

# HiSeq X

## Systemhandbuch



Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichen Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN, WAS ZU EINEM ERLÖSCHEN DER PRODUKTGARANTIE FÜHRT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2018 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Versionshistorie

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Material-Nr. 20023569 Dokument-Nr. 15050091 v07	März 2018	Informationen über den Überwachungsdienst Illumina Proactive wurden in den Abschnitt „Anzeigen und Senden von Gerätedaten“ aufgenommen.
Material-Nr. 20023569 Dokument-Nr. 15050091 v06	Oktober 2017	Softwarebeschreibungen für HiSeq Control Software HD v3.5, die doppelte Indizierung ermöglicht, wurden aktualisiert. Reagenzieninformationen wurden aktualisiert: HP12 wird durch HP14 und PLM2 wird durch PLM2 v2 ersetzt.
Dokument-Nr. 15050091 v05	Oktober 2017	Version wurde nicht verwendet.
Material-Nr. 20015568 Dokument-Nr. 15050091 v04	Januar 2017	Das Wartungswaschlaufverfahren wurde aktualisiert. Der Name der Steuerungssoftware wurde in HiSeq Control Software HD v3.4 geändert. Die Illumina-Katalognummer für das HiSeq X HD cBot Multi-Primer-Rehybridisierungs-Kit wurde in GD-305-2001 geändert. Sigma-Aldrich Katalog-Nr. SRE0076 für SeqClin-Waschlösung wurde entfernt.
Material-Nr. 20013048 Dokument-Nr. 15050091 v03	September 2016	Custom Protocol Selector wurde zu „Weitere Ressourcen“ hinzugefügt. Sigma-Aldrich Katalog-Nr. SRE0076 für SeqClin-Waschlösung wurde hinzugefügt. Anmerkung zur ungefähren Häufigkeit des Auswechselns von Waschflaschen und Röhrchen wurde hinzugefügt. Anweisungen zum Starten des Geräts wurden aktualisiert: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vor, nicht nach der Anmeldung am Betriebssystem, soll gewartet werden, bis das System geladen ist.</li> <li>• Die Zeitdauer für die Konfiguration der Geräte und die Initialisierung von „DoNotEject“ wurde von einer Minute auf drei Minuten erhöht.</li> <li>• Anmerkung, dass Festplatten für den ordnungsgemäßen Betrieb leer sein müssen, wurde hinzugefügt.</li> </ul> Die Anweisungen für die Schnellformatierung wurden aktualisiert, um das Scratch-Laufwerk (S: \) zu berücksichtigen. Die Anweisungen für den Zugriff auf die Protokolldatei wurden korrigiert.

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Material-Nr. 20007156 Dokument-Nr. 15050091 v02	Mai 2016	<p>Software-Beschreibungen zur HiSeq Control Software v3.3.76 wurden aktualisiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anweisungen für BaseSpace Enterprise-Abonnenten zum Konfigurieren einer Domäne wurden hinzugefügt.</li> <li>• Informationen zu Sensoranzeigen, die den Datenübertragungsstatus des BaseSpace Sequence Hub anzeigen, wurden hinzugefügt.</li> <li>• Die Anweisungen für gestaffelte Läufe wurden aktualisiert. Es wurde die Verwendung der Schaltfläche „Pause“ (Anhalten) aufgenommen.</li> </ul> <p>„BaseSpace“ wurde in „BaseSpace Sequence Hub“ umbenannt. Das <i>cBot 2 Systemhandbuch (Dokument-Nr. 15065681)</i> wurde als Referenz für das Clustering hinzugefügt. Der Standard-Benutzername und das Standard-Kennwort für die Anmeldung beim Betriebssystem wurden entfernt. Illumina empfiehlt die Verwendung standortspezifischer Anmeldeinformationen. Die Katalog-Nr. für dieses Handbuch wurde entfernt.</p>
Material-Nr. 20002066 Dokument-Nr. 15050091 v01	Dezember 2015	<p>Die Ordnerstruktur der Ausgabedateien und Informationen zum Laufordner wurden hinzugefügt. Die Empfehlung für eine jährliche präventive Wartung wurde hinzugefügt. Die beim Wartungswaschlauf erwarteten Volumina wurden korrigiert.</p>

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Teile-Nr. 15050091 Rev. E	Juli 2015	<p>Software-Beschreibungen zur HiSeq X Control Software v3.3 wurden aktualisiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Das Wartungswaschlaufprotokoll wurde aktualisiert. Ein Tween 20- und ein ProClin 300-Waschlauf ersetzen den drei Schritte umfassenden NaOH-Waschlauf.</li> <li>• Der Fließzellentyp HiSeq X HD v2 wurde im Bildschirm „Flow Cell Setup“ (Konfiguration der Fließzelle) durch den Fließzellentyp HiSeq X ersetzt.</li> <li>• Informationen zur Sensoranzeige, die den Status der von der RunCopyService-Software durchgeführten Datenübertragung anzeigt, wurden hinzugefügt.</li> </ul> <p>Anweisungen für das Vorbereiten von für die Indizierung und die Paired-End-Resynthese verwendeten Reagenzien und Sequenzierungs-Primern wurden hinzugefügt.</p> <p>Der Abschnitt „Workflow-Unterschiede“ wurde für Illumina SeqLab hinzugefügt. Dieser beschreibt, wo die Anweisungen für das Vorbereiten von Reagenzien und das Sequenzieren zu finden sind, wenn Illumina SeqLab verwendet wird.</p> <p>Katalognummern der HiSeq X v2.5-Kits wurden hinzugefügt.</p> <p>Außerdem wurde die Katalognummer des Rehybridisierungs-Kits aktualisiert.</p> <p>Die Anweisungen für gestaffelte Läufe auf den Fließzellen A und B wurden aktualisiert.</p> <p>Die Beschreibungen der Systemeinstellungen wurden durch Anweisungen für das Anpassen der Systemeinstellungen ersetzt.</p> <p>Die Informationen über das Beheben von Fehlern befinden sich jetzt in Anhang A und Informationen über die Echtzeitanalyse-Software sind jetzt in Anhang B zu finden.</p> <p>Die Offset- und Phasierungsdateien wurden aus der Liste der Sequenzierungsausgabedaten entfernt. RTA2 generiert diese Dateien nicht mehr.</p> <p>Das <i>HiSeq X Five Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung</i> (Teile-Nr. 15067045) wurde aus „Weitere Ressourcen“ entfernt. Informationen zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung für HiSeq X Ten, HiSeq X Five und Illumina SeqLab stehen im <i>Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung für das HiSeq X-System</i> (Dokument-Nr. 15050093) zur Verfügung.</p>
Teile-Nr. 15050091 Rev. D	Januar 2015	<p>Die Anzahl der Base-Calls unter 0,6, die in den ersten 25 Zyklen zulässig sind, wurde von 2 auf 1 korrigiert.</p> <p>Die Liste der HiSeq X-Reagenzien-Kits wurde aktualisiert und enthält jetzt HiSeq X Ten- und HiSeq X Five-Reagenzien-Kits.</p> <p>Der Name des 20er-Pack-Kits wurde in 10er-Pack-Kit geändert. (Nur Namensänderung; Inhalt hat sich nicht geändert.)</p> <p>Das <i>HiSeq X Five Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung</i> (Teile-Nr. 15067045) wurde zu „Weitere Ressourcen“ hinzugefügt.</p>

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Teile-Nr. 15050091 Rev. C	Oktober 2014	<p>Software-Beschreibungen zur HiSeq X Control Software v3.1 wurden aktualisiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fließzellentyp HiSeq X HD v2 wurde zum Bildschirm „Flow Cell Setup“ (Konfiguration der Fließzelle) hinzugefügt.</li> <li>• Option, nach jedem Lauf einen Wartungswaschlauf oder einen Wasserwaschlauf durchzuführen, wurde hinzugefügt. Ein Wartungswaschlauf wird empfohlen, ist aber nicht mehr zwingend erforderlich. Die Dichtungen müssen nicht mehr nach jedem Wartungswaschlauf ausgetauscht werden. Eine Auswechslung ist vor der Durchführung des alle 10 Tage erforderlichen Wartungswaschlaufs notwendig.</li> <li>• Die Option, dass nur die SBS-Reagenzienpositionen gespült werden können, wurde hinzugefügt.</li> <li>• Indizierungs-Reagenzien-Kit-ID wurde aus dem Bildschirm „Reagents“ (Reagenzien) entfernt. Die Indizierungsreagenzien befinden sich zusammen mit den Paired-End-Reagenzien in den HiSeq X HD-Reagenzien-Kits.</li> <li>• Der Befehl „Sequence“ (Sequenzieren) im Begrüßungsbildschirm wurde aktualisiert.</li> </ul> <p>Es wurde darauf hingewiesen, dass die Fließzellen HiSeq X HD (v1) und HiSeq X HD v2 als Fließzelle A und Fließzelle B gleichzeitig sequenziert werden können.</p> <p>Es wurde darauf hingewiesen, dass auch dann ein Ausgabeordner angegeben werden muss, wenn BaseSpace zur Speicherung und Datenanalyse verwendet wird.</p> <p>Es wurde der Hinweis hinzugefügt, dass vor dem Entfernen der Verschlüsse und Laden der SBS-Reagenzien jede Flasche mehrmals gedreht werden sollte.</p> <p>Die VWR-Katalog-Nr. für Alkoholtücher wurde in 95041-714 geändert.</p> <p>Die URL für Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) wurde in <a href="http://support.illumina.com/sds.html">support.illumina.com/sds.html</a> geändert.</p>
Teile-Nr. 15050091 Rev. B	Mai 2014	<p>Folgende Informationen wurden aktualisiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Es wurde eine Beschreibung von Clustern nach Filterung basierend auf den Merkmalen einer strukturierten Fließzelle hinzugefügt.</li> <li>• Es wurde eine Beschreibung der Q-Score-Gruppierung hinzugefügt.</li> <li>• Die Anforderungen an den verfügbaren Speicherplatz wurden aktualisiert.</li> <li>• Es wurde darauf hingewiesen, dass die Wartezeit zur Geräteinitialisierung mindestens eine Minute beträgt.</li> <li>• Es wurde eine Best Practice zur Durchführung einer Schnellformatierung von Laufwerk O:\ nach jedem Lauf hinzugefügt.</li> <li>• Die Teile-Nr. des <i>HiSeq X HD Reagenzien-Kit Referenzhandbuchs</i> im Workflow-Diagramm wurde in 15050092 korrigiert.</li> </ul>
Teile-Nr. 15050091 Rev. A	März 2014	Erste Version.

# Inhaltsverzeichnis

Versionshistorie .....	iii
<b>Kapitel 1 Überblick .....</b>	<b>1</b>
Einleitung .....	1
Weitere Ressourcen .....	2
Gerätekomponenten .....	2
Überblick über die Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien .....	7
<b>Kapitel 2 Erste Schritte .....</b>	<b>8</b>
Starten des HiSeq X-Systems .....	8
Anpassen der Systemeinstellungen .....	9
Anzeigen und Senden von Gerätedaten .....	10
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien .....	11
<b>Kapitel 3 Vorbereiten von Reagenzien .....</b>	<b>12</b>
Einleitung .....	12
Vorbereiten von SBS-Reagenzien .....	12
Vorbereiten von Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien .....	13
<b>Kapitel 4 Sequenzierung .....</b>	<b>14</b>
Einleitung .....	14
Sequenzierungsworkflow .....	14
Eingeben von Laufparametern .....	15
Laden und Vorfüllen von Reagenzien .....	17
Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle .....	22
Überwachen des Laufs .....	24
Entladen von Reagenzien .....	25
Durchführen eines Wasserwaschlaufs .....	25
Schnellformatierung der Ausgabe- und Scratch-Laufwerke .....	27
<b>Kapitel 5 Wartung .....</b>	<b>28</b>
Einleitung .....	28
Durchführen eines Wartungswaschlaufs .....	28
Versetzen des Geräts in den Leerlauf .....	33
Ausschalten des Geräts .....	34
<b>Anhang A Fehlerbehebung .....</b>	<b>35</b>
Protokolldatei .....	35
Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration .....	35
Durchführen einer Fluidikprüfung .....	36
Unterbrechen bzw. Beenden eines Laufs auf dem HiSeq X-System .....	36
Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B .....	38

Mögliche Primer-Rehybridisierung für Read 1 .....	38
<b>Anhang B Echtzeitanalyse .....</b>	<b>39</b>
Überblick über die Echtzeitanalyse .....	39
Echtzeitanalyse-Workflow .....	40
<b>Anhang C Ausgabedateien und -ordner .....</b>	<b>45</b>
Sequenzierungsausgabedateien .....	45
Ordnerstruktur der Ausgabedaten .....	46
Name und Pfad des Laufordners .....	46
Plattennummerierung .....	47
<b>Index .....</b>	<b>48</b>
<b>Technische Unterstützung .....</b>	<b>52</b>



# Kapitel 1 Überblick

Einleitung .....	1
Weitere Ressourcen .....	2
Gerätekomponenten .....	2
Überblick über die Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien .....	7

## Einleitung

Das HiSeq X<sup>®</sup>-System kombiniert innovative Technik mit bewährter SBS-Technologie und der Fähigkeit, die Sequenzierung von humanen Gesamtgenomen im Bevölkerungsmaßstab zu ermöglichen.

## Merkmale

- ▶ **Bildgebung von zwei Oberflächen:** Das HiSeq X verwendet ein Epifluoreszenzsystem mit zwei Kameras und vier Sensoren, das mit einer modernen Scan-Technologie zur Darstellung von zwei Oberflächen ausgestattet ist.
- ▶ **Strukturierte Fließzelle:** Eine strukturierte Fließzelle ermöglicht das Generieren von Sequenzierungs-Clustern in einer geordneten Anordnung. Dies sorgt für mehr Ausgabe-Reads und generierte Daten.
- ▶ **Reagenzienkühler mit hoher Aufnahmekapazität:** Die Reagenzienkammer ist ein hochleistungsfähiger Kühler, der ausreichend Reagenzien für den gesamten Sequenzierungsablauf aufnehmen kann.
- ▶ **Integrierte Fluidik für Paired-End-Läufe:** Die integrierte Paired-End-Fluidik liefert Reagenzien aus der Reagenzienkammer für die Read 2-Resynthese und die indizierte Sequenzierung an die Fließzelle.
- ▶ **Steuerungsoptionen für die Benutzeroberfläche:** Die Oberfläche der Gerätesoftware verfügt über Optionen zur Konfiguration eines Laufs und zur Steuerung des Geräts. Eingaben sind über den Touchscreenmonitor oder die integrierte Tastatur möglich.
- ▶ **Base Calling in Echtzeit:** Die Gerätesoftware extrahiert Intensitäten aus Bildern und führt auf dem Gerätecomputer einen qualitativ benoteten Base-Call durch. Mit dieser Methode lassen sich während des Laufs Qualitätskennzahlen überwachen und bei der nachfolgenden Datenanalyse Zeit sparen. Die nachgeschaltete Analyse von Sequenzierungsdaten kann mit Illumina<sup>®</sup>-Analysesoftware oder Software-Programmen von Drittanbietern auf einer benutzerdefinierten Infrastruktur durchgeführt werden.
- ▶ **BaseSpace<sup>®</sup> Sequence Hub-Integration:** Der Sequenzierungsworkflow ist mit BaseSpace Sequence Hub, der Genomik-Computing-Umgebung von Illumina für Datenanalyse, Speicherung und Zusammenarbeit, integriert. Beim Durchführen des Laufs werden die Ausgabedateien in Echtzeit zum BaseSpace Sequence Hub gestreamt.

## Unterschiede beim Illumina SeqLab-Workflow

Bei Verwendung von HiSeq X als Komponente von Illumina SeqLab, weist Clarity LIMS X Edition Unterschiede im Workflow auf, die nicht in diesem Handbuch beschrieben sind. Alle Schritte von der Bibliotheksvorbereitung bis zur Sequenzierung sind betroffen. Auf der Illumina SeqLab-Supportseite der Illumina-Website können Sie eine anwendungsspezifische Workflow-Anleitung für Ihren Versuch generieren.

## Weitere Ressourcen

Die folgenden Dokumente stehen auf der Illumina-Website zum Herunterladen zur Verfügung. Vergewissern Sie sich stets auf den Supportseiten, dass Sie über die aktuellen Versionen verfügen.

Ressource	Beschreibung
<a href="#">Custom Protocol Selector</a>	Ein Assistent zum Erstellen einer anwendungsspezifischen End-to-End-Dokumentation, die auf das für den Sequenzierungslauf verwendete Bibliotheksvorbereitungsverfahren, die Laufparameter und die Analysemethode zugeschnitten ist.
<i>HiSeq X-System Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung (Dokument-Nr. 15050093)</i>	Enthält Spezifikationen für den Arbeitsplatz, die elektrischen Anforderungen und die Umgebungsbedingungen.
<i>HiSeq X-System Sicherheits- und Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 15050094)</i>	Bietet Informationen zu Gerätekennzeichnungen und Compliance-Zertifizierungen sowie sicherheitsbezogene Informationen.

Auf der [HiSeq X-Supportseite der Illumina-Website](#) stehen Ihnen eine Dokumentation, Software-Downloads, Online-Schulungen und häufig gestellte Fragen zur Verfügung. Spezifische Informationen zu Illumina SeqLab finden Sie auf der Supportseite von Illumina SeqLab.

## Gerätekomponenten

Das HiSeq X-System besteht aus dem Gerät, dem Bildschirm, dem Gerätesteuerungscomputer und Zubehör wie einer Tastatur, einer Maus und einem Barcodescanner. Das Gerät enthält vier Hauptkammern: das Optikmodul, die Fließzellenkammer, die Fluidikkammer und die Reagenzienkammer. Eine beleuchtete Statusleiste zeigt den Betriebszustand.

Abbildung 1 Externe Komponenten



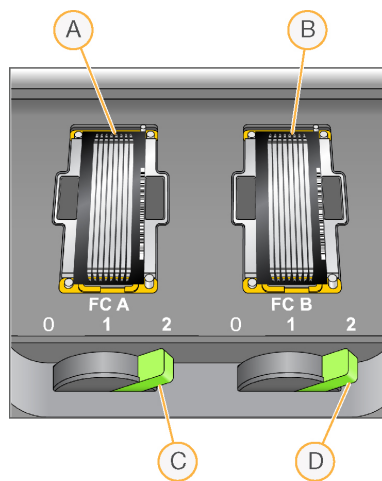
- A **Optikmodul:** Enthält optische Komponenten, die die Darstellung zweier Oberflächen der Fließzelle ermöglichen, indem A, C, G und T gleichzeitig mithilfe von Epifluoreszenz aufgenommen werden. Der Anregungslaserstrahl tritt durch das Objektiv und die Fluoreszenz wird gleichzeitig von demselben Objektiv erfasst.
- B **Fließzellenkammer:** Enthält den vakuumgesteuerten Fließzellentisch, der die Fließzelle während des Sequenzierungslaufs in Position hält.

- C **Fluidikkammer:** Enthält Fluidikpumpen, die die Reagenzien in die Fließzelle und anschließend in den Abfallbehälter leiten.
- D **Statusleiste:** Zeigt den Gerätestatus anhand von drei Farben an. Blau bedeutet, dass das Gerät läuft, Orange weist darauf hin, dass das Gerät überprüft werden muss, und Grün zeigt an, dass das Gerät für den nächsten Lauf bereit ist.
- E **Reagenzienkammer:** Enthält Reagenzien-Racks mit Reagenzien für Sequenzierungsläufe und die Waschlösung für Gerätewaschläufe.

## Fließzellenkammer

In der Fließzellenkammer sind der Fließzellentisch, die Heizelemente, das Vakuumsystem und die Fluidikanschlüsse für die einzelnen Fließzellen untergebracht.

Abbildung 2 Fließzellentisch mit zwei Fließzellen



- A Fließzelle A
- B Fließzelle B
- C Fließzellenregler A
- D Fließzellenregler B

Fließzelle A befindet sich auf der linken, Fließzelle B auf der rechten Seite. Jede Fließzelle befindet sich auf dem Fließzellentisch, der von der Steuerungssoftware in das optische Modul hineingefahren bzw. aus diesem herausgefahren wird. Der Fließzellentisch muss in der vordersten Position positioniert sein, um die Tür der Fließzellenkammer öffnen zu können und eine Fließzelle einzusetzen oder zu entfernen.

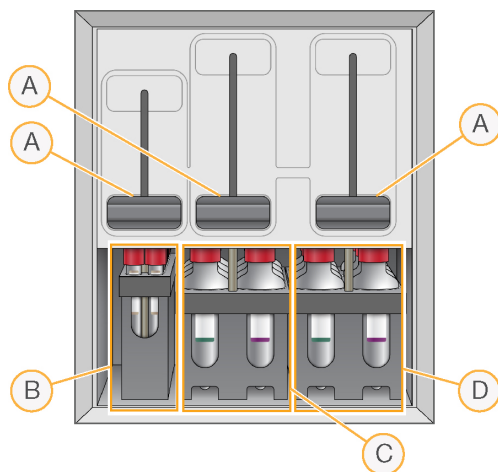
Die Fließzelle befindet sich auf dem Fließzellenhalter, wobei Einlass- und Auslassanschlüsse nach unten weisen. Die Fließzelle wird durch ein Vakuum unter dem Fließzellenhalter fixiert. Der beleuchtete Fließzellenregler vor jedem Fließzellenhalter steuert das Vakuum. Wenn der Fließzellenregler grün leuchtet, sitzt die Vakuumdichtung sicher.

## Reagenzienkammer

Bei der Reagenzienkammer handelt es sich um einen Reagenzienkühler mit drei Reagenzien-Racks und einer hohen Aufnahmekapazität: zwei Racks für SBS-Reagenzien und ein Rack für Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien. Mithilfe der Sipper-Griffe werden die Sipper in die Reagenzienflaschen abgesenkt.

- ▶ **SBS-Reagenzien-Racks:** Fassen konische 250-ml-Flaschen. Das Reagenzien-Rack für Fließzelle A befindet sich in der Mitte und das Rack für Fließzelle B befindet sich ganz rechts. Die Nummern der Positionen auf dem Reagenzien-Rack entsprechen den Anschlüssen auf einem internen Reagenzien-Selektor-Ventil.
- ▶ **Rack für Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien:** Befindet sich auf der linken Seite. Es verfügt über zwei Reihen mit nummerierten Positionen, die konische 15-ml-Röhrchen mit Paired-End-Reagenzien und Indizierungsreagenzien enthalten. Die linke Reihe enthält die Reagenzien für Fließzelle A und die rechte Reihe die Reagenzien für Fließzelle B.
- ▶ **Reagenzienkühler:** Die Reagenzien-Racks sind im Reagenzienkühler untergebracht, in dem eine Innentemperatur von 2 °C bis 8 °C herrscht.

Abbildung 3 Reagenzienkammer



- A Sipper-Griffe
- B Reagenzien-Rack für Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien
- C Reagenzien-Rack für SBS-Reagenzien für Fließzelle A
- D Reagenzien-Rack für SBS-Reagenzien für Fließzelle B






## HiSeq X-Software

Auf dem Gerätecomputer sind drei Software-Anwendungen installiert:

- ▶ **HiSeq X-Steuerungssoftware:** Die Benutzeroberfläche der HiSeq Control Software HD führt Sie durch die Schritte für die Konfiguration eines Sequenzierungslaufs. Während des Laufs steuert die Software die Geräte-Hardware und die Fluidik, legt Temperaturen fest und liefert eine visuelle Zusammenfassung von Qualitätsstatistikwerten.
- ▶ **Echtzeitanalyse-Software:** Die in die Steuerungssoftware integrierte Real-Time Analysis-Software führt das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Zyklus einen Qualitäts-Score zu. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Echtzeitanalyse auf Seite 39*.
- ▶ **Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software:** Der Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) liefert detaillierte Qualitätsstatistikwerte.

## Statussymbole

In der oberen rechten Ecke jedes Bildschirms befindet sich ein Statussymbol, das Sie über Änderungen der Bedingungen und über Fehler oder Warnungen informiert, die während der Laufkonfiguration und des Laufs auftreten.

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Status okay	Keine Änderung. Das System funktioniert normal.
	Information	Nur zur Information. Es ist keine Aktion erforderlich.
	Achtung	Informationen, die möglicherweise Ihre Aufmerksamkeit erfordern.
	Warnung	Warnungen stoppen einen Lauf nicht, erfordern jedoch möglicherweise eine Aktion, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Fehler	Fehler stoppen einen Lauf in der Regel und erfordern im Allgemeinen eine Aktion, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.

Wenn eine Bedingungsänderung auftritt, blinkt das entsprechende Symbol, um Sie darauf aufmerksam zu machen.

- ▶ Wählen Sie das Symbol aus, um das Statusfenster zu öffnen und eine Beschreibung der Bedingung anzuzeigen.
- ▶ Wählen Sie **Acknowledge** (Bestätigen), um die Meldung zu akzeptieren, und **Close** (Schließen), um das Dialogfeld zu schließen.

## Aktivitäts- und Sensoranzeigen

Auf dem Begrüßungsbildschirm wird unten rechts eine Reihe von Symbolen angezeigt. Die Symbole geben die Geräteaktivität und den Status bestimmter Komponenten anhand der Gerätesensoren an.

Abbildung 4 Aktivitätsanzeigen



Von links nach rechts befinden sich Aktivitätsanzeigen für die X-, Y- und Z-Motoren, die Elektronik-Funktionalität, die Kamera, das Fluidiksystem und Verarbeitungsfunktionen.

Abbildung 5 Sensoranzeigen



Von links nach rechts stellen Sensoranzeigen die Temperatur der Fließzelle A, die Temperatur des Reagenzienkühlers, den Status der Datenübertragung, den Cloud-Status des BaseSpace Hub und die Temperatur von Fließzelle B dar.





## Status der Datenübertragung

Die HiSeq X-Softwaresuite umfasst den Laufkopierdienst, der die Datenübertragung zum Ausgabeordner verwaltet. Eine BaseSpace-Option sendet Gerätestatus- und Sequenzierungsdaten an den BaseSpace Sequence Hub.

Zwei der Sensoranzeigen auf der Softwareoberfläche zeigen den Übertragungsstatus des Laufkopierdienstes und des BaseSpace Sequence Hub an.





### Laufkopierdienst


Der Übertragungsstatus beeinflusst, ob Sie einen neuen Lauf starten oder das Ausgabelaufwerk sicher formatieren können.

Statussymbol	Beschreibung
	Daten werden übertragen. Formatieren Sie das Ausgabelaufwerk erst, nachdem die Übertragung abgeschlossen ist.
	Daten werden übertragen, aber die Netzwerkverbindung ist langsam. Sie können einen Sequenzierungslauf konfigurieren und das Ausgabelaufwerk formatieren, wenn die Übertragung abgeschlossen ist.
	Der Laufkopierdienst ist deaktiviert.
	Der Laufkopierdienst ist aktiv, aber es werden keine Daten übertragen.

### BaseSpace Sequence Hub

Eine BaseSpace-Sensoranzeige gibt den Status von BaseSpace Sequence Hub an. Eine blaue Wolke bedeutet eine aktive Verbindung. Eine graue Wolke zeigt an, dass die Software keine Verbindung herstellen kann. Die folgende Tabelle enthält weitere Details zu den einzelnen Statussymbolen.

Statussymbol	Beschreibung
	Nicht mit BaseSpace Sequence Hub verbunden.
	Mit BaseSpace Sequence Hub verbunden, jedoch keine Datenübertragung.
	Mit BaseSpace Sequence Hub verbunden. Es werden Daten für vier Läufe oder weniger übertragen.
	Mit BaseSpace Sequence Hub verbunden. Es werden Daten für fünf Läufe oder mehr übertragen. Während dieses Symbol angezeigt wird, verhindert die Steuerungssoftware, dass neue Läufe eine Verbindung zu BaseSpace Sequence Hub herstellen.

Statussymbol	Beschreibung
	Verbindung zu BaseSpace Sequence Hub getrennt. Daten für die Übertragung befinden sich in der Warteschlange.

## Überblick über die Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung einer Sequenzierung auf dem HiSeq X sind Reagenzien-Kits von Illumina erforderlich. Jedes Kit enthält Cluster-Reagenzien zur Verwendung auf dem cBot-Gerät sowie SBS-Reagenzien, Indizierungsreagenzien und Paired-End-Reagenzien für das HiSeq X-System.

- ▶ **Einzelverpackungs-Kit:** Jedes Kit enthält Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung von zwei Fließzellen bzw. für einen Lauf mit zwei Fließzellen. Die Verbrauchsmaterialien befinden sich in zwei vollständigen Sets, ein Set pro Fließzelle.
- ▶ **10er-Pack-Kit:** Jedes Kit enthält Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung von 20 Fließzellen bzw. für 10 Läufe mit zwei Fließzellen. Die Verbrauchsmaterialien in einem Paket reichen für vier Fließzellen.

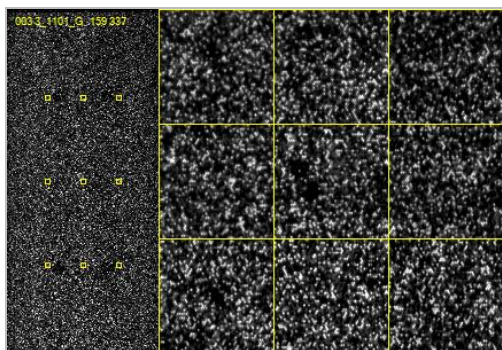
Name des HiSeq X-Kits	Katalog-Nr.
HiSeq X Ten-Reagenzien-Kit v2.5 (300 Zyklen)	FC-501-2501
HiSeq X Ten-Reagenzien-Kit v2.5 (300 Zyklen), 10er-Packung	FC-501-2521
HiSeq X Five-Reagenzien-Kit v2.5 (300 Zyklen)	FC-502-2501
HiSeq X Five-Reagenzien-Kit v2.5 (300 Zyklen), 10er-Packung	FC-502-2521

## Strukturierte Fließzelle

Das HiSeq X verwendet eine strukturierte Fließzelle mit Milliarden von angeordneten Nanowells, die im Glas der Fließzelle eingearbeitet sind. Die geordnete Struktur trägt zur Erhöhung der Anzahl der Ausgabe-Reads und der Menge der generierten Sequenzierungsdaten bei.

Die strukturierte Fließzelle befindet sich im HiSeq X-Reagenzien-Kit v2.5.

**Abbildung 6** Beispiel: Cluster auf einer strukturierten Fließzelle



# Kapitel 2 Erste Schritte

Starten des HiSeq X-Systems .....	8
Anpassen der Systemeinstellungen .....	9
Anzeigen und Senden von Gerätedaten .....	10
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien .....	11

## Starten des HiSeq X-Systems

- 1 Starten Sie den Gerätesteuerscomputer.
- 2 Warten Sie, bis das System geladen ist, und melden Sie sich dann beim Betriebssystem an. Fragen Sie, falls erforderlich, den Administrator Ihres Unternehmens nach dem Benutzernamen und dem Kennwort.
- 3 Schalten Sie den Netzschalter auf der linken Seite des Geräts in die Position „ON“ (EIN).
- 4 Warten Sie mindestens drei Minuten, bis das Gerät konfiguriert und das Gerätelaufwerk „DoNotEject“ initialisiert ist.
- 5 Schließen Sie das Fenster, das bei der Initialisierung von „DoNotEject“ geöffnet wird. Falls das Fenster nicht geöffnet wird, suchen Sie unter „Arbeitsplatz“ nach dem Gerätelaufwerk „DoNotEject“.



### HINWEIS

Werfen Sie niemals das Flash-Laufwerk „DoNotEject“ aus, das sich im Gehäuse des Geräts befindet, und ändern Sie nicht die darauf gespeicherten Dateien. Das Laufwerk enthält Hardwarekonfigurationsdateien und wird jedes Mal initialisiert, wenn Sie das Gerät einschalten.

- 6 Archivieren Sie die auf dem Gerätecomputer befindlichen Daten der vorherigen Läufe an einem Netzwerkspeicherort, um ausreichend Speicherplatz freizugeben. Führen Sie eine Schnellformatierung der Laufwerke O:\ und S:\ durch, um alle verbliebenen Daten zu löschen. Die Festplatten müssen für den ordnungsgemäßen Betrieb leer sein.
- 7 Öffnen Sie die HCS mithilfe des Symbols auf dem Desktop.  
Wenn die Initialisierung der Software abgeschlossen ist, wird der Begrüßungsbildschirm geöffnet. Rechts unten im Bildschirm wird das Symbol „Initialized“ (Initialisiert) angezeigt.

## Gerätesteuerscomputer – Best Practices

- ▶ Schalten Sie den Computer nicht ein, während das Gerät läuft. Schalten Sie immer zuerst den Computer ein, bevor Sie das Gerät einschalten.
- ▶ Schalten Sie das Gerät nicht aus, während die Gerätesteuersoftware läuft.
- ▶ Warten Sie nach dem Ausschalten des Geräts eine Minute, bevor Sie es wieder einschalten.
- ▶ Schließen Sie die USB-Kabel des Geräts, des Bildschirms und der Tastatur an die USB-Ports auf der Rückseite des Computers an, bevor Sie den Computer einschalten.
- ▶ Schließen Sie die USB-Kabel des Barcodescanners und der Maus an die USB-Ports auf der Vorderseite des Computers an.



## Anpassen der Systemeinstellungen

Die Steuerungssoftware enthält benutzerdefinierbare Systemeinstellungen für Laufordner, LIMS-Voreinstellungen und Domänen. Das Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) bietet Einstellungen, mit denen die Lauf-ID-Vorlage, die Standardspeicherorte der Ordner, die LIMS-Authentifizierung und die Domänen für BaseSpace Enterprise festgelegt werden können. Außerdem können Sie angeben, ob die Gerätestatusinformationen übermittelt werden sollen.

Um die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware anzupassen, wählen Sie **Menu | View** (Menü | Ansicht) aus. Sie können die Benutzeroberfläche im Bildschirmmodus sowie im Fenstermodus anzeigen oder die Benutzeroberfläche minimieren.

## Definieren der Laufordnereinstellungen

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Menu | Tools | Options** (Menü | Extras | Optionen), um das Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) zu öffnen.
- 2 Um die Benennungskonvention für Laufordnernamen anzupassen, ändern Sie die Einstellungen im Feld **Run ID Template** (Lauf-ID-Vorlage). Wählen Sie **Reset** (Zurücksetzen), um den Feldinhalt zu löschen.
- 3 Um Standardspeicherorte für die Ausgabe festzulegen, geben Sie einen Speicherort für jeden der folgenden Ordner ein:
  - ▶ **Default Output Folder** (Standardausgabeordner): Der Standardspeicherort, an dem Läufe der Fließzelle A gespeichert werden.
  - ▶ **Default Output Folder2** (Standardausgabeordner2): Der Standardspeicherort, an dem Läufe der Fließzelle B gespeichert werden.



### HINWEIS

Illumina empfiehlt einen Speicherort im Netzwerk für die Ausgabeordner. Sollte sich der Speicherort vom Ordner „HiSeq Temp“ unterscheiden, können Sie auch einen Speicherort auf dem Laufwerk O:\ angeben. Verwenden Sie nicht die Laufwerke S:\ und C:\. Laufwerk S:\ ist für Gerätevorgänge reserviert und Laufwerk C:\ ist zu klein.

- 4 Um den Speicherort für LIMS-Probenformulare festzulegen, geben Sie den Speicherort im Feld **Run Setup Folder** (Laufkonfigurationsordner) ein.
- 5 Wählen Sie **OK**, um Ihre Arbeit zu speichern und das Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) zu schließen. Wählen Sie **Cancel** (Abbrechen), wenn Sie das Fenster schließen möchten, ohne Ihre Arbeit zu speichern.

## Festlegen der LIMS-Voreinstellungen

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Menu | Tools | Options** (Menü | Extras | Optionen), um das Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) zu öffnen.
- 2 Geben Sie die folgenden LIMS-Einstellungen ein:
  - ▶ **LIMS Server** (LIMS-Server): Der Name des Servers für Interaktionen mit dem unterstützten Illumina-LIMS.
  - ▶ **LIMS User Name** (LIMS-Benutzername): Der Benutzername, der für die Authentifizierung beim Illumina-LIMS verwendet wird.
  - ▶ **LIMS Password** (LIMS-Kennwort): Das Kennwort, das für die Authentifizierung beim Illumina-LIMS verwendet wird.

- 3 Wählen Sie **OK**, um Ihre Arbeit zu speichern und das Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) zu schließen. Wählen Sie **Cancel** (Abbrechen), wenn Sie das Fenster schließen möchten, ohne Ihre Arbeit zu speichern.

## Konfigurieren einer Domäne

Wenn Sie BaseSpace Enterprise abonniert haben, gehen Sie folgendermaßen vor, um Ihre Domäne zu konfigurieren.

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Menu | Tools | Options** (Menü | Extras | Optionen), um das Fenster „Options“ (Optionen) zu öffnen.
- 2 Geben Sie den Domänennamen des BaseSpace Sequence Hub-Servers ein.
- 3 Wählen Sie **OK**, um Ihre Arbeit zu speichern und das Fenster „Options“ (Optionen) zu schließen. Wählen Sie **Cancel** (Abbrechen), wenn Sie das Fenster schließen möchten, ohne Ihre Arbeit zu speichern.

## Anzeigen und Senden von Gerätedaten

Über die Schaltfläche „Menu“ (Menü) auf dem Begrüßungsbildschirm und im Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) stehen Optionen für das Anzeigen und Senden von Gerätedaten zur Verfügung.

- ▶ Wählen Sie **Menu | About** (Menü | Info), um Informationen zur Gerätehardware und den Softwareversionen sowie Kontaktinformationen für den technischen Support zu erhalten.
- ▶ Wählen Sie **Menu | Tools | Options** (Menü | Extras | Optionen) und aktivieren Sie anschließend das Kontrollkästchen **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Gerätestatusdaten an Illumina senden, um Illumina bei der Verbesserung seiner Produkte zu helfen), wenn Sie den Überwachungsdienst Illumina Proactive aktivieren möchten. Je nach verwendeter HCS-Version kann der Name dieser Einstellung auf der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.

Nach Aktivierung dieser Einstellung werden Leistungsdaten des Geräts an Illumina gesendet. Mit diesen Daten werden das Erkennen möglicher Fehler und die Fehlerbehebung durch Illumina unterstützt, sodass durch proaktive Wartung die Geräteverfügbarkeit maximiert werden kann. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Services finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.

Dieser Dienst:

- ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
- ▶ Erfordert, dass das Gerät mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden ist.
- ▶ Ist standardmäßig aktiviert. Wenn Sie den Dienst ausschalten möchten, deaktivieren Sie die Einstellung **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Gerätestatusdaten an Illumina senden, um Illumina bei der Verbesserung seiner Produkte zu helfen).



### HINWEIS

Nach der Durchführung von Software-Upgrades wird die Einstellung wieder aktiviert. Wenn Geräteleistungsdaten nicht an Illumina gesendet werden sollen, deaktivieren Sie den Dienst nach jedem Software-Upgrade.

## Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

Eine umfassende Liste der vom Benutzer bereitzustellenden Verbrauchsmaterialien finden Sie im *Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung für das HiSeq X-System (Dokument-Nr. 15050093)*.

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Alkoholtupfer, 70 % Isopropyl oder Ethanol, 70 %	Allgemeiner Laborlieferant WWR, Katalog-Nr. 95041-714	Reinigen der Fließzelle und des Fließzellentisches.
Ballonflasche, Fassungsvermögen mindestens 6 Liter	Allgemeiner Laborlieferant Corning, Katalog-Nr. 430776	Vorbereitung der Lösung für den Wartungswaschlauf.
Handschuhe, ungepudert	Allgemeiner Laborlieferant	Allgemeine Verwendung.
Labortücher, fusselfrei	WWR, Katalog-Nr. 21905-026	Reinigen des Fließzellenhalters.
ProClin 300, 50 ml*	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 48912-U	Wartungswaschlauf.
Zentrifugenröhrchen, 250 ml	Allgemeiner Laborlieferant Corning, Katalog-Nr. 430776	Gerätewaschlauf. SBS-Reagenzien-Rack, Positionen mit PW1.
Röhrchen, konisch, 15 ml	Allgemeiner Laborlieferant Corning, Katalog-Nr. 430052	Sammeln und Messen der Abfallvolumina. PE-Reagenzien-Rack, Positionen mit PW1.
Tween 20, viskose Flüssigkeit, 100 ml	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. P7949	Wartungswaschlauf.
Pinzette, viereckige Kunststoffspitze	McMaster-Carr, Katalog-Nr. 7003A22	Entfernen der Fließzellen-Dichtungen.
Wasser, Laborqualität, 18 MΩ	Millipore	Wasserwaschlauf. SBS- und PE-Reagenzien-Racks, Positionen mit PW1.

\* ProClin 300 darf nur für den IVD-Gebrauch verwendet werden.

# Kapitel 3 Vorbereiten von Reagenzien

Einleitung .....	12
Vorbereiten von SBS-Reagenzien .....	12
Vorbereiten von Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien .....	13

## Einleitung

Bevor Sie den Lauf konfigurieren, bereiten Sie alle Reagenzien für die Sequenzierung vor: SBS-Reagenzien, Indizierungsreagenzien und Paired-End-Reagenzien. Die Anweisungen für das Vorbereiten der Reagenzien sind für alle Kit-Versionen identisch. Alle Reagenzien werden geladen, wenn Sie von der Software dazu aufgefordert werden. Sie müssen während des Laufs nicht zum Gerät zurückkehren, um Reagenzien nachzuladen.

Sequenzierungsreagenzien können während der Clusterbildung vorbereitet werden. Anweisungen zur Vorbereitung und dem Clustering von Fließzellen und Clusterreagenzien finden Sie im *Handbuch zum cBot 2-System (Dokument-Nr. 15065681)* und im *Handbuch zum cBot-System (Dokument-Nr. 15006165)*.

## Vorbereiten von SBS-Reagenzien

Befolgen Sie die nachfolgenden Anweisungen, um die SBS-Reagenzien PSM, PIM und PCM aufzutauen und zu inspizieren. Verwenden Sie PB1 und PB2 direkt aus der Lagerung.

Bereiten Sie die entsprechende Anzahl SBS-Reagenzienflaschen vor.

Reagenz	Für eine Fließzelle (Lauf mit einer Fließzelle)	Für zwei Fließzellen (Lauf mit zwei Fließzellen)	Für vier Fließzellen (zwei Läufe mit je zwei Fließzellen)
PB1	1	2	4
PB2	3	6	12
PCM	1	2	4
PIM	1	2	4
PSM	1	2	4

## Auftauen von SBS-Reagenzien

- 1 Entnehmen Sie je vier Flaschen PSM, PIM und PCM aus der Lagerung bei -25 °C bis -15 °C.
- 2 Lassen Sie sie bei 2 °C bis 8 °C etwa 16 Stunden lang auftauen.  
Alternativ können Sie PSM und PIM etwa 90 Minuten lang in einem Bad mit raumtemperiertem deionisiertem Wasser auftauen. Tauen Sie PCM in einem **separaten** Wasserbad auf.



### HINWEIS

Wechseln Sie nach der Handhabung von PCM immer Ihre Handschuhe.

- 3 Invertieren Sie jede Flasche zum Mischen.
- 4 Überprüfen Sie PSM, um sicherzugehen, dass keine wirbelnden Muster sichtbar sind.
- 5 Stellen Sie PSM und PIM auf Eis beiseite.
- 6 Legen Sie PCM **separat** auf Eis, um eine Kreuzkontaminierung zu vermeiden.

## Vorbereiten von Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien

Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien werden während des Read 2-Resynthese-Vorgangs eines Paired-End-Sequenzierungslaufs verwendet.

Bereiten Sie die entsprechende Anzahl von Röhrchen für jedes Indizierungs- und Paired-End-Reagenz vor.

Reagenz	Menge für eine Fließzelle (Lauf mit einer Fließzelle)	Menge für zwei Fließzellen (Lauf mit zwei Fließzellen)	Menge für vier Fließzellen (zwei Läufe mit je zwei Fließzellen)
PRM	1	2	4
PLM2 v2	1	2	4
PAM	1	2	4
PPM	1	2	4
PDR	1	2	4
HP11	1	2	4
HP14	1	2	4



### WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Auftauen von Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien

- 1 Entnehmen Sie folgenden Reagenzien aus der Lagerung bei -25 °C bis -15 °C: PRM, PLM2 v2, PAM, PPM, PDR, HP11 und HP14. Für nicht indizierte Bibliotheken ist HP14 nicht erforderlich.
- 2 Lassen Sie sie in einem raumtemperierten Wasserbad mit deionisiertem Wasser etwa 20 Minuten lang auftauen.
- 3 Stellen Sie PRM, PLM2 v2 und PAM auf Eis beiseite.

## Vorbereiten von PRM, PLM2 v2, PAM, PPM, PDR, HP11 und HP14

- 1 Invertieren Sie jedes Röhrchen zum Mischen.
- 2 Zentrifugieren Sie das Reagenz eine Minute lang bei 1000 rpm.
- 3 Stellen Sie PRM, PLM2 v2 und PAM auf Eis beiseite.
- 4 Stellen Sie PPM, PDR, HP11 und HP14 bei Raumtemperatur beiseite.

# Kapitel 4 Sequenzierung

Einleitung .....	14
Sequenzierungsworkflow .....	14
Eingeben von Laufparametern .....	15
Laden und Vorfüllen von Reagenzien .....	17
Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle .....	22
Überwachen des Laufs .....	24
Entladen von Reagenzien .....	25
Durchführen eines Wasserwaschlaufs .....	25
Schnellformatierung der Ausgabe- und Scratch-Laufwerke .....	27

## Einleitung

Um auf dem HiSeq X einen Lauf durchzuführen, bereiten Sie die Reagenzien für den Lauf vor und halten Sie sich an die Eingabeaufforderungen zum Konfigurieren des Laufs. Zu den Schritten für das Konfigurieren des Laufs gehören das Eingeben der Laufparameter, das Laden und Vorfüllen der Reagenzien, das Laden der Fließzelle und das Durchführen einer Fluidikprüfung.

Die Schritte für die Laufkonfiguration sind in drei Registerkarten unterteilt: „Run Configuration“ (Laufkonfiguration), „Pre-Run Setup“ (Vorlaufkonfiguration) und „Initiate Run“ (Lauf initiieren).

- ▶ Die Laufkonfigurationsbildschirme enthalten Dropdown-Listen, Kontrollkästchen oder Textfelder zur Angabe der Laufparameter. Scannen Sie die Fließzellen- oder Reagenzien-Kit-ID mit dem tragbaren Barcodescanner ein oder geben Sie die ID über die Touchscreen-Tastatur ein. Das Tastatursymbol befindet sich rechts neben den Textfeldern.
- ▶ Wählen Sie **Next** (Weiter), um zum nächsten Bildschirm zu wechseln, oder **Back** (Zurück), um zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren.
- ▶ Sie können jederzeit während der Laufkonfiguration **Cancel** (Abbrechen) wählen, um die Laufkonfiguration zu beenden und zum Begrüßungsbildschirm zurückzukehren.

Informationen zur Laufdauer sowie zu weiteren Leistungsspezifikationen finden Sie auf der Illumina-Website auf der Seite mit den technischen Daten zu HiSeq X.

## Gestaffelte Läufe

Sie können einen neuen Lauf auf Fließzelle A bzw. Fließzelle B starten, während auf der benachbarten Fließzelle gerade ein Lauf ausgeführt wird. Weitere Informationen finden Sie unter *Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B* auf Seite 38.

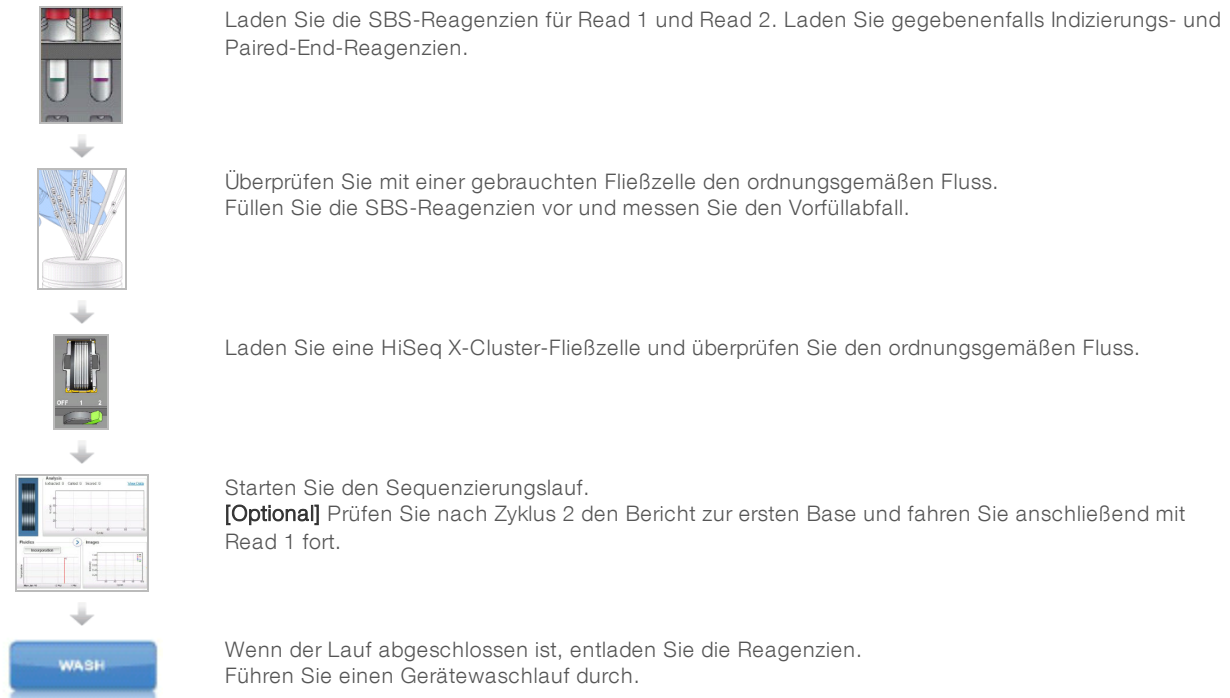
## Sequenzierungsworkflow



Bereiten Sie die Fließzelle und die Reagenzien für den Lauf vor.



Geben Sie die Laufparameter gemäß den Anweisungen auf der Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware ein.



## Eingeben von Laufparametern

Starten Sie die Laufkonfiguration, indem Sie Laufparameter für eine Reihe von Bildschirmen auf der Registerkarte „Run Configuration“ (Laufkonfiguration) eingeben. Die Software führt Sie durch jeden Bildschirm, wenn Sie die BaseSpace Sequence Hub-Konnektivität angeben, Verbrauchsmaterial-IDs eintragen, Indizierungsoptionen auswählen und weitere Parameter angeben.

## Bildschirm „Storage“ (Speicherung)

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Sequence** (Sequenzieren), um den Bildschirm „Storage“ (Speicherung) zu öffnen.
- 2 **[Optional]** Stellen Sie wie folgt eine Verbindung zu BaseSpace Sequence Hub her.
  - a Wählen Sie **Connect to BaseSpace** (Mit BaseSpace verbinden).
  - b Wählen Sie aus den folgenden BaseSpace-Optionen aus:
    - ▶ **Storage and Analysis** (Speicherung und Analyse): Sendet zwecks Remote-Überwachung und Datenanalyse Laufdaten an den BaseSpace Sequence Hub. Zur Verwendung dieser Option ist ein Probenblatt erforderlich.
    - ▶ **Run Monitoring Only** (Nur Laufüberwachung): Sendet nur InterOp-Dateien an den BaseSpace Sequence Hub, sodass Sie den Lauf remote überwachen können.
  - c Melden Sie sich mit der E-Mail-Adresse Ihres Myllumina-Kontos und Ihrem Kennwort beim BaseSpace Sequence Hub an.
- 3 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum Speicherort des bevorzugten Ausgabeordners.
- 4 Stellen Sie sicher, dass die Miniaturbildeinstellung **Save All Thumbnails** (Alle Miniaturbilder speichern) lautet.

Die Software speichert automatisch alle Miniaturbilder. Ein Miniaturbild ist eine Auswahl von Bildern aus vielen Platten in jeder Plattenspalte bzw. in jedem Bildstreifen, die in einem Bild zusammengefasst werden.

- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Bildschirm „Flow Cell Setup“ (Konfiguration der Fließzelle)

Im Bildschirm „Flow Cell Setup“ (Konfiguration der Fließzelle) werden Informationen über die Fließzelle aufgezeichnet, die für Ihren Lauf verwendet wird. Alle Felder müssen ausgefüllt werden.

- 1 Scannen Sie die Fließzellen-ID (Barcode Nummer) der zu sequenzierenden Fließzelle ein oder geben Sie sie ein.
- 2 Vergewissern Sie sich, dass der Fließzellentyp **HiSeq X** oder **HiSeq X HD** ist.



### HINWEIS

Die Fließzellen HiSeq X und HiSeq X HD können als Fließzelle A und Fließzelle B gleichzeitig sequenziert werden.

- 3 Geben Sie einen Versuchsnamen ein, der auf jedem Bildschirm erscheint und den gerade durchgeführten Lauf identifiziert.
- 4 Geben Sie den Benutzernamen ein.
- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Bildschirm „Advanced“ (Erweitert)

- 1 **[Optional]** Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Confirm First Base** (Erste Base bestätigen). Ein Bericht zur ersten Base wird automatisch für jeden Lauf nach Zyklus 2 generiert und im Stammverzeichnis des Laufordners gespeichert. Wenn Sie diese Option wählen, können Sie den Bericht zur ersten Base bestätigen, bevor Sie mit dem Lauf fortfahren. Anderenfalls wird der Lauf fortgesetzt, ohne dass das Bestätigungsdiaologfeld angezeigt wird.
- 2 **[Optional]** Wählen Sie im Fließzellenbild die Lanes aus, die vom Lauf entfernt werden sollen. Standardmäßig werden keine Lanes entfernt. Das PhiX-Alignment wird für alle Lanes automatisch durchgeführt.



### HINWEIS

Eine dedizierte Kontroll-Lane ist nicht erforderlich bzw. optional.

- 3 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Rezepturbildschirm

Aus den im Rezepturbildschirm eingegebenen Informationen wird automatisch eine Rezeptur generiert.

- 1 Wählen Sie eine der Optionen für den „Index Type“ (Indextyp):
  - ▶ **No Index** (Kein Index): Führt einen nicht indizierten Paired-End-Lauf durch.
  - ▶ **Single Index** (Einfacher Index): Führt einen Paired-End-Lauf mit einem Index-Read von 8 bp durch.
  - ▶ **Dual Index** (Doppelter Index): Führt einen Paired-End-Lauf mit Index-Reads von 8 bp durch.
 Diese verbleibenden Felder werden entsprechend dem gewählten Indextyp automatisch ausgefüllt.
- 2 Bestätigen Sie die automatisch ausgefüllten Einstellungen:
  - ▶ Zyklen: **151** für Read 1 und Read 2 sowie **8** oder **0** für Index 1 und Index 2. Hierbei handelt es sich um die Anzahl der Zyklen in jedem Sequenzierungs- und Index-Read.



- ▶ SBS: **HiSeq X SBS**: Die SBS-Chemie, die für Read 1 und Read 2 verwendet wird.
- ▶ Index: **HiSeq X Sequencing Primer** oder **HiSeq X Dual Index Sequencing Primer**. Falls zutreffend, die Chemie, die für Index-Read 1 und Index-Read 2 verwendet wird.
- ▶ PE-Turnaround: **HiSeq X PE** oder **HiSeq X PE Dual Index**. Die Chemie, die für Paired-End-Resynthese verwendet wird.

## Bildschirm „Sample Sheet“ (Probenblatt)

Probenblätter sind optional, es sei denn, Sie verwenden den BaseSpace Sequence Hub, um eine Datenanalyse durchzuführen.

- 1 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen), um das gewünschte Probenblatt auszuwählen.
- 2 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Bildschirm „Reagents“ (Reagenzien)

Im Bildschirm „Reagents“ (Reagenzien) werden Informationen zu den für den Lauf verwendeten Reagenzien-Kits aufgeführt.

- 1 Scannen Sie die Reagenzien-Kit-ID von einer der folgenden SBS-Kit-Boxen oder geben Sie sie in das Feld „SBS Reagent Kit ID“ (SBS-Reagenzien-Kit-ID) ein:
  - ▶ **Einzelverpackungs-Kit**: SBS-Kit-Box 1 oder 2
  - ▶ **10er-Pack-Kit**: SBS-Kit-Boxen A–F
- 2 Scannen Sie im Feld „PE Reagent Kit ID“ (PE-Reagenzien-Kit-ID) die Paired-End-Reagenzien-Kit-ID von einer der folgenden PE-Cluster-Kit-Boxen oder geben Sie die ID manuell ein:
  - ▶ **Einzelverpackungs-Kit**: PE-Cluster-Kit Box 2
  - ▶ **10er-Pack-Kit**: PE-Cluster-Kit Box C
- 3 Wählen Sie **300 Cycles** (300 Zyklen) aus.  
Der Standardwert für das Feld „Cycles Remaining“ (Verbleibende Zyklen) lautet „325“.



### HINWEIS

Die Software zählt die eingegebene Zyklenanzahl im Feld „Cycles Remaining“ (Verbleibende Zyklen) abwärts. Ist die Zyklenanzahl gering, werden Sie aufgefordert, frische Reagenzien zu laden.

- 4 Wählen Sie **Prime SBS Reagents** (SBS-Reagenzien vorfüllen), um die Reagenzien vorzufüllen.  
Führen Sie immer einen Vorfüllvorgang aus, **bevor** Sie eine Cluster-Fließzelle laden.
- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Überprüfungsbildschirm

- 1 Überprüfen Sie die Laufparameter auf dem Überprüfungsbildschirm.
- 2 Wählen Sie **Next** (Weiter), um fortzufahren, bzw. **Back** (Zurück), um Parameter zu ändern.

## Laden und Vorfüllen von Reagenzien

Nach der Eingabe der Laufparameter sind die nächsten Schritte für die Laufkonfiguration das Laden der SBS-, Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien sowie das Vorfüllen der Reagenzien durch das Fluidiksystem. Die Software führt Sie in mehreren Voreinstellungsbildschirmen auf der Registerkarte „Pre-Run Setup“ (Vorlaufkonfiguration) durch diese Schritte.

## Laden von SBS-Reagenzien

- 1 Invertieren Sie jede Flasche zum Mischen.



### VORSICHT

Mischen und laden Sie PCM erst, nachdem alle anderen Reagenzien geladen wurden, um eine Kreuzkontaminierung zu verhindern. Entsorgen Sie nach dem Umgang mit PCM stets Ihre Handschuhe und ziehen Sie ein neues Paar Handschuhe an.

- 2 Ersetzen Sie den Verschluss auf jeder Flasche durch einen Trichterverschluss.
- 3 Öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer.
- 4 Heben Sie die Sipper für das SBS-Reagenzien-Rack wie folgt an:
  - a Ziehen Sie den Sipper-Griff zu sich hin und schieben Sie ihn dann nach oben.
  - b Schieben Sie den Griff in die Aussparung am oberen Ende der Schiene. Vergewissern Sie sich, dass der Griff fest in der Aussparung sitzt.
- 5 Schieben Sie das Reagenzien-Rack mithilfe des Rack-Griffs aus der Reagenzienkammer.
- 6 Platzieren Sie die einzelnen Reagenzienflaschen in die nummerierten Positionen des Racks. Stellen Sie sicher, dass sich die konische Seite der Flasche in der Aussparung auf dem Boden des Racks befindet.

**Tabelle 1 SBS-Reagenzienpositionen**

Position	Reagenz	Beschreibung
1	PIM	Strukturierte Inkorporationsmischung
2	PW1	25 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität
3	PSM	Strukturierte Scanmischung
4	PB1	Strukturierter SBS-Puffer 1
5	PB2	Strukturierter SBS-Puffer 2
6	PB2	Strukturierter SBS-Puffer 2
7	PCM	Strukturierte Aufspaltungsmischung
8	PB2	Strukturierter SBS-Puffer 2

- 7 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Latexhandschuhe an.
- 8 Schieben Sie das SBS-Rack in die Reagenzienkammer, indem Sie es an der erhöhten Führung unten in der Kammer ausrichten.
- 9 Senken Sie die Sipper wie folgt in die SBS-Reagenzienflaschen ab:
  - a Ziehen Sie den Sipper-Griff zu sich hin und drücken Sie ihn dann nach unten.
  - b Inspizieren Sie die Sipper, um sicherzustellen, dass sie beim Eintauchen in die Trichterverschlüsse nicht verbogen werden.
  - c Schieben Sie den Griff in die Aussparung am unteren Ende der Schiene.

## Laden von Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien

- 1 Heben Sie die Sipper für das Paired-End-Reagenzien-Rack wie folgt an:
  - a Ziehen Sie den Griff zu sich hin und heben Sie ihn an.

- b Schieben Sie den Griff in die Aussparung am oberen Ende der Schiene. Vergewissern Sie sich, dass der Griff fest in der Aussparung sitzt.
- 2 Schieben Sie das Reagenzien-Rack mithilfe des Rack-Griffs aus der Reagenzienkammer.
- 3 Laden Sie konische 15-ml-Röhrchen mit 10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität in die Positionen 12, 18 und 19 des Paired-End-Racks.
- 4 Entfernen Sie die Verschlüsse von den Reagenzröhrchen und stellen Sie die einzelnen Röhrchen in die entsprechend nummerierte Position des Racks bzw. in die Position mit der Farbe, die der Farbe des Etiketts entspricht.

**Tabelle 2 Positionen der Paired-End-Reagenzien**

Position	Reagenz	Beschreibung
10	PRM	Strukturierte Resynthese-Mischung
11	PLM2 v2	Strukturierte Linearisierungs-Mischung 2
12	PW1	10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität
13	PAM	Strukturierte Amplifikationsmischung
14	PPM	Strukturierte Amplifikationsvormischung
15	PDR	Strukturierte Denaturierungsmischung (enthält Formamid)
16	HP11	Primer-Mischung, Read 2
17	HP14*	Indizierungs-Primer-Mischung
18	PW1	10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität
19	PW1	10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität

\* HP14 ist nur für indizierte Läufe erforderlich. Falls HP14 nicht verwendet wird, laden Sie ein konisches 15-ml-Röhrchen mit 10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität.

- 5 Schieben Sie das Reagenzien-Rack in die Reagenzienkammer, indem Sie es an der erhöhten Führung unten in der Kammer ausrichten.
- 6 Senken Sie die Sipper wie folgt in die Paired-End-Reagenzröhrchen ab:
  - a Ziehen Sie den Griff zu sich hin und senken Sie ihn ab.
  - b Inspizieren Sie die Sipper, um sicherzustellen, dass sie beim Eintauchen in die Röhrchen nicht verbogen werden.
  - c Schieben Sie den Griff in die Aussparung am unteren Ende der Schiene.
- 7 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **PW1 (25 ml) loaded in Position 2** (PW1 (25 ml) in Position 2 geladen) und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).

## Vorfüllen von Reagenzien

Die Schritte zum Vorfüllen der Reagenzien umfassen das Laden der Primer-Fließzelle, das Verifizieren des ordnungsgemäßen Flusses und anschließend das Starten des Vorfüllvorgangs.



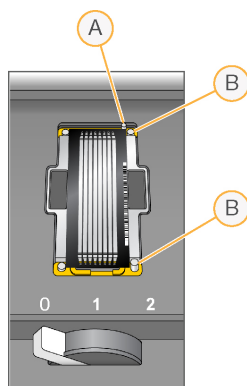
### VORSICHT

Verwenden Sie immer eine **gebrauchte** Fließzelle zum Vorfüllen von Reagenzien. Sie können die Fließzelle aus dem vorherigen Lauf verwenden, um die Reagenzien des nachfolgenden Laufs vorzufüllen oder einen Nachwaschlauf durchzuführen.

## Laden der Primer-Fließzelle

- 1 Scannen Sie die ID (Barcode Nummer) der Primer-Fließzelle ein oder geben Sie sie ein.
- 2 Spülen Sie die Primer-Fließzelle mit Wasser in Laborqualität. Trocknen Sie sie mit einem Reinigungstuch für Objektive oder einem anderen fusselfreien Tuch ab.
- 3 Reinigen Sie sie mit Alkoholtupfern und einem Reinigungstuch für Objektive.
- 4 Legen Sie die Fließzelle so auf den Fließzellenhalter, dass die Einlass- und Auslassanschlüsse nach **unten** weisen und der Barcode sich auf der rechten Seite befindet. Stellen Sie sicher, dass der Pfeil am linken Rand der Fließzelle, der die Flussrichtung angibt, in Richtung Gerät zeigt.
- 5 Schieben Sie die Fließzelle vorsichtig bis zum Anschlag in Richtung der oberen und rechten Führungsstifte.

**Abbildung 7** Fließzelle an oberem und rechten Führungsstiften ausgerichtet



- A Oberer Führungsstift
- B Rechte Führungsstifte

- 6 Nehmen Sie die Hand von der Fließzelle, um zu verhindern, dass im Laufe der Zeit eine Verschiebung der Ausrichtung auftritt.
- 7 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 1. Dadurch wird das Vakuum aktiviert und die Fließzelle wird gesichert.  
Wenn der Fließzellenregler grün blinkt, ist das Vakuum aktiviert. Falls der Regler nicht grün leuchtet, lesen Sie *Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration* auf Seite 35.
- 8 Warten Sie etwa fünf Sekunden und bewegen Sie dann den Fließzellenregler langsam in Position 2. Wenn der Fließzellenregler dauerhaft grün leuchtet, sind die Manifolds in Position und die Fließzelle ist bereit.
- 9 Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) aktiviert ist, und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).

## Prüfen des Flusses

Bei der Überprüfung des Flusses wird auch festgestellt, ob die Fließzelle und die Dichtungen ordnungsgemäß installiert sind und ein Vakuum entstanden ist.

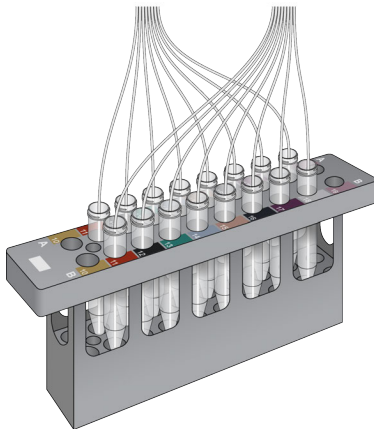
- 1 Wählen Sie Position **2** aus der Dropdown-Liste aus.

- 2 Überprüfen Sie die folgenden Standardwerte:
  - ▶ Volume (Volumen): **125**
  - ▶ Aspirate Rate (Aspirationsrate): **250**
  - ▶ Dispense Rate (Zufuhrtrate): **2.000**
- 3 Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
- 4 Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
- 5 Wenn übermäßig viele Luftblasen vorhanden sind, gehen Sie wie folgt vor:
  - a Überprüfen Sie die Dichtungen auf Verstopfungen.
  - b Senken Sie die Aspirationsrate auf 100.
  - c Pumpen Sie weitere 125 µl Wasser in die Fließzelle.
  - d Wenn die Probleme weiterhin bestehen, entfernen Sie die Fließzelle, wiederholen Sie die Reinigungsschritte und setzen Sie die Fließzelle erneut ein.

## Positionieren der Röhrcchen und Starten des Vorfüllvorgangs

- 1 Entfernen Sie die Abfallröhrcchen jeder Fließzelle vom Abfallbehälter.

**Abbildung 8** Positionieren der Röhrcchen



- 2 Platzieren Sie jedes Röhrcchen in einem separaten leeren 15-ml-Röhrcchen.
- 3 Wählen Sie **Start Prime** (Vorfüllvorgang starten). Im Vorfüllbildschirm können Sie den Vorfüllvorgang überwachen.
- 4 Messen Sie nach Abschluss des Vorfüllvorgangs den gesammelten Abfall und überprüfen Sie, ob das Volumen in jedem Röhrcchen **1,75 ml** beträgt. Wenn Sie die Vorfüllvolumina der einzelnen Fließzellen in einer Flasche gesammelt haben, überprüfen Sie, ob das Volumen **14 ml** beträgt.  
Die Volumina werden wie folgt berechnet:
  - ▶ 250 µl für jede SBS-Position außer Position 2 ( $250 \times 7 = 1,75 \text{ ml}$ )
  - ▶ 1,75 ml für jede Lane ( $1,75 \times 8 = 14 \text{ ml}$ )
- 5 Legen Sie die Abfallröhrcchen zurück in den Abfallbehälter.
- 6 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle

Das Einsetzen der Fließzelle für die Sequenzierung umfasst das Entfernen der Primer-Fließzelle, das Reinigen des Fließzellenhalters, das Einsetzen der Cluster-Fließzelle sowie das Verifizieren des ordnungsgemäßen Flusses.

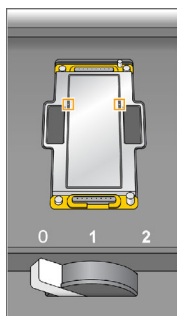
### Entfernen der gebrauchten Fließzelle

- 1 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 1, um die Manifolds zu lösen.
- 2 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 0, um die Vakuumdichtung zu lösen und die Fließzelle freizugeben.
- 3 Heben Sie die gebrauchte Fließzelle aus dem Fließzellenhalter.

### Reinigen des Fließzellenhalters

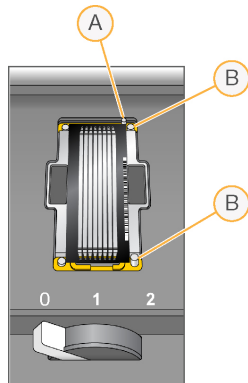
- 1 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Latexhandschuhe an.
- 2 Wischen Sie die Oberfläche des Fließzellenhalters mit einem mit Wasser in Laborqualität befeuchteten, fusselfreien Tuch ab, um Salzablagerungen zu entfernen.
- 3 Wischen Sie die Oberfläche des Fließzellenhalters mit einem Alkoholtupfer oder einem fusselfreien, mit Ethanol oder Isopropanol befeuchteten Tuch ab. Es darf kein Alkohol in die Vakuümöffnungen oder auf die Umgebung der Manifolds gelangen.
- 4 Trocknen Sie den Tisch ggf. mit einem fusselfreien Labortuch.
- 5 Unterziehen Sie den Fließzellenhalter einer Prüfung, um sicherzustellen, dass sich keine Fussel auf dem Halter befinden und die Vakuümöffnungen nicht blockiert werden.

**Abbildung 9** Überprüfen der Vakuümöffnungen



### Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle

- 1 Legen Sie die Fließzelle so auf den Fließzellenhalter, dass die Einlass- und Auslassanschlüsse nach **unten** weisen und der Barcode sich auf der rechten Seite befindet. Stellen Sie sicher, dass der Pfeil am linken Rand der Fließzelle, der die Flussrichtung angibt, in Richtung Gerät zeigt.
- 2 Schieben Sie die Fließzelle vorsichtig bis zum Anschlag in Richtung der oberen und rechten Führungsstifte.

**Abbildung 10** Fließzelle an oberem und rechten Führungsstiften ausgerichtet

- A Oberer Führungsstift
- B Rechte Führungsstifte

- 3 Nehmen Sie die Hand von der Fließzelle, um zu verhindern, dass im Laufe der Zeit eine Verschiebung der Ausrichtung auftritt.
- 4 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 1. Dadurch wird das Vakuum aktiviert und die Fließzelle wird gesichert.  
Wenn der Fließzellenregler grün blinkt, ist das Vakuum aktiviert. Falls der Regler nicht grün leuchtet, lesen Sie *Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration* auf Seite 35.
- 5 Warten Sie etwa fünf Sekunden und bewegen Sie dann den Fließzellenregler langsam in Position 2. Wenn der Fließzellenregler dauerhaft grün leuchtet, ist ein Vakuum entstanden und die Fließzelle ist einsatzbereit.
- 6 Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) aktiviert ist, und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).

## Prüfen des Flusses

Bei der Überprüfung des Flusses wird auch festgestellt, ob die Fließzelle und die Dichtungen ordnungsgemäß installiert sind und ein Vakuum entstanden ist.

- 1 Wählen Sie Position **5** aus der Dropdown-Liste aus.
- 2 Geben Sie die folgenden Werte ein:
  - ▶ Volume (Volumen): **250**
  - ▶ Aspirate Rate (Aspirationsrate): **250**
  - ▶ Dispense Rate (Zufuhrtrate): **2.000**
- 3 Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
- 4 Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
- 5 Wenn übermäßig viele Luftblasen vorhanden sind, gehen Sie wie folgt vor:
  - a Überprüfen Sie die Manifold-Dichtungen auf Verstopfungen.
  - b Starten Sie die Pumpe erneut an Position 6, um zu verhindern, dass die Lösung an Position 5 aufgebraucht wird.
  - c Senken Sie die Aspirationsrate auf 100.

- d Pumpen Sie weitere 250 µl in die Fließzelle.
- 6 Wählen Sie **Next** (Weiter).
- 7 Stellen Sie sicher, dass der Fließzellenregler grün leuchtet, und schließen Sie anschließend die Tür der Fließzellenkammer.
- 8 Achten Sie darauf, dass die Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) und **Door Closed** (Tür geschlossen) aktiviert sind, und wählen Sie **Next** (Weiter).
- 9 Wählen Sie **Start**, um den Sequenzierungslauf zu starten.

## Überwachen des Laufs

- 1 Sie können die Laufkennzahlen auf dem Laufübersichtsbildschirm überwachen.

Abbildung 11 Laufübersichtsbildschirm



- A **Statusleiste:** In der Statusleiste können Sie prüfen, wie viele Zyklen bereits abgeschlossen sind.
- B **Fließzellenbild:** Überwachen Sie die dargestellten Lanes.
- C **Fluidikdiagramm:** Erweitern Sie den Fluidikabschnitt und überwachen Sie die chemischen Schritte.
- D **Laufkonfiguration:** Hier können Sie die Parameter des aktuellen Laufs überprüfen.
- E **Analysediagramm:** Überprüfen Sie die Qualitäts-Scores pro Zyklus.
- F **Bilddiagramm:** Überprüfen Sie die Intensitäten pro Zyklus. Für jeden gescannten Bildstreifen wird ein Miniaturbild dargestellt. Die anderen Bilder werden in der Benutzeroberfläche der Software nicht angezeigt.

## Bericht zur ersten Base

Wenn Sie während der Laufkonfiguration gewählt haben, dass die erste Base bestätigt wird, wird das Dialogfeld für die Bestätigung der ersten Base automatisch nach Abschluss des zweiten Zyklus angezeigt. Der Lauf wird an diesem Punkt angehalten.

- 1 Überprüfen Sie den Bericht zur ersten Base im Bestätigungsdialogfeld.
- 2 Wenn die Ergebnisse zufriedenstellend sind, wählen Sie **Continue** (Fortfahren).



## Anzeigen der Laufkennzahlen

Wenn Laufkennzahlen verfügbar sind, wird der Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) automatisch geöffnet, um sie anzuzeigen. Die Kennzahlen werden in Form von Schaubildern, Diagrammen und Tabellen dargestellt. Weitere Informationen finden Sie im *Benutzerhandbuch zum Sequenzierungsanalyse-Viewer (Dokument-Nr. 15051736)*.

- 1 Sie können aktualisierte Kennzahlen anzeigen, wenn Sie zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Laufs **Refresh** (Aktualisieren) wählen.

## Entladen von Reagenzien

- 1 Wenn der Lauf abgeschlossen ist, öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer.
- 2 Heben Sie die Sipper für das entsprechende SBS-Rack bzw. Paired-End-Rack wie folgt an:
  - a Ziehen Sie den Sipper-Griff auswärts.
  - b Heben Sie den Sipper-Griff an und ziehen Sie ihn gleichzeitig auswärts.
  - c Schieben Sie den Sipper-Griff in die Aussparung am oberen Ende der Schiene. Vergewissern Sie sich, dass der Sipper-Griff fest in der Aussparung sitzt.
- 3 Schieben Sie jedes Reagenzien-Rack mithilfe der Rack-Griffe aus der Reagenzienkammer.
- 4 Nehmen Sie die Flaschen aus jedem Reagenzien-Rack.



### WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Durchführen eines Wasserwaschlaufs

Nach jedem Sequenzierungslauf ist ein Wasserwaschlauf erforderlich, um das System zu waschen und die Fluidik zu überprüfen. Ein Wartungswaschlauf ist eine optionale Alternative zum Wasserwaschlauf nach dem Lauf. Anweisungen finden Sie unter *Durchführen eines Wartungswaschlaufs auf Seite 28*. Anweisungen finden Sie im Handbuch für das HiSeq X-System (Dokument-Nr. 15050091).

Wenn das Gerät einen Tag oder länger nicht verwendet wurde, führen Sie einen Wasserwaschlauf durch, bevor Sie einen neuen Sequenzierungslauf starten.

- 1 Wählen Sie auf dem Begrüßungsbildschirm die Option **Wash | Water** (Waschlauf | Wasser).
- 2 Wählen Sie **Yes** (Ja), um die Paired-End-Reagenzienpositionen zu waschen. Wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).
- 3 Laden Sie Wasser in Laborqualität in das Gerät:
  - a Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit 250 ml Wasser in Laborqualität.
  - b Füllen Sie 10 PE-Röhrchen mit 12 ml Wasser in Laborqualität.

**HINWEIS**

Waschflaschen und Röhrchen werden in der Regel alle sechs Monate ersetzt, während das Wasser ca. einmal pro Woche ausgetauscht wird.

- 4 Stellen Sie sicher, dass eine gebrauchte Fließzelle geladen ist. Setzen Sie ggf. eine gebrauchte Fließzelle ein.
- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter).
- 6 Führen Sie eine Fluidikprüfung durch:
  - a Wählen Sie Lösung 2 aus der Dropdown-Liste aus.
  - b Akzeptieren Sie die Standardwerte für die Pumpe.
  - c Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
  - d Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
- 7 Entfernen Sie die Abfallröhrchen der entsprechenden Fließzelle vom Abfallbehälter.
- 8 Bündeln Sie die Abfallröhrchen mit Parafilm. Achten Sie darauf, dass die Enden nebeneinanderliegen.
- 9 Platzieren Sie die gebündelten Enden der Röhrchen in eine 250-ml-Flasche.
- 10 Wählen Sie **Next** (Weiter), um den Wasserwaschlauf zu starten.

Positionen	Ungefähre Laufzeit
Acht SBS-Positionen	20 Minuten
Acht SBS-Positionen und 10 Paired-End-Positionen	60 Minuten

- 11 Messen Sie nach Abschluss des Waschlaufs die abgegebenen Volumina.

Positionen	Abgegebenes Volumen insgesamt	Abgegebenes Volumen pro Lane
Acht SBS-Positionen	32 ml	4 ml
Acht SBS-Positionen und 10 Paired-End-Positionen	72 ml	9 ml

- 12 Entfernen Sie die Umwicklung von den Abfallröhrchen und setzen Sie sie wieder in die Abfallflasche ein.

## Schnellformatierung der Ausgabe- und Scratch-Laufwerke

Führen Sie nach Abschluss der Datenübertragung eine Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks (O:\) und des Scratch-Laufwerks (S:\) durch. Eine Schnellformatierung löscht das Laufwerk für den nachfolgenden Lauf, ohne wichtige System- oder Gerätewartungsdateien zu entfernen.

Zum Starten eines Laufs mit zwei Fließzellen werden mindestens 2 TB an Speicherplatz benötigt. Wenn der verfügbare Speicherplatz während des Laufs den sicheren Grenzwert unterschreitet, stoppt die Software den Lauf und versetzt die Fließzelle in einen sicheren Status. Nachdem Speicherplatz verfügbar gemacht wurde, wird der Lauf automatisch fortgesetzt.



### HINWEIS

Gerätewartungsprotokolle werden auf dem Laufwerk C:\ gespeichert. Daher kann gefahrlos während eines Gerätewaschlaufs eine Schnellformatierung der Laufwerke O:\ und S:\ vorgenommen werden.

- 1 Öffnen Sie in Windows „Computer“, um eine Liste der Computerlaufwerke anzuzeigen.
- 2 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Laufwerk O:\ und wählen Sie **Formatieren**.
- 3 Aktivieren Sie im Dialogfeld „Formatieren“ das Kontrollkästchen **Schnellformatierung**.
- 4 Wählen Sie **Start**.
- 5 Wiederholen Sie die Schritte 1 bis 4, um das Laufwerk S:\ zu löschen.

# Kapitel 5 Wartung

Einleitung .....	28
Durchführen eines Wartungswaschlaufs .....	28
Versetzen des Geräts in den Leerlauf .....	33
Ausschalten des Geräts .....	34

## Einleitung

Wartungsverfahren gewährleisten eine konstante Leistungsfähigkeit des Geräts.

- ▶ Fahren Sie das Gerät herunter oder versetzen Sie es in den Leerlauf, wenn es für einen gewissen Zeitraum nicht zum Einsatz kommt.
- ▶ Führen Sie neben dem Wasserwaschlauf am Ende jedes Laufs in regelmäßigen Abständen Wartungswaschläufe durch, um die Fluidik zu erhalten.  
Regelmäßige Gerätewaschläufe gewährleisten eine konstante Geräteleistung, indem sie das Fluidiksystem spülen sowie Salzansammlungen und eine Kreuzkontaminierung von Reagenzien verhindern.

## Präventive Wartung

Illumina empfiehlt, jährlich eine präventive Wartung durchführen zu lassen. Wenn Sie keinen Servicevertrag abgeschlossen haben, wenden Sie sich an den für Ihre Region zuständigen Kundenbetreuer oder an den technischen Support von Illumina, um einen Termin für eine kostenpflichtige präventive Wartung zu vereinbaren.

## Durchführen eines Wartungswaschlaufs

Führen Sie alle 10 Tage einen Wartungswaschlauf durch, wenn Sie von der Software dazu aufgefordert werden, oder optional nach einem Lauf. Ein Wartungswaschlauf dauert etwa 90 Minuten. Abhängig von der Verfügbarkeit von ProClin 300 wird einer der beiden folgenden Workflows durchgeführt:

- ▶ **Tween 20- und ProClin 300-Waschlauf:** Spült das System mit einer vom Benutzer vorbereiteten Tween 20- und ProClin 300-Lösung. Siehe *Tween 20- und ProClin 300-Wartungswaschlauf auf Seite 28*.
- ▶ **Tween 20-Waschlauf:** Spült das System mit einer vom Benutzer vorbereiteten Tween 20-Lösung. Möglicherweise ist zusätzlich ein Wasserwaschlauf erforderlich. Siehe *Tween 20-Wartungswaschlauf auf Seite 31*.

Wenn vor einem Wartungswaschlauf der Bildschirm „Load Gasket“ (Dichtung einsetzen) eingeblendet wird, müssen die Dichtungen vor und hinter dem Manifold ausgetauscht werden, bevor der Waschlauf gestartet werden kann.

## Tween 20- und ProClin 300-Wartungswaschlauf

### Vorbereiten der Lösung für den Wartungswaschlauf

Bereiten Sie für ein Gerät 5 Liter Wartungswaschlauf-Lösung vor. Die Lösung kann bis zu 30 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und während dieser Zeit bis zu dreimal verwendet werden.

Entsorgen Sie die Waschlösung gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften für Ihre Region.

- 1 Fügen Sie zuerst das Wasser hinzu und kombinieren Sie die folgenden Volumina, um Tween 20 zu verdünnen:
  - ▶ Wasser in Laborqualität (225 ml)

- ▶ Tween 20 (25 ml)  
Diese Volumina ergeben ca. 10 % Tween 20.
- 2 Platzieren Sie einen Rührstab in einer leeren Ballonflasche mit einem Fassungsvermögen von mindestens 6 Litern.
- 3 Fügen Sie zuerst das Wasser hinzu und kombinieren Sie die folgenden Volumina in der Ballonflasche:
  - ▶ Wasser in Laborqualität (750 ml)
  - ▶ 10 % Tween 20 (250 ml)
  - ▶ ProClin 300 (1,5 ml)
 Diese Volumina ergeben eine Lösung aus ca. 2,5 % Tween 20 und 0,15 % ProClin 300.
- 4 Stellen Sie die Flasche auf eine Rührplatte und mischen Sie gründlich.
- 5 Fügen Sie 4 Liter Wasser in Laborqualität hinzu.  
Diese Volumina ergeben eine Lösung aus ca. 0,5 % Tween 20 und 0,03 % ProClin 300.
- 6 Rühren Sie weiter, bis die Lösung gründlich gemischt ist.
- 7 Legen Sie sie in einem geschlossenen Behälter bei Raumtemperatur beiseite.

## Tween 20 und ProClin 300

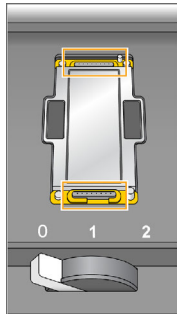
- 1 Wählen Sie auf dem Begrüßungsbildschirm die Option **Wash | Maintenance** (Waschlauf | Wartung).
- 2 Wenn Sie eine frische Wartungswaschlaufösung verwenden, laden Sie das Gerät folgendermaßen mit der Lösung:
  - a Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit 250 ml frischer Waschlösung.
  - b Füllen Sie 10 PE-Röhrchen mit 12 ml frischer Waschlösung.
  - c Weisen Sie jeder Flasche und jedem Röhrchen eine Position im Reagenzien-Rack zu. Behalten Sie die Positionen für die nachfolgenden Waschläufe bei, um Kreuzkontaminationen durch das auf den Sipperrn befindliche Reagenz zu verhindern.
- 3 Wenn Sie die Wartungswaschlaufösung eines vorherigen Laufs aufbewahrt haben, laden Sie das Gerät folgendermaßen mit der Lösung.
  - a Füllen Sie die aufbewahrte Lösung auf und invertieren Sie sie zum Mischen. Füllen Sie die Lösung nicht häufiger als zwei Mal nach dem ursprünglichen Einsatz auf.
  - b Laden Sie die Flaschen und Röhrchen in die zugewiesenen Reagenzien-Rack-Positionen im Gerät.



### HINWEIS

Ein monatlicher Austausch der Waschflaschen und Röhrchen ist in der Regel ausreichend.

- 4 Leeren Sie die Abfallflasche.
- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter).
- 6 Entfernen Sie die Fließzelle vom Fließzellentisch und legen Sie sie beiseite.
- 7 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Latexhandschuhe an.
- 8 Drücken Sie leicht auf eine Seite der vorderen Dichtung, bis sich die andere Seite anhebt. Verwenden Sie eine Pinzette, um die Dichtung zu fassen und zu entfernen. Entfernen Sie die hintere Dichtung auf dieselbe Weise.

**Abbildung 12** Entfernen der gebrauchten Manifold-Dichtungen

- 9 Legen Sie eine neue Dichtung in jede Aussparung vorne und hinten am Fließzellenhalter. Drücken Sie die Dichtungen leicht nach unten.
- 10 Laden Sie die Fließzelle neu, die Sie zum Einsetzen der neuen Dichtungen entfernt hatten.
- 11 Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) aktiviert ist, und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).
- 12 Führen Sie eine Fluidikprüfung mit den Standardwerten für die Pumpe durch:
  - a Wählen Sie Lösung 2 aus der Dropdown-Liste aus.
  - b Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
  - c Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
  - d Falls Sie einen kontinuierlichen Strom von Luftblasen feststellen, ersetzen Sie die Dichtung und wiederholen Sie die Fluidikprüfung.
- 13 Entfernen Sie die Abfallröhrchen der entsprechenden Fließzelle vom Abfallbehälter.
- 14 Bündeln Sie die acht Abfallröhrchen mit Parafilm. Achten Sie darauf, dass die Röhrchenenden einheitlich ausgerichtet sind.
- 15 Platzieren Sie die gebündelten Enden der Röhrchen in eine 250-ml-Flasche.
- 16 Wählen Sie **Next** (Weiter), um den Waschlauf zu starten.
- 17 Wählen Sie nach Abschluss des Waschlaufs **Return to Start** (Zurück zum Anfang).
- 18 Messen Sie das abgegebene Volumen.

Positionen	Abgegebenes Volumen
Acht SBS-Positionen	74 ml
10 Paired-End-Positionen	52 ml
Alle Positionen	15,75 ml pro Lane

**HINWEIS**

Alle Flaschen und Röhrchen werden vollgefüllt, um sicherzugehen, dass die Sipper gespült werden. Das abgegebene Volumen für jede Position variiert jedoch, sodass nach Abschluss des Waschlaufs die Flaschen und Röhrchen unterschiedliche Volumina enthalten.

- 19 Entfernen Sie die Umwicklung von den Abfallröhrchen und setzen Sie sie wieder in den Abfallbehälter ein.

## Tween 20-Wartungswaschlauf

### Vorbereiten der Lösung für den Wartungswaschlauf

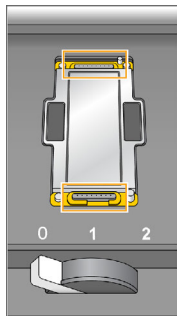
Bereiten Sie für einen Tween 20-Wartungswaschlauf immer eine frische Waschlösung vor. Bereiten Sie 5 Liter Wartungswaschlösung vor. Dieses Volumen ist zum Waschen beider Seiten eines Geräts ausreichend.

Entsorgen Sie die Waschlösung gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften für Ihre Region.

- 1 Fügen Sie zuerst das Wasser hinzu und kombinieren Sie die folgenden Volumina, um Tween 20 zu verdünnen:
  - ▶ Wasser in Laborqualität (225 ml)
  - ▶ Tween 20 (25 ml)
 Diese Volumina ergeben ca. 10 % Tween 20.
- 2 Platzieren Sie einen Rührstab in einer leeren Ballonflasche mit einem Fassungsvermögen von mindestens 6 Litern.
- 3 Fügen Sie zuerst das Wasser hinzu und kombinieren Sie die folgenden Volumina in der Ballonflasche:
  - ▶ Wasser in Laborqualität (750 ml)
  - ▶ 10 % Tween 20 (250 ml)
 Diese Volumina ergeben eine Lösung aus ca. 2,5 % Tween 20.
- 4 Stellen Sie die Flasche auf eine Rührplatte und mischen Sie gründlich.
- 5 Fügen Sie 4 Liter Wasser in Laborqualität hinzu, sodass Sie eine Lösung aus ca. 0,5 % Tween 20 erhalten.
- 6 Rühren Sie weiter, bis die Lösung gründlich gemischt ist.
- 7 Fahren Sie umgehend mit dem Einrichten des Waschlaufs fort.

### Tween 20-Waschlauf

- 1 Wählen Sie auf dem Begrüßungsbildschirm die Option **Wash | Maintenance** (Waschlauf | Wartung).
- 2 Laden Sie das Gerät folgendermaßen mit einer frischen Lösung für den Wartungswaschlauf.
  - a Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit 250 ml frischer Waschlösung.
  - b Füllen Sie 10 PE-Röhrchen mit 12 ml frischer Waschlösung.
- 3 Leeren Sie die Abfallflasche.
- 4 Wählen Sie **Next** (Weiter).
- 5 Entfernen Sie die Fließzelle vom Fließzellentisch und legen Sie sie beiseite.
- 6 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Latexhandschuhe an.
- 7 Drücken Sie leicht auf eine Seite der vorderen Dichtung, bis sich die andere Seite anhebt. Verwenden Sie eine Pinzette, um die Dichtung zu fassen und zu entfernen. Entfernen Sie die hintere Dichtung auf dieselbe Weise.

**Abbildung 13** Entfernen der gebrauchten Manifold-Dichtungen

- 8 Legen Sie eine neue Dichtung in jede Aussparung vorne und hinten am Fließzellenhalter. Drücken Sie die Dichtungen leicht nach unten.
- 9 Laden Sie die Fließzelle neu, die Sie zum Einsetzen der neuen Dichtungen entfernt hatten.
- 10 Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) aktiviert ist, und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).
- 11 Führen Sie eine Fluidikprüfung mit den Standardwerten für die Pumpe durch:
  - a Wählen Sie Lösung 2 aus der Dropdown-Liste aus.
  - b Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
  - c Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
  - d Falls Sie einen kontinuierlichen Strom von Luftblasen feststellen, ersetzen Sie die Dichtung und wiederholen Sie die Fluidikprüfung.
- 12 Entfernen Sie die Abfallröhrchen der entsprechenden Fließzelle vom Abfallbehälter.
- 13 Bündeln Sie die acht Abfallröhrchen mit Parafilm. Achten Sie darauf, dass die Röhrchenenden einheitlich ausgerichtet sind.
- 14 Platzieren Sie die gebündelten Enden der Röhrchen in eine 250-ml-Flasche.
- 15 Wählen Sie **Next** (Weiter), um den Waschlauf zu starten.
- 16 Wählen Sie nach Abschluss des Waschlaufs **Return to Start** (Zurück zum Anfang).
- 17 Messen Sie das abgegebene Volumen.

Positionen	Abgegebenes Volumen
Acht SBS-Positionen	74 ml
10 Paired-End-Positionen	52 ml
Alle Positionen	15,75 ml pro Lane

**HINWEIS**

Alle Flaschen und Röhrchen werden vollgefüllt, um sicherzugehen, dass die Sipper gespült werden. Das abgegebene Volumen für jede Position variiert jedoch, sodass nach Abschluss des Waschlaufs die Flaschen und Röhrchen unterschiedliche Volumina enthalten.

- 18 Entfernen Sie die Umwicklung von den Abfallröhrchen und setzen Sie sie wieder in den Abfallbehälter ein.



## Wasserwaschlauf

Wenn das Gerät nach dem Tween 20-Waschlauf mehr als fünf Tage lang nicht genutzt wird, führen Sie einen Waschlauf durch. Das Wasser spült Tween 20 aus dem Fluidiksystem.

- 1 Wählen Sie auf dem Begrüßungsbildschirm die Option **Wash | Water Wash** (Waschlauf | Wasserwaschlauf) aus.
- 2 Geben Sie Wasser in Laborqualität wie folgt in das Gerät.
  - a Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit mindestens 20 ml Wasser in Laborqualität.
  - b Füllen Sie 10 PE-Röhrchen mit 10 ml Wasser in Laborqualität.



### VORSICHT

Wasser, Flaschen oder Röhrchen, die für den Tween 20-Waschlauf genutzt wurden, dürfen nicht wiederverwendet werden. Das Wasser könnte mit Reagenzien auf den Sippem kontaminiert sein.

- 3 Laden Sie die Flaschen und Röhrchen in das entsprechende Reagenzien-Rack im Gerät.
- 4 Wählen Sie **Next** (Weiter), um den Waschlauf zu starten.
- 5 Messen Sie nach Abschluss des Waschlaufs die abgegebenen Volumina.

Positionen	Abgegebenes Volumen
Acht SBS-Positionen	32 ml
Acht SBS-Positionen und 10 Paired-End-Positionen	72 ml

- 6 Entfernen Sie die Umwicklung von den Abfallröhrchen und setzen Sie sie wieder in den Abfallbehälter ein.

## Versetzen des Geräts in den Leerlauf

Gehen Sie wie nachfolgend beschrieben vor, wenn das Gerät bis zu 10 Tage im Leerlaufmodus bleiben soll. Falls das Gerät länger als 10 Tage nicht verwendet werden soll, schalten Sie es stattdessen aus.

- 1 Führen Sie einen Wartungswaschlauf durch, um das System zu spülen.
- 2 Lassen Sie die Fließzelle auf dem Fließzellentisch, wobei sich der Fließzellenregler in Position 2 befinden muss. Lassen Sie die Manifolds in der angehobenen Position.
- 3 Geben Sie 10 ml Wasser in Laborqualität in jede Position in den Reagenzien-Racks und senken Sie anschließend die Sipper ab.
- 4 Führen Sie vor Verwendung des Geräts einen Wasserwaschlauf durch.

## Ausschalten des Geräts

Gehen Sie wie folgt vor, um die Fluidik sicher vorzubereiten und das System auszuschalten: Schalten Sie das Gerät nur aus, wenn es innerhalb der nächsten 10 Tage oder länger nicht benutzt werden soll. Wenn Sie das Gerät innerhalb der nächsten 10 Tage verwenden möchten, versetzen Sie es stattdessen in den Leerlauf.

- 1 Führen Sie einen Wartungswaschlauf durch, um das System zu spülen.
- 2 Entfernen Sie die Fließzelle vom Fließzelltisch.
- 3 Wischen Sie die Oberfläche des Fließzellenhalters mit einem Alkoholtupfer oder einem fusselfreien, mit Ethanol oder Isopropanol befeuchteten Tuch ab.



### **VORSICHT**

Es darf kein Alkohol in die Vakuumöffnungen oder auf die Umgebung der Manifolds gelangen. Reinigen Sie den Tisch ggf. mit einem fusselfreien Labortuch.

- 4 Geben Sie 10 ml Wasser in Laborqualität in jede Position in den Reagenzien-Racks und senken Sie anschließend die Sipper ab.
- 5 Schalten Sie das Gerät aus.
- 6 So starten Sie das Gerät neu:
  - a Geben Sie Wasser in alle Reagenzienpositionen.
  - b Schalten Sie das Gerät ein.
  - c Führen Sie einen Wasserwaschlauf durch.

# Anhang A Fehlerbehebung

Protokolldatei .....	35
Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration .....	35
Durchführen einer Fluidikprüfung .....	36
Unterbrechen bzw. Beenden eines Laufs auf dem HiSeq X-System .....	36
Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B .....	38
Mögliche Primer-Rehybridisierung für Read 1 .....	38

## Protokolldatei

In der Protokolldatei werden alle in der Steuerungssoftware aufgetretenen Fehler aufgeführt. Verwenden Sie diese Datei zu Fehlerbehebungszwecken.

Wählen Sie zum Aufrufen der Protokolldatei auf dem Begrüßungsbildschirm **Menu | Tools | Show Log** (Menü | Extras | Protokoll anzeigen) aus.

## Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration

Problem	Mögliche Ursache	Aktion
Die Software wurde nicht initialisiert.	Die Software konnte interne Hardwaregeräte nicht initialisieren.	Schließen Sie die Fehlermeldung und starten Sie anschließend die Gerätesoftware neu. Falls das Problem weiterhin besteht, starten Sie den Gerätecomputer neu. Wenn Sie den Computer neu starten möchten, schalten Sie das Gerät zuerst aus, um sicherzustellen, dass das „DoNotEject“-Laufwerk korrekt erkannt wird. Falls das Problem nach dem Neustart des Gerätecomputers weiterhin besteht, schalten Sie das Gerät aus, warten Sie mindestens 60 Sekunden und starten Sie das Gerät anschließend neu.
Der Fließzellenregler ist orange.	Die Fließzelle wurde nicht richtig platziert. Das Vakuum ist nicht dicht. Die Manifolds wurden nicht angehoben.	Entfernen Sie die Fließzelle und wiederholen Sie die Reinigungsschritte. Stellen Sie sicher, dass die Dichtungen vorhanden sind und gut sitzen. Setzen Sie die Fließzelle wieder ein. Falls die vorhergehenden Schritte nicht zum Erfolg führen, ersetzen Sie die Dichtungen und setzen Sie anschließend die Fließzelle erneut ein.
Der Fließzellenregler blinkt orange.	Das Vakuum wirkt zwar, aber unzureichend.	Entfernen Sie die Fließzelle und wiederholen Sie die Reinigungsschritte. Stellen Sie sicher, dass die Dichtungen vorhanden sind und gut sitzen. Setzen Sie die Fließzelle wieder ein. Falls die vorhergehenden Schritte nicht zum Erfolg führen, ersetzen Sie die Dichtungen und setzen Sie anschließend die Fließzelle erneut ein.
Der Fließzellenregler blinkt grün.	Der Vakuumdruck ist zufriedenstellend.	Stellen Sie den Fließzellenregler auf Position 2.

Problem	Mögliche Ursache	Aktion
Schlechte Flüssigkeitsabgabe.	Möglicherweise Luftblasen im System.	Positionieren Sie die Fließzelle neu und überprüfen Sie, ob die Aussparungen nach <b>unten</b> zeigen. Suchen Sie im Bereich der Dichtungen nach weißen Ablagerungen. Falls Ablagerungen vorhanden sind, tauschen Sie die Dichtungen aus. Tauschen Sie die Dichtungen vor jedem Gerätewartungswaschlauf aus. Überprüfen Sie, ob die Sipper-Einheiten vollständig abgesenkt wurden und jeder Sipper in Kontakt mit den Reagenzien ist.

## Durchführen einer Fluidikprüfung

Führen Sie während der Geräteinstallation und bei der Behebung von Fluidikproblemen eine Fluidikprüfung durch.

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Check** (Prüfung).
- 2 Scannen Sie die Waschlauf-Fließzellen-ID (Barcode Nummer) der Primer-Fließzelle ein oder geben Sie sie ein. Stellen Sie sicher, dass Sie eine **gebrauchte** Fließzelle verwenden.
- 3 Setzen Sie die gebrauchte Fließzelle in das Gerät ein.
- 4 Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit PW1 oder mit Wasser in Laborqualität und laden Sie die Flaschen auf das SBS-Reagenzien-Rack.
- 5 Wählen Sie Lösung 2 aus der Dropdown-Liste aus.
- 6 Überprüfen Sie die folgenden Standardwerte:
  - ▶ Volume (Volumen): **250**
  - ▶ Aspirate Rate (Aspirationsrate): **250**
  - ▶ Dispense Rate (Zufuhrtrate): **2.000**
- 7 Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
- 8 Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
- 9 Wenn übermäßig viele Luftblasen vorhanden sind, gehen Sie wie folgt vor:
  - a Überprüfen Sie die Manifold-Dichtungen auf Verstopfungen.
  - b Senken Sie die Aspirationsrate auf 100.
  - c Pumpen Sie weitere 250 µl Wasser in die Fließzelle.

## Unterbrechen bzw. Beenden eines Laufs auf dem HiSeq X-System

Beim Beenden eines Laufs gibt es keine Option, Daten zu speichern oder den Lauf wieder aufzunehmen. Das Unterbrechen eines Laufs ist ggf. erforderlich, um die Laufkomponenten zu überprüfen oder um einen Lauf auf der benachbarten Fließzelle zu konfigurieren.

### Unterbrechen eines Laufs

Das Unterbrechen eines Laufs ist möglich, um ggf. die Laufkomponenten, z. B. die Reagenzienmengen, zu prüfen. Im normalen Betrieb gibt es keinen Grund, einen Lauf zu unterbrechen.

RTA2 nimmt die Verarbeitung nach der Fortsetzung eines unterbrochenen Laufs automatisch wieder auf. Der Lauf kann also ohne Datenverlust fortgesetzt werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Echtzeitanalyse auf Seite 39](#).

- 1 Wählen Sie im Laufübersichtsbildschirm die Option **Pause** (Unterbrechen) | **Normal Pause** (Normale Unterbrechung).
- 2 Wählen Sie **Yes** (Ja), um die Auswahl zu bestätigen.  
Die Software beendet den aktuellen Chemie- oder Bildgebungsvorgang und versetzt die Fließzelle in einen sicheren Status.
- 3 Wählen Sie **Resume** (Fortsetzen), um den Lauf fortzusetzen.

## Wechseln von Reagenzien während des Laufs

Wenn Sie den Lauf mit nicht vollständig gefüllten Reagenzien starten, wählen Sie die Funktion „Change Reagents“ (Reagenzien wechseln), um den Lauf anzuhalten und die Reagenzien aufzufüllen.



### HINWEIS

Das Vorfüllen der Reagenzien ist nicht erforderlich.

- 1 Wählen Sie im Laufübersichtsbildschirm die Option **Pause** (Unterbrechen), um das Menü „Pause“ (Unterbrechen) zu öffnen.
- 2 Wählen Sie **Change Reagents** (Reagenzien wechseln).
- 3 Wählen Sie **Yes** (Ja), um den Befehl „Pause“ (Unterbrechen) zu bestätigen.  
Die Software beendet den aktuellen Chemie- oder Bildgebungsvorgang, versetzt die Fließzelle in einen sicheren Status und öffnet den Bildschirm „Reagents“ (Reagenzien).
- 4 Geben Sie die folgenden Parameter ein:
  - ▶ Die Reagenzien-Kit-ID für die neuen Reagenzien.
  - ▶ Die Anzahl der Zyklen, für die die Reagenzien ausreichen sollen.
- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter), um mit dem Laden der Reagenzien fortzufahren.

## Beenden eines Laufs

Wenn RTA2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert. Daher kann ein Lauf nicht fortgesetzt werden, nachdem er gestoppt wurde.



### VORSICHT

Das Beenden eines Laufs auf dem HiSeq X ist *endgültig*.

- 1 Wählen Sie zum Beenden des Laufs **Abort** (Abbrechen). Bestätigen bzw. brechen Sie die Ausführung des Befehls ab.
- 2 Wenn Sie den Befehl bestätigen, wird der Begrüßungsbildschirm angezeigt.
- 3 Fahren Sie mit dem Verfahren nach einem Lauf fort.



### HINWEIS

Falls ein Lauf während Read 1 gestoppt wird, ist es möglich, eine Primer-Rehybridisierung auf dem cBot durchzuführen. Starten Sie nach der Primer-Rehybridisierung einen neuen Lauf auf dem HiSeq X, um die Fließzelle zu sequenzieren.

## Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B

- 1 Wählen Sie **Pause** | **Normal Pause** (Unterbrechen | Normale Unterbrechung) aus.
- 2 Warten Sie, bis der aktuelle Chemie- oder Bildgebungsschritt abgeschlossen wurde. Das System wird automatisch in einen sicheren Zustand versetzt.
- 3 Überprüfen Sie, ob der Lauf erfolgreich angehalten wurde. Wenn der Lauf angehalten wurde, wird die Schaltfläche „Resume“ (Fortsetzen) angezeigt.
- 4 Konfigurieren Sie den neuen Lauf.
- 5 Sobald Sie die neue Fließzelle für den neuen Lauf geladen haben, schließen Sie die Tür der Fließzellenkammer.
- 6 Wählen Sie **Start**, um den neuen Lauf zu starten.
- 7 Wählen Sie **Resume** (Fortsetzen) auf der benachbarten Fließzelle, um den unterbrochenen Lauf fortzusetzen. Die Software steuert automatisch die Chemie- und Bildgebungsverfahren auf beiden Fließzellen.

## Mögliche Primer-Rehybridisierung für Read 1

Wenn die Laufkennzahlen für Read 1 niedrige Clusterzahlen oder niedrige Intensitäten zeigen oder auf andere Probleme hindeuten, können Sie eine Primer-Rehybridisierung für Read 1 durchführen, um die Fließzelle zu retten. Die Primer-Rehybridisierung für Read 1 wird auf dem cBot-System durchgeführt und beschädigt nicht die Cluster auf der Fließzelle.

Zur Durchführung einer Primerhybridisierung für Read 1 auf einer strukturierten HiSeq X-Fließzelle benötigen Sie folgende Verbrauchsmaterialien von Illumina:

- ▶ HiSeq X HD cBot-Multi-Primer-Rehybridisierungs-Kit (Katalog-Nr. GD-305-2001)
- ▶ HiSeq-cBot-Manifold (Katalog-Nr. SY-401-2015)

Weitere Informationen finden Sie in *Read 1-Primer-Rehybridisierung auf einer HiSeq X-Fließzelle (Dokument-Nr. 15053711)*.

# Anhang B Echtzeitanalyse

Überblick über die Echtzeitanalyse .....	39
Echtzeitanalyse-Workflow .....	40

## Überblick über die Echtzeitanalyse

Das HiSeq X-System nutzt eine Implementierung der Echtzeitanalyse-Software namens RTA2. RTA2 wird auf dem Gerätecomputer ausgeführt und extrahiert Intensitäten aus Bildern, führt das Base-Calling durch und weist dem Base-Call einen Qualitäts-Score zu. RTA2 und die Steuerungssoftware kommunizieren über ein HTTP-Webinterface und gemeinsame Speicherbereiche. Wenn RTA2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert.



### HINWEIS

Die Demultiplexierungsleistung wird nicht berechnet. Daher wird die Registerkarte „Index“ im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) nicht ausgefüllt.

## Eingabedateien

RTA2 benötigt die folgenden Eingabedateien:

- ▶ Die im lokalen Speicher des Systems gespeicherten Plattenbilder.
- ▶ RunInfo.xml, die von der Steuerungssoftware zu Beginn des Laufs automatisch generiert wird. RTA2 liest aus dieser Datei den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen und die Angabe, ob ein Read indiziert ist, sowie die Anzahl der Platten auf der Fließzelle.
- ▶ RTA.exe.config, eine Softwarekonfigurationsdatei im XML-Format.

RTA2 erhält Befehle von der Steuerungssoftware, die über den Speicherort der Datei RunInfo.xml und darüber informieren, ob ein optionaler Ausgabeordner angegeben wurde oder nicht.

## Ausgabedateien

Bilder von jedem Kanal werden gespeichert und als Platten an RTA2 übergeben. RTA2 generiert von diesen Bildern die Primäranalyse-Ausgabe, die mehrere hinsichtlich ihrer Qualität ausgewertete Base-Call-Dateien und Filter-Dateien umfasst. Andere Dateien unterstützen die Generierung primärer Ausgabedateien.

- ▶ **Base-Call-Dateien:** Für jede analysierte Platte wird eine komprimierte Base-Call-Datei (\*.bcl) pro Zyklus generiert. Die Base-Call-Datei enthält den Base-Call und den entsprechenden Qualitäts-Score.
- ▶ **Filterdateien:** Jede Platte liefert Filterinformationen, die pro Platte über den gesamten Lauf in einer Filterdatei (\*.filter) gespeichert werden. Die Filterdatei gibt an, ob Cluster die Filter passiert haben.
- ▶ **Clusterpositionsdateien:** Die Clusterpositionsdatei (s.locs) enthält die X- und Y-Koordinaten jedes Clusters auf der Fließzelle.

Die primären Ausgabedateien werden für die anschließende Datenanalyse verwendet. Mit der Konvertierungssoftware bcl2fastq können Sie die Demultiplexierung und die FASTQ-Konvertierung durchführen. Verwenden Sie bcl2fastq v2.14.03.07 oder höher zum Konvertieren von HiSeq X-Daten. Die aktuelle Softwareversion und Informationen zum Download finden Sie auf der HiSeq X-Supportseite der Illumina-Website.

RTA2 liefert Echtzeitkennzahlen zur Laufqualität, die in InterOp-Dateien gespeichert werden. InterOp-Dateien sind Binärdateien mit Kennzahlen zu Platten, Zyklen und zur Read-Ebene. Sie werden benötigt, um Kennzahlen im Sequenzierungsanalyse-Viewer ansehen zu können. Verwenden Sie zur Anzeige der von RTA2 generierten Kennzahlen SAV v1.8.37 oder höher.

Näheres zu den einzelnen Ausgabedateien finden Sie unter [Sequenzierungsausgabedateien auf Seite 45](#).

## Fehlerbehandlung

RTA2 erstellt Protokolldateien und speichert sie im Ordner „RTALogs“. Fehler werden im \*.tsv-Format in einer Fehlerdatei aufgezeichnet.

Wenn die Verarbeitung abgeschlossen ist, werden die folgenden Protokoll- und Fehlerdateien an das endgültige Ausgabeziel übertragen:

- ▶ \*GlobalLog\*.tsv enthält eine Zusammenfassung wichtiger Lauf-Ereignisse.
- ▶ \*LaneNLog\*.tsv listet die Verarbeitungsereignisse pro Lane auf.
- ▶ \*Error\*.tsv protokolliert während des Laufs aufgetretene Fehler.
- ▶ \*WarningLog\*.tsv führt während des Laufs aufgetretene Warnungen auf.

## Datenübertragung

Während des Laufs fordert RTA2 eine Datenübertragung vom Laufkopierdienst an, der Software, die die Übertragung zum angegebenen Ausgabeordner steuert. Wenn der BaseSpace Sequence Hub verwendet wird, sorgt der BaseSpace Broker für die Übertragung von Daten an den BaseSpace Sequence Hub. Wenn die Netzwerkverbindung unterbrochen wird, fährt RTA2 mit der Verarbeitung fort und speichert die Daten lokal. Nach Wiederherstellung der Verbindung wird die Datenübertragung automatisch fortgesetzt.

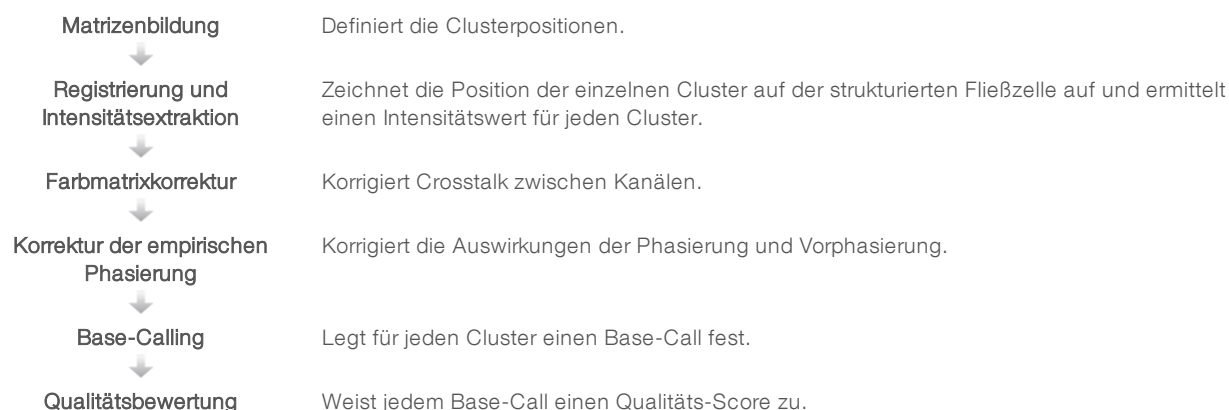


### HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass Ihre Netzwerkverbindung die Mindestanforderungen zum Senden der Laufdaten an den BaseSpace Sequence Hub erfüllt. Weitere Informationen finden Sie im Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung.

Nach Abschluss des Vorgangs erstellt RTA2 eine Markerdatei namens „RTAComplete.txt“. Die Datenübertragung wird abgeschlossen, sobald diese Datei generiert wurde. Eine Sensoranzeige im unteren Bereich des Bildschirms zeigt den Übertragungsstatus an. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Aktivitäts- und Sensoranzeigen auf Seite 5](#).

## Echtzeitanalyse-Workflow





## Matrizenbildung

Bei der Matrizenbildung werden die einzelnen Clusterpositionen in einer Platte anhand von X- und Y-Koordinaten definiert. Die Matrize dient im nachfolgenden Schritt „Registrierung und Intensitätsextraktion“ als Referenz.

Aufgrund des Arrays auf den strukturierten Fließzellen werden Clusterpositionen vorab nach der Anzahl der Reihen und Spalten sowie der Distanz zwischen Nanowells bestimmt. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Strukturierte Fließzelle auf Seite 7*.

Die Clusterpositionen des gesamten Laufs werden in einer Clusterpositionsdatei (s.locs) gespeichert.

## Registrierung und Intensitätsextraktion

Die Registrierung und die Intensitätsextraktion werden durchgeführt, nachdem die Matrize mit den Clusterpositionen erstellt wurde.

- ▶ Bei der Registrierung werden die Clusterpositionen in der Matrize an die Positionen auf dem Bild in jedem der vier Farbkanäle übertragen.
- ▶ Die Intensitätsextraktion ermittelt für ein bestimmtes Bild einen Intensitätswert für jeden Cluster in der Matrize.

Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden für diese Platte in diesem Zyklus keine Base-Calls erzeugt. Sehen Sie sich die Miniaturbilder im SAV an und überprüfen Sie, ob die Registrierung bei einzelnen Bildern fehlgeschlagen ist.

## Farbmatrixkorrektur

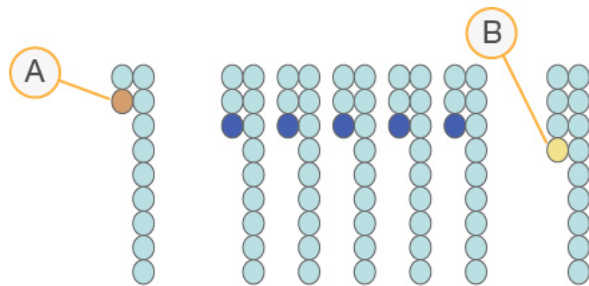
Nach der Registrierung und Intensitätsextraktion korrigiert RTA2 den Crosstalk zwischen Kanälen. Crosstalk tritt z. B. auf, wenn ein Cluster Intensität in Kanal C und auch etwas Intensität in Kanal A zeigt. RTA2 korrigiert mithilfe einer 4-x-4-Farbmatrix die Intensitäten, sodass sie nur einen geringen oder keinen Crosstalk aufweisen, und gleicht Unterschiede in der Gesamtintensität zwischen den Farbkanälen aus.

## Korrektur der empirischen Phasierung

Während der Sequenzierungsreaktion erweitert sich jeder DNA-Strang in einem Cluster um eine Base pro Zyklus. Die Phasierung und Vorphasierung finden statt, wenn eine Phasenverschiebung eines Strangs mit dem aktuellen Inkorporationszyklus eintritt.

- ▶ Eine Phasierung tritt ein, wenn eine Base zurückfällt.
- ▶ Eine Vorphasierung tritt ein, wenn eine Base vorseilt.

**Abbildung 14** Phasierung und Vorphasierung



- A Read mit einer phasierenden Base
- B Read mit einer vorphasierenden Base

RTA2 verwendet den Algorithmus zur Korrektur der empirischen Phasierung, um die Auswirkungen der Phasierung und der Vorphasierung zu korrigieren. Bei diesem Algorithmus wird während jedes Zyklus des Laufs die Datenqualität maximiert.

## Base-Calling

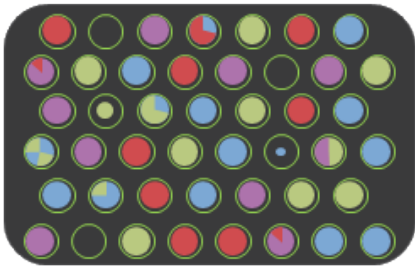
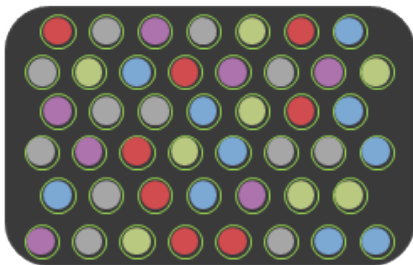
Nach der Korrektur der Roh-Intensitäten für Crosstalk, Phasierung und Vorphasierung ist der Kanal mit der hellsten Intensität der Call für diesen Cluster in diesem Zyklus. Das Base-Calling beginnt auf einem HiSeq X, das RTA2 verwendet, nach Zyklus 3.

Beim Base-Calling wird eine Base (A, C, G oder T) für jeden Cluster einer bestimmten Platte eines bestimmten Zyklus festgelegt. Base-Calls werden in Base-Call-Dateien (\*.bcl) gespeichert. Base-Call-Dateien sind Binärdateien mit 1 Byte pro Call und Qualitäts-Score. Jede Base-Call-Datei enthält den Base-Call und den entsprechenden Qualitäts-Score. Um einen Base-Call durchzuführen, müssen die Cluster zunächst den Reinheitsfilter passieren. Cluster, die den Filter nicht passieren oder nicht aufgerufen werden können, weil sie außerhalb des Bildes sind oder die Bildregistrierung fehlgeschlagen ist, werden als No-Calls beschriftet. No-Calls werden mit (N) dargestellt.

## Cluster nach Filterung

Während der ersten 25 Zyklen von Read 1 entfernt der Reinheitsfilter Cluster niedriger Qualität aus den Analyseergebnissen. Cluster passieren den Filter, wenn nicht mehr als ein Base-Call einen Reinheitswert unter 0,6 in den ersten 25 Zyklen aufweist. Die Reinheit ist definiert als das Verhältnis der hellsten Basenintensität dividiert durch die Summe der hellsten und der zweithellsten Basenintensität. Der Prozentsatz der Cluster nach Filterung wird in Analyseberichten als %PF dargestellt.

Die strukturierte HiSeq X-Fließzelle verfügt über ein geordnetes Array von Clustern. Leere Wells ohne Cluster sowie polyklonale Wells, bei denen mehr als eine Sequenz vorhanden ist, sind in der Roh-Cluster-Anzahl enthalten, passieren aber nicht den Filter. Daher liefert ein geordnetes Array auf einer strukturierten Fließzelle einen relativ niedrigen Prozentsatz von Clustern nach Filterung.

**Abbildung 15** Leere und polyklonale Wells (in der Roh-Cluster-Anzahl enthalten)**Abbildung 16** Wells mit Clustern, die nicht den Filter passieren (grau dargestellt)

## Qualitätsbewertung

Ein Qualitäts-Score oder Q-Score ist eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Base-Calls. Je höher der Q-Score ist, desto höher ist die Qualität des Base-Calls und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser korrekt ist.

Der Q-Score ist eine kompakte Möglichkeit, kleine Fehlerwahrscheinlichkeiten zu kommunizieren.  $Q(X)$  repräsentiert Qualitäts-Scores, wobei X für den Score steht. Die folgende Tabelle zeigt die Beziehung zwischen dem Qualitäts-Score und der Fehlerwahrscheinlichkeit.

Q-Score $Q(X)$	Fehlerwahrscheinlichkeit
Q40	0,0001 (1 von 10.000)
Q30	0,001 (1 von 1.000)
Q20	0,01 (1 von 100)
Q10	0,1 (1 von 10)



### HINWEIS

Die Qualitätsbewertung basiert auf einer geänderten Version des Phred-Algorithmus.

Die Qualitätsbewertung berechnet für jeden Base-Call mehrere Fehlerwahrscheinlichkeiten und ermittelt anhand der Prognosewerte den Q-Score aus einer Qualitätstabelle. Qualitätstabellen werden erstellt, um optimale Qualitätsprognosen für Läufe zu liefern, die auf spezifisch konfigurierten Sequenzierungsplattformen mit bestimmten Chemie-Versionen durchgeführt werden.

Nachdem der Q-Score ermittelt wurde, werden die Ergebnisse in Base-Call-Dateien gespeichert.

## Q-Score-Gruppierung

RTA2 gruppiert die Qualitäts-Scores in bestimmte Bereiche und weist jedem Bereich einen Wert zu. Die Q-Score-Gruppierung reduziert den Speicherplatzbedarf erheblich, ohne die Genauigkeit und Leistung von nachgeschalteten Anwendungen zu beeinträchtigen.

Die Q-Score-Gruppierung trägt zur Effizienz der Analyseverfahren und Datenübertragungsanforderungen bei, die mit dem hohen Durchsatz des HiSeq X einhergehen. Die resultierende \*.bcl-Datei ist kleiner, da die Komprimierungsalgorithmen die Datei besser komprimieren können. Es werden weniger Daten auf den Gerätecomputer geschrieben und auf einen Speicherort im Netzwerk übertragen, wodurch das Kopieren der Dateien schneller erfolgt.

# Anhang C Ausgabedateien und -ordner

Sequenzierungsausgabedateien .....	45
Ordnerstruktur der Ausgabedaten .....	46
Name und Pfad des Laufordners .....	46
Plattenummerierung .....	47

## Sequenzierungsausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Base-Call-Dateien	Die Analyseergebnisse der einzelnen Platten werden in Base-Call-Dateien gespeichert. Sie enthalten den Base-Call und den kodierten Qualitäts-Score. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien für jede Lane werden pro Zyklus in den jeweiligen Ordnern gespeichert. <b>s_[Lane]_[Platte].bcl.gz</b> , wobei „Lane“ der Platzhalter für die einstellige Nummer der Lane und „Platte“ der Platzhalter für die vierstellige Plattenummer ist. Die Base-Call-Dateien werden mit dem gzip-Tool komprimiert.
Clusterpositionsdateien	Die Clusterpositionsdateien für die einzelnen Platten enthalten die X- und Y-Koordinaten jedes Clusters. Clusterpositionsdateien werden bei der Matrizenbildung generiert. Data\Intensities: Eine Datei für den gesamten Lauf wird im Ordner „Intensities“ gespeichert. <b>s.locs</b>
Filterdateien	Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Filterdateien werden bei Zyklus 26 generiert und verwenden 25 Datenzyklen. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien werden pro Lane und Platte in einem entsprechenden Ordner gespeichert. <b>s_[Lane]_[Platte].filter</b>
InterOp-Dateien	Binäre Berichtsdateien, die im Sequenzierungsanalyse-Viewer verwendet werden. InterOp-Dateien werden während des Laufs aktualisiert. InterOp-Ordner
Echtzeitanalyse-Konfigurationsdatei	Die RTA-Konfigurationsdatei wird zu Beginn des Laufs generiert. Sie enthält die Einstellungen für den Lauf. [Stammordner] <b>RTAConfiguration.xml</b>
Laufinformationsdatei	Enthält den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen in jedem Read, die Angabe, ob der Read indiziert ist, sowie die Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle. Die Laufinformationsdatei wird am Anfang des Laufs generiert. [Stammordner] <b>RunInfo.xml</b>
Miniaturbilddateien	Während der Bildgebung wird bei jedem Zyklus ein Miniaturbild für jeden Kanal und jede Platte in den einzelnen Bildstreifen erzeugt. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: Für jede Lane wird ein Ordner und für jeden Zyklus ein entsprechender Unterordner angelegt. <b>s_[Lane]_[Platte]_[Kanal].jpg</b> ; „Platte“ ist der Platzhalter für die vierstellige Zahl, die die Oberfläche, die Bildstreifen und die Platte angibt. Siehe <i>Plattenummerierung</i> auf Seite 47.


## Ordnerstruktur der Ausgabedaten

 **Config** – Enthält Konfigurationsdateien für den Lauf.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]** – Base-Call-Dateien für jede Lane, zusammengefasst in einer Datei pro Zyklus.

 s.locs

 **Images**

 **Focus**


 **L00[X]** – Fokusbilder für jede Lane.

 **InterOp** – Vom Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) verwendete Binärdateien.

 **Logs** – Protokolldateien, die betriebliche Ereignisse beschreiben.

 **Recipe** – Laufspezifische Rezepturdatei mit der Reagenzienkartuschen-ID als Name.

 **RTALogs** – Protokolldateien, in denen RTA2-Ereignisse beschrieben sind.

 **Thumbnail\_Images** – Für jeden Zyklus und jede Base generierte Miniaturbilder von neun Positionen einer Teilmenge von Platten.

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

## Name und Pfad des Laufordners

Der Laufordner ist der Stammordner für die Ausgabe eines Sequenzierungslaufs. Wenn Sie den Lauf konfigurieren, fordert Sie die Software zur Eingabe des Pfads des Laufordners auf. Standardmäßig hat der Name des Ordners das folgende Format:

JJMMTT\_<Computername>\_<Laufnummer>\_<Fließzellenseite><Fließzellen-ID>

**Beispiel:** 110114\_SN106\_0716\_A90095ACXX

Die Laufnummer wird jedes Mal, wenn das Gerät einen Sequenzierungslauf durchführt, um eins erhöht. Die Fließzellenseite (A oder B) und die Fließzellen-ID, die Sie beim Konfigurieren des Laufs eingegeben haben, werden an das Ende des Laufordnernamens angehängt.

Der Laufordner wird in dem Ausgabepfad gespeichert, den Sie bei der Laufkonfiguration angegeben haben. Der temporäre Laufordner für Fließzelle A wird auf das Laufwerk D: und der temporäre Laufordner für Fließzelle B wird auf das Laufwerk E: geschrieben.

## Plattenummerierung

Die strukturierte Fließzelle des HiSeq X-Systems wird für jeden Zyklus in 96 Platten auf jeder Lane oben und unten aufgenommen. Jede der acht Lanes verfügt über zwei Bildstreifen mit je 24 Platten. Die Platten werden entsprechend ihrer Position nummeriert.



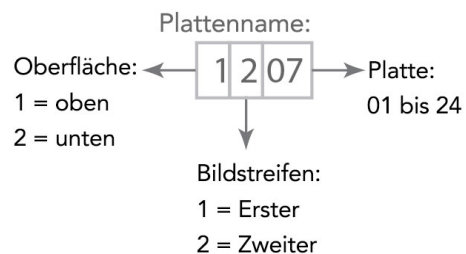
### HINWEIS

Ein Bildstreifen ist eine Plattenreihe innerhalb einer Lane der Fließzelle.

Bei dem Plattenamen handelt es sich um eine vierstellige Zahl, die die Position der Fließzelle darstellt.

- ▶ Die erste Ziffer steht für die Oberfläche:
  - ▶ 1 steht für oben
  - ▶ 2 steht für unten
- ▶ Die zweite Ziffer steht für den Bildstreifen:
  - ▶ 1 steht für den ersten Bildstreifen
  - ▶ 2 steht für den zweiten Bildstreifen
- ▶ Die letzten beiden Ziffern stehen für die Platte, von 01 bis 24. Die Plattenummerierung beginnt bei 01 am Ausgabeende der Fließzelle bis 24 am Eingabeende.

**Abbildung 17** Plattenummerierung



In diesem Beispiel handelt es sich um eine Platte aus der oberen Oberfläche der Fließzelle, den zweiten Bildstreifen und die siebte Platte.

# Index

## A

- Abfallröhrchen 21, 30, 32
- Abgegebene Volumina
  - Vorfüllen 21
  - Wartungswaschläufe 30, 32
  - Wasserwaschläufe 26
- An PhiX ausrichten 16
- Anschließen von USB-Kabeln 8
- Anwendungen, installiert 4
- Anzahl der Zyklen
  - Standard 17
- Aufzeichnen von Fließzellen-IDs 16
- Aufzeichnen von Reagenzien-Kit-IDs 17
- Ausgabelaufwerk 27
- Ausgabeordner
  - Speicherorte 9, 15
  - Struktur 46

## B

- Barcodescanner 14
- Base-Call-Dateien 42
- BaseSpace Broker 40
- BaseSpace Enterprise 10
- BaseSpace Sequence Hub
  - Datenübertragung 40
  - Domänenkonfiguration 10
  - Integration 1
  - Mit Lauf verbinden 15
  - Probenblätter 17
  - Symbole 6
- bcl2fastq, Version 39
- Benachbarte Läufe 38
- Benennung
  - Läufe 16
  - Laufordner 9, 46
  - Platten 47
- Bericht zur ersten Base 16
- Berichte
  - Integration der ersten Base 24
- Bilder speichern 15
- Bildstreifen 15, 47
- Blinkender Fließzellenregler 35

## C

- Chemie-Einstellungen 16
- Chemische Schritte überwachen 24

- Clarity LIMS X Edition 1
- Cluster-Array 42
- Clusterpositionen 7, 41
- Clusterqualität 42
- Compliance 2
- Crosstalk 41

## D

- Dateispeicherorte 45-46
- Daten
  - An Illumina senden 10
  - Illumina Proactive 10
  - Komprimierung 44
  - Konvertieren 39
- Datenübertragung 27, 40
- Datenübertragungsstatus
  - BaseSpace Sequence Hub 6
  - Laufkopierdienst 6
- Datenverlust 37, 39
- Definition der Clusterpositionen 41
- Demultiplexierung 39
- Dichtungen 28
- Dichtungen, Fehlerbehebung 36
- Dokumentation 2, 52
- Domäne konfigurieren 10

## E

- Einschalten des Geräts 8
- Einstellungen, Software 9
- Erforderlicher Speicherplatz 27
- Erwartete Volumina
  - Vorfüllen 21
  - Wartungswaschläufe 30, 32
  - Wasserwaschläufe 26

## F

- Farben, Statusleiste 3
- FASTQ-Konvertierung 39
- Fehler 40
  - Wahrscheinlichkeit 43
- Fehlerprotokolle 35, 40
- Fenster „Menu Options“ (Menüoptionen) 9
- Fließzelle
  - Cluster-Array 41-42
  - Positionierung 3, 20, 22
  - Strukturiert 7



- Überprüfen 21, 23
- Vorfüllen 19
- Fließzellen
  - Bildgebung 47
- Fließzellen-ID aufzeichnen 16
- Fließzellenregler 3
  - Blinkt 35
  - Orange 35
- Fließzellenseite 3, 46
- Fluidik
  - Wartung 25
- Fluidiksystem 3
  - Fehlerbehebung 36
  - Wartung 28
  - Zugriff auf 3
- Freigeben von Speicherplatz 27
- Führungsstifte 20, 22

## G

- Generieren von Rezepturen 16

## H

- Hardware-Merkmale 1
- HCS 4
  - Ansichtsoptionen 9
  - Fehlerprotokolle 35
  - Navigation 14
  - Öffnen 8
- Hilfe
  - Clustering 12
  - Dokumentation 2
  - Illumina SeqLab 1-2
  - Primer-Rehybridisierung 38
  - SAV 25
- Hilfe, technische 52

## I

- Illumina SeqLab 1-2
- Indizierung von Reagenzienpositionen 19
- Indizierungsoptionen 16
- Indizierungsschema 17
- Initialisieren der Software 8
- Initialisieren der Software, Fehlerbehebung 35
- Installation, Fluidikprüfung 36
- Integration der ersten Base 24
- Intensitäten überwatchen 24
- Intensitätswerte 41

- InterOp-Dateien 39, 45

## K

- Kammern 2
- Katalognummern
  - Illumina-Reagenzien-Kits 7
  - Illumina-Rehybridisierungs-Kits 38
  - Manifolds 38
  - Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien 11
- Kits, Reagenzien 7
- Konfigurationsdatei 45
- Kontroll-Lane 16
- Konvertieren von Daten 39
- Kreuzkontaminierung vermeiden 12, 29
- Kundendienst 52

## L

- Laboreinrichtung 2, 40
- Lagerung der Wartungswaschlaufösung 28, 31
- Lanes
  - Fließzelle 16, 47
- Laufinformationsdatei 45
- Laufkennzahlen 24, 39
- Laufkopierdienst 6, 40
- Laufkopierdienst-Symbole 6
- Laufordner, temporär 46
- Laufparameter überprüfen 17
- Laufübersichtsbildschirm 24
- Leerlauf, zulässige Dauer 33
- Leistungsspezifikationen 14
- LIMS
  - Einstellungen 9
  - Illumina SeqLab 1
  - Server 9
- Luftblasen 21, 23

## M

- Markerdatei 40
- Miniaturbilder 15, 45

## N

- Nachwaschlauf 25
- Nanowells 7
- Netzwerkverbindung 40
- Neustart des Geräts 34

No-Calls (N) 42

## O

Online-Support 2  
 Optikmodul 2  
 Optionen im Menü „Pause“ 38  
 Optionen im Menü „Pause“ (Unterbrechen) 37  
 Orangefarbener Fließzellenregler 35  
 Ordnerspeicherorte 9, 46  
 Ordnerstruktur 46

## P

PE-Reagenzienpositionen 19  
 PF % 42  
 Phasierung 41  
 PhiX  
   Alignment 16  
   Kontroll-Lane 16  
 Phred-Algorithmus 43  
 Platten 39, 47  
 Polyklonale Wells 42  
 Positionen, Reagenzien  
   Indizierung 19  
   PE 19  
   SBS 18  
 Positionieren der Fließzellen 20, 22  
 Präventive Wartung 28  
 Probenblätter erforderlich 17  
 Protokolldateien 45  
 PSM, Wirbelmuster 12

## Q

Qualitäts-Scores 43  
   Überwachen 24  
 Qualitätstabellen 43

## R

Racks, Reagenzien 3  
 Read 1-Fehlerbehebung 38  
 Read 2-Resynthese 13  
 Reagenzien  
   Indizierung 13  
   Menge pro Lauf 12-13  
   Nach dem Lauf 25  
   Paired-End 13  
   SBS 12

Vorbereiten 12  
   Wechsel während des Laufs 37  
 Reagenzien-Kit 7  
 Reagenzien-Kit-ID aufzeichnen 17  
 Reagenzien-Racks 3  
 Reagenzienkühler, Temperatur 4  
 Reagenzienpositionen  
   PE-Rack 19  
   SBS-Rack 18  
 Registrierung, Fehlerbehebung 41  
 Rehybridisierung 37-38  
 Reinheitsfilter 42  
 Remote-Überwachung 15  
 Rezepturen 16  
 RTA 4  
 RTA2  
   Beenden eines Laufs 37  
   Eingabedateien 39  
   Ende der Verarbeitung 39

## S

SAV 4  
   Dokumentation 25  
   Index (Registerkarte) 39  
   InterOp-Dateien 45  
   Version 39  
 SBS-Reagenzien-Positionen 18  
 Scratch-Laufwerk 27  
 Sensoranzeigen  
   BaseSpace Sequence Hub 6  
   Laufkopierdienst 6  
 Sensoren 5  
 Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien 7  
 Sequenzierungsschritte, Überblick 14  
   RTA 40  
 Sicherheit 2  
 Software  
   Fehlerbehebung 35  
   Installierte Anwendungen 4  
   Merkmale 1  
 Speicherbereiche 39  
 Speicherkapazität  
   Optimierung 44  
 Speichern von Miniaturbildern 15  
 Speicherort des Laufordners 46  
 Spezifikationen, Leistung 14  
 Standardspeicherorte der Ordner 9  
 Standardzyklen 17  
 Standortvorbereitung 2, 40  
 Statusleistenfarben 3

Strukturierte Fließzelle 1, 7, 41  
Supportseiten 2  
Symbole 5  
    Datenübertragungsstatus 6

## T

Technische Unterstützung 52  
Temperatur, Reagenzienkühler 4  
Temporäre Ordner 46  
Trichterverschlüsse 18

## U

Überwachungsdienst Illumina Proactive 10  
Undichtigkeiten 21, 23  
USB-Kabel anschließen 8

## V

Vakuumsystem 3  
Verbleibende Zyklen 17  
Verbrauchsmaterialien  
    Illumina 7  
    Vom Benutzer bereitzustellen 11  
Verfügbarer Speicherplatz 27  
Versuchsname 16  
Vorbereiten des Vorfüllens 21  
Vorfüllabfall 21  
Vorfüllen einer Fließzelle 19  
Vorphasierung 41

## W

Warnungen  
    Beheben 5  
    Beschreibungen 5  
Wartung, präventive 28  
Wartungswaschläufe 28  
    Abgegebene Volumina 30, 32  
    Häufigkeit 28  
    Wiederverwenden der Lösung 28-29, 31  
Wartungswaschlauflösung 28, 31  
Waschläufe  
    Systemanforderungen 25, 28  
    Vorteile 28  
    Wartungswaschlauflösung 28, 31  
    Wasser vs. Wartung 28  
Wasserbad 12-13

Wasserwaschläufe  
    Abgegebene Volumina 26  
    Dauer und Häufigkeit 25  
Wechseln von Reagenzien während des  
    Laufs 37  
Wiederverwenden der  
    Wartungswaschlauflösung 29  
Wirbelmuster 12

# Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

Website: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
E-Mail: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Telefonnummern des Illumina-Kundendiensts

Region	Gebührenfrei	Regional
Nordamerika	+1.800.809.4566	
Australien	+1.800.775.688	
Belgien	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Dänemark	+45 80820183	+45 89871156
Deutschland	+49 8001014940	+49 8938035677
Finnland	+358 800918363	+358 974790110
Frankreich	+33 805102193	+33 170770446
Großbritannien	+44 8000126019	+44 2073057197
Hongkong	800960230	
Irland	+353 1800936608	+353 016950506
Italien	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Neuseeland	0800.451.650	
Niederlande	+31 8000222493	+31 207132960
Norwegen	+47 800 16836	+47 21939693
Österreich	+43 800006249	+43 19286540
Schweden	+46 850619671	+46 200883979
Schweiz	+41 565800000	+41 800200442
Singapur	+1.800.579.2745	
Spanien	+34 911899417	+34 800300143
Taiwan	00806651752	
Andere Länder	+44.1799.534000	

Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) sind auf der Illumina-Website unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) verfügbar.

Die **Produktdokumentation** steht auf der Illumina-Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu [support.illumina.com](http://support.illumina.com), wählen Sie ein Produkt und wählen Sie anschließend **Documentation & Literature** (Dokumentation und Literatur).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornien 92122, USA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.**

© 2018 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

**illumina®**