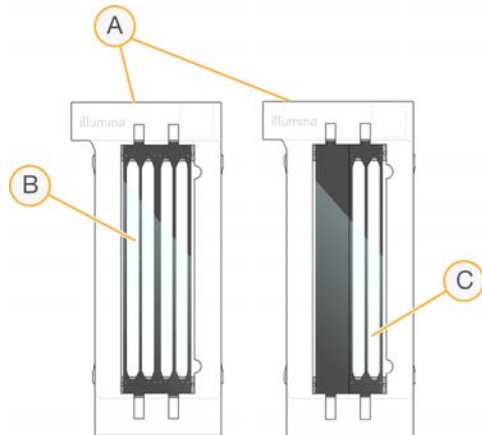
Chaque Flow Cell possède plusieurs lignes pour les bibliothèques regroupées de séquençage. Les Flow Cell SP, S1 et S2 ont chacune deux lignes, alors que la Flow Cell S4 en a quatre. Chaque ligne est imagée en de multiples témoins. Le logiciel divise ensuite l'image de chaque témoin en portions plus petites, appelées plaques. Pour plus de renseignements, consultez la section *Plaques de la Flow Cell*, page 67.



REMARQUE

Si vous utilisez une Flow Cell S1, assurez-vous d'utiliser NVCS v1.3.1 ou ultérieure. Si vous utilisez une Flow Cell SP, assurez-vous d'utiliser NVCS v1.6 ou ultérieure.

Figure 5 Flow Cell



- A Cartouche de Flow Cell
- B Flow Cell à quatre lignes (S4)
- C Flow Cell à deux lignes (SP, S1 et S2)

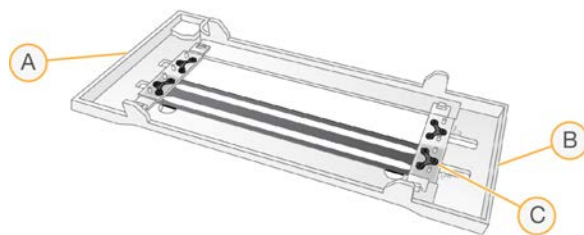
Le dessous de chaque Flow Cell présente quatre joints. Les librairies et les réactifs entrent dans les lignes de la Flow Cell par les joints sur l'extrémité d'entrée de la Flow Cell. Les réactifs usagés sont expulsés des lignes par les joints sur l'extrémité de sortie.



REMARQUE

Évitez de toucher les joints lorsque vous manipulez une Flow Cell.

Figure 6 Flow Cell inversée



- A Extrémité de sortie
- B Extrémité d'entrée
- C Joint (un sur quatre)




Cartouche de tampon, cartouche d'amplification et cartouche SBS

La cartouche de tampon, la cartouche d'amplification et la cartouche SBS de l'instrument NovaSeq 6000 comportent des réservoirs scellés par des opercules en aluminium et préremplis de réactifs, de tampons ou de solution de lavage. La trousse de réactifs comprend une cartouche de chaque type.

Les cartouches sont chargées directement dans l'instrument, ont un code de couleurs et portent une étiquette pour éviter les erreurs de chargement. Des guides situés dans les tiroirs du réfrigérant pour réactifs et de tampons assurent la bonne orientation des cartouches.

L'étiquette pour une cartouche comprends les modes pris en charge comme les modes S1/S2 ou les modes SP/S1/S2. Les cartouches peuvent uniquement être utilisées pour les modes indiqués sur l'étiquette.

Tableau 7 Cartouches de réactifs

Cartouche	Description
<p>Cartouche de tampon NovaSeq 6000</p> 	<p>Cartouche préremplie de tampons de séquençage et pouvant peser jusqu'à 6,8 kg (15 livres). Une poignée de plastique facilite le transport, le chargement et le déchargement de la cartouche. Les encoches sur la plaque supérieure permettent l'empilement des cartouches de réactifs.</p>
<p>Cartouche d'amplification NovaSeq 6000</p> 	<p>Cartouche préremplie avec des réactifs de génération d'amplifiats, des réactifs d'indexage, des réactifs à paires de bases appariées et une solution de lavage. Comprend une position désignée pour le tube de librairies. Son étiquette orange la distingue de la cartouche SBS.</p>
<p>Cartouche SBS NovaSeq 6000</p> 	<p>Cartouche préremplie avec des réactifs de séquençage dont le volume est fonction du nombre de cycles prévu pour la trousse (500, 300, 200, 100 ou 35). Pour chacune des trois positions des réactifs, une position adjacente est réservée au lavage automatique après analyse. L'étiquette grise distingue la cartouche SBS de la cartouche d'amplification.</p>

Réservoirs de la cartouche d'amplification

Réservoir amovible

En position n° 30, le réactif de dénaturation contient du formamide, un amide organique et une toxine reproductive. Pour faciliter l'élimination sûre de tout réactif non utilisé après l'analyse de séquençage, ce réservoir est amovible.



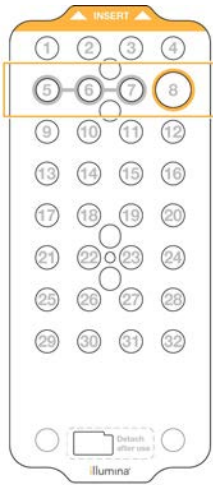
REMARQUE

Ne placez pas la cartouche SBS sur le dessus de la cartouche d'amplification, pour ne pas déconnecter la position n° 30.

Réservoirs réservés

Trois réservoirs sont réservés pour les primers personnalisés et une position vide est réservée pour le tube de librairies. Pour des raisons de traçabilité des échantillons, le tube de librairies est chargé dans la cartouche d'amplification au moment de la configuration de l'analyse et reste dans la cartouche jusqu'à la fin de l'analyse.

Figure 7 Réservoirs numérotés



Position	Réservé pour
5, 6 et 7	Primers personnalisés facultatifs
8	Tube de librairies

Pour plus de renseignements, consultez le *Guide des primers personnalisés de la série NovaSeq* (document n° 1000000022266).

Composants des trousse NovaSeq Xp

Chaque trousse NovaSeq Xp est à usage unique et contient les composants suivants. Lorsque vous recevez votre trousse, stockez rapidement ses composants à la température indiquée afin de garantir leurs performances.



REMARQUE

Les consommables DPX1 et DPX2 peuvent être étiquetés de la mention JPX1 et JPX2, respectivement. Tous deux sont compatibles avec les trousse de réactifs v1.0 ou v1.5.

Tableau 8 Composants des trousse NovaSeq Xp

Quantité	Composant de la trousse	Température de stockage
1	DPX1/JPX1	De -15 à -25 °C
1	DPX2/JPX2	De -15 à -25 °C
1	DPX3	De -15 à -25 °C
1	Collecteur NovaSeq Xp	Conserver avec la trousse ou à température ambiante.

Réactifs de trousse Xp

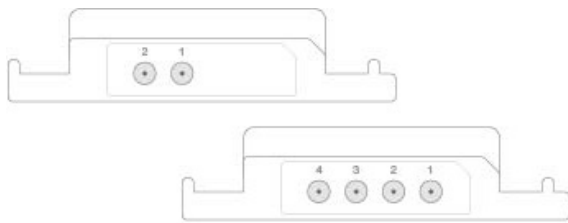
DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 et DPX3 sont des réactifs ExAmp fournis dans des tubes individuels pour le flux de travail NovaSeq Xp. Combiner ces réactifs produit le mélange principal ExAmp qui est mélangé aux regroupements de librairies avant le chargement sur la Flow Cell.

Collecteur NovaSeq Xp

Le collecteur NovaSeq Xp est placé sur le dock de Flow Cell NovaSeq Xp afin de permettre le chargement direct des groupements de bibliothèques dans les lignes individuelles de Flow Cell. Les bras de chaque côté du collecteur NovaSeq Xp sont conçus pour faciliter le placement sur le dock.

Les collecteurs NovaSeq Xp sont fournis dans des configurations à deux puits et à quatre puits pour correspondre aux Flow Cell à deux lignes et à quatre lignes. Chaque puits correspond à une ligne de Flow Cell. Parce que la Flow Cell est chargée dans le dock de Flow Cell NovaSeq Xp à l'envers, les puits sont numérotés de droite à gauche pour correspondre à la numérotation de lignes d'une Flow Cell inversée.

Figure 8 Collecteurs NovaSeq Xp avec puits numérotés

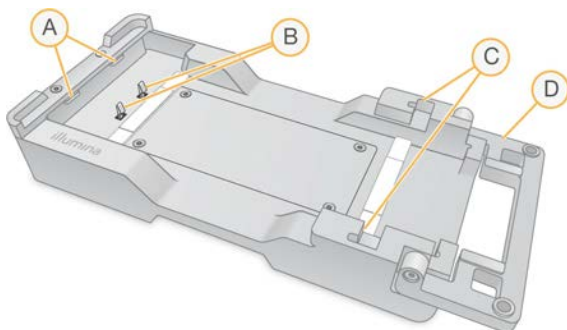


Dock de Flow Cell NovaSeq Xp

Le dock de la Flow Cell NovaSeq Xp est un accessoire réutilisable pour charger les bibliothèques directement sur une Flow Cell. La Flow Cell est inversée et chargée sur le dock, et le conduit NovaSeq Xp est ajusté au-dessus de la Flow Cell.

Les deux extrémités saillantes (sous les supports) et deux ressorts guident l'insertion de la Flow Cell et assurent une bonne orientation. Les découpes maintiennent les bras du conduit NovaSeq Xp dans la bonne direction et uniformément positionnés. Une pince magnétique pivote à 180° pour fixer le conduit NovaSeq Xp au-dessus de la Flow Cell.

Figure 9 Dock de Flow Cell NovaSeq Xp



- A Extrémités saillantes (sous les supports) pour guider le chargement
- B Ressorts pour aligner la Flow Cell
- C Découpes pour maintenir les bras du conduit NovaSeq Xp
- D Pince pour fixer la Flow Cell et le conduit NovaSeq Xp

Légende des symboles

Le tableau suivant explique les symboles présents sur les consommables ou leur emballage.

Symbole	Description
	Date de péremption du consommable. Pour de meilleurs résultats, utilisez le consommable avant cette date.
	Fabricant de l'instrument (Illumina).
	Le consommable est destiné à la recherche uniquement.
	Numéro de référence du consommable pour son identification ¹ .
	Numéro du lot de fabrication du consommable ¹ .
	Numéro de série.
	Protection contre la lumière ou la chaleur nécessaire. Entreposez à l'abri de la lumière.
	Risques pour la santé.
	Signal de danger
	Températures de stockage en degrés Celsius. Entreposez le consommable en respectant la plage de températures indiquée ² .

¹ Le symbole REF identifie le composant, alors que le LOT identifie le lot d'origine du composant.
La température de stockage peut être différente de la température de livraison.

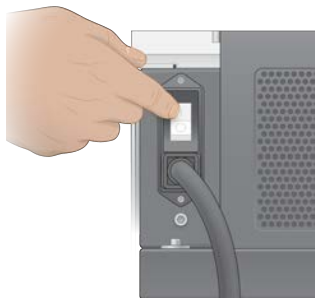
Chapitre 3 Pour commencer

Démarrer l'instrument	19
Configurer les paramètres	20
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	26

Démarrer l'instrument

- 1 Mettez l'interrupteur d'alimentation situé à l'arrière de l'instrument en position | (on) (marche).

Figure 10 Emplacement de l'interrupteur d'alimentation



- 2 Attendez que le bouton d'alimentation situé sur le côté droit de l'instrument s'allume en bleu, puis appuyez dessus.

Figure 11 Emplacement du bouton de mise en marche



Comptes utilisateur

La version 1.5 du NVCS, ou les versions plus récentes, comprennent deux types de comptes : administrateur et utilisateur. Les permissions pour chaque type de compte sont indiquées dans le tableau suivant.

Autorisations	Administrateur	User (Utilisateur)
Configurer, démarrer et surveiller les analyses de séquençage	X	X
Télécharger et mettre à jour le logiciel	X	
Consulter le statut d'analyses en cours démarrées par un autre utilisateur	X	
Terminer un processus UCS qui ne répond pas	X	

Les fichiers de données de l'application sont sauvegardés dans **C:/ProgramData**. Les applications sont installées dans **C:/Program Files**. Le NVCS est lancé en tant qu'application plein écran pour les deux types de compte.

Se connecter au système

1 Une fois le système d'exploitation chargé, connectez-vous à Windows au moyen du nom d'utilisateur et du mot de passe assignés à votre emplacement.

2 Ouvrez le NVCS.

Une fois lancé, le logiciel initialise le système. À la fin de l'initialisation, l'écran d'accueil apparaît.

Le NVCS est lancé en tant qu'application de l'utilisateur. Si vous essayez d'utiliser une fonctionnalité qui nécessite les permissions de l'administrateur, comme pour Software Update (Mise à jour logicielle), et que vous n'êtes pas connecté en tant qu'administrateur, l'interface vous invitera à vous connecter au compte administrateur.

Pour suivre le progrès de l'analyse de séquençage, restez connecté pendant l'exécution du NVCS et pendant l'exécution de l'analyse de séquençage.

Configurer les paramètres

Le logiciel de commande NovaSeq (NVCS) comprend les paramètres pour les éléments suivants :

- ▶ Mode de l'analyse (manuel ou fondé sur les fichiers)
- ▶ Flux de travail NovaSeq Xp
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Mises à jour logicielles



REMARQUE

Avant de configurer Workflow Selection (Sélection du flux de travail) ou Automatic Checks for Software Updates (Vérification automatique des mises à jour logicielles), assurez-vous d'avoir configuré Mode Selection (Sélection du mode).

Modes de configuration d'analyse

- ▶ **Manual** (Mode manuel) : mode par défaut qui envoie les données vers le dossier de sortie spécifié pour une analyse ultérieure.
- ▶ **File-Based** (Mode fondé sur les fichiers) : mode de rechange qui utilise les fichiers de BaseSpace Clarity LIMS ou d'un autre système LIMS pour définir les paramètres de l'analyse. Pour plus de renseignements, consultez la section *Configuration des sorties LIMS*, page 22.

Lors de la configuration du mode de configuration d'analyse, assurez-vous de préciser un emplacement existant pour le dossier de configuration de l'analyse. Ce dossier est requis. Si l'emplacement n'existe pas, un message indiquera qu'il n'est pas valide.

Les deux modes de configuration d'analyse comportent l'option d'envoyer les données à BaseSpace Sequence Hub pour l'analyse.

Configurer le mode manuel

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Settings** (Paramètres).
L'écran des paramètres s'ouvre à l'onglet Mode Selection (Sélection du mode).
- 2 Sélectionnez **Manual** (Manuel).
- 3 **[Facultatif]** Sélectionnez l'emplacement réseau de votre choix pour le dossier de sortie en saisissant le chemin vers le dossier en question ou en naviguant jusqu'à ce dossier.

Ne sélectionnez pas un emplacement sur les unités de disque C:\, D:\ ou Z:\. Cela entraîne une erreur de disque invalide.

Ce paramètre correspond à l'emplacement par défaut. L'emplacement du dossier de sortie peut être changé à chaque analyse.

- 4 **[Facultatif]** 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 NVCS 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).
- 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Configurer le mode fondé sur les fichiers

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Settings** (Paramètres).
L'écran des paramètres s'ouvre à l'onglet Mode Selection (Sélection du mode).
- 2 Sélectionnez **File-Based** (Fondé sur les fichiers).
- 3 Sélectionnez l'emplacement réseau de votre choix pour le dossier de configuration de l'analyse, qui contient les fichiers LIMS.
Assurez-vous que les fichiers LIMS appropriés sont ajoutés au dossier de configuration de l'analyse avant de préparer l'analyse. Lors de la configuration de l'analyse, le logiciel utilise l'identifiant du tube de bibliothèques ou de la Flow Cell pour localiser les fichiers pour l'analyse en cours.
- 4 **[Facultatif]** Sélectionnez l'emplacement réseau de votre choix pour le dossier de sortie en saisissant le chemin vers le dossier en question ou en naviguant jusqu'à ce dossier.
Ne sélectionnez pas un emplacement sur les unités de disque C:\, D:\ ou Z:\. Cela entraîne une erreur de disque invalide.
L'emplacement du dossier de sortie peut être changé à chaque analyse.
- 5 **[Facultatif]** 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 NVCS 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).

Lorsqu'elle est activée, cette option requiert une connexion Internet externe.

6 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Configuration des sorties LIMS

Si votre système est configuré pour utiliser le mode fondé sur les fichiers et que vous utilisez un autre logiciel LIMS que BaseSpace Clarity LIMS, configurez le LIMS de façon à ce que le fichier de configuration de l'analyse soit généré au format *.json. Pour le flux de travail standard, le nom de fichier doit correspondre à l'identifiant du tube de bibliothèques. Le champ d'identifiant de la Flow Cell peut être laissé vide. Pour le flux de travail NovaSeq Xp, le nom de fichier doit correspondre à l'identifiant de la Flow Cell et l'identifiant de la Flow Cell ainsi que de la bibliothèques doivent être spécifiés dans le fichier. Le nom de fichier et les valeurs ne sont pas sensibles à la casse.

Le logiciel LIMS externe peut utiliser l'interface de programmation d'applications (API) LIMS NovaSeq pour interagir avec le NovaSeq 6000. Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour plus de renseignements sur les points d'extrémité de l'API.

Nom du champ	Valeurs
run_name	Nom choisi pour l'analyse, qui peut comprendre des caractères alphanumériques, des tirets et du soulignement
run_mode	L'un des modes suivants : <ul style="list-style-type: none"> • SP • S1 • S2 • S4
workflow_type	NoIndex (Aucun index), SingleIndex (Un seul index), ou DualIndex (Deux index)
librarytube_ID	Identifiant RFID du tube de bibliothèques
rehyb*	True (Vrai) ou False (Faux)
sample_loading_type	NovaSeqStandard ou NovaSeqXp
Flowcell_ID	L'identifiant de la Flow Cell
paired_end	True (Vrai) ou False (Faux)
read1	Une valeur allant jusqu'à 251 (jusqu'à 259 cycles de lectures IMU supplémentaires possibles)
read2	Une valeur allant jusqu'à 251 (jusqu'à 259 cycles de lectures IMU supplémentaires possibles)
index_read1	N'importe quelle valeur
index_read2	N'importe quelle valeur
output_folder	Chemin vers le dossier de sortie comportant deux barres obliques inverses pour les séquences d'échappement
sample-sheet	Chemin vers une feuille d'échantillons ou un autre fichier *.csv comportant deux barres obliques inverses pour les séquences d'échappement
use_basespace	True (Vrai) ou False (Faux)
basespace_mode	RunMonitoringOnly (Surveillance de l'analyse uniquement) ou RunMonitoringAndStorage (Surveillance de l'analyse et stockage)

Nom du champ	Valeurs
use_custom_read1_primer	True (Vrai) ou False (Faux)
use_custom_read2_primer	True (Vrai) ou False (Faux)
use_custom_index_read1_primer	True (Vrai) ou False (Faux)
use_custom_index_read2_primer	True (Vrai) ou False (Faux)

* La réhybridation n'est pas disponible avec NVCS v1.4.0 ou une version antérieure.

Exemple : un fichier *.json nommé H6655DMXX.json :

```
{
  "run_name": "2x151_PhiX",
  "run_mode": "S2",
  "workflow_type": "NoIndex",
  "sample_loading_type": "NovaSeqXp",
  "librarytube_ID": "NV1236655-LIB", "flowcell_ID": "H6655DMXX",
  "rehyb": false,
  "paired_end": true,
  "read1": 151,
  "read2": 151,
  "index_read1": 0,
  "index_read2": 0,
  "output_folder": "\\snt-prd-isi01\\NovaSEQ\\SeqRuns",
  "attachment": "\\snt-prd-isi01\\NVSQ\\SampleSheet.csv",
  "use_basespace": false,
  "basespace_mode": null,
  "use_custom_read1_primer": false,
  "use_custom_read2_primer": false,
  "use_custom_index_read1_primer": false
}
```

Configurer les cycles d'index par défaut

Vous pouvez configurer le nombre par défaut des cycles d'index pour le flux de travail standard comme suit.

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Settings** (Paramètres).
L'écran des paramètres s'ouvre à l'onglet Mode Selection (Sélection du mode).
- 2 Cliquez sur l'onglet **Workflow Selection** (Sélection du flux de travail).
- 3 Entrez le nombre par défaut des cycles d'index dans la boîte de texte **Index Cycles** (Cycles d'index).
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Flux de travail NovaSeq standard et NovaSeq Xp

Les flux de travail NovaSeq standard et NovaSeq Xp utilisent tous deux la chimie ExAmp exclusive à Illumina.

- Flux de travail standard

Le flux de travail NovaSeq standard automatise deux étapes importantes de la chimie d'amplification ExAmp exclusive à Illumina sur l'instrument.

- ▶ Préparation du mélange principal ExAmp
- ▶ Distribution du mélange principal à la Flow Cell

La préparation sur l'instrument et la distribution du mélange principal minimise l'interaction de l'utilisateur et réduit les variances dans le mélange préparé.

Pendant la configuration de l'analyse pour le flux de travail standard, un tube de bibliothèques contenant le groupement de bibliothèques dénaturées et neutralisées à la concentration recommandée est inséré à la position n° 8 de la cartouche d'amplification. Pour plus de renseignements sur les concentrations recommandées, consultez le Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351) Une fois l'analyse initiée, les étapes suivantes sont effectuées sur l'instrument et aucune interaction avec l'utilisateur n'est nécessaire. Les étapes comprennent le transfert des réactifs ExAmp de la cartouche d'amplification au tube de bibliothèque, la préparation du mélange des réactifs et du groupement de bibliothèques et la distribution du mélange préparé à toutes les lignes de la Flow Cell.

Une fois l'étape de génération d'amplifiats terminée, l'instrument effectue plusieurs étapes communes aux deux types de flux de travail. Ces étapes comprennent l'application d'un mélange de conditionnement à la Flow Cell en amplifiats et des étapes chimiques supplémentaires pour préparer les amplifiats au séquençage par synthèse. Le mélange de conditionnement est préparé pendant le processus de génération d'amplifiats à l'aide des réactifs de la cartouche d'amplification et le tube de bibliothèques est inséré pendant la configuration de l'analyse. Le mélange de conditionnement permet de renforcer l'efficacité de la génération d'amplifiats sur l'instrument NovaSeq.

▶ Flux de travail NovaSeq Xp

Le flux de travail NovaSeq Xp permet le chargement de différentes bibliothèques ou regroupement de bibliothèques sur les lignes individuelles de la Flow Cell NovaSeq à l'aide du dock de Flow Cell NovaSeq Xp et de la trousse de consommables pour Flow Cell (trousse NovaSeq Xp 2-Lane Kit ou NovaSeq Xp 4-Lane Kit). La trousse NovaSeq Xp comprend les réactifs ExAmp nécessaires à la génération d'amplifiats le collecteur NovaSeq Xp à utiliser pour le chargement des lignes.

Le mélange de ExAmp/librairie est préparé et chargé sur les lignes individuelles de la Flow Cell à l'aide du dock de Flow Cell NovaSeq Xp et le collecteur NovaSeq Xp. Un distributeur de liquide automatisé peut être utilisé pour préparer le mélange ExAmp/librairie et le distribuer au collecteur pour l'auto-remplissage de la Flow Cell. Lorsque le chargement de l'échantillon de Flow Cell est terminé, un tube de bibliothèques vide est inséré à la position n° 8 de la cartouche d'amplification, la Flow Cell est placée sur l'instrument et l'analyse de séquençage débute.

Après le début de l'analyse, l'instrument effectue plusieurs étapes communes aux deux types de flux de travail. Ces étapes comprennent l'application d'un mélange de conditionnement à la Flow Cell en amplifiats et des étapes chimiques supplémentaires pour préparer les amplifiats au séquençage par synthèse. Le mélange de conditionnement est préparé pendant le processus de génération d'amplifiats à l'aide des réactifs de la cartouche d'amplification et mixé dans le tube de bibliothèques vide inséré pendant la configuration de l'analyse. Le mélange de conditionnement permet de renforcer l'efficacité de la génération d'amplifiats sur l'instrument NovaSeq.

Configurer le flux de travail NovaSeq Xp

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Settings** (Paramètres).
L'écran des paramètres s'ouvre à l'onglet Mode Selection (Sélection du mode).
- 2 Cliquez sur l'onglet **Workflow Selection** (Sélection du flux de travail).

- 3 Pour activer le flux de travail NovaSeq Xp, sélectionnez **Enable Workflow Selection** (Activer la sélection du flux de travail).
- 4 [Facultatif] Pour faire de NovaSeq Xp le flux de travail par défaut, sélectionnez **NovaSeq Xp**.
- 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Configurer BaseSpace Sequence Hub

Suivez les instructions ci-dessous pour configurer les paramètres par défaut de BaseSpace Sequence Hub. Lors de la configuration de l'analyse, vous pouvez désactiver BaseSpace Sequence Hub pour l'analyse en cours ou modifier les paramètres de surveillance d'analyse et de stockage. La connexion à BaseSpace Sequence Hub requiert une connexion Internet.

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Settings** (Paramètres).
L'écran des paramètres s'ouvre à l'onglet Mode Selection (Sélection du mode).
- 2 Cochez la case **BaseSpace Sequence Hub**.
- 3 « Select a Configuration » suivante :
 - ▶ **Run Monitoring and Storage** (Surveillance de l'analyse et stockage) : envoie les données de l'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour la surveillance et l'analyse à distance des données. Cette option exige le téléversement d'une feuille d'échantillons avec l'analyse.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse seulement) : envoie les fichiers InterOp, le journal et les autres fichiers d'analyse non CBCL à BaseSpace Sequence Hub pour la surveillance à distance des analyses.
- 4 Dans le menu déroulant Hosting Location (Emplacement de l'hébergement), sélectionnez **EU (Frankfurt)** (Europe [Frankfurt]) ou **USA (N. Virginia)** (États-Unis [Virginie du Nord]).
Cette option détermine vers où les données seront téléversées.
- 5 Si vous êtes abonné à BaseSpace Enterprise :
 - a Cochez la case **Private Domain** (Domaine privé).
 - b Entrez le nom du domaine utilisé pour l'ouverture de session propre à BaseSpace Sequence Hub.
- 6 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Nom de la feuille d'échantillons

Si vous exécutez la version 1.3.1 du NVCS, ou une version antérieure, une feuille d'échantillons utilisée pour une analyse NovaSeq 6000 et téléversée dans BaseSpace Sequence Hub doit être nommée `SampleSheet.csv` (sensible à la casse). Si elle n'est pas nommée de cette façon et que l'option de surveillance de l'analyse et de stockage est activée, BaseSpace Sequence Hub portera l'analyse à l'attention de l'utilisateur. Afin que l'analyse ainsi marquée soit mise en attente pour la génération de fichiers FASTQ, cliquez sur **More** (Voir plus) | **Fix Sample Sheet and Requeue** (Corriger la feuille d'échantillons et la remettre en file d'attente), puis saisissez le nom de la feuille d'échantillons. Les données de séquençage ne pourront pas être converties en fichiers FASTQ tant que la feuille d'échantillons ne sera pas fournie.

Si vous exécutez la version 1.4 du NVCS, ou une version plus récente, il n'existe aucune limitation relative au nom de la feuille d'échantillons.

Si vous utilisez la version 2.19 du logiciel de conversion `bcl2fastq2`, ou une version plus récente, pour convertir les données en fichiers FASTQ sur le disque local, vous pouvez utiliser l'option de ligne de commande `--sample-sheet` pour désigner un fichier CSV de n'importe quel emplacement. Cette ligne de commande permet l'utilisation de n'importe quel nom de fichier.

Configurer les mises à jour logicielles

La vérification automatique des mises à jour logicielles est activée par défaut. Il est possible d'activer et désactiver la vérification automatique des mises à jour logicielles dans Settings (Paramètres).

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Settings** (Paramètres).
- 2 Sélectionnez **Software Update** (Mise à jour logicielle).
- 3 Cochez la case **If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available** (Si cette option est activée, l'instrument affichera une notification chaque fois qu'une mise à jour du logiciel sera disponible).
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Consommables et équipement fournis par l'utilisateur

Les équipements et les consommables fournis par l'utilisateur indiqués ci-après sont utilisés pour la préparation des consommables, le séquençage et la maintenance du système.

Consommables

Consommable	Fournisseur	Utilisation
NaOH 1 N	Fournisseur de laboratoire général	Dilution à 0,2 N pour dénaturer les librairies.
Flacon pour centrifugeuse, 500 ml	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de Tween 20 pour un lavage de maintenance.
Tube pour centrifugeuse, 30 ml	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de NaOCl pour un lavage de maintenance.
Gants jetables sans talc	Fournisseur de laboratoire général	Usage général.
Lingettes d'alcool isopropylique à 70 % ou Lingettes d'alcool à l'éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714 (ou équivalent) Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage des composants avant l'analyse et usage général.
Tissu de laboratoire non pelucheux	VWR, n° de référence 21905-026, ou équivalent	Séchage de la platine de Flow Cell et usage général.
Tube de microcentrifugeuse, 1,5 ml	VWR, n° de référence 20170-038 (ou équivalent)	Combinaison des volumes lors de la dilution du NaOH et de la librairie.
NaOCl de qualité « réactif », 5 %	Sigma-Aldrich, n° de référence 239305	Effectuer un lavage de maintenance.
Trousse de réactifs NovaSeq 6000	Illumina, consultez le Aperçu des trousse , page 11	Exécution d'une analyse de séquençage
Embouts de pipette, 20 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
Embouts de pipette, 200 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Embouts de pipette, 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
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.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n° de référence P7949	Effectuer un lavage de maintenance.
Eau de laboratoire	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de NaOH pour la dénaturation des librairies. Dilution de Tween 20 et d'hypochlorite de sodium pour les lavages de maintenance.
[Flux de travail NovaSeq Xp] Une des trousse suivantes : • Trousse à 2 lignes NovaSeq Xp • Trousse à 4 lignes NovaSeq Xp	Illumina : • N° de référence 20021664 • N° de référence 20021665	Chargement manuel des librairies sur Flow Cell : • Trousse à 2 lignes pour Flow Cell SP, S1 et S2 • Trousse à 4 lignes pour Flow Cell S4
[Flux de travail NovaSeq Xp] Une des trousse suivantes : • NovaSeq Xp 2-Lane Kit v1.5 • NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	Illumina : • N° de référence 20043130 • N° de référence 20043131	Chargement manuel des librairies sur Flow Cell : • Trousse à 2 lignes pour Flow Cell SP, S1 et S2 • Trousse à 4 lignes pour Flow Cell S4
[Flux de travail NovaSeq Xp] tubes de 0,5 ml et 1,7 ml	Fournisseur de laboratoire général	Requis pour le mélange ExAmp.
[Flux de travail NovaSeq Xp] [Facultatif] Un des lots de collecteurs suivants : • Lot de collecteurs à deux lignes NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack • Lot de collecteurs à quatre lignes NovaSeq Xp 4-Lane Manifold Pack	Illumina : • N° de référence 20021666 • N° de référence 20021667	Collecteurs NovaSeq Xp de rechange pour le chargement manuel des librairies sur une Flow Cell.
[Facultatif] Contrôle PhiX v3	Illumina, n° de référence FC-110-3001	Ajout d'un contrôle PhiX.

Consommables dans les trousse Illumina

Une trousse de réactifs NovaSeq 6000 est nécessaire pour le séquençage d'une Flow Cell. Chaque trousse comprend plusieurs consommables, énumérés dans le tableau suivant. Pour une analyse à double Flow Cell, utilisez deux trousse.

Tableau 9 Consommables dans une trousse de réactifs NovaSeq 6000

Consommable (un de chacun)	Utilisation
Cartouche de tampon	Contient les tampons de séquençage nécessaires à l'analyse.
Cartouche d'amplification	Contient les réactifs de génération d'amplifiats, les réactifs d'indexage et les réactifs à paires de bases appariées nécessaires à l'analyse.
Flow Cell	La réaction d'amplification et de séquençage se produit sur la Flow Cell.
Cartouche SBS	Contient les réactifs de séquençage nécessaires à l'analyse.
Tube de librairies	Tube vide utilisé pour tenir les librairies regroupées et dénaturées (fournies par le client) ou pour préparer le mélange de conditionnement pour renforcer l'efficacité de génération d'amplifiats à des fins de séquençage.

Si vous suivez le flux de travail NovaSeq Xp pour charger les bibliothèques directement sur la Flow Cell, ajoutez une trousse NovaSeq Xp à chaque trousse de réactifs. Chaque trousse de réactifs NovaSeq Xp comprend les consommables suivants.



REMARQUE

Les consommables DPX1 et DPX2 peuvent être étiquetés de la mention JPX1 et JPX2, respectivement. Tous deux sont compatibles avec les trousse de réactifs v1.0 ou v1.5.

Tableau 10 Consommables dans une trousse de réactifs NovaSeq Xp

Consommable (un de chacun)	Utilisation
DPX1/JPX1	Préparation du mélange principal ExAmp.
DPX2/JPX2	
DPX3	
Collecteur NovaSeq Xp	Chargement des bibliothèques sur la Flow Cell.

Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

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

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

Équipement

Élément	Source
Congélateur, de -15 à -25 °C	Fournisseur de laboratoire général
Cylindre gradué, 500 ml, stérile	Fournisseur de laboratoire général
Seau d'eau glacé	Fournisseur de laboratoire général
Pipette, 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipette, 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipette, 1000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Réfrigérateur, de 2 °C à 8 °C	Fournisseur de laboratoire général
Cuve, bains d'eau*	Fournisseur de laboratoire général
[Flux de travail NovaSeq Xp] Dock de Flow Cell NovaSeq Xp	Illumina, n° de référence 20021663

* Utilisez une cuve pouvant accueillir deux cartouches de réactifs et le niveau d'eau approprié. Par exemple, une cuve de 61 cm x 91,4 cm x 25,4 cm (24 po x 36 po x 10 po).

Chapitre 4 Flux de travail standard : préparation des consommables

Méthodes	29
Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification	29
Vider les flacons de réactifs usagés	30
Préparer la Flow Cell	32
Regrouper et dénaturer les bibliothèques aux fins du séquençage	32

Méthodes

Avant de débiter la préparation des échantillons ou des consommables, assurez-vous que la version NVCS rencontre les exigences minimales de logiciel indiquées dans le tableau suivant.

Tableau 11 Exigences minimales de logiciel

Flow Cell	Version logicielle minimale pour la trousse de réactifs v1.0	Version logicielle minimale pour la trousse de réactifs v1.5
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Toutes	1.7
S4	1.2.0	1.7

- ▶ Assurez-vous d'avoir l'équipement et les consommables nécessaires. Consultez la section *Consommables et équipement fournis par l'utilisateur*, page 26.
- ▶ Vérifiez toujours l'étiquette lorsque vous préparez les consommables pour assurer la compatibilité entre les composants. Il est interdit de mélanger/jumeler des composants SP, S1, S2 et S4.
- ▶ Il est interdit de mélanger les versions des trousse de réactifs.
 - ▶ Seules les cartouches SBS et CPE v1.0 peuvent être jumelées ensemble.
 - ▶ Seules les cartouches SBS et CPE v1.5 peuvent être jumelées ensemble.
- ▶ Suivez les instructions dans l'ordre indiqué, en respectant les volumes, les concentrations, les températures et les durées précisés.
- ▶ À moins qu'un point d'arrêt ne soit stipulé dans les instructions, passez immédiatement à l'étape suivante.

Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification

- 1 Si une analyse de séquençage est en cours, assurez-vous que les deux côtés de l'instrument seront disponibles une fois les réactifs décongelés.
- 2 Retirez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification de leur lieu de stockage maintenu entre -25 °C et -15 °C.

- Placez chaque cartouche dans le support de décongélation en broche. Les supports de décongélation sont fournis avec l'instrument et empêchent les cartouches de chavirer dans le bain d'eau.

Figure 12 Cartouches dans les supports de décongélation en broche



- Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19 °C à 25 °C). Immergez jusqu'à la moitié environ.
- Utilisez le tableau ci-dessous pour déterminer la durée de décongélation.



ATTENTION

Utiliser de l'eau chaude pour décongeler les réactifs peut réduire la qualité des données ou causer un échec de l'analyse.

Cartouche	Durée de décongélation
Cartouches SBS SP, S1 et S2	4 heures
Cartouche d'amplification SP, S1 et S2	Jusqu'à 2 heures
Cartouche SBS S4	4 heures
Cartouche d'amplifiat S4	Jusqu'à 4 heures

- Séchez bien la base des cartouches avec des essuie-tout. Épongez entre les puits pour que toute l'eau soit enlevée.
- Vérifiez la présence d'eau sur les opercules en aluminium. S'il y a de l'eau, épongez-la avec un tissu non pelucheux.
- Vérifiez le dessous de chaque cartouche pour vous assurer qu'il n'y a pas de glace dans les réservoirs, ce qui indique que les réactifs sont décongelés.
- Retournez chaque cartouche 10 fois pour mélanger les réactifs.
- Tapotez doucement le fond de chaque cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.
- S'il n'est pas possible de charger les cartouches sur l'instrument dans les quatre heures qui suivent, elles peuvent être conservées entre 2 °C et 8 °C pendant une période maximale de 24 heures.

Vider les flacons de réactifs usagés

Suivez les instructions ci-dessous pour vider les flacons de réactifs usagés à **chaque** analyse de séquençage. Si votre système est configuré pour évacuer les réactifs usagés vers l'extérieur, le petit flacon reçoit des réactifs usagés et doit être vidé à chaque analyse de séquençage. Le grand flacon doit rester en place.

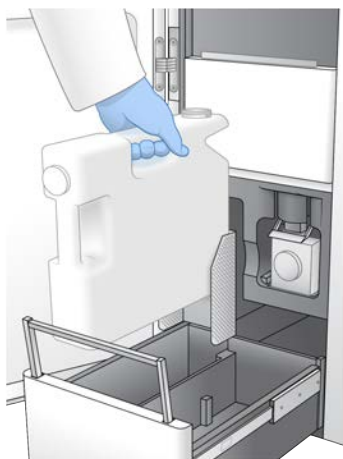


AVERTISSEMENT

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.

- 1 Retirez et videz le petit flacon de réactifs usagés, comme suit.
 - a Soulevez le levier et retirez le petit flacon de réactifs usagés du renforcement. Tenez le flacon par les côtés.
 - b Retirez le bouchon fileté du porte-bouchon situé sur le devant du flacon.
 - c Fermez hermétiquement le flacon à l'aide du bouchon pour prévenir les déversements.
 - d Jetez le contenu conformément aux normes en vigueur, en le gardant séparé du contenu de l'autre flacon.
 - e Remettez le flacon débouché dans le renforcement, puis abaissez le levier. Placez le bouchon sur le porte-bouchon.
- 2 Retirez et videz le grand flacon de réactifs usagés, comme suit.
 - a À l'aide de la poignée du dessus, retirez le grand flacon de réactifs usagés du côté gauche du tiroir de tampon.
 - b Retirez le bouchon fileté du porte-bouchon situé sur le devant du flacon.
 - c Fermez hermétiquement le flacon à l'aide du bouchon fileté pour prévenir les déversements.
 - d Jetez le contenu conformément aux normes en vigueur. Tenez les deux poignées durant la vidange.
 - e Remettez le flacon débouché dans le tiroir de tampon. Placez le bouchon sur le porte-bouchon.

Figure 13 Remise en place du flacon vide



- 3 Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc pour éviter de contaminer la surface de l'instrument.
- 4 Fermez le tiroir de tampon, puis fermez les portes du compartiment des liquides.



AVERTISSEMENT

Le fait de ne pas vider les flacons de réactifs usagés peut entraîner un arrêt de l'analyse et un débordement qui endommage l'instrument et constitue un risque pour la sécurité.

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 Placez la Flow Cell emballée et scellée de côté pendant 1015 minutes pour que la Flow Cell atteigne une température ambiante.
Utilisez la Flow Cell dans les douze heures après avoir l'avoir retirée de son emballage.

Regrouper et dénaturer les librairies aux fins du séquençage

La concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation, de quantification et de normalisation des librairies. Pour obtenir les directives, consultez le Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351) Une fois que la librairie groupée est prête, passez à la section *Préparer la cartouche SBS et la cartouche d'amplification*, page 42.



ATTENTION

Ne stockez le tube de librairies que si cela est absolument nécessaire. Le stockage à long terme sous -25 °C à -15 °C peut augmenter les doublons, ce qui diminue le rendement.

Préparer la cartouche SBS et la cartouche d'amplification

- 1 Vérifiez le dessous de chaque cartouche pour vous assurer qu'il n'y a pas de glace dans les réservoirs, ce qui indique que les réactifs sont décongelés.
- 2 Retournez chaque cartouche 10 fois pour mélanger les réactifs.
- 3 Tapotez doucement le fond de chaque cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.

Préparer les primers personnalisés

Si votre librairie nécessite des primers personnalisés, préparez-les en suivant les directives dans le Guide des primers personnalisés de la gamme NovaSeq (document n° 1000000022266).

Charger le tube de librairies

- 1 Sans déranger la librairie dans la partie inférieure, insérez le tube de librairies sans bouchon contenant le groupe de librairies dénaturées et diluées dans la position du **tube de librairies (n° 8)** de la cartouche d'amplification.

Figure 14 Tube de bibliothèques sans bouchon chargé dans la position n° 8



Chapitre 5 Flux de travail NovaSeq Xp : préparation des consommables

Résumé du flux de travail NovaSeq Xp	34
Méthodes	35
Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification	36
Vider les flacons de réactifs usagés	37
Préparer la Flow Cell	38
Décongeler les réactifs ExAmp	38
Regrouper, dénaturer et charger les bibliothèques aux fins du séquençage	39

Résumé du flux de travail NovaSeq Xp

Avant de débuter la préparation des échantillons ou des consommables, assurez-vous que la version NVCS rencontre les exigences minimales de logiciel indiquées dans le tableau suivant.

Tableau 12 Exigences minimales de logiciel

Flow Cell	Version logicielle minimale pour la trousse de réactifs v1.0	Version logicielle minimale pour la trousse de réactifs v1.5
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Toutes	1.7
S4	1.2.0	1.7



REMARQUE

Le NVCS prend en charge le démarrage échelonné de nouvelles analyses. Consultez la section *Démarrage échelonné d'analyses*, page 52.

Assurez-vous d'avoir suivi dans l'ordre toutes les étapes du flux de travail NovaSeq Xp.



REMARQUE

Les étapes un à quatre peuvent être complétées en parallèle et doivent être terminées avant de passer à l'étape cinq.

- 1 Décongelez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification.
- 2 Videz les flacons de réactifs usagés.
- 3 Placez la Flow Cell emballée et scellée de côté pendant 10 à 15 minutes pour que la Flow Cell atteigne une température ambiante. Utilisez la Flow Cell dans les douze heures après avoir l'avoir retirée de son emballage.
- 4 Normalisez et regroupez les bibliothèques et, au choix, ajoutez le contrôle PhiX selon le protocole approprié pour vos bibliothèques disponible dans le Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351).



REMARQUE

Complétez les étapes 5 à 11 dans l'ordre établi.

- 5 Décongelez les réactifs ExAmp.

- 6 Préparez une nouvelle dilution de NaOH selon les directives du Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351).
- 7 Dénaturez et neutralisez le groupement de librairies selon les directives du Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351).
- 8 Préparez la Flow Cell et le dock.
- 9 Préparez le mélange principal ExAmp.
- 10 Chargez le mélange ExAmp/librairie sur la Flow Cell.
- 11 Chargez un tube de librairies vide à la position n° 8 de la cartouche d'amplification.

Méthodes

- ▶ Assurez-vous d'avoir l'équipement et les consommables nécessaires. Consultez la section *Consommables et équipement fournis par l'utilisateur*, page 26.
- ▶ Assurez-vous que l'instrument est allumé et qu'il dispose d'un espace suffisant pour l'analyse. Consultez la section *Gestion du processus*, page 9.
- ▶ Assurez-vous que le lavage automatique après analyse situé sur les deux côtés de l'instrument est terminé avant de débiter l'étape *Décongeler les réactifs ExAmp* de la section *Résumé du flux de travail NovaSeq Xp*, page 34.
- ▶ Vérifiez toujours l'étiquette lorsque vous préparez les consommables pour assurer la compatibilité entre les composants. Ne mélangez pas les composants SP, S1, S2 et S4, ni les composants à deux lignes et à quatre lignes, sur un côté de l'instrument.
- ▶ Il est interdit de mélanger les versions des trousse de réactifs.
 - ▶ Seules les cartouches SBS et CPE v1.0 peuvent être jumelées ensemble.
 - ▶ Seules les cartouches SBS et CPE v1.5 peuvent être jumelées ensemble.
- ▶ Suivez les instructions dans l'ordre indiqué, en respectant les volumes, les températures et les durées précisés.
- ▶ Lorsque vous n'êtes pas en train d'effectuer de mélange, placez tous les réactifs et les librairies sur de la glace.
- ▶ À moins qu'un point d'arrêt ne soit stipulé dans les instructions, passez immédiatement à l'étape suivante.
- ▶ Pour démarrer avec succès le séquençage pour une Flow Cell à deux lignes, les deux lignes doivent être remplies. Pour démarrer avec succès le séquençage pour une Flow Cell à quatre lignes, une ligne peut être partiellement remplie ou laissée vide.
- ▶ Les causes les plus courantes de variations de résultats lors du mélange manuel des réactifs ExAmp sont une distribution inexacte des volumes de composants ExAmp et une solution qui n'a pas été assez mélangée. Ne pas sous-mélanger.



REMARQUE

Démarrez l'analyse de séquençage immédiatement après le chargement des librairies sur la Flow Cell, de préférence dans les 30 minutes suivantes.

Décongeler la cartouche SBS et la cartouche d'amplification

- 1 Si une analyse de séquençage est en cours, assurez-vous que les deux côtés de l'instrument seront disponibles une fois les réactifs décongelés.
- 2 Retirez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification de leur lieu de stockage maintenu entre -25 °C et -15 °C.
- 3 Placez chaque cartouche dans le support de décongélation en broche.
Les supports de décongélation sont fournis avec l'instrument et empêchent les cartouches de chavirer dans le bain d'eau.

Figure 15 Cartouches dans les supports de décongélation en broche



- 4 Décongelez dans un bain d'eau à température ambiante (de 19 °C à 25 °C). Immergez jusqu'à la moitié environ.
- 5 Utilisez le tableau ci-dessous pour déterminer la durée de décongélation.



ATTENTION

Utiliser de l'eau chaude pour décongeler les réactifs peut réduire la qualité des données ou causer un échec de l'analyse.

Cartouche	Durée de décongélation
Cartouches SBS SP, S1 et S2	4 heures
Cartouche d'amplification SP, S1 et S2	Jusqu'à 2 heures
Cartouche SBS S4	4 heures
Cartouche d'amplifiat S4	Jusqu'à 4 heures

- 6 Séchez bien la base des cartouches avec des essuie-tout. Épongez entre les puits pour que toute l'eau soit enlevée.
- 7 Vérifiez la présence d'eau sur les opercules en aluminium. S'il y a de l'eau, épongez-la avec un tissu non pelucheux.
- 8 Vérifiez le dessous de chaque cartouche pour vous assurer qu'il n'y a pas de glace dans les réservoirs, ce qui indique que les réactifs sont décongelés.
- 9 Retournez chaque cartouche 10 fois pour mélanger les réactifs.
- 10 Tapotez doucement le fond de chaque cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.
- 11 S'il n'est pas possible de charger les cartouches sur l'instrument dans les quatre heures qui suivent, elles peuvent être conservées entre 2 °C et 8 °C pendant une période maximale de 24 heures.

Vider les flacons de réactifs usagés

Suivez les instructions ci-dessous pour vider les flacons de réactifs usagés à **chaque** analyse de séquençage. Si votre système est configuré pour évacuer les réactifs usagés vers l'extérieur, le petit flacon reçoit des réactifs usagés et doit être vidé à chaque analyse de séquençage. Le grand flacon doit rester en place.



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.

- 1 Retirez et videz le petit flacon de réactifs usagés, comme suit.
 - a Soulevez le levier et retirez le petit flacon de réactifs usagés du renforcement. Tenez le flacon par les côtés.
 - b Retirez le bouchon fileté du porte-bouchon situé sur le devant du flacon.
 - c Fermez hermétiquement le flacon à l'aide du bouchon pour prévenir les déversements.
 - d Jetez le contenu conformément aux normes en vigueur, en le gardant séparé du contenu de l'autre flacon.
 - e Remettez le flacon débouché dans le renforcement, puis abaissez le levier. Placez le bouchon sur le porte-bouchon.

- 2 Retirez et videz le grand flacon de réactifs usagés, comme suit.
 - a À l'aide de la poignée du dessus, retirez le grand flacon de réactifs usagés du côté gauche du tiroir de tampon.
 - b Retirez le bouchon fileté du porte-bouchon situé sur le devant du flacon.
 - c Fermez hermétiquement le flacon à l'aide du bouchon fileté pour prévenir les déversements.
 - d Jetez le contenu conformément aux normes en vigueur. Tenez les deux poignées durant la vidange.
 - e Remettez le flacon débouché dans le tiroir de tampon. Placez le bouchon sur le porte-bouchon.

Figure 16 Remise en place du flacon vide



- 3 Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc pour éviter de contaminer la surface de l'instrument.
- 4 Fermez le tiroir de tampon, puis fermez les portes du compartiment des liquides.



AVERTISSEMENT

Le fait de ne pas vider les flacons de réactifs usagés peut entraîner un arrêt de l'analyse et un débordement qui endommage l'instrument et constitue un risque pour la sécurité.

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 Placez la Flow Cell emballée et scellée de côté pendant 1015 minutes pour que la Flow Cell atteigne une température ambiante.
Utilisez la Flow Cell dans les douze heures après avoir l'avoir retirée de son emballage.

Décongeler les réactifs ExAmp

- 1 Retirez un tube de chaque réactif DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 et DPX3 de leur emplacement de stockage à -25 °C à -15 °C.
- 2 Décongelez à température ambiante pendant 10 minutes.
- 3 Réservez sur de la glace.



REMARQUE

Si vous devez recongeler des réactifs ExAmp qui n'ont pas été ouverts, faites-le immédiatement après la décongélation. Les réactifs ExAmp peuvent être recongelés une fois seulement. Les réactifs résiduels neufs peuvent être congelés ou combinés.

Regrouper, dénaturer et charger les bibliothèques aux fins du séquençage

La concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation, de quantification et de normalisation des bibliothèques. Pour obtenir les directives, consultez le Guide de dénaturation et de dilution du NovaSeq 6000 (document n° 1000000106351) Une fois que la bibliothèque groupée est prête, passez à la section *Préparer la Flow Cell et le dock*, page 39.

Préparer la Flow Cell et le dock

- 1 Placez le dock de la Flow Cell NovaSeq Xp sur une surface plane. Gardez la Flow Cell à niveau jusqu'à son chargement sur l'instrument.
- 2 Inspectez le dock et assurez-vous qu'il est libre de particules.
- 3 Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc pour éviter de contaminer la surface en verre de la Flow Cell.
- 4 Placez l'emballage en aluminium de la Flow Cell sur une surface plane, puis ouvrez-le en partant de l'extrémité angulaire.
- 5 Retirez l'emballage en plastique transparent qui couvre la Flow Cell.
- 6 Sortez la Flow Cell de son emballage. Saisissez la Flow Cell par les côtés en évitant de toucher le verre et les joints du dessous.
- 7 Si des particules sont visibles sur l'une ou l'autre des surfaces en verre de la Flow Cell, nettoyez la surface à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse et séchez-la avec un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
- 8 Jetez l'emballage comme il convient.

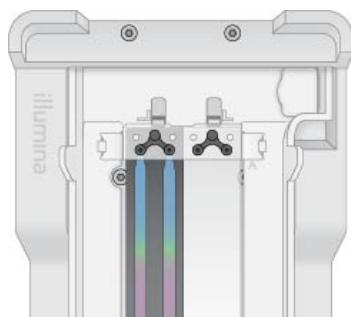


REMARQUE

Il est normal que de petites rayures et d'autres défauts superficiels mineurs soient visibles sur la Flow Cell, ce qui ne devrait pas compromettre la qualité des données ni le rendement. Illumina recommande l'utilisation de ces Flow Cell selon les procédures habituelles.

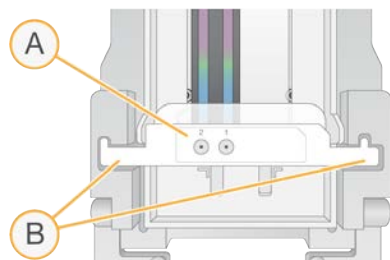
- 9 Inversez la Flow Cell pour que la surface supérieure soit tournée vers le **bas**.
- 10 Faites glisser l'extrémité de sortie de la Flow Cell sous le support et placez-la sur le dock. Consultez la section *Flow Cell*, page 13 et la section *Dock de Flow Cell NovaSeq Xp*, page 17.

Figure 17 Placement de Flow Cell



- 11 Les puits tournés vers le haut, chargez le conducteur NovaSeq Xp sur l'extrémité d'entrée de la Flow Cell. Assurez-vous que les bras du conducteur NovaSeq Xp sont solidement insérés dans les découpes du dock.

Figure 18 Placement du collecteur NovaSeq Xp



- A Puits du collecteur NovaSeq Xp tournés vers le haut
- B Bras du conducteur NovaSeq insérés dans les découpes du dock

- 12 Fermez la pince pour fixer la Flow Cell et le conduit NovaSeq Xp et sceller les joints.
- 13 Disposez du collecteur NovaSeq Xp après le chargement des groupements de bibliothèques sur la Flow Cell. Le collecteur NovaSeq Xp est à usage unique.

Préparer le mélange principal ExAmp

Lors de la préparation du mélange principal ExAmp, utilisez un tube de microcentrifugeuse pouvant contenir au moins deux fois le volume exigé :

- ▶ Pour Flow Cell à deux lignes, utilisez un tube de 0,5 ml ou de 1,7 ml.
- ▶ Pour Flow Cell à quatre lignes, utilisez un tube de 1,7 ml.

Les causes les plus courantes de variations de résultats lors du mélange manuel des réactifs ExAmp sont une distribution inexacte des volumes et une solution qui n'a pas été assez mélangée. Ne pas sous-mélanger.



REMARQUE

Les consommables DPX1 et DPX2 peuvent être étiquetés de la mention JPX1 et JPX2, respectivement. Tous deux sont compatibles avec les trousse de réactifs v1.0 ou v1.5.

- 1 Inversez ou agitez brièvement pour mélanger les réactifs DPX1/JPX1 et DPX2/JPX2.
- 2 Agitez brièvement le réactif DPX3 pour mélanger.
Les réactifs ExAmp peuvent être stockés séparément. Ils sont visqueux, particulièrement les réactifs DXP2/JPX2 et DPX3. Le réactif DPX3 ne se mélange pas facilement lorsqu'il est inversé en raison de sa haute viscosité.
- 3 Centrifugez brièvement les réactifs DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 et DPX3.
- 4 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse adéquat dans l'ordre établi.

Ordre d'ajout	Réactif*	Volume pour Flow Cell à deux lignes (SP/S1/S2) (µl)	Volume pour Flow Cell à quatre lignes (S4) (µl)
1	DPX1/JPX1	126	315
2	DPX2/JPX2	18	45
3	DPX3	66	165

* Les bouchons de tubes de réactifs pourraient suivre un code couleur (rouge, jaune et bleu pour les réactifs DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 et DPX3 respectivement). Assurez-vous de continuer le code couleur lorsque les bouchons de tubes sont remplacés.

Ces volumes donnent 210 µl de mélange principal ExAmp pour les modes SP, S1 ou S2 ou 525 µl de mélange principal pour le mode S4. Ces volumes suffisent pour le mode appliqué. Le volume est augmenté pour tenir compte des erreurs de pipetage lors du chargement des bibliothèques sur la Flow Cell.

- 5 Pipettez et distribuez lentement pour éviter la formation de bulles et assurez-vous que le volume entier est expulsé de la pointe.
- 6 Agitez pendant 20 à 30 secondes ou jusqu'au mélange complet.



REMARQUE

Le mélange principal ExAmp est stable à mélanger.

Le mélange peut paraître trouble, c'est normal.

- 7 Centrifugez jusqu'à 280 x g durant une minute.
- 8 **Pour une performance de séquençage optimale, passez immédiatement à l'étape suivante. Si nécessaire, conservez le mélange principal en le plaçant pendant un maximum d'une heure sur de la glace. Utilisez le mélange dans les 30 minutes suivantes si conservé à température ambiante.**

Charger des bibliothèques sur la Flow Cell

Pour de meilleurs résultats, procédez comme suit :

- ▶ Gardez la Flow Cell chargée à température ambiante. Ne la mettez pas au réfrigérateur ni sur de la glace.
- ▶ Une incubation prolongée peut réduire le pourcentage d'amplifiats passant le filtre (%PF).
- ▶ Démarrez l'analyse dans les 30 minutes suivant le chargement des groupements de bibliothèques sur la Flow Cell.
- ▶ L'utilisation immédiate du mélange ExAmp/librairie donne de meilleurs résultats.

- 1 Ajoutez le mélange principal ExAmp à chaque groupement de bibliothèques dénaturé comme suit, puis agitez pendant 20 à 30 secondes pour mélanger.

Si vous utilisez des barrettes de tubes, pipettez pour mélanger jusqu'à obtention d'une consistance homogène.

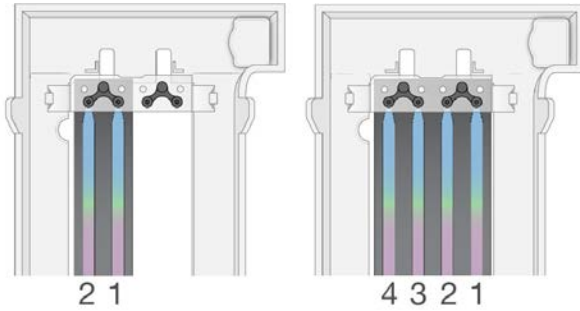
Mode	Regroupement de bibliothèques dénaturées (µl)	Mélange principal ExAmp (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 2 Centrifugez jusqu'à 280 x g durant une minute.
- 3 À l'aide d'une pipette p200 µl, ajoutez le volume approprié du mélange ExAmp/librairie à chaque puits de collecteur NovaSeq Xp.
 - ▶ Chargez les échantillons lentement pour éviter la création de bulles.
 - ▶ Assurez-vous d'ajouter le mélange du groupement de bibliothèques au puits qui correspond à la ligne prévue.
 - ▶ Évitez de toucher le filtre au fond du puits pendant le pipetage.
 - ▶ Il n'est pas nécessaire d'attendre qu'une ligne se remplisse entièrement avant d'ajouter du mélange aux autres puits du collecteur.

Mode	Mélange ExAmp/librairie par puits (µl)
SP/S1	80
S2	95
S4	130

Les puits du collecteur NovaSeq Xp numérotés correspondent au numéro de la ligne de Flow Cell. Lorsque la Flow Cell est inversée, la numérotation de la ligne est inversée.

Figure 19 Numérotation de ligne inversée



- 4 Attendez environ deux minutes après avoir ajouté le mélange ExAmp/librairie à tous les puits du collecteur pour que celui-ci atteigne le bout opposé de chaque ligne.
La formation d'une petite bulle d'air au bout de la ligne est normal. Une petite quantité du mélange peut rester dans les puits du collecteur une fois que la ligne est remplie.



ATTENTION

N'inclinez pas la Flow Cell en essayant de déterminer si les lignes sont remplies ou si des bulles sont présentes. Incliner la Flow Cell peut entraîner le déversement du mélange ExAmp/librairie de la Flow Cell. Si une ligne n'est pas entièrement remplie, n'essayez pas de la rajuster. Cela peut entraîner une réduction dans le rendement des données de la ligne partiellement remplie. N'essayez pas de récupérer l'échantillon de la Flow Cell.



REMARQUE

N'inclinez pas la Flow Cell lorsque vous la déplacez.

Préparer la cartouche SBS et la cartouche d'amplification

- 1 Vérifiez le dessous de chaque cartouche pour vous assurer qu'il n'y a pas de glace dans les réservoirs, ce qui indique que les réactifs sont décongelés.
- 2 Retournez chaque cartouche 10 fois pour mélanger les réactifs.
- 3 Tapotez doucement le fond de chaque cartouche sur la paillasse pour réduire les bulles d'air.

Préparer les primers personnalisés

Si votre librairie nécessite des primers personnalisés, préparez-les en suivant les directives dans le Guide des primers personnalisés de la gamme NovaSeq (document n° 1000000022266).

Charger le tube de librairies vide

- 1 Retirez le bouchon du tube de librairies fourni avec la trousse de réactifs NovaSeq 6000.
- 2 Insérez le tube sans bouchon et videz le tube de librairies dans la position **Library Tube** (Tube de librairies) (n° 8) de la cartouche d'amplification.

Le tube de librairies vide est nécessaire pour le balayage RFID et le mélange de réactifs intégré. Le code à barres du tube de librairies n'est pas validé avec le code à barres spécifié dans le fichier LIMS. Le RFID est validé pour assurer que le tube n'a pas été utilisé.

Figure 20 Tube de librairies sans bouchon chargé dans la position n° 8



Chapitre 6 Séquençage

Configurer une analyse de séquençage	44
Surveiller la progression de l'analyse	51
Démarrage échelonné d'analyses	52
Supprimer l'analyse	53
Détacher la position n° 30	53
Lavage automatique après analyse	54

Configurer une analyse de séquençage

Illumina recommande de demeurer connecté pendant l'exécution du NVCS et tout au long de l'analyse de séquençage.

- 1 Retirez tous les éléments de la surface de l'instrument.
Gardez la surface dégagée pendant l'analyse de séquençage et évitez de vous appuyer sur l'instrument. Toute pression sur la porte de la Flow Cell peut déclencher son ouverture, ce qui interrompt l'analyse. Les analyses interrompues ne peuvent pas être reprises au point d'interruption.



REMARQUE

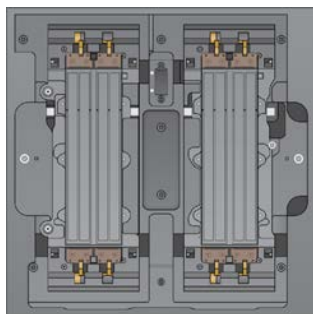
Le démarrage échelonné de nouvelles analyses est pris en charge. La minuterie indique lorsque le démarrage échelonné peut commencer. Pour plus de renseignements, consultez la section *Démarrage échelonné d'analyses*, page 52.

- 2 À l'écran d'accueil, sélectionnez **Sequence** (Séquencer), puis choisissez l'analyse d'une Flow Cell unique ou d'une double Flow Cell :
 - ▶ **A+B** : configurez l'analyse d'une double Flow Cell.
 - ▶ **A** : configurez l'analyse d'une Flow Cell unique sur le côté A.
 - ▶ **B** : configurez l'analyse d'une Flow Cell unique sur le côté B.Le logiciel lance une série d'écrans de configuration de l'analyse, en commençant par Load (Charger).
- 3 Sélectionnez **OK** pour accepter l'avertissement et ouvrir la porte de la Flow Cell.

Charger la Flow Cell sur l'instrument

- 1 Retirez la Flow Cell de l'analyse précédente, si elle se trouve encore dans l'appareil.
- 2 Si des particules sont visibles sur la platine de Flow Cell, nettoyez toute la platine, y compris l'interface fluïdique et la surface de verre de la cible d'alignement optique, avec une lingette imbibée d'alcool. Séchez à l'aide d'un tissu non pelucheux.

Figure 21 Platine de Flow Cell



- 3 **[Flux de travail standard]** Sortez la Flow Cell de son emballage conformément aux instructions suivantes :
 - a Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc pour éviter de contaminer la surface en verre de la Flow Cell.
 - b Placez l'emballage en aluminium sur une surface plate, puis ouvrez-le en partant de l'extrémité angulaire.
 - c Retirez l'emballage en plastique transparent qui couvre la Flow Cell.
 - d Sortez la Flow Cell de son emballage. Saisissez la Flow Cell par les côtés en évitant de toucher le verre et les joints du dessous.
 - e Si des particules sont visibles sur l'une ou l'autre des surfaces en verre de la Flow Cell, nettoyez la surface à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse et séchez-la avec un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
 - f Jetez l'emballage comme il convient.

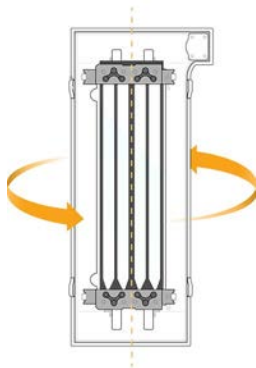


REMARQUE

Il est normal que de petites rayures et d'autres défauts superficiels mineurs soient visibles sur la Flow Cell, ce qui ne devrait pas compromettre la qualité des données ni le rendement. Illumina recommande l'utilisation de ces Flow Cell selon les procédures habituelles.

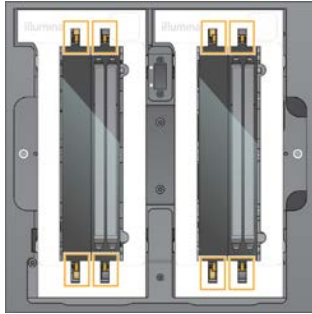
- 4 **[Flux de travail NovaSeq Xp]** Déchargez la Flow Cell du dock conformément aux instructions suivantes :
 - a Ouvrez la pince gardant en place la Flow Cell et le collecteur.
 - b En vous assurant de ne pas laisser de liquide se déverser sur la Flow Cell, retirez le collecteur avec précaution et jetez-le.
 - c Si du liquide se déverse sur la Flow Cell, nettoyez à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse et séchez à l'aide d'un tissu non pelucheux de laboratoire.
 - d Saisissez les côtés de la Flow Cell pour la retirer du dock. Gardez la Flow Cell de niveau.
 - e S'il y a des résidus de matière sur les joints, éponger les quatre joints de la Flow Cell avec un tissu non pelucheux pour les faire sécher. Ne touchez pas les joints.
 - f Inversez la Flow Cell sur la longueur pour que la surface supérieure soit tournée vers le haut.

Figure 22 Inverser la Flow Cell sur la longueur



- g Inspectez le dock avant de le retourner au stockage et assurez-vous que le dock est libre de particules.
- 5 Alignez la Flow Cell sur les quatre pinces relevées et placez-la sur la platine de Flow Cell.

Figure 23 Flow Cell chargées, alignées sur les pinces



- 6 Sélectionnez **Close Flow Cell Door** (Fermer la porte de la Flow Cell).
La porte de la Flow Cell se ferme, les capteurs et la RFID sont vérifiés, et l'identifiant de la Flow Cell s'affiche à l'écran.

Charger la cartouche SBS et la cartouche d'amplification



REMARQUE

Pour le flux de travail NovaSeq X, assurez-vous que le tube de librairies sans bouchon vide est chargé dans la cartouche avant de charger la cartouche d'amplification.

- 1 Ouvrez les portes du compartiment des liquides, puis ouvrez la porte du réfrigérant pour réactifs.
- 2 Retirez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification usagées.
Les opercules en aluminium des cartouches usagées sont percés.
- 3 Mettez les contenus inutilisés au rebut conformément aux normes en vigueur.
Aux fins de l'élimination en toute sécurité de la position n° 30 de la cartouche d'amplification, consultez la section *Détacher la position n° 30*, page 53.
- 4 Chargez les cartouches préparées dans le tiroir du réfrigérant pour réactifs de sorte que les étiquettes **Insert** soient face au dos de l'instrument :
 - ▶ Placez la cartouche SBS (étiquette grise) dans la position de gauche.
 - ▶ Placez la cartouche d'amplification (étiquette orange) contenant le tube de librairies débouché dans la position de droite.

Figure 24 Cartouches de réactifs chargées

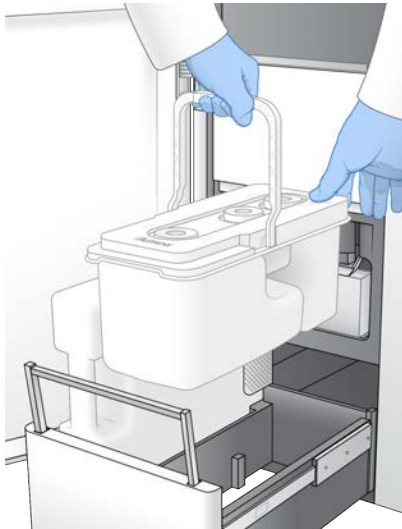


- 5 Glissez le tiroir dans le réfrigérant, puis fermez la porte du réfrigérant pour réactifs.
Les capteurs et les RFID sont vérifiés. Les identifiants du tube de librairies et des deux cartouches s'affichent à l'écran.

Charger la cartouche de tampon

- 1 Tirez la poignée métallique pour ouvrir le tiroir de tampon.
- 2 Retirez la cartouche de tampon usagée du côté droit du tiroir de tampon.
Les opercules en aluminium des cartouches de tampon usagées sont percés.
- 3 Placez une nouvelle cartouche de tampon dans le tiroir de tampon, de sorte que l'étiquette **Illumina** soit face au devant du tiroir. Alignez la cartouche avec les guides surélevés dans le fond du tiroir et sur les côtés.
Lorsqu'elle est chargée correctement, la cartouche de tampon repose uniformément dans l'appareil, et le tiroir peut fermer.

Figure 25 Charger la cartouche de tampon



- 4 Cochez la case confirmant que les deux flacons de réactifs usagés sont vides une fois que les deux flacons de réactifs ont été vidés.



AVERTISSEMENT

Le fait de ne pas vider les flacons de réactifs usagés peut entraîner un arrêt de l'analyse et un débordement qui endommage l'instrument et constitue un risque pour la sécurité.

- 5 Sélectionnez le bouton activé :
 - ▶ **Log In** (Ouverture de session) : ouvre l'écran d'ouverture de session de BaseSpace Sequence Hub. Consultez la section *Ouvrir une session de BaseSpace Sequence Hub*.
 - ▶ **Run Setup** (Configuration de l'analyse) : saute l'ouverture de session de BaseSpace Sequence Hub et ouvre l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse) pour la configuration des paramètres de l'analyse. Consultez la section *Saisir les paramètres de l'analyse, page 48*.Le bouton activé varie selon que le système est configuré pour BaseSpace Sequence Hub ou non.

Ouvrir une session de BaseSpace Sequence Hub

Lorsque vous ouvrez le NVCS, votre groupe de travail par défaut dans BaseSpace Sequence Hub est sélectionné comme groupe de travail par défaut. Si aucun groupe de travail par défaut n'a été spécifié, le NVCS sélectionne votre groupe de travail personnel.

- 1 **[Facultatif]** Effectuez la mise à jour des paramètres de BaseSpace Sequence Hub pour l'analyse en cours :
 - ▶ Pour désactiver BaseSpace Sequence Hub, désactivez la case **BaseSpace Sequence Hub**, puis sélectionnez **Run Setup** (Configuration de l'analyse) pour continuer sans ouvrir de session.
 - ▶ Pour envoyer les données d'analyse à BaseSpace Sequence Hub en vue de la surveillance à distance ou de l'analyse des données, sélectionnez **Run Monitoring and Storage** (Surveillance de l'analyse et stockage). Cette option requiert une feuille d'échantillons.
 - ▶ Pour envoyer des fichiers InterOp, runinfo.xml et runParameters.xml à BaseSpace Sequence Hub en vue de surveiller l'analyse à distance, sélectionnez **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse uniquement).
- 2 Saisissez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe BaseSpace Sequence Hub, puis sélectionnez **Sign In** (Ouverture de session).
- 3 Si vous y êtes invité, sélectionnez un groupe de travail pour le téléversement des données d'analyse, puis sélectionnez **Run Setup** (Configuration de l'analyse).
Vous y serez invité seulement si vous faites partie de plusieurs groupes de travail.

Saisir les paramètres de l'analyse

- 1 Si le flux de travail NovaSeq Xp est activé, sélectionnez un type de flux de travail.
 - ▶ Si vous sélectionnez **NovaSeq Xp**, assurez-vous qu'un tube de librairies vide est chargé.
 - ▶ Si vous sélectionnez **NovaSeq Standard**, assurez-vous que l'échantillon est chargé dans le tube de librairies.
- 2 Dans le champ Run Name (Nom de l'analyse), entrez le nom de votre choix pour l'analyse en cours. Le nom de l'analyse peut contenir des caractères alphanumériques, des tirets et des traits de soulignement.
- 3 Indiquez le nombre de cycles pour chaque longueur de lecture et d'index de l'analyse de séquençage. Il n'y a pas de nombre maximum de cycles d'index. Toutefois, la somme des lectures d'index et des cycles d'index ne doit pas dépasser le nombre de cycles pour la trousse.
 - ▶ **Read 1** (Lecture 1) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles pour les troussees v1.0 de 300 cycles, ou dans la limite de 251 cycles pour les troussees v1.0 de 500 cycles. Saisissez une valeur dans la limite de 159 cycles pour les troussees v1.5 de 300 cycles, ou dans la limite de 259 pour les troussees v1.5 de 500 cycles.
 - ▶ **Index 1** : saisissez le nombre de cycles pour le primer d'index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** : saisissez le nombre de cycles pour le primer d'index 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Lecture 2) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles pour les troussees v1.0 de 300 cycles, ou dans la limite de 251 cycles pour les troussees v1.0 de 500 cycles. Saisissez une valeur dans la limite de 159 cycles pour les troussees v1.5 de 300 cycles, ou dans la limite de 259 pour les troussees v1.5 de 500 cycles. Cette valeur est généralement la même que la valeur de la lecture 1.



REMARQUE

Le nombre de cycles analysés dans la lecture 1 et la lecture 2 est égal à la valeur saisie moins un cycle. Par exemple, pour une analyse de 150 cycles à lecture appariée (analyse 2 × 150 pb), entrez 151 pour la lecture 1 et la lecture 2.

Pour les trousseaux v1.0, la somme des quatre valeurs saisies peut dépasser le nombre de cycles indiqués pour les trousseaux de réactifs sélectionnés, jusqu'à 23 cycles de plus pour les analyses à lecture appariée et 30 cycles de plus pour les analyses à lecture unique.

Pour les trousseaux v1.5, la somme des quatre valeurs saisies peut dépasser le nombre de cycles indiqués pour les trousseaux de réactifs sélectionnés, jusqu'à 38 cycles de plus pour les analyses à lecture appariée et à lecture unique.

La trousse S4 de 35 cycles contient un total de 72 cycles de séquençage. La somme des quatre valeurs peut dépasser le nombre indiqué par un maximum de 37 cycles de plus. Les valeurs de lecture par défaut peuvent être modifiées et le nombre de cycles peut être distribué à travers les quatre lectures, par exemple : 36, 10, 10 et 0.

- 4 Déroulez **Advanced Settings** (Paramètres avancés) pour appliquer les paramètres à l'analyse en cours. Ces paramètres sont facultatifs, sauf indication contraire.
 - ▶ **v1.0 Custom Primers** (Primers personnalisés v1.0) : sélectionnez la case **Custom Primers** (Primers personnalisés), puis sélectionnez les cases appropriées. Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation : le primer de séquençage Read 1 (Lecture 1) (VP10) personnalisé est nécessaire pour les librairies si vous utilisez les trousseaux v1.0. Consultez le Guide des primers personnalisés de la série NovaSeq (document n° 1000000022266) pour plus de renseignements.
 - ▶ **Read 1** (Lecture 1) : utilisez le primer personnalisé pour la lecture 1.
 - ▶ **Read 2** (Lecture 2) : utilisez le primer personnalisé pour la lecture 2.
 - ▶ **Custom Index** (Index personnalisé) : utilisez le primer personnalisé pour l'index 1.
 - ▶ **v1.5 Custom Primers** (Primers personnalisés v1.5) : sélectionnez la case **Custom Primers** (Primers personnalisés), puis sélectionnez les cases appropriées. Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation : aucun primer personnalisé n'est nécessaire pour les librairies si vous utilisez les trousseaux v1.5. Consultez le Guide des primers personnalisés de la série NovaSeq (document n° 1000000022266) pour plus de renseignements.
 - ▶ **Read 1** (Lecture 1) : utilisez le primer personnalisé pour la lecture 1.
 - ▶ **Read 2** (Lecture 2) : utilisez le primer personnalisé pour la lecture 2.
 - ▶ **Custom Index** (Index personnalisé) : utilisez le primer personnalisé pour les lectures d'index 1 et d'index 2.
 - ▶ **Fichier de sortie** : sélectionnez **Browse** (Naviguer) pour changer le fichier de sortie pour l'analyse en cours. Un dossier de sortie est requis lorsque l'analyse n'est pas connectée à BaseSpace Sequence Hub pour le stockage.
 - ▶ **Samplesheet** (Feuille d'échantillons) : sélectionnez **Browse** (Naviguer) pour télécharger la feuille d'échantillons, qui est requise lorsque BaseSpace Sequence Hub est utilisé pour la surveillance de l'analyse et le stockage, ou un autre fichier CSV. Le fichier CVS est copié dans le dossier de sortie et n'a pas d'incidence sur les paramètres de l'analyse. Assurez-vous que la feuille d'échantillons est au format approprié (direction d'adaptateur de la lecture d'index 2) en fonction des flux de travail v1.0 et v1.5, qui utilisent différentes stratégies. Le flux de travail du brin direct est exécuté avec les trousseaux de réactifs v1.0. Le flux de travail du complément inverse est exécuté avec les trousseaux de réactifs v1.5.

- ▶ **Custom Recipe** (Formule personnalisée) : sélectionnez **Custom Recipe** (Formule personnalisée), puis **Browse** (Parcourir) pour utiliser une formule personnalisée au format XML pour cette analyse. Les formules personnalisées pour la v1.0 ne seront pas compatibles avec la v1.5. Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.



REMARQUE

La modification des étapes de génération d'amplifiats en une formule personnalisée n'est pas pris en charge.

- 5 Sélectionnez **Review** (Révision).
Le logiciel confirme que les paramètres indiqués sont appropriés pour la formule.

Confirmer les paramètres de l'analyse

- 1 Confirmez les paramètres de l'analyse affichés à l'écran Review (Révision).
- 2 **[Facultatif]** Sélectionnez **Back** (Retour) pour retourner à l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse) et modifier les paramètres.
- 3 Sélectionnez **Start Run** (Démarrer l'analyse).
Les vérifications avant analyse démarrent automatiquement.

Examiner les vérifications avant analyse

- 1 La vérification avant analyse prend environ 5 minutes.
L'analyse débute automatiquement après la réussite de la vérification.



REMARQUE

Pour éviter de surcharger le disque dur, ne copiez aucune donnée sur le lecteur C:\ après le démarrage de l'analyse.

- 2 Si les vérifications avant analyse échouent en raison d'une erreur liée au capteur, comme une Flow Cell non détectée, quittez et redémarrez le flux de travail.
- 3 Pour les autres types d'échec des vérifications avant analyse, sélectionnez **Retry** (Réessayer) pour redémarrer la vérification qui a échoué ou **Retry All** (Réessayer tout) pour redémarrer toutes les vérifications.
Les erreurs doivent être résolues pour que l'analyse puisse démarrer. Consultez la section *Erreurs lors de la vérification avant analyse, page 61*, pour des renseignements sur le dépannage.
- 4 Sélectionnez l'icône **Error** (Erreur) pour voir les précisions sur les erreurs.
- 5 Si la vérification de l'alignement échoue, résolvez l'erreur comme suit.
 - a Sélectionnez **Reload** (Recharger), puis sélectionnez **OK** pour confirmer le retour à l'écran Load (Charger).
 - b Retirez tous les éléments qui se trouvent sur le dessus de l'instrument, puis sélectionnez **OK**.
 - c Rechargez la Flow Cell, puis sélectionnez **Run Setup** (Configuration de l'analyse).
 - d Examinez chaque écran pour relire chaque RFID et retournez à l'écran Pre-Run Checks (Vérifications avant analyse).
 - e Refaites la vérification.

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.

Pour plus de renseignements sur les indicateurs de l'analyse, consultez la section *Real-Time Analysis*, page 66.

Figure 26 Progression et indicateurs de l'analyse de séquençage



- A **Time to completion** (Fin de l'analyse) : la date et l'heure de fin de l'analyse (au format aaaa-mm-jj hh:mm).
- B **Run progress** (Progression de l'analyse) : l'étape de l'analyse en cours. La taille de la barre de progression n'est pas proportionnelle à la durée d'analyse de chaque étape.
- C **Q-scores** (Scores de qualité) : la répartition des scores de qualité.
- D **Intensity** (Intensité) : la valeur des intensités d'amplifiats du 90^e centile pour chaque plaque. Les couleurs du tracé indiquent les canaux rouges et verts.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Amplifiats passant le filtre [%]) : le pourcentage d'amplifiats passant le filtre.
- F **Projected Total Yield (Gb)** (Rendement total attendu [Gb]) : le rendement total attendu pour l'analyse de Flow Cell. Si les indicateurs par ligne sont sélectionnés (H), les nombres affichés indiquent le rendement par ligne et seront mis à jour tout le long de l'analyse à chaque cycle.
- G **Q30** : le pourcentage de définitions des bases pour l'analyse qui a un score de qualité ≥ 30 .
- H **Per lane breakdown** (Données par ligne) : sélectionner les valeurs dans les champs E, F et G affichera les données par ligne pour chacun de ces champs.



REMARQUE

Si l'arrêt ou le redémarrage est enclenché pendant l'exécution du NVCS, l'utilisateur doit confirmer cette action avant de poursuivre l'arrêt ou le redémarrage.

Indicateurs de l'analyse

Le logiciel affiche les indicateurs générés au cours de l'analyse. Les indicateurs s'affichent sous forme de diagrammes, de graphiques et de tableaux qui s'appuient sur des données générées par le logiciel RTA3 et qui sont enregistrés dans des fichiers InterOp.

La génération d'amplifiats prend environ deux heures, puis le séquençage démarre avec le premier cycle. Les indicateurs sont mis à jour tout au long du séquençage. Les amplifiats passant le filtre, le rendement et les scores de qualité sont disponibles après le cycle 26. Avant le cycle 26, aucune valeur ne sera affichée dans les champs. Les champs afficheront la mention « N/A » (S. O.).

État du traitement

L'écran Process Management (Gestion du processus) répertorie l'état de chaque analyse. Dans le menu principal, cliquez sur **Process Management** (Gestion du processus).

Pour chaque nom d'analyse, l'écran Process Management (Gestion du processus) répertorie l'état des processus suivants :

- ▶ **Run Status** (État de l'analyse) : en fonction du traitement des fichiers CBCL.
- ▶ **Network** (Réseau) : en fonction du transfert de fichiers à l'aide de Universal Copy Service.
- ▶ **BaseSpace** : en fonction du téléversement des fichiers dans BaseSpace Sequence Hub, le cas échéant.

Lorsqu'un processus est terminé, un crochet vert s'affiche. Pour plus de renseignements, consultez la section *Gestion du processus*, page 9.

Démarrage échelonné d'analyses

Il est possible de configurer et démarrer une analyse sur le côté inactif de l'instrument pendant qu'une analyse est en cours de l'autre côté. C'est ce que l'on appelle un démarrage échelonné. Les analyses échelonnées sont configurées pour démarrer à un temps précis pendant l'analyse, tel qu'indiqué par les états de démarrage suivants du minuteur décroissant.

- ▶ **Run Start: Available** (Démarrage de l'analyse : disponible) : le démarrage échelonné est actuellement disponible. La date et l'heure affichées indiquent lorsque le démarrage de l'analyse ne sera plus disponible. Sélectionnez **Sequence** (Séquencer) pour commencer une nouvelle analyse échelonnée une fois que le cycle en cours est terminé.
- ▶ **Run Start: Unavailable** (Démarrage de l'analyse : non disponible) : le démarrage échelonné est actuellement indisponible. La date et l'heure affichées indiquent lorsque le démarrage de l'analyse sera disponible de l'autre côté de l'instrument.
- ▶ **Waiting...** (Attente...) : si une nouvelle analyse est lancée alors que le démarrage échelonné n'est pas disponible, l'état change à Waiting (Attente) et la date et l'heure affichées sont une approximation du moment où l'instrument sera prêt pour une nouvelle analyse. L'instrument procède à la configuration de l'analyse lorsque que le démarrage échelonné est disponible.

Lorsque vous configurez la nouvelle analyse, le logiciel interrompt et reprend automatiquement l'analyse sur la Flow Cell adjacente au besoin. Le système est placé en état de sécurité lorsqu'il est interrompu.

Procédure

- 1 À l'écran Home (Accueil), sélectionnez **Sequence** (Séquencer), puis **A** ou **B**.
Le côté sélectionné doit correspondre au côté inactif.
- 2 Attendez que l'analyse sur la Flow Cell adjacente s'interrompe. Pour annuler la nouvelle analyse et prévenir l'interruption, sélectionnez **Cancel** (Annuler).
Si l'analyse adjacente est à l'étape de la génération d'amplifiats, de la resynthèse des paires de bases, de l'imagerie ou du lavage, le logiciel termine l'étape en cours avant de s'interrompre.
- 3 Lorsque l'analyse adjacente s'interrompt et que les portes de la Flow Cell s'ouvrent, configurez la nouvelle analyse.

Lors du démarrage d'une nouvelle analyse, l'analyse interrompue reprend automatiquement, puis la nouvelle analyse commence.

Supprimer l'analyse

Après le transfert des données, vous pouvez supprimer l'analyse en cours dans Process Management (Gestion du processus) pour libérer de l'espace en vue d'une analyse subséquente. La suppression de l'analyse libère le moteur de calcul (Compute Engine ou CE) et le lecteur C:\ sans supprimer les fichiers de maintenance du système et sans toucher le réseau ou le processus de copie de BaseSpace Sequence Hub. Les analyses dont le séquençage est en cours ne peuvent pas être supprimées.

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Process Management** (Gestion du processus).
- 2 **[Facultatif]** Assurez-vous qu'un crochet vert est affiché pour chacun des processus de l'analyse, ce qui indique que le transfert des données est terminé.
Vous pouvez supprimer une analyse dont le transfert des données vers le réseau ou BaseSpace Sequence Hub n'est pas terminé, mais vous perdrez alors toutes les données de l'analyse.
- 3 Cliquez sur **Delete Run** (Supprimer l'analyse), puis sur **Yes** (Oui) pour confirmer.
- 4 Cliquez sur **Done** (Terminer).

Détacher la position n° 30

Le réservoir de la position n° 30 de la cartouche d'amplification contient du formamide. Il est retiré de la cartouche d'amplification usagée et jeté séparément.



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.

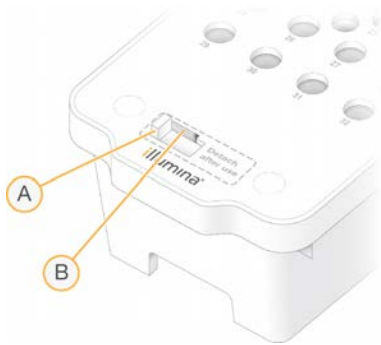
- 1 Équipé de gants, appuyez sur l'onglet en plastique blanc à droite qui porte la mention **Detach after use** (Détacher après usage).
- 2 Placez une main ou une surface solide sous le réservoir et poussez l'onglet de plastique transparent vers l'étiquette Illumina pour éjecter le réservoir de sous la cartouche d'amplification.



REMARQUE

Évitez d'empiler les cartouches d'amplifiat lors de leur entreposage. Un empilement pourrait causer un décollement accidentel du réservoir.

Figure 27 Position n° 30 amovible



- A Onglet en plastique blanc pour détacher
- B Onglet en plastique transparent pour éjecter

3 Mettez le réservoir au rebut conformément aux normes de sécurité en vigueur.

Lavage automatique après analyse

Lorsque le séquençage est terminé, le logiciel lance un lavage automatique après analyse qui prend environ 80 minutes. Le système pompe une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,24 % de la position n° 17 et la dilue à 0,12 %. La solution de NaOCl à 0,12 % est pompée vers les positions des réactifs ExAmp et des bibliothèques, à travers la Flow Cell, puis vers les flacons de réactifs usagés. Le lavage rince le système avec ce liquide afin de prévenir la contamination croisée.

Lorsque le lavage est terminé, le système est placé en état de sécurité et le bouton Home (Accueil) devient actif. Laissez les consommables en place jusqu'à l'analyse suivante. Après le lavage, les dispositifs d'aspiration demeurent dans la cartouche SBS et la cartouche d'amplification afin d'empêcher l'air d'entrer dans le système. Les dispositifs d'aspiration de la cartouche de tampon sont levés pour que les flacons de réactifs usagés puissent être vidés.



REMARQUE

Si une erreur se produit pendant un lavage automatique après analyse et que le lavage après analyse est incomplet, un lavage de maintenance est nécessaire.

Chapitre 7 Maintenance

Maintenance préventive	55
Réaliser un lavage de maintenance	55
Mises à jour logicielles	59

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.

Réaliser un lavage de maintenance

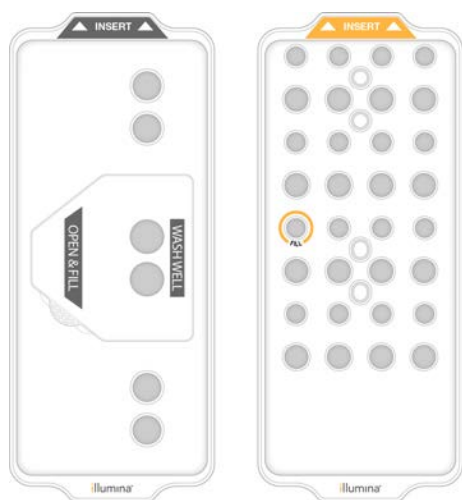
Des invites logicielles pour un lavage de maintenance s'afficheront aux moments suivants :

- ▶ lorsqu'il n'y a pas eu d'analyse à quatre lignes avec un lavage après analyse au cours des 14 derniers jours;
- ▶ lorsqu'il n'y a pas eu de lavage de maintenance au cours des 14 derniers jours;
- ▶ lorsqu'un lavage après analyse échoue ou est incomplet.

Le lavage de maintenance rince le système avec des dilutions de Tween 20 et de NaOCl fournies par l'utilisateur. Les dilutions sont pompées des cartouches de lavage vers la Flow Cell, les flacons de réactif usagé et chaque réservoir de cartouche, afin de laver tous les dispositifs d'aspiration. La durée du lavage est de 80 minutes environ.

Le lavage de maintenance requiert une cartouche de tampon usagée et la cartouche de lavage de la position SBS, la cartouche de lavage de la position d'amplification et la Flow Cell de lavage à quatre lignes fournie avec l'instrument (ou une Flow Cell à quatre lignes usagée). Tout comme les cartouches de réactifs, les cartouches de lavage ont un code de couleurs pour prévenir les erreurs de chargement. La cartouche de lavage SBS a un puits central pour la dilution de Tween 20. La dilution de NaOCl est ajoutée à un réservoir de la cartouche de lavage de la position d'amplification.

Figure 28 Cartouche de lavage de la position SBS (à gauche) et cartouche de lavage de la position d'amplification (à droite)



Préparer la solution de lavage

- 1 Ajoutez 400 ml d'eau de laboratoire à un flacon de centrifugeuse de 500 ml.
- 2 Ajoutez 0,2 ml de Tween 20 à 100 % pour obtenir au moins 400 ml de solution de lavage Tween 20 à 0,05 %.
L'utilisation d'une solution de Tween 20 fraîchement préparée limite l'introduction de contaminants biologiques dans le système fluide.
- 3 Inversez pour mélanger.
- 4 Retirez le couvercle du puits central de la cartouche de lavage SBS.
- 5 Ajoutez la solution de lavage dans le puits central. Remplissez jusqu'à la ligne de remplissage, qui indique le volume minimal requis.
Les autres réservoirs demeurent vides.

Figure 29 Centrer le puits rempli à la ligne MIN FILL VOLUME (VOLUME DE REMPLISSAGE MINIMUM)



- 6 Combinez les volumes suivants dans un tube pour centrifugeuse de 30 ml pour préparer 20 ml de NaOCl de qualité « réactif » à 0,25 % :
 - ▶ NaOCl de qualité « réactif » à 5 % (1 ml)
 - ▶ Eau désionisée (19 ml)

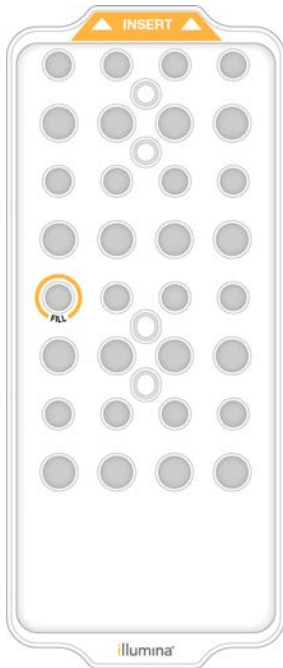


ATTENTION

Utilisez du NaOCl de qualité « réactif » uniquement. Évitez l'utilisation de produits de blanchiment car ils peuvent contenir des composés d'ammoniaque, ce qui peut entraîner des analyses avec un faible pourcentage de lectures passant le filtre.

- 7 Inversez pour mélanger.
- 8 Ajoutez 5 ml de NaOCl de qualité « réactif » à 0,25 % à la cartouche de lavage d'amplification.
L'emplacement est marqué de la mention « FILL » entourée d'un cercle de couleur orange. Tous les autres réservoirs demeurent vides.

Figure 30 Position du NaOCl à 0,25 %



Charger la Flow Cell de lavage

- 1 Retirez tous les éléments de la surface de l'instrument.
Gardez la surface dégagée pendant le lavage de maintenance et évitez de vous appuyer sur l'instrument. Toute pression sur la porte de la Flow Cell peut déclencher son ouverture, ce qui interrompt le lavage.
- 2 À l'écran d'accueil, sélectionnez **Wash** (Lavage), puis le côté à laver :
 - ▶ **A+B** : laver les deux côtés simultanément.
 - ▶ **A** : laver le côté A uniquement.
 - ▶ **B** : laver le côté B uniquement.Le logiciel lance une série d'écrans de lavage.



REMARQUE

Un lavage de maintenance pour un seul côté ne peut commencer que lorsque l'autre côté est inactif ou exécute des cycles de lecture SBS. L'heure de démarrage échelonné du NVCS indique la disponibilité de l'instrument pour démarrer une nouvelle analyse ou un lavage. Consultez la section *Démarrage échelonné d'analyses*, page 52.

- 3 Sélectionnez **OK** pour accepter l'avertissement et ouvrir la porte de la Flow Cell.
- 4 Si une Flow Cell de lavage ou une Flow Cell à quatre lignes usagée n'est pas déjà présente, chargez-en une.
- 5 Sélectionnez **Close Flow Cell Door** (Fermer la porte de la Flow Cell).
La porte se ferme, les capteurs et la RFID sont vérifiés, et l'identifiant de la Flow Cell s'affiche à l'écran.

Charger les cartouches de lavage

Il est nécessaire d'utiliser des cartouches de lavage pour réaliser un lavage d'entretien. N'utilisez pas la cartouche SBS ni la cartouche d'amplification usagées.

- 1 Ouvrez les portes du compartiment des liquides, puis ouvrez la porte du réfrigérant pour réactifs.
- 2 Retirez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification de réactifs usagées. Mettez les contenus inutilisés au rebut conformément aux normes en vigueur.
Aux fins de l'élimination en toute sécurité de la position n° 30 de la cartouche d'amplification, consultez la section *Détacher la position n° 30, page 53*.
- 3 Chargez les cartouches de lavage dans le tiroir du réfrigérant pour réactifs de sorte que les étiquettes d'**Insert** soient face au dos de l'instrument :
 - ▶ Placez la cartouche SBS (étiquette grise) dans la position de gauche.
 - ▶ Placez la cartouche d'amplifiat (étiquette orange) dans la bonne position.
- 4 Glissez le tiroir dans le réfrigérant, puis fermez la porte du réfrigérant pour réactifs.
Les capteurs sont vérifiés, et la RFID pour chaque cartouche est balayée et affichée à l'écran.
- 5 Ouvrez le tiroir de tampon.
- 6 Si une cartouche de tampon usagée n'est pas déjà présente, chargez-en une.

Vider les flacons de réactifs usagés

Suivez les instructions ci-dessous pour vider les flacons de réactifs usagés à **chaque** lavage de maintenance. Même si votre système est configuré pour évacuer les réactifs usagés vers l'extérieur, le petit flacon reçoit des réactifs usagés et le grand flacon doit être en place.



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.

- 1 Retirez le petit flacon de réactifs usagés et jetez son contenu conformément aux normes en vigueur.
Gardez le contenu séparé du contenu de l'autre flacon.
- 2 Remettez le petit flacon de réactifs usagés dans son renforcement.
- 3 Retirez le grand flacon de réactifs usagés et jetez son contenu conformément aux normes en vigueur.
- 4 Remettez le grand flacon de réactifs usagés dans le tiroir de tampon.
- 5 Enfilez une nouvelle paire de gants sans talc.
- 6 Fermez le tiroir de tampon, puis fermez les portes du compartiment des liquides.
Les capteurs et les RFID sont vérifiés. L'identifiant de chaque composant de lavage s'affiche à l'écran.

Démarrer le lavage

- 1 Cochez la case confirmant que les deux flacons de réactifs usagés sont vides, puis sélectionnez **Start Wash** (Démarrer le lavage).

Le lavage démarre, et la durée estimée du lavage s'affiche.



AVERTISSEMENT

Le fait de ne pas vider les flacons de réactifs usagés peut entraîner un arrêt du lavage et un débordement qui endommage l'instrument et constitue un risque pour la sécurité.

- 2 Une fois le lavage terminé, sélectionnez **Home** (Accueil).
- 3 Laissez les consommables en place jusqu'à l'analyse suivante.
Les dispositifs d'aspiration demeurent dans la cartouche SBS et la cartouche d'amplification afin d'empêcher l'air d'entrer dans le système. Les dispositifs d'aspiration de la cartouche de tampon sont levés pour que les flacons de réactifs usagés puissent être vidés.

Mises à jour logicielles

Des mises à jour logicielles sont disponibles pour la version 1.4 du NVCS ou les versions plus récentes. Les mises à jour peuvent être téléchargées et installées à l'aide du NVCS. La vérification automatique des mises à jour logicielles est activée par défaut. Il est possible d'activer et désactiver la recherche automatique de mises à jour dans Settings (Paramètres).



REMARQUE

L'instrument NovaSeq 6000 doit être connecté à Internet pour vérifier s'il existe des mises à jour logicielles et télécharger ces mises à jour, le cas échéant.

La recherche automatique de mises à jour est réalisée toutes les 24 heures. Lorsqu'une mise à jour est disponible, le menu principal affiche un message à cet effet. La notification de mise à jour est visible à tous les utilisateurs, mais seul un administrateur peut télécharger et installer les mises à jour.

Pour le flux de travail NovaSeq Xp, assurez-vous que la version NVCS rencontre les exigences minimales de logiciel indiquées dans le tableau suivant avant de débiter la préparation des échantillons ou des consommables.

Tableau 13 Exigences minimales de logiciel

Flow Cell	Version logicielle minimale pour la trousse de réactifs v1.0	Version logicielle minimale pour la trousse de réactifs v1.5
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Toutes	1.7
S4	1.2.0	1.7



REMARQUE

Il n'est pas possible de mettre à jour le logiciel durant une analyse de séquençage, durant un lavage, durant une configuration d'analyse ou durant un transfert de fichier vers un dossier de sortie ou vers BaseSpace Sequence Hub. Si un flux de travail NovaSeq Xp est en cours, attendez le chargement des librairies sur la Flow Cell et la fin du séquençage avant de mettre à jour le logiciel.

Si vous désirez rechercher manuellement des mises à jour, ou télécharger et installer une mise à jour, exécutez les opérations suivantes :

- 1 Dans le menu principal, cliquez sur **Software Update** (Mise à jour logicielle).
L'écran Software Update (Mise à jour logicielle) est affiché et fournit les notes de mises à jour disponibles. Si la fonction de recherche automatique de mises à jour logicielles n'est pas activée, vous pouvez faire une recherche manuelle de mises à jour ou activer la fonction de recherche automatique.

- 2 Si vous désirez télécharger et installer une mise à jour, cochez la case confirmant que vous avez lu l'avis avertissant qu'environ 30 minutes sont nécessaires pour le téléchargement et l'installation.
- 3 Cliquez sur **Download and Install** (Télécharger et installer).
Lorsque le téléchargement est terminé, le NVCS se ferme et l'installateur démarre. Suivez les instructeurs de l'installateur jusqu'à la fin de l'installation.
Si une erreur survient durant un téléchargement ou une installation, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Annexe A Dépannage

Ressources de dépannage	61
Fichiers de dépannage	61
Erreurs lors de la vérification avant analyse	61
Dépannage des problèmes de gestion du processus	62
Échec de l'analyse avant la génération d'amplifiats	63
Arrêt d'une analyse	64
Arrêt de l'instrument	64

Ressources de dépannage

En cas de questions techniques, consultez la [page d'assistance du système de séquençage NovaSeq 6000 sur le site Web d'Illumina](#). La page d'assistance donne accès à la documentation, aux téléchargements et aux foires aux questions. Pour accéder aux bulletins d'assistance, connectez-vous à votre compte MyIllumina.

En cas de problème de qualité d'analyse ou de performances, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina. Consultez la section *Assistance technique*, page 81. Pour faciliter le dépannage, envisagez de communiquer un lien vers le résumé d'analyse dans BaseSpace Sequence Hub à l'assistance technique d'Illumina.

Fichiers de dépannage

Fichier clé	Dossier	Description
Fichier de renseignements sur l'analyse (RunInfo.xml)	Dossier racine	Contient les paramètres de l'analyse : <ul style="list-style-type: none">• Nombre de cycles de l'analyse• Nombre de lectures de l'analyse• Indexation ou non de la lecture• Nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell
Fichier des paramètres de l'analyse (RunParameters.xml)	Dossier racine	Contient le nom de l'analyse et l'information sur les paramètres et les composants de l'analyse, y compris les données RFID suivantes : numéros de série, numéros de lot, dates d'expiration et numéros de référence.
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	Logs	Les fichiers journaux décrivent chaque étape effectuée par l'instrument au cours de chaque cycle, y compris lequel des réactifs est utilisé, 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.

Erreurs lors de la vérification avant analyse

Si une erreur survient au cours des vérifications avant analyse, utilisez les actions suivantes pour la résoudre. Si vous configurez l'analyse d'une double Flow Cell et qu'un côté échoue, vous pouvez annuler ce côté et utiliser le côté ayant réussi.

Lorsqu'une vérification avant analyse échoue, la RFID pour la Flow Cell, les réactifs et les tampons ne sont pas verrouillés; ainsi, les consommables peuvent être utilisés pour une analyse subséquente. Lorsque l'analyse est commencée, les dispositifs d'aspiration percent les opercules en aluminium sur les cartouches de réactifs, et toutes les RFID sont verrouillées.

Vérification du système	Motif de l'échec	Action recommandée
Capteurs	La porte d'un compartiment est ouverte, un consommable n'est pas correctement chargé ou au moins un capteur ne fonctionne pas.	Sélectionnez Retry (Réessayer) et suivez les instructions affichées à l'écran pour résoudre l'erreur.
Espace disque	L'espace disque est insuffisant, car l'emplacement indiqué pour le dossier de sortie est plein.	Servez-vous de l'écran Process Management (Gestion du processus) pour libérer de l'espace disque dans l'emplacement du dossier de sortie spécifié.
Connectivité du système	La connexion à RTA3, au système fluide ou à tout autre élément a été interrompue.	Sélectionnez Retry (Réessayer) et suivez les instructions affichées à l'écran pour résoudre l'erreur.
Alignement	La position de la Flow Cell empêche l'imagerie.	Suivez les instructions affichées à l'écran pour recharger la Flow Cell.

Plateau pour recueillir les fuites

Un plateau se trouve à la base de l'instrument pour recueillir les fuites de réactifs ou de réfrigérant et le trop-plein des flacons de réactifs usagés. Normalement, ce plateau est sec. Les fuites indiquent un problème dans l'instrument, et un trop-plein survient lorsque les flacons de réactifs usagés ne sont pas vidés régulièrement.

Lors de la vérification avant analyse, les capteurs détectent la présence ou non de liquides dans le plateau :

- ▶ Si le plateau contient des liquides, mais qu'il n'est pas plein, l'analyse peut être effectuée, mais vous devez communiquer avec l'assistance technique d'Illumina. Consultez la section *Assistance technique*, page 81.
- ▶ Si le plateau est plein, l'analyse ne peut pas être effectuée, et vous devez communiquer avec l'assistance technique d'Illumina.



AVERTISSEMENT

Videz les flacons de réactifs usagés à **chaque analyse**. Les analyses s'arrêtent lorsque l'un des flacons de réactifs usagés est plein. Un trop-plein d'un des gros flacons de réactifs usagés endommage l'instrument, nécessite la visite d'un représentant d'Illumina et présente un risque pour la sécurité.

Dépannage des problèmes de gestion du processus

Le tableau ci-dessous présente les options de dépannage pour l'icône N/A (Sans objet) de l'écran Process Management (Gestion du processus) :

- ▶ L'icône N/A (Sans objet) s'affiche dans la colonne BaseSpace et l'analyse est configurée de façon à ce que les données soient téléversées dans BaseSpace Sequence Hub.
- ▶ L'icône N/A (Sans objet) s'affiche dans la colonne Network (Réseau) et l'analyse est configurée de façon à ce que les données soient téléversées dans un fichier de sortie, sur le réseau.

Run Status (État de l'analyse)	Mesure à prendre
L'analyse est en cours	Fermez l'écran Process Management (Gestion du processus), attendez environ cinq minutes, puis rouvrez l'écran.
L'analyse n'est pas en cours	Fermez l'instrument et redémarrez-le, puis rouvrez l'écran Process Management (Gestion du processus).

Si l'icône N/A (Sans objet) s'affiche toujours après ces étapes de dépannage, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina. Consultez la section *Assistance technique*, page 81.

Échec de l'analyse avant la génération d'amplifiats

Si le logiciel ne réussit pas à effectuer l'analyse avant le début de la génération d'amplifiats, vous pouvez conserver les cartouches de réactifs, le tube de librairies (y compris l'échantillon) et la Flow Cell, si utilisée de nouveau immédiatement, pour une nouvelle analyse. Lorsque la génération d'amplifiats commence, les dispositifs d'aspiration percent les opercules en aluminium et les réactifs sont transférés au tube de librairies et à la Flow Cell. Les réactifs et les librairies ne peuvent donc pas être utilisés pour une autre analyse.

Vous avez deux options pour configurer une nouvelle analyse qui utilisera les cartouches de réactifs, le tube de librairies et la Flow Cell conservés après l'échec d'une analyse :

- ▶ **Configuration immédiate d'une nouvelle analyse** : configurez la nouvelle analyse dans les quatre heures suivant l'échec de l'analyse. Les cartouches de réactifs, le tube de librairies et la Flow Cell demeurent chargés.



REMARQUE

Pour optimiser les résultats du flux de travail NovaSeq Xp, démarrez une nouvelle analyse le plus rapidement possible.

- ▶ **Configuration ultérieure d'une nouvelle analyse** : configurez la nouvelle analyse dans les trois semaines suivant l'échec de l'analyse. Les cartouches de réactifs et le tube de librairies sont déchargés de l'instrument et stockés. Étiquetez les consommables réservés avec la date d'utilisation et stockez-les dans suivant les conditions d'origine.



REMARQUE

La Flow Cell ne peut être réutilisée et doit être jetée. Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour demander une nouvelle Flow Cell.

Configuration immédiate d'une nouvelle analyse

Si une analyse a échoué avec le flux de travail NovaSeq Xp, démarrez une nouvelle analyse le plus rapidement possible pour de meilleurs résultats.

- 1 Lorsque une analyse échoue et que l'autre côté de l'instrument est inactif, redémarrez l'instrument. Autrement, cliquez sur **Home** (Accueil).
- 2 Configurez une nouvelle analyse.
- 3 Ne déplacez pas la Flow Cell.
- 4 Ouvrez et fermez la porte du réfrigérant pour réactifs et le tiroir de tampon pour demander au NVCS de lire de nouveau les données RFID de la cartouche de réactifs. Les cartouches, le tube de librairies et la Flow Cell peuvent rester dans l'instrument pendant un maximum de quatre heures après l'échec de l'analyse.
- 5 Videz les flacons de réactifs usagés, si nécessaire, et remettez-les dans l'instrument.
- 6 Passez à la configuration de l'analyse.

Configuration ultérieure d'une nouvelle analyse

- 1 Lorsque l'analyse échoue, cliquez sur **Home** (Accueil).

- 2 Configurez une nouvelle analyse ou un lavage de maintenance pour éjecter les consommables de l'instrument.
- 3 Lorsque l'appareil vous le demande, retirez et stockez les consommables suivants :
 - ▶ Mettez le bouchon sur le tube de bibliothèques et stockez-le à une température se situant entre -25 °C et -15 °C pendant un maximum de trois semaines.
 - ▶ Remettez la cartouche SBS et la cartouche d'amplification dans leur lieu de stockage, entre -25 °C et -15 °C.
 - ▶ Remettez la cartouche de tampon dans son lieu de stockage à température ambiante, à l'abri de la lumière.Si les cartouches ne sont pas percées, elles peuvent être utilisées de nouveau dans une nouvelle analyse.
- 4 Cliquez sur **End** (Arrêter) pour annuler l'analyse ou le lavage de maintenance, puis cliquez sur **Yes** (Oui) pour confirmer la commande.
Vous pouvez laisser le lavage de maintenance terminer au lieu de l'annuler.

Arrêt d'une analyse

L'arrêt d'une analyse sur le système NovaSeq 6000 est une action **définitive**. Le logiciel ne peut pas reprendre l'analyse ni enregistrer les données de séquençage, et les consommables ne peuvent pas être réutilisés.

- 1 Cliquez sur **End** (Arrêter), puis cliquez sur **Yes** (Oui) pour confirmer la commande.
Si l'analyse est arrêtée après la lecture 1, le logiciel lance le lavage automatique après analyse.
- 2 Si le logiciel vous le demande, faites votre choix parmi les options de lavage suivantes :
 - ▶ **End Run Without Wash** (Arrêter l'analyse sans réaliser un lavage) : Arrêter l'analyse et lancer un lavage de maintenance.
 - ▶ **End Run and Wash** (Arrêter l'analyse et réaliser un lavage) : Arrêter l'analyse et effectuer un lavage automatique après analyse.
 - ▶ **Cancel** (Annuler) : Poursuivre l'analyse en cours.Si l'analyse est arrêtée après la génération d'amplifiats et avant la lecture 1, le logiciel affiche les options de lavage. Autrement, le logiciel lance le lavage automatique après analyse.
- 3 Si vous avez choisi l'option End Run Without Wash (Arrêter l'analyse sans réaliser un lavage), suivez les instructions du logiciel pour réaliser le lavage de maintenance.

Arrêt de l'instrument

L'arrêt sûr de l'instrument ferme tous les logiciels et systèmes et coupe aussi l'alimentation de l'instrument. La barre d'état passe du vert au blanc, indiquant que l'arrêt est en cours.

Normalement, l'arrêt de l'instrument n'est pas nécessaire.

Un arrêt complet et une mise sous tension de l'instrument doivent être effectués à chaque fois qu'un incident logiciel se produit.

Si l'arrêt ou le redémarrage est enclenché pendant l'exécution du NVCS, l'utilisateur doit confirmer cette action avant de poursuivre l'arrêt ou le redémarrage.

- 1 Dans le menu principal, sélectionnez **Shutdown Instrument** (Arrêter l'instrument).
- 2 Une fois l'écran éteint, mettez l'interrupteur d'alimentation situé à l'arrière de l'instrument en position OFF (Arrêt).

- 3 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 une incidence sur l'alignement optique et compromettre l'intégrité des données. Pour obtenir de l'assistance concernant le déplacement de l'instrument, communiquez avec votre représentant Illumina.

Annexe B Real-Time Analysis

Présentation de Real-Time Analysis	66
Flux de travail de Real-Time Analysis	68

Présentation de Real-Time Analysis

Le système de séquençage NovaSeq 6000 exploite RTA3, une version du logiciel Real-Time Analysis, à partir de son propre moteur de calcul (CE ou Compute Engine). RTA3 extrait les intensités des images reçues de la caméra, effectue les définitions des bases, associe un score de qualité à chaque définition des bases, effectue l'alignement à PhiX et élabore les rapports dans les fichiers InterOp à des fins de consultation dans le logiciel Sequencing Analysis Viewer.

Pour optimiser le délai de traitement, RTA3 conserve les données en mémoire. Si RTA3 est arrêté, le traitement ne reprend pas et les données de l'analyse en cours de traitement dans la mémoire sont perdues.

Entrées dans RTA3

RTA3 nécessite les images des plaques contenues dans la mémoire locale du système aux fins du traitement. RTA3 reçoit l'information sur l'analyse et des commandes du NVCS.

Sorties RTA3

Les images de chaque canal de couleur passent de la mémoire à RTA3 sous forme de plaques. À l'aide de ces images, RTA3 produit un ensemble de fichiers de filtrage et de fichiers de définition des bases dont la qualité est notée. Toutes les autres données de sortie sont des données complémentaires des principaux fichiers de sortie.

Type de fichiers	Description
Fichiers de définition des bases	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier de définition des bases concaténé (*.cbcl). Les plaques de la même ligne et de la même surface sont rassemblées dans un fichier *.cbcl pour chacune des lignes et des surfaces.
Fichiers de filtrage	Chaque plaque produit un fichier de filtrage (*.filter) qui précise si un amplifiat a franchi les filtres.
Fichiers d'emplacement des amplifiats	Les fichiers d'emplacement des amplifiats (*.locs) contiennent les coordonnées X et Y de chaque amplifiat dans une plaque. Un fichier d'emplacement des amplifiats est généré pour chaque analyse.

Les fichiers de sortie sont utilisés pour une analyse en aval dans BaseSpace Sequence Hub. Vous pouvez aussi utiliser le logiciel de conversion bcl2fastq pour la conversion FASTQ, ainsi que des solutions d'analyse tierces. Les fichiers de NovaSeq requièrent la version 2.19 du logiciel de conversion bcl2fastq2, ou une version plus récente. Pour obtenir la dernière version de bcl2fastq2, consultez la [page de téléchargement bcl2fastq](#) sur le site Web d'Illumina.

RTA3 donne des mesures en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockées dans des fichiers InterOp, qui sont des fichiers de sortie binaires contenant des mesures relatives aux plaques, aux cycles et au niveau de lecture. La consultation des mesures en temps réel au moyen du logiciel Sequencing Analysis Viewer requiert des fichiers InterOp. Pour obtenir la dernière version du logiciel Sequencing Analysis Viewer, veuillez consulter la [page de téléchargement de Sequencing Analysis Viewer](#) du site Web d'Illumina.

Gestion des erreurs

RTA3 crée des fichiers journaux et les enregistre dans le dossier Logs (journaux). Les erreurs sont enregistrées dans un format de fichier texte (*.log).

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

- ▶ info_00000.log résume les activités d'analyse importantes.
- ▶ error_00000.log répertorie les erreurs survenues au cours d'une analyse.
- ▶ warning_00000.log répertorie les avertissements reçus au cours d'une analyse.

Plaques de la Flow Cell

Les plaques sont de petites zones d'imagerie sur la Flow Cell. La caméra prend une image de chaque témoin, que le logiciel divise en plaques aux fins du traitement par RTA3. Le nombre total de plaques dépend du nombre de lignes, de témoins et de surfaces qui sont imagés sur la Flow Cell.

- ▶ Les Flow Cell SP possèdent un total de 312 plaques.
- ▶ Les Flow Cell S1 possèdent un total de 624 plaques.
- ▶ Les Flow Cell S2 possèdent un total de 1 408 plaques.
- ▶ Les Flow Cell S4 possèdent un total de 3 744 plaques.

Tableau 14 Plaques de la Flow Cell

Composant de la Flow Cell	SP	S1	S2	S4	Description
Lignes	2	2	2	4	Une ligne est un canal physique possédant des ports d'entrée et de sortie.
Surfaces	1	2	2	2	Les Flow Cell S1, S2 et S4 sont imagées sur deux surfaces : les surfaces inférieure et supérieure. La surface supérieure de la plaque est imagée en premier. La Flow Cell SP est imagée sur la surface inférieure uniquement.
Témoins par ligne	2	2	4	6	Un témoin est une colonne d'une ligne de la Flow Cell que la caméra saisie dans une seule image.
Plaques par témoin	78	78	88	78	Une plaque est une partie d'un témoin qui montre une zone imagée sur la Flow Cell.
Nombre total de plaques générées	312	624	1 408	3 744	Lignes × surfaces × témoins × plaques par témoins = nombre total de plaques.

Numérotation des plaques

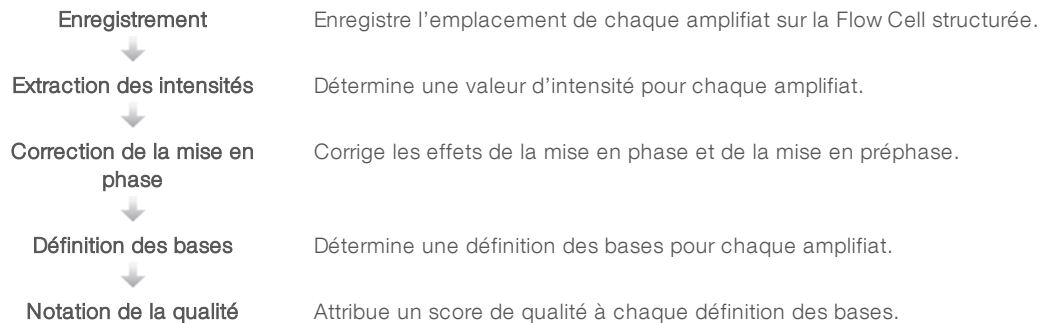
Le numéro de la plaque est composé de cinq chiffres qui représentent la position sur la Flow Cell. Par exemple, le numéro de plaque 1_1205 indique la ligne 1, la surface du haut, le témoin 2 et la plaque 5.

- ▶ Le premier chiffre représente la ligne :
 - ▶ 1 ou 2 pour une Flow Cell SP, S1 ou S2.
 - ▶ 1, 2, 3 ou 4 pour une Flow Cell S4.
- ▶ Le deuxième chiffre représente la surface : 1 pour le haut et 2 pour le bas.

Pour la Flow Cell SP, le deuxième chiffre est toujours « 2 » parce que seulement cette Flow Cell a une surface inférieure.
- ▶ Le troisième chiffre représente le témoin :
 - ▶ 1 ou 2 pour une Flow Cell SP ou S1.
 - ▶ 1, 2, 3 ou 4 pour une Flow Cell S2.
 - ▶ 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 pour une Flow Cell S4.

- ▶ Les deux derniers chiffres représentent le numéro de plaque. La numérotation des plaques commence à 01 à l'extrémité de sortie de la Flow Cell et va jusqu'à 88 ou 78 à l'extrémité d'entrée.
 - ▶ 01 à 78 pour une Flow Cell SP, S1 ou S4.
 - ▶ 01 à 88 pour une Flow Cell S2.

Flux de travail de Real-Time Analysis



Enregistrement

La fonction d'enregistrement aligne une image au réseau hexagonal de nanopuits sur la Flow Cell structurée. En raison de l'arrangement ordonné des nanopuits, les coordonnées X et Y sont prédéterminées pour chaque amplifiat dans une plaque. Les positions des amplifiats de chaque analyse s'inscrivent dans un même fichier d'emplacement des amplifiats (s.locs).

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 pour trouver les images n'ayant pas été enregistrées.

Extraction des intensités

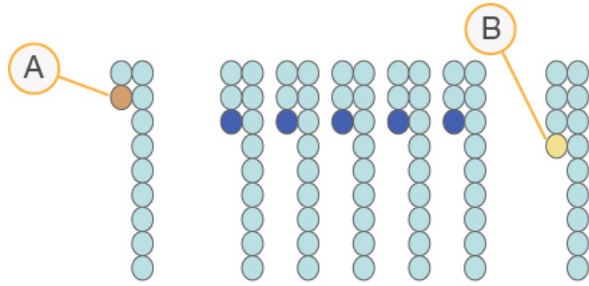
Après l'enregistrement, la fonction d'extraction des intensités calcule une valeur d'intensité pour chaque nanopuits dans une image donnée. Si l'enregistrement échoue, l'intensité de la plaque ne peut pas être extraite.

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 31 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

RTA3 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. Le système de séquençage NovaSeq 6000 utilise un séquençage à deux canaux, qui ne nécessite que deux images pour encoder les données de quatre bases d’ADN, une provenant du canal rouge et une autre du canal vert.

L’absence de définition est indiquée par la lettre N. Il n’y a aucune définition lorsqu’un amplifiat ne passe pas le filtre, que l’enregistrement échoue ou que l’amplifiat se trouve hors de l’image.

Les intensités de chaque amplifiat sont extraites de l’image rouge et de l’image verte, puis sont comparées l’une à l’autre, ce qui donne quatre populations distinctes. Chaque population correspond à une base. Le processus de définition des bases détermine à quelle population appartient chaque amplifiat.

Figure 32 Visualisation de l’intensité des amplifiats

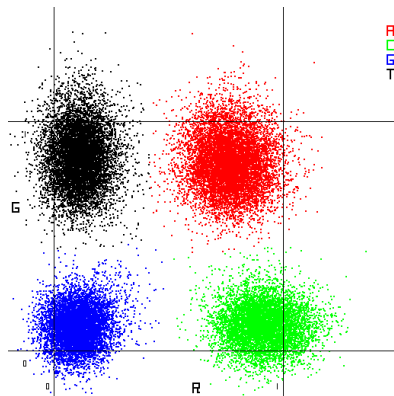


Tableau 15 Définition des bases dans le séquençage à deux canaux

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, RTA3 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, RTA3 utilise un système basé sur une population pour déterminer la pureté (mesure de la pureté de l'intensité) d'une définition des bases. Les amplifiats franchissent le filtre (PF) lorsqu'une définition des bases ou moins, au cours des 25 premiers cycles, a une pureté inférieure à un seuil déterminé. L'alignement PhiX est réalisé au cycle 26 dans un sous-ensemble de plaques pour les amplifiats ayant passé le filtre. Les amplifiats qui ne passent pas le filtre ne servent pas à la définition des bases et ne sont pas alignés.

Scores de qualité

Un score de qualité, ou Q-score, est une prévision de la probabilité d'une définition des bases erronée. Un score de qualité plus élevé suppose qu'une définition des bases est de plus haute qualité et plus susceptible d'être correcte. Une fois le score de qualité établi, les résultats sont enregistrés dans des fichiers de définition des bases (*.cbc1).

Le score de qualité communique de manière concise les probabilités de petites erreurs. Les scores de qualités sont représentés sous la forme Q(X), où X est le score. Le tableau suivant montre la relation entre le score de qualité et la probabilité d'une erreur.

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

Scores de qualité et rapports

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.



REMARQUE

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

RTA3 associe l'un des trois scores de qualité à chaque définition des bases, selon la fiabilité de la définition des bases. Ce modèle de rapport sur les scores de qualité réduit les besoins d'espace de stockage et de bande passante sans nuire à la précision ni à la performance.

Pour plus de renseignements sur les scores de qualité, consultez le document sur *les scores de qualité et le logiciel RTA3 du système NovaSeq^{MC} 6000 (Pub. n° 770-2017-010)*.

Annexe C Dossiers et fichiers de sortie

Structure des dossiers de sortie de séquençage	71
Fichiers de sortie de séquençage	72

Structure des dossiers de sortie de séquençage

Le NVCS génère automatiquement le nom du dossier de sortie.

 **Config** : paramètres de configuration de l'analyse.

 **Logs** : fichiers journaux décrivant les étapes de fonctionnement, les étapes des analyses sur l'instrument et les événements de RTA3.

 **Data** (Données)

 **Intensities (Intensités)**

 **BaseCalls (Appels de bases)**

 **LOO[X]** : fichiers de définition des bases (*.cbcl), rassemblés dans un fichier par ligne, par surface et par cycle.

 s.locs : fichier d'emplacement des amplifiats de l'analyse.

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

 **Recipe** (Formule) : fichier de formule propre à l'analyse.

 **Thumbnail Images** : images miniatures générées après chaque tranche de 10 plaques.

 **LIMS** : fichier de configuration (*.json), s'il y a lieu.

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SampleSheet.csv : feuille d'échantillons ou autre fichier joint, s'il y a lieu.

 SequenceComplete.txt

Fichiers de sortie de séquençage

Type de fichiers	Description, emplacement et nom des fichiers
Fichiers de définition des bases	Chaque amplifiat analysé est compris dans un fichier de définition des bases; ces fichiers sont rassemblés dans un fichier pour chaque cycle, chaque ligne et chaque surface. Le fichier rassemblé contient la définition des bases ainsi que le score de qualité codé associé à chaque amplifiat. Les fichiers de définition des bases sont utilisés par BaseSpace Sequence Hub ou bcl2fastq2. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[ligne]_[surface].cbcl , par exemple L001_1.cbcl
Fichiers d'emplacement des ampliats	Pour chaque Flow Cell, un fichier d'emplacement des ampliats binaire comprend les coordonnées XY des ampliats sur la plaque. Une disposition hexagonale qui concorde avec l'emplacement des nanopuits de la Flow Cell prédéfinit les coordonnées. Data\Intensities s_[ligne].locs
Fichiers de filtrage	Le fichier de filtrage spécifie si un amplifiat a franchi les filtres. Les fichiers de filtrage sont générés au cycle 26 et portent sur 25 cycles de données. Un fichier de filtrage est généré pour chaque plaque. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[ligne]_[plaque].filter
Fichiers 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. Dossier InterOp
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 d'index 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. [Dossier racine], RunInfo.xml
Fichiers des miniatures	Lorsque ces réglages sont activés, une image miniature est créée après chaque tranche de 10 plaques, pour chaque canal de couleur (rouge et vert). Thumbnail_Images\L001\C[X.1] : les fichiers sont stockés dans un sous-dossier pour chaque cycle. s_[ligne]_[plaque]_[canal].jpg : l'image miniature comprend le numéro de la plaque.

Annexe D Sécurité Windows

Configuration de sécurité	73
Exigences relatives aux mots de passe	73
Pare-feu Windows	73
Trousse à outils EMET	73
Stratégies de restriction logicielle	74

Configuration de sécurité

Le système d'exploitation Windows de l'ordinateur de commande de l'instrument comprend des configurations de sécurité qui empêchent l'exécution de logiciels non désirables. La présente annexe décrit ces configurations et la façon de les personnaliser selon vos besoins.

Sous des conditions normales, il n'est pas nécessaire de changer les configurations de sécurité par défaut. Si vous devez y apporter des changements, veillez à ce que cela soit fait par un administrateur expérimenté, après une planification mûrement réfléchie.



ATTENTION

Puisque ces configurations ont une incidence sur le rendement du système et peuvent compromettre la sécurité, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina si vous n'êtes pas certain de la nécessité de modifier un paramètre ou de l'incidence possible des changements.

Exigences relatives aux mots de passe

Le tableau ci-dessous résume les politiques applicables aux mots de passe pour l'ordinateur de commande. Le logiciel demande le changement du mot de passe à la première ouverture de session.

Tableau 16 Politiques applicables par défaut aux mots de passe

Politique	Paramètre de sécurité
Historique des mots de passe en mémoire	Cinq mots de passe en mémoire
Période de validité maximale du mot de passe	180 jours
Période de validité minimale du mot de passe	0 jour
Longueur minimale du mot de passe	Dix caractères
Exigences de complexité du mot de passe	Désactivé
Stockage des mots de passe avec chiffrement réversible	Désactivé

Pare-feu Windows

Le pare-feu Windows protège l'ordinateur de commande en filtrant le trafic entrant pour supprimer les menaces potentielles. Par défaut, le pare-feu est activé de façon à bloquer toutes les connexions entrantes. Laissez le pare-feu activé et autorisez les connexions sortantes. Pour plus de renseignements sur les connexions sortantes, consultez le *Guide de préparation du site de la série NovaSeq (document n° 1000000019360)*.

Trousse à outils EMET

La trousse à outils EMET (Enhanced Mitigation Experience Toolkit) empêche l'exploitation des vulnérabilités du logiciel et comporte la fonction des certificats de confiance. Cette fonction détecte et bloque les attaques qui utilisent des certificats malveillants.

Stratégies de restriction logicielle

Les stratégies de restriction logicielle (SRP) de Windows ont recours à des règles pour n'autoriser l'exécution que de certains logiciels. Dans le cas du NovaSeq 6000, les règles des SRP peuvent être basées sur les certificats, le nom et l'extension des fichiers, et les répertoires.

La stratégie de restriction logicielle est activée par défaut pour prévenir l'exécution de logiciels indésirables sur l'ordinateur de commande. Un représentant des TI ou un administrateur du système peut ajouter ou supprimer des règles pour personnaliser le niveau de sécurité. Si le système est ajouté à un domaine, il est possible que les objets de stratégie de groupe (GPO) modifient automatiquement les règles et que les SRP soient désactivées.



ATTENTION

La désactivation de la stratégie de restriction logicielle bloque la protection que procure cette stratégie. Les règles modifiées ont préséance sur les règles par défaut.

Règles permises par la stratégie de restriction logicielle

Sur le système de séquençage NovaSeq 6000, la stratégie de restriction logicielle (SRP) autorise par défaut les règles suivantes.

Certificats

DigitalSystems
Illumina, Inc.
NovaSeq

Fichiers exécutables

Portmon.exe
Procmon.exe
Procmon64.exe
Tcpview.exe

Extensions de fichiers

*.bin
*.cbcl
*.cfg
*.config
*.csv
*.dat
*.focus
*.imf1
*.ims
*.jpg
*.json
*.lnk
*.locs
*.log
*.manifest
*.sdf
*.tif
*.txt
*.xml

Répertoires

%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%
%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows NT\CurrentVersion\SystemRoot%

Répertoires

C:\CrashDumps\
C:\Illumina\
C:\Illumina Maintenance Logs\
C:\LocalSymbols\
C:\Program Files (x86)\Chromium\Application\
C:\Program Files (x86)\EMET 5.5\
C:\Program Files (x86)\Illumina\
C:\Program Files (x86)\Internet Explorer\
C:\Program Files (x86)\LibreOffice 5\
C:\Program Files\Illumina\
C:\ProgramData\Illumina\
C:\ProgramData\Package Cache\
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix\
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs\
C:\Users\sbsuser\Desktop\FSE turn over to customer.bat
D:\Illumina\

Ajouter ou supprimer des règles de la stratégie de restriction logicielle

Ajoutez ou supprimez des règles concernant la stratégie de restriction logicielle pour personnaliser la sécurité du système. La modification des règles nécessite la désactivation temporairement de la stratégie de restriction logicielle.



ATTENTION

La désactivation de la stratégie de restriction logicielle a préséance sur les règles par défaut.

- 1 Connectez-vous au système d'exploitation.
- 2 Désactivez la stratégie de restriction logicielle :
 - a Accédez au répertoire C:\Illumina\Security.
 - b Faites un double-clic sur **Disable.reg**.
 - c Sélectionnez **Yes** (Oui) pour confirmer les modifications.

Lorsque vous utilisez l'interface tactile, le fait d'appuyer sur l'écran et de maintenir votre doigt en place pendant environ deux secondes équivaut à un clic droit.

- 3 Sélectionnez **Start** (Démarrer), puis **Run** (Exécuter).
- 4 Saisissez **secpol.msc** dans le champ Open (Ouvrir).
- 5 Dans la boîte de dialogue de la stratégie de sécurité locale, développez la ligne **Software Restriction Policies** (Stratégie de restriction logicielle), puis sélectionnez **Additional Rules** (Règles supplémentaires).
- 6 Pour ajouter une règle :
 - a Dans le menu Action, sélectionnez **New Path Rule** (Nouvelle règle de chemin d'accès).
 - b Dans le champ Path (Chemin), saisissez le certificat, le nom du fichier, l'extension du fichier, ou le répertoire à autoriser.
 - c Dans la liste Security level (Niveau de sécurité), sélectionnez **Unrestricted** (Sans restriction).
 - d **[Facultatif]** Dans le champ Description, notez la raison de la création de la règle.
 - e Cliquez sur **OK** pour ajouter une règle.

- 7 Pour supprimer une règle :
 - a Sélectionnez la règle à supprimer, puis sélectionnez **Delete** (Supprimer).
 - b Sélectionnez **Yes** (Oui) pour confirmer la suppression.
- 8 Fermez la boîte de dialogue Local Security Policy (Stratégie de sécurité locale).
- 9 Rétablissez *immédiatement* la stratégie de restriction logicielle :
 - a Accédez au répertoire C:\Illumina\Security.
 - b Faites un double-clic sur **Enable.reg**.
- 10 Si vous avez modifié les règles de la stratégie de restriction logicielle pour la première fois, déconnectez-vous, puis reconnectez-vous pour que les règles soient activées.

Index

%

%PF 70

A

activités après analyse 54
aide 61
 documentation 2
aide, technique 81
algorithme Phred 70
alignement PhiX 66
alimentation 19
amplifiats passant le filtre 51, 70
amplification 2
analyse 25
analyses
 échelonnage 52
 indicateurs 51
 interruption 52
 mesures 66
 reprise 64
 suppression 9
 surveillance 25, 48
analyses à lecture unique 48
analyses de séquençage
 suppression 53
analyses, durée 51
applications 1
arrêt 64
assistance clientèle 81
assistance technique 81
aucune définition 68-69
avertissements 8

B

bains d'eau 29, 36
balayage 2
barre d'état 5, 64
barre lumineuse 5, 64
BaseSpace Enterprise 25
BaseSpace Sequence Hub 1, 25
 assistance 2
 connexion et déconnexion 48
bcl2fastq2 25, 66
bulles 41
bulletins d'assistance 61

C

caméras 1, 5, 67
canal rouge 69
canal vert 69
capteurs 5, 58, 61
caractéristiques du congélateur 28
caractéristiques du réfrigérateur 28
cartouche d'amplification 13
cartouche de tampon 47, 58
cartouches
 empilement 15
cartouches de lavage 55-56, 58
cartouches de réactif
 étiquetage 11
cartouches de réactifs
 déchargement 46
 étiquetage 14
 préparation 29, 36
 stockage 12, 63
CE 9, 53, 66
certificats de confiance 73
cible d'alignement optique 5, 44
collecteurs NovaSeq Xp
 Flow Cell
 rayures 39
 stockage 16
compartiment de tampon 47
compartiment des liquides 14
compartiments 5
composants de la trousse 27
compte administrateur 75
Compute Engine 9, 53, 66
concentration de chargement 2
conditions de stockage 18
configuration de LIMS 21
configurations des trousse 11
connexions entrantes 73
connexions sortantes 73
connectivité du système 61
conservation des cartouches de réactifs 63
conservation des tubes de bibliothèques 63
consommables
 déchargement 53-54, 58
 eau de laboratoire 28
 emballage 18
 lavages de maintenance 55
consommables de séquençage 26
contamination croisée 7, 54

conversion FASTQ 25, 66
couleurs du tracé 51
cycles de séquençage 51

D

dates de péremption, fabricant 18
débordement 30, 37
déchargement des cartouches de réactifs 46
déménagement de l'instrument 64
déplacement de l'instrument 64
détection 5
directives à propos de l'eau de laboratoire 28
disque dur 9, 20-21, 53
dock 39, 44
 composants 17
dock NovaSeq Xp 39, 44
documentation 2, 81
domaine, BaseSpace Sequence Hub 25
données de performance de l'instrument 20-21
données sur l'état de l'instrument 20-21
dossier de configuration de l'analyse 20-22
dossier de sortie 20-21
dossiers de sortie 20
droits, compte administrateur 75
durées
 analyse de séquençage 51
 génération d'amplifiats 51
 lavage après analyse automatique 54
 lavage de maintenance 55

E

échec de l'alignement 61
échecs d'enregistrement 68
écran de séquençage 51
élimination des réactifs usagés 7
élimination du formamide 15, 53
EMET 73
empilement des cartouches 15
emplacement des amplifiats 66, 72
emplacements d'hébergement 25
erreurs 8, 61
 probabilité 70
espace disque 9, 61
étapes de séquençage 2
étiquettes, composants de trousse 11

F

feuilles d'échantillons 25, 48
fiches signalétiques 7
fichiers
 propre à l'analyse 61
fichiers CBCL 2, 52, 70
fichiers de définition des bases 66, 72
fichiers de filtrage 66, 72
fichiers InterOp 8, 61, 66, 72
fichiers journaux 61, 66
filtre de pureté 70
Flow Cell
 étiquetage 11
 nettoyage 39, 44
 rayures 44
 spécifications 11
 stockage 12, 39
flow cell à deux lignes 13
flow cell à quatre lignes 13
Flow Cell de lavage 55
Flow Cell structurée 1
flow cell structurées 13
flux de travail 23
flux de travail NovaSeq Xp 23
flux de travail standard 23
format de feuille d'échantillons 25
formation en ligne 2
fournisseurs 26
fuites 62

G

gants, changement 30, 37, 58
génération d'amplifiats, durée 51
génération du modèle 68
gestion du processus 52
GPO 74

H

hypochlorite de sodium 54, 56

I

icônes 9, 18
icônes clignotantes 8
imagerie 2, 13, 66-67
images miniatures 72
initialisation 19

intensité des amplifiats 68
interruption des analyses 52

J

joints 13, 39, 44
joints, débordant 41
journaux des erreurs 66

L

lavages
durée 54-55
fréquence 55
lavages de maintenance
consommables 26, 55
solutions de lavage 56
lecture 1 64
lectures d'index 48
lectures, nombre de 11
librairies
stockage 63
lignes 67
lignes individuelles adressables 3, 17
LIMS 1, 20
LIMS de tierces parties 22
liste blanche, stratégie de restriction logicielle 74
livres blancs 70
logiciel de commande 8

M

maintenance préventive 55
maintenance, préventive 55
mélange principal ExAmp 2, 41
méthodes d'analyse 2
mise en marche 19
mise en phase et en préphase 68
modes 11
modes d'analyse 20
moteur de calcul 9, 53, 66

N

nanopuits 68
NaOCl 54, 56
nom du dossier de sortie 71
nombre de cycles 48, 51
NovaSeq Xp, défini 3
nucléotides 69

numéro du lot 18
numéros de catalogue 11
numéros de référence 18
consommables fournis par l'utilisateur 26
numérotation des lignes 17, 41
numérotation des plaques 67
numérotation des puits 41
numérotation des surfaces 67
numérotation, puits 17

O

objets de stratégie de groupe 74
optique 5
ordinateur de commande 73

P

pages d'assistance 61
paramètres de l'analyse 20
paramètres de l'analyse, LIMS 22
paramètres de sécurité 73
paramètres par défaut 20, 25
pare-feu 73
passant le filtre (PF) 70
PhiX
numéro de référence 26
pincés, Flow Cell 5
pipettes 28
plaques 2, 13, 66
plateau d'égouttage 62
platine de Flow Cell 5, 44
politiques de mots de passe 73
portes-bouchons 30, 37
portoir de Flow Cell 44
ports USB 5
position n° 30 53, 58
positions des dispositifs d'aspiration 54, 58
préparation du site 2, 73
primers personnalisés 2, 15, 48
problèmes fluidiques 62
produits chimiques dangereux 7, 18
puits d'entrée 17
puits du collecteur NovaSeq Xp,
numérotation 17

Q

qualité des données 70

R

- rayures, Flow Cell 39, 44
- réactif JPX, stockage 16
- Réactifs DPX, stockage 16
- réactifs DPX/JPX, compatibilité 16
- réactifs ExAmp 13
 - décongélation 38
 - méthodes de mélange 3
 - stockage 16
- Réactifs ExAmp 40
- réactifs usagés 7, 30, 37, 46
- Real-Time Analysis 1, 8
- redémarrage après un arrêt 64
- réfrigérant 7
- réfrigérant pour réactifs 7
- réhybridation 22
- rendement 51
- reprise des analyses 64
- RFID 12, 61
- RunInfo.xml 61, 72

S

- scores de qualité 51, 70
- sécurité 74
 - personnalisation 75
- sécurité, paramètres 73
- séquençage à deux canaux 2, 69
- Sequencing Analysis Viewer 66, 68
- Service de surveillance Illumina Proactive 21
- site Web, soutien 61
- solution de lavage 14
- spécifications 11
- standard, défini 3
- stockage des données 48
- stockage des trousse de réactifs 12, 16
- stratégie de restriction logicielle, règles par défaut 74
- suite logicielle 8
- suivi des échantillons 15
- supports de décongélation 29, 36
- supports en broche 29, 36
- système d'exploitation 19, 73
- système fluidique 7, 56

T

- tableaux de qualité 70
- témoins 2, 13, 67

- transfert de données 53
- transfert des données 9
- trop-plein 62
- tubes de bibliothèques 15, 63
 - stockage 12, 63
 - stockage de la cartouche intégrée 63
- Tween 20 56

U

- Universal Copy Service 8-9, 52

V

- valeurs d'intensité 68
- vérifications automatiques 61
- vérifications avant analyse 61
- volume de chargement 2

W

- Windows
 - sécurité 74

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

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

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



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.**

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina®