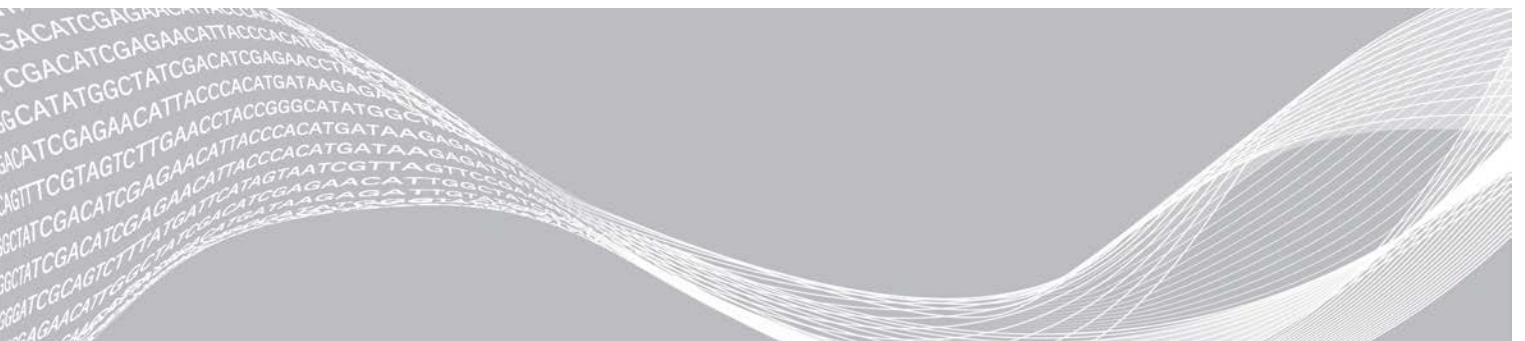


NovaSeq 6000

测序系统指南



本文档及其内容归 Illumina, Inc. 及其附属公司（以下简称“Illumina”）所有，并且仅供其客户用于与本文档内所述产品用途相关的合同用途，不得用于其他任何目的。若事先未获得 Illumina 的书面许可，不得出于任何其他目的使用或分发本文档及其内容，以及/或者以其他任何方式对其进行传播、披露或复制。Illumina 不通过本文档向第三方授权其任何专利、商标、所有权或普通法权利或类似权利。

必须由具备资质且受过相关培训的人员严格明确遵照本文档中的说明操作，以确保本文档中所述产品的使用适当且安全。在使用此类产品之前，相关人员必须通读并理解本文档中的所有内容。

未能完整阅读并明确遵守本文档中包含的所有说明可能会导致产品损坏、对用户或其他人员造成人身伤害以及对其他财产造成损害，并且将导致产品适用的保证失效。

对于由不当使用本文档中描述的产品（包括其部件或软件）引起的任何后果，ILLUMINA 概不承担任何责任。

© 2020 Illumina, Inc. 保留所有权利。

所有商标均为 Illumina, Inc. 或其各自所有者的财产。有关特定的商标信息，请参见 www.illumina.com/company/legal.html。

修订历史记录

文档	日期	更改描述
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v14	2020 年 9 月	根据目前提供的 v1.0 和 v1.5 试剂盒更新了可用试剂盒的商品目录号。
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v13	2020 年 7 月	添加了支持 NovaSeq 6000 试剂盒 v1.5 和软件 v1.7 的信息，即针对某些运行指标数据字段提供每泳道指标明细。
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v12	2020 年 2 月	将变性和稀释信息移到了新的《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）。
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v11	2019 年 2 月	更新了 Xp 工作流程的混合文库复杂度表。
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v10	2019 年 1 月	添加了 SP 流动槽的信息。 更新了标准和 Xp 工作流程的推荐的混合文库复杂度表。
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v09	2018 年 11 月	更正了 NovaSeq 6000 支持页面的链接。 更正了缺少警告。
材料号 20020483 文档号 1000000019358 v08	2018 年 9 月	<ul style="list-style-type: none"> 添加了 NovaSeq 6000 S4 试剂盒（200 次循环）的信息。 添加了用户帐户信息。 添加了单槽装入浓度。 更新了交错开始运行的说明。 更新了说明中的 BaseSpace 符号。 更新了运行前检查的说明。 添加了确认关机或重新启动相关要求的说明。 添加了未完成的运行后清洗的相关说明。 解释了维护清洗信息。 解释了软件更新信息。
材料号 20020483 文档号 1000000019358 v07	2018 年 4 月	<ul style="list-style-type: none"> 说明了如何在测序前的提升步骤使用文库试管混合试剂。 针对耗材或耗材包装上的符号添加了符号描述表。 在“运行设置模式”部分添加了有关 Illumina Proactive 监控服务的信息。 添加了有关 NovaSeq LIMS API 的信息。 更新了对 NovaSeq Control Software v1.4.0 的软件描述。 更新了 S2 流动槽的典型通过过滤片段数量。 更新了 NovaSeq Xp 工作流程的建议装入浓度。 更新了打开流动槽包装的说明。 说明了将文库装入流动槽的程序。 添加了有关开始维护清洗时仪器的可用性说明。 添加了有关交错开始倒计时的信息。 更新了有关如何添加或移除 SRP 规则的说明。

文档	日期	更改描述
文档号 1000000019358 v06	2018 年 2 月	<p>在“流动槽”部分中添加了一条说明，指明使用 S1 流动槽时需要软件版本为 1.3.1。</p> <p>更新了文库装入方法部分的表格中的描述和标准剂量。</p> <p>在试剂盒组件部分中添加了注意事项。</p> <p>在“耗材”表中添加了 0.5 和 1.5 毫升试管，以及适用于 20、200 和 1000 微升移液器的移液器吸头。在“设备”表中添加了刻度量筒。</p> <p>在第 4 和第 5 章中添加了准备流动槽部分，并将第 6 章中的步骤移到了这两部分。</p> <p>更新了第 4 章中 S1 流动槽的总剂量。</p> <p>在第 4 章中的制作标准化混合文库部分添加了“建议的混合文库复杂度”表。</p> <p>更新了第 4 和第 5 章中的解冻 SBS 和簇生成夹盒步骤。</p> <p>解释了准备流动槽中的解冻说明。</p> <p>更新了 NovaSeq Xp 建议的装入浓度中的解冻信息。</p> <p>更新了第 5 章的制作标准化混合文库部分中的“建议的混合文库复杂度”表。</p> <p>在 NovaSeq Xp 工作流程摘要和准备流动槽中添加了说明，指明一旦将流动槽从包装中取出，则必须在 12 小时内进行使用。</p>
文档号 1000000019358 v05	2017 年 12 月	<p>在“测序工作流程”图中添加了有关 Xp 适用的空文库试管的解释。</p> <p>在适用于标准工作流程的“变性混合文库和可选 PhiX 对照品”中，更新了步骤 5 的表中的 Tris-HCl 剂量。</p> <p>在适用于 NovaSeq Xp 工作流程的“制备 ExAmp 预先混合液”中，于步骤 4 后添加了一条说明，指明需要振荡才能获得最佳结果。</p> <p>在适用于 NovaSeq Xp 工作流程的“将文库装入流动槽”中，于步骤 3 后添加了一条提醒，指明应缓慢装入样品。</p>
材料号 20023471 文档号 1000000019358 v04	2017 年 10 月	<p>在仪器特点列表中添加了“单个泳道装入”。</p> <p>耗材 - 添加了 NovaSeq Xp 2 泳道试剂盒和 NovaSeq Xp 4 泳道试剂盒。添加了 NovaSeq Xp 2 泳道歧管包和 NovaSeq 4 泳道歧管包。</p> <p>设备 - 添加了 NovaSeq Xp 工作流程适用的 NovaSeq Xp 流动槽固定架和 P200 移液器。</p> <p>针对 NovaSeq Xp 工作流程添加了“准备耗材”一章。</p> <p>将“测序”一章中的“清空废试剂瓶”移至“NovaSeq 标准工作流程”和“NovaSeq Xp 工作流程”这两章的开头。</p> <p>针对标准工作流程更新了“混合文库浓度”表和“建议的装入浓度”表。</p>

文档	日期	更改描述
材料号 20020483 文档号 1000000019358 v03	2017 年 9 月	更新了对 NovaSeq Control Software v1.2 的软件描述，添加了对 S1 和 S4 流动槽的支持。 对于 S1 和 S4 流动槽的双流动槽运行，添加了磁盘空间要求。 为某些 *.json 文件指定了命名要求。 重新组织了 试剂盒和配件 一章中的试剂盒概述信息。此章涵盖试剂和文库装入试剂盒的配置、组件以及兼容性标签。 在用户自备耗材中添加了 NovaSeq 6000 试剂盒。 更新了混合和变性文库说明，添加了 S1 和 S4 流动槽的相关信息。 更新了解冻试剂夹盒的说明，对于 S1 和 S2 需要放于水槽中解冻 2 小时，对于 S4 需要放于水槽中解冻 4 小时。 更新了文库试管、试剂夹盒和流动槽的描述，加入了 S4 组件。 在“维护”一章中添加了有关自动软件更新的部分。 将对 降低全基因组数据存储空间 (出版编号 970-2012-013) 的引用替换为 NovaSeq 系列和 HiSeq X Ten 数据质量压缩 (出版编号 770-2017-010)。 在第 6 章的输入运行参数中，为步骤 3 添加了说明。 更新了 流动槽 小区部分，添加了 S1 和 S4 小区信息。
材料号 20018871 文档号 1000000019358 v02	2017 年 4 月	添加了以下信息： · Illumina 提供的运行所需的耗材。 · 试剂盒组件的存储条件。 · 文库装入浓度建议。 · 用于两个流动槽的 NaOH 稀释液。 · 装入前使流动槽升到室温的步骤。 · 清空废试剂瓶之后的更换手套步骤。 · 用于第三方 LIMS 系统的 LIMS 输出配置。 · 样品表的命名约定。 · 流程管理图标和故障诊断。 · 包含 Windows 安全功能和配置说明的附录。 · 用于获得技术协助的联系信息。 将试剂夹盒解冻时间增加到 4 小时。 更新了 PhiX 注入说明，将 1% PhiX 注入量更改为 0.9 微升，并使用 10 毫摩尔/升 pH 8.5 的 Tris-HCl 来稀释 10 纳摩尔/升 PhiX。 更新了清洁流动槽和流动槽台的说明，仅当观察到微粒时才清洁。 将维护清洗频率更新为每 14 天一次。 重新组织并合并了耗材准备说明以提高连贯性。 将对开门重命名为液体仓门。
材料号 20018406 文档号 1000000019358 v01	2017 年 3 月	将“Process Management (流程管理)”屏幕上的列名称修正为“Sequencing (测序)”。
材料号 20015871 文档号 1000000019358 v00	2017 年 2 月	初始版本。

目录

第 1 章概述	1
简介	1
更多资源	2
测序概述	2
测序工作流程	3
仪器组件	4
第 2 章试剂盒和配件	9
试剂盒概述	9
试剂盒组件	10
NovaSeq Xp 试剂盒组件	14
NovaSeq Xp 流动槽固定架	14
符号描述	15
第 3 章入门	17
启动仪器	17
配置设置	18
用户自备的耗材和设备	22
第 4 章标准工作流程：准备耗材	26
方法	26
解冻 SBS 和簇生成夹盒	26
清空废试剂瓶	27
准备流动槽	28
混合文库并进行变性以用于测序	28
第 5 章NovaSeq Xp 工作流程：准备耗材	30
NovaSeq Xp 工作流程摘要	30
方法	31
解冻 SBS 和簇生成夹盒	31
清空废试剂瓶	32
准备流动槽	33
解冻 ExAmp 试剂	33
混合、变性并装入文库以进行测序	33
第 6 章测序	38
设置测序运行	38
监控运行进度	44
交错开始运行	45
删除运行	45
拆下位置 30	45
运行后自动清洗	46

第 7 章维护	47
预防性维护	47
执行维护清洗	47
软件更新	50
附录 A 故障诊断	51
故障诊断资源	51
故障诊断文件	51
运行前检查错误	51
流程管理故障诊断	52
簇生成之前运行失败	52
结束运行	53
关闭仪器	53
附录 B Real-Time Analysis	55
Real-Time Analysis 概述	55
Real-Time Analysis 工作流程	56
附录 C 输出文件夹和文件	59
测序输出文件夹结构	59
测序输出文件	60
附录 D Windows 安全	61
安全配置	61
密码要求	61
Windows 防火墙	61
增强型减灾体验工具包	61
软件限制策略	61
索引	64
技术协助	68

第 1 章概述

简介	1
更多资源	2
测序概述	2
测序工作流程	3
仪器组件	4

简介

Illumina® NovaSeq™ 6000 测序系统将可扩展的通量与灵活的测序技术融入生产规模平台中，以此具备台式系统的效率和性价比。

特点

- ▶ **可扩展测序** — NovaSeq 6000 可扩展成适用于广泛应用且可产生高质量数据的生产级测序。
- ▶ **可调整输出** — NovaSeq 6000 是具有大输出范围的双流动槽系统。可对一个流动槽测序，或同时对两个片段长度不同的流动槽测序。可混合搭配四种流动槽以及各种片段长度。
- ▶ **图形化流动槽** — 图形化流动槽会生成紧密排列的簇。缩小纳米孔之间的空间可提高簇密度和数据输出。
- ▶ **仪器上的 ExAmp 混合** — NovaSeq 6000 会将 ExAmp 试剂与文库混合、扩增文库，并执行簇生成以进行精简的测序工作流程。
- ▶ **单个泳道装入** — 使用 NovaSeq Xp 流动槽固定架可为流动槽的单个泳道预先装入文库，从而减少文库装入量。
- ▶ **高通量行扫描** — NovaSeq 6000 使用一部具有双向扫描技术的相机同时在双色通道中对流动槽进行快速成像。
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** — NovaSeq 6000 使用名为 RTA3 的 RTA 实施。此集成软件会分析图像并检出碱基。
- ▶ **BaseSpace™ Sequence Hub 集成** — 测序工作流程与 BaseSpace Sequence Hub 相集成，后者是 Illumina 用于数据分析、存储和协作的基因组计算环境。在运行进行时，输出文件会实时传送到该环境。
- ▶ **BaseSpace Clarity LIMS 可用** — 利用样品和试剂端到端跟踪、自动化工作流程和集成仪器操作来提高操作效率。

更多资源

Illumina 网站上的 [NovaSeq 6000 测序系统支持页面](#) 提供了更多系统资源。这些资源包括软件、培训、兼容产品及以下文档。请务必查看支持页面获取最新版本。

资源	描述
自定义操作流程选择器	用来生成定制的端到端文档的向导，会针对测序运行所用的文库制备方法、运行参数和分析方法而调整。
《NovaSeq 系列场地准备指南》（文档号 1000000019360）	提供实验室空间规范、电气要求、环境和网络注意事项。
《NovaSeq 系列安全和合规性指南》（文档号 1000000019357）	提供有关操作安全注意事项、合规性声明和仪器标签的信息。
《RFID 读写器合规性指南》（文档号 1000000002699）	提供有关仪器中的 RFID 读写器的信息，包括合规认证和安全注意事项。
《NovaSeq 系列自定义引物指南》（文档号 1000000022266）	提供有关使用自定义测序引物代替 Illumina 测序引物的信息。
《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）	提供有关为测序运行稀释及变性已制备的文库以及制备可选 PhiX 对照品的说明。

测序概述

簇生成

在簇生成期间，单个 DNA 分子会粘附到流动槽的表面，同时进行扩增以形成簇。如果使用标准工作流程，会先在仪器上将 ExAmp 预先混合液与预装的文库混合然后再生成簇。如果使用 NovaSeq Xp 工作流程，则是在仪器外将 ExAmp 试剂与文库混合并输送到流动槽。剂量因流动槽类型和工作流程而异。

测序

使用双向扫描和双通道测序化学反应对簇进行成像。相机使用检测红色和绿色光线的传感器对每个测绘带成像，会同时生成整个测绘带的红色图像和绿色图像。成像后，为每个小区内的簇执行的碱基检出基于每个簇的红色和绿色信号比率，即根据图形化流动槽确定的位置而定。此过程会针对测序的每次循环重复进行。

分析

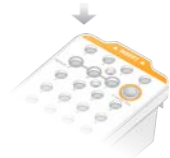
在运行进行时，NovaSeq Control Software (NVCS) 会自动将碱基检出 (*.cbcl) 文件传送到指定的输出文件夹位置，以进行数据分析。

分析方法有多种，具体取决于您的应用。有关详细信息，请访问 [Illumina 网站上的 BaseSpace Sequence Hub 支持页面](#)。

测序工作流程

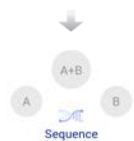


将 SBS 和簇生成试剂夹盒解冻。



混合文库并进行变性。如果使用标准工作流程，请将文库加到文库试管中。如果使用 NovaSeq Xp 工作流程，请将 ExAmp/文库混合液装入流动槽。

无论哪种工作流程，都需要将文库试管装入已解冻的簇生成夹盒。
有关详细信息，请参见《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）。



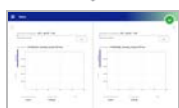
从软件界面选择 **Sequence（测序）**，然后指定双流动槽运行或单流动槽运行。



取出上次运行残留的耗材，然后装入当前运行所需的新耗材。



在“Run Setup（运行设置）”屏幕中指定运行参数。如果配置了 BaseSpace Sequence Hub，请从“Log In（登录）”屏幕登录。
运行前检查完成后，运行便会自动开始。



从“Sequence（测序）”屏幕、BaseSpace Sequence Hub（若启用了运行监控）监控运行，或使用 Sequencing Analysis Viewer 从网络计算机监控运行。
数据会传输到指定的输出文件夹。



测序完成后，仪器会自动开始清洗。

文库装入方法

根据所选工作流程，使用以下两种方法之一将文库装入 NovaSeq 6000 流动槽。测序运行的设置因工作流程而异。请确保始终遵循所用方法的相应说明进行操作。请参见 [标准工作流程：准备耗材（第 26 页）](#) 和 [NovaSeq Xp 工作流程：准备耗材（第 30 页）](#)。

表 1 文库装入方法

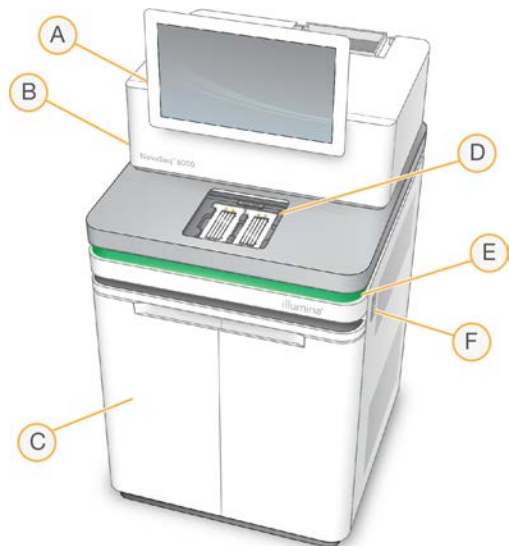
工作流程	混合文库装入和 ExAmp 混合方法	泳道可单独寻址和数据分析	装入量* SP/S1-S2-S4 模式 (微升)
标准	将单个混合文库装入文库试管，于文库试管中完成与 ExAmp 试剂的仪器上混合后，混合液会自动输送到流动槽中进行簇生成和测序。测序前有一个提升步骤，使用簇生成夹盒中的试剂和文库试管制备一种调节混合液，该混合液有助于提高簇生成效率。	单个混合文库将被输送到流动槽的所有泳道，并进行测序。系统会对来自所有泳道的片段进行汇总分析。	150-225-465 微升 (整个流动槽)
NovaSeq Xp	在仪器外手动将一个或多个文库 (该数量与流动槽泳道的数量对应) 与 ExAmp 试剂混合，并使用 NovaSeq Xp 流动槽固定架将其直接装入流动槽的各个泳道。然后将已注入试剂的流动槽装入仪器，以进行簇生成和测序。测序前有一个提升步骤，使用空文库试管混合簇生成夹盒中的试剂制备一种调节混合液，该混合液有助于提高簇生成效率。	每个文库将被装入流动槽的单独泳道中，随后进行测序。可以使用不同的混合文库、相同混合文库的等分或任意组合。系统会根据情况，对来自不同泳道的片段进行单独分析或汇总分析。	27-33-45 微升 (单个泳道)

* NovaSeq Xp 工作流程所需的变性文库浓度比标准工作流程低 25-50%。

仪器组件

NovaSeq 6000 测序系统由一个触摸屏显示器、一个状态栏、一个电源按钮 (及相邻的 USB 端口) 和三个仓室组成。

图 1 外部组件



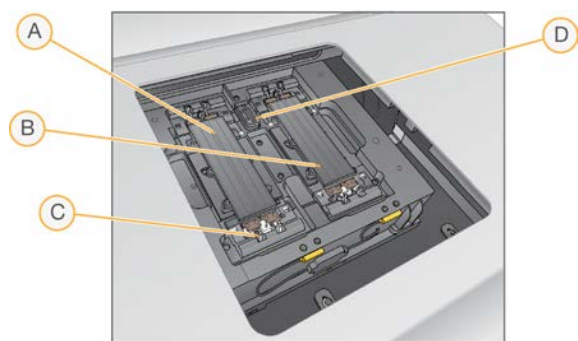
- A **触摸屏显示器** — 显示用于配置系统及设置和监控运行的 NVCS 界面。
- B **光学仓** — 包含用于实现流动槽双面成像的光学组件。
- C **液体仓** — 包含试剂和缓冲液夹盒及废试剂瓶。
- D **流动槽仓** — 用于放置流动槽。
- E **状态栏** — 指出流动槽状态，包括：可供测序 (绿色)、处理中 (蓝色) 或需要引起注意 (橙色)。
- F **电源按钮和 USB 端口** — 分别用于开关电源和外设组件的 USB 连接。

流动槽仓

流动槽仓中装有流动槽台，流动槽台左侧放置流动槽 A，右侧放置流动槽 B。每侧有四个夹具，用于自动定位并固定流动槽。

装在流动槽台上的光学对准目标可诊断并修正光学问题。NVCS 发出提示时，光学对准目标会重新对准系统并调整相机焦距，以改善测序结果。

图 2 流动槽台



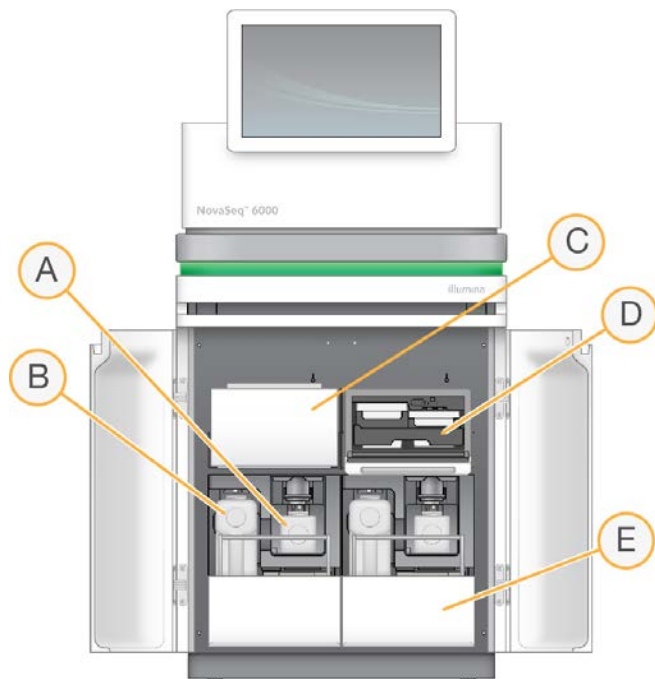
- A A 侧流动槽支架
- B B 侧流动槽支架
- C 流动槽夹（每侧四个，图示为其中之一）
- D 光学对准目标

软件会控制流动槽仓门的开和关。仓门会自动打开供您装入流动槽，以用于运行或维护清洗。装入后，软件会关闭仓门、将流动槽移动到位并固定夹具及真空密封装置。传感器会验证流动槽的存在和兼容性。

液体仓

要设置运行，需要打开液体仓以装入试剂和缓冲液以及空的废试剂瓶。液体仓外装有对开门，两扇门分别对应流动槽 A 和流动槽 B。

图 3 液体仓组件



- A **小废试剂瓶** — 用于收集来自簇生成夹盒的废试剂，带有盖座，方便存放瓶盖。
- B **大废试剂瓶** — 用于收集来自 SBS 夹盒和缓冲液夹盒的废试剂，带有盖座，方便存放瓶盖。
- C **试剂冷却器** — 用于冷却 SBS 夹盒和簇生成夹盒。
- D **试剂冷却器抽屉** — 以颜色编码的位置，左边用于放置 SBS 夹盒（灰色标签），右边用于放置簇生成夹盒（橙色标签）。
- E **缓冲液抽屉** — 左边用于放置大废试剂瓶，右边用于放置缓冲液夹盒。

废试剂

射流系统用于将簇生成夹盒试剂（潜在危险品）导流到小废试剂瓶中。SBS 夹盒和缓冲液夹盒中的试剂会导流到大废试剂瓶。但是，废试剂流之间可能会发生交叉污染。为了安全起见，假定两个废试剂瓶都包含潜在危险化学品。安全数据表 (SDS) 提供了详细的化学信息。



注意

如果系统配置为在外部收集废试剂，那么流向大废试剂瓶的试剂会导流到外部。簇生成夹盒试剂始终会导流到小废试剂瓶。

系统软件

仪器软件套装包括用于执行测序运行、仪器内分析和相关功能的集成式应用程序。

- ▶ **NovaSeq Control Software (NVCS)** — 会逐步引导您完成测序运行设置、控制仪器操作，并在运行期间显示统计情况。为了演示如何正确取出和装入耗材，NVCS 会在运行设置过程中播放说明视频。




- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** — 在运行期间执行图像分析和碱基检出。NovaSeq 6000 使用的是 RTA3，在体系结构、安全性和其他功能上进行了增强，性能更优。有关详细信息，请参见 *Real-Time Analysis* (第 55 页)。
- ▶ **Universal Copy Service (UCS)** — 在运行过程中将 RTA3 和 NVCS 中的输出文件复制到输出文件夹。如果适用，该服务也可将数据传输到 BaseSpace Sequence Hub。如果运行期间 Universal Copy Service 中断，服务将多次尝试重新连接并自动恢复数据传输。

状态图标

NVCS 界面上的状态图标会指示运行状态。图标上的数字表示状态的状况编号。

当运行状态改变时，图标会闪烁发出警示。选择图标可查看对该状况的说明。选择 **Acknowledge (确认)** 清除消息，然后选择 **Close (关闭)** 关闭对话框。

表 2 NVCS 状态图标



状态图标	状态名称	描述
	状态正常	系统正常。
	正在处理	系统正在处理。
	警告	出现警告，需要引起注意。 警告不会使运行停止，但是需要执行操作才能继续运行。
	错误	发生错误。 如果有错误，需要采取措施后才能继续运行。

流程管理

通过“Process Management (流程管理)”屏幕可访问计算引擎 (CE) 和硬盘驱动器 (C:\)。使用该屏幕可以监控运行进度、删除运行以及管理磁盘空间。切勿直接从 C:\ 盘删除文件和文件夹。

“Process Management (流程管理)”屏幕会显示 CE 和 C:\ 上的可用磁盘空间、已用空间，以及正在使用磁盘空间的运行的状态。“Run Date (运行日期)”和“Name (名称)”列可识别每次运行。“Run Status (运行状态)”、BaseSpace 和“Network (网络)”列显示运行的每个流程的状态。

表 3 流程管理状态图标

流程	图标	描述
运行状态	 Running	运行正在进行。
	 Complete	运行已完成测序。

流程	图标	描述
网络		正在将文件复制到网络上的输出文件夹。
	Copying	
		所有文件均已复制到网络上的输出文件夹。
	Complete	
	N/A	不适用，因为运行未配置为上载到网络输出文件夹，或者上载状态未知。要进行故障诊断，请参见 流程管理故障诊断 （第 52 页）。
BaseSpace		正在将文件上载到 BaseSpace Sequence Hub。
	Uploading	
		所有文件均已上载到 BaseSpace Sequence Hub。
	Complete	
	N/A	不适用，因为运行未配置为上载到 BaseSpace Sequence Hub，或者上载状态未知。要进行故障诊断，请参见 流程管理故障诊断 （第 52 页）。

要想开始流动槽运行，必须满足 CE 和 C:\ 的最小空间要求。



注意

如果是单流动槽运行，那么最小空间要求为下表中所示的一半。

表 4 CE 和 C:\ 的最小空间要求（双流动槽运行）

流动槽	每次循环需要的 CE 空间Gb	每对流动槽需要的 C:\ 空间Gb
SP	0.5 Gb	5 Gb
S1	1.35 Gb	20 Gb
S2	2.7 Gb	20 Gb
S4	4.3 Gb	40 Gb

要计算运行所需的 CE 总空间，请将“每次循环最小 CE 空间”下列出的值乘以片段 1、片段 2、标签 1 和标签 2 长度值之和，请参见 [输入运行参数](#)（第 41 页）。例如，对于含 150 次循环的双末端测序运行（即两个标签的长度均为 8 个碱基的双流动槽 S4 运行），所需的 CE 空间为 $(151 * 2 + 8 * 2) * 4.3 = 1.37 \text{ Tb}$ 。

有关清理磁盘空间的信息，请参见 [删除运行](#)（第 45 页）。

第 2 章 试剂盒和配件

试剂盒概述	9
试剂盒组件	10
NovaSeq Xp 试剂盒组件	14
NovaSeq Xp 流动槽固定架	14
符号描述	15

试剂盒概述

在 NovaSeq 6000 上执行一次运行需要一个 NovaSeq 6000 试剂盒。NovaSeq Xp 工作流程也需要一个 NovaSeq Xp 试剂盒。这些试剂盒具有以下配置。

为实验设计选择合适的试剂盒规格。Illumina 建议只为长度超过 300 次循环的运行使用 500 次循环试剂盒。有关一次运行所需的物品完整列表，请参见[用户自备的耗材和设备](#)（第 22 页）。

表 5 试剂盒配置





试剂盒名称	v1.0 试剂盒 Illumina 商品目录号	v1.5 试剂盒 Illumina 商品目录号
NovaSeq 6000 S4 试剂盒 (300 次循环) – 40 件装	20039236	不适用
NovaSeq 6000 S4 试剂盒 (300 次循环) – 20 件装	20039234	不适用
NovaSeq 6000 S4 试剂盒 (300 次循环) – 10 件装	20039233	不适用
NovaSeq 6000 S4 试剂盒 (300 次循环)	20012866	20028312
NovaSeq 6000 S4 试剂盒 (200 次循环)	20027466	20028313
NovaSeq 6000 S4 试剂盒 (35 次循环)	不适用	20044417
NovaSeq 6000 S2 试剂盒 (300 次循环)	20012860	20028314
NovaSeq 6000 S2 试剂盒 (200 次循环)	20012861	20028315
NovaSeq 6000 S2 试剂盒 (100 次循环)	20012862	20028316
NovaSeq 6000 S1 试剂盒 (300 次循环)	20012863	20028317
NovaSeq 6000 S1 试剂盒 (200 次循环)	20012864	20028318
NovaSeq 6000 S1 试剂盒 (100 次循环)	20012865	20028319
NovaSeq 6000 SP 试剂盒 (500 次循环)	20029137	20028402
NovaSeq 6000 SP 试剂盒 (300 次循环)	20027465	20028400
NovaSeq 6000 SP 试剂盒 (200 次循环)	20040326	20040719
NovaSeq 6000 SP 试剂盒 (100 次循环)	20027464	20028401
NovaSeq Xp 2 泳道试剂盒	20021664	20043130
NovaSeq Xp 4 泳道试剂盒	20021665	20043131

兼容性标签

确定兼容试剂盒组件、流动槽及夹盒是否标有表明试剂盒模式（SP、S1、S2或S4）的符号。NovaSeq Xp 歧管支持多种模式，标有 2 泳道（用于 SP、S1 和 S2 流动槽）或 4 泳道（用于 S4 流动槽）。

同一运行中不能使用模式不同的组件。例如，不能将 S1 夹盒与 S2 流动槽搭配使用。

不允许混合使用 v1.0 SBS/CPE 夹盒和 v1.5 夹盒，这样会导致错误消息。

试剂盒模式	标签上的标识	描述
SP 试剂盒组件		SP 流动槽可生成 6.5 到 8 亿个通过过滤的单端片段，以及在 2x150 碱基对下最多 250 千兆碱基的输出和 2x250 碱基对下最多 400 千兆碱基的输出。
S1 试剂盒组件		S1 流动槽可生成多达 16 亿个通过过滤的单端片段，以及在 2x150 碱基对下最多 500 千兆碱基的输出。S1 试剂盒可为大部分高通量应用提供较少样品的快速测序。
S2 试剂盒组件		S2 流动槽可生成多达 41 亿个通过过滤的单端片段，以及在 2x150 碱基对下最多 1250 千兆碱基的输出。S2 可为大部分高通量应用提供比 S1 流动槽更多片段的快速测序，以及更多的测序输出。
S4 试剂盒组件		S4 流动槽可生成多达 100 亿个通过过滤的单端片段，以及在 2x150 碱基对下最多 3000 千兆碱基的输出。此模式为流动槽的 4 泳道版本，专为最大输出而设计。它可用于进行跨物种及覆盖深度且具成本效益的全基因组测序。

Illumina 网站上的 [NovaSeq 试剂盒产品页面](#) 提供有每种模式的详细规格。

试剂盒组件

每个 NovaSeq 6000 试剂盒中包含以下组件。每个组件使用射频识别（radio-frequency identification，简称 RFID）进行精确的耗材跟踪并确保兼容性。

收到试剂盒后，请立即将组件存储在所示温度下以确保性能正常。

表 6 试剂盒组件

数量	试剂盒组件	存储温度
1	文库试管	15°C 到 30°C
1	流动槽	2°C 到 8°C
1	缓冲液夹盒	15°C 到 30°C
1	簇生成夹盒	-25°C 到 -15°C
1	SBS 夹盒	-25°C 到 -15°C



注意

谨防夹盒坠落。如果坠落，可能会造成伤害。如果夹盒中的试剂渗漏，可能会刺激皮肤。请在使用前检查夹盒是否开裂。

文库试管

NovaSeq 6000 文库试管是指适合放置在簇生成夹盒位置 8 处的 16 毫米试管。位置 8 标为 **Library Tube**（**文库试管**），并圈有橙色圆圈以方便识别。试管带有一个螺纹盖，可在需要时存储文库。确保取下管盖后，再将试管装入簇生成夹盒。

图 4 文库试管



根据工作流程的不同，文库试管有以下两种使用方式：

- ▶ **标准** — 将经过混合和变性的文库加到文库试管中后，需要将该文库试管（取下管盖）装到簇生成夹盒中。运行开始后，仪器会将文库试管内的文库与 ExAmp 试剂混合，并将混合液自动输送到流动槽中。
- ▶ **NovaSeq Xp** — 会将取下管盖的空文库试管装入簇生成夹盒。运行期间，先在文库试管中混合试剂，然后再将试剂输送到流动槽中。

流动槽

NovaSeq 6000 流动槽是封装在夹盒中的图形化流动槽。该流动槽为玻璃底物，按序排列着数十亿纳米孔，可增加输出片段和测序数据的数量。簇在这些纳米孔中生成，然后系统会通过这些簇执行测序。

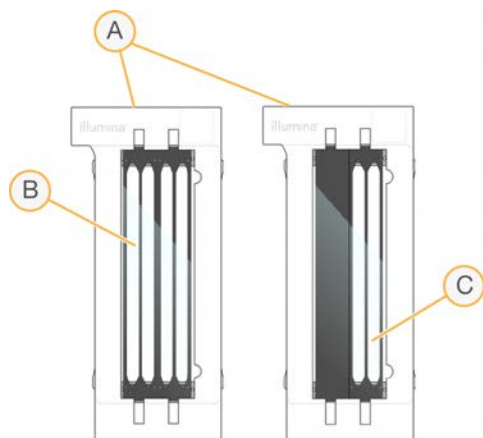
每个流动槽都有多个泳道用于测序混合文库。SP、S1和 S2 流动槽各有两个泳道，S4 流动槽有四个泳道。每个泳道在多个测绘带中成像，然后软件会将每个测绘带的图像分成更小的部分（称为小区）。有关详细信息，请参见 [流动槽小区](#)（第 55 页）。



注意

要使用 S1 流动槽，请务必使用 NVCS v1.3.1 或更高版本。要使用 SP 流动槽，请务必使用 NVCS v1.6 或更高版本。

图 5 流动槽



- A 流动槽夹盒
- B 四泳道流动槽 (S4)
- C 双泳道流动槽 (SP、S1 和 S2)

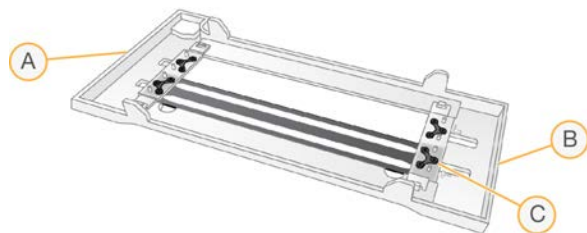
每个流动槽的底面有四个垫片。文库和试剂通过流动槽入口端的垫片进入流动槽泳道。废试剂通过出口端的垫片排出泳道。



注意

操作流动槽时请避免碰触垫片。

图 6 倒放的流动槽



- A 出口端
- B 入口端
- C 垫片 (四个中的一个)

缓冲液、簇生成和 SBS 夹盒

NovaSeq 6000 缓冲液、簇生成和 SBS 夹盒配有预先装入试剂、缓冲液和清洗液的封箔槽。试剂盒会随附每种夹盒各一个。

夹盒会直接装入到仪器上，并使用颜色编码和标签，以减少装入错误。试剂冷却器抽屉和缓冲液抽屉中的定位点可确保正确定位。

夹盒的标签包含支持的模式，如 S1/S2 或 SP/S1/S2。夹盒只能用于标签上所列的模式。

表 7 试剂夹盒

夹盒	描述
 <p>NovaSeq 6000 缓冲液夹盒</p>	<p>已预先装入测序缓冲液，重量不超过 6.8 千克（15 磅）。塑料把手方便携带、装入和取出。顶板中的凹陷处可以叠放夹盒。</p>
 <p>NovaSeq 6000 簇生成夹盒</p>	<p>已预先装入簇生成试剂、标签试剂和双末端测序试剂以及清洗液。包含专用于放置文库试管的位置。橙色标签可将簇生成夹盒与 SBS 夹盒区分开。</p>
 <p>NovaSeq 6000 SBS 夹盒</p>	<p>已预先装入测序试剂，剂量视试剂盒支持的循环次数（500、300、200、100 或 35）而定。这三个试剂位置中的每个位置旁边均预留了一个位置，用于运行后自动清洗。灰色标签可将 SBS 夹盒与簇生成夹盒区分开。</p>

簇生成夹盒槽

可取下的槽

位置 30 处的变性试剂含有甲酰胺，甲酰胺是一种有机酰胺和生殖毒素。为了方便您在测序运行后安全处置任何未使用的试剂，这个槽是可以取下来的。



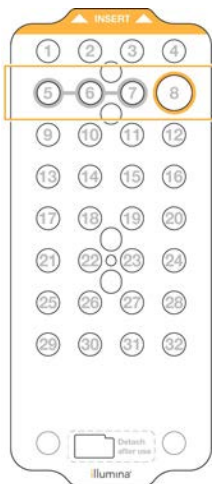
注意

请勿将 SBS 夹盒叠放在簇生成夹盒上，因为这样可能会使位置 30 脱落。

预留的槽

预留了三个槽用于放置自定义引物，一个空位用于放置文库试管。为实现样品可追溯性，系统会在运行设置期间将文库试管装入簇生成夹盒中，并且直到运行结束时，文库试管都会留在夹盒中。

图 7 带编号的槽



位置	为以下项目预留
5、6 和 7	可选的自定义引物
8	文库试管

有关自定义引物的详细信息，请参见《NovaSeq 系列自定义引物指南》（文档号 100000022266）。

NovaSeq Xp 试剂盒组件

每个 NovaSeq Xp 试剂盒均为一次性试剂盒，内含以下组件。收到试剂盒后，请立即将组件存储在所示温度下以确保性能正常。



注意

DPX1 和 DPX2 耗材可能标记为 JPX1 和 JPX2。两者均与 v1.0 或 v1.5 试剂盒兼容。

表 8 NovaSeq Xp 试剂盒组件

数量	试剂盒组件	存储温度
1	DPX1/JPX1	-25°C 到 -15°C
1	DPX2/JPX2	-25°C 到 -15°C
1	DPX3	-25°C 到 -15°C
1	NovaSeq Xp 歧管	留在试剂盒内，或存储在室温下。

Xp 试剂盒试剂

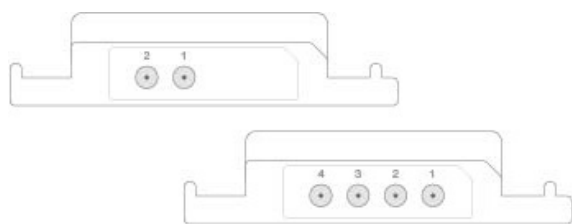
DPX1/JPX1、DPX2/JPX2 和 DPX3 是分别装在不同试管中的 ExAmp 试剂，用于 NovaSeq Xp 工作流程。将这些试剂混合可得到 ExAmp 预先混合液，该混合液需在装入流动槽前与混合文库混合。

NovaSeq Xp 歧管

将 NovaSeq Xp 歧管放置在 NovaSeq Xp 流动槽固定架上，可将混合文库直接装入单个流动槽泳道。通过 NovaSeq Xp 歧管两侧的歧管臂，可轻松将歧管放到固定架上。

NovaSeq Xp 歧管有双孔和四孔两种配置，分别与双泳道和四泳道流动槽相对应。每个孔对应一个流动槽泳道。由于流动槽是倒放在 NovaSeq Xp 流动槽固定架上的，因此歧管孔自右向左编号，以与倒放的流动槽上的泳道编号相对应。

图 8 带编号孔的 NovaSeq Xp 歧管

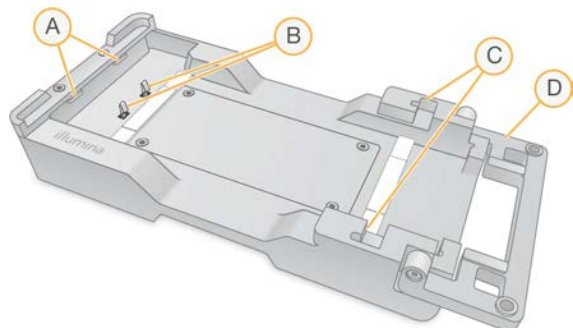


NovaSeq Xp 流动槽固定架

NovaSeq Xp 流动槽固定架是可重复使用的配件，用于将文库直接装入流动槽。流动槽需翻转后装到固定架中，NovaSeq Xp 歧管安放在流动槽上。

有两个突起（托架下方）和两个弹簧用于引导流动槽插入，并确保方向正确。切口用于安放 NovaSeq Xp 歧管臂，可确保方向正确且放置均衡。磁力夹可旋转 180 度，将 NovaSeq Xp 歧管固定在流动槽上。

图 9 NovaSeq Xp 流动槽固定架






- A 突起（托架下方）用于引导装入
- B 弹簧对齐流动槽
- C 切口安放 NovaSeq Xp 歧管臂
- D 磁力夹固定流动槽和 NovaSeq Xp 歧管

符号描述

下表介绍耗材或耗材包装上的符号。

符号	描述
	耗材的过期日期。为获得最佳结果，请在此日期之前使用耗材。
	表示制造商 (Illumina)。
	预期用途是仅供科研使用 (RUO)。
	表示部件号，可用于识别耗材。 ¹
	表示批代码，用于识别生产耗材的批或批次。 ¹
	表示序列号。
	表示需要避光或避热。请避免阳光直接照射。

符号	描述
	表示会危害人体健康。
	表示危险警告。
	存储温度范围（以摄氏度为单位）。请在所指示的范围内存储耗材。 ²

¹ REF 用于识别单个组件，而 LOT 用于识别组件所属的批次或批。

² 存储温度可能与装运温度不同。

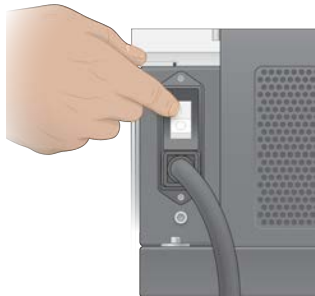
第 3 章入门

启动仪器	17
配置设置	18
用户自备的耗材和设备	22

启动仪器

- 1 | 将仪器背面的电源开关切换到 | (开) 位置。

图 10 电源开关位置



- 2 | 等到仪器右边的电源按钮发出蓝光时，按下该按钮。

图 11 电源按钮位置



用户帐户

NVCS v1.5 及更高版本中有两种帐户类型，分别是管理员和用户。每种帐户类型的权限如下表所示。

权限	管理员	用户
设置、开始、监控测序运行	X	X
下载和更新软件	X	
查看其他用户开始的活动运行的状态	X	
终止无响应的 UCS 进程	X	

应用程序数据文件存储在 C:/ProgramData 中。应用程序安装在 C:/Program Files 中。无论哪种帐户，NVCS 都会以全屏应用程序的形式启动。

登录系统

- 1 | 操作系统加载后，使用您所在站点的用户名和密码登录 Windows。

2 打开 NVCS。

该软件会启动并初始化系统。初始化完成后，“Home（主页）”界面即会显示。

NVCS 会以用户应用程序的形式启动。如果您要使用软件更新等需要管理员权限的功能，而又没有以管理员身份登录，系统会提示您以管理员身份登录。

要想随时了解测序运行的进度，请在 NVCS 运行期间以及测序运行进行期间保持登录状态。

配置设置

NVCS 包含针对以下几项的设置：

- ▶ 运行模式（手动或基于文件）
- ▶ NovaSeq Xp 工作流程
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ 软件更新



注意

在配置“Workflow Selection（工作流程选择）”或“Automatic Checks for Software Updates（自动检查软件更新）”之前，请确保已配置“Mode Selection（模式选择）”。

运行设置模式

- ▶ **Manual（手动）** — 默认模式，会向指定输出文件夹发送数据以供日后分析之用。
- ▶ **File-Based（基于文件）** — 备选模式，使用来自 BaseSpace Clarity LIMS 或其他 LIMS 系统的文件定义运行参数。有关详细信息，请参见 [配置 LIMS 输出（第 19 页）](#)。

配置运行设置模式时，请务必为运行设置文件夹指定现有的位置。此文件夹是必需的，如果指定的位置不存在，系统会显示无效位置消息。

两种运行设置模式都包含将数据发送到 BaseSpace Sequence Hub 进行分析的选项。

配置手动模式

- 1 在主菜单中，选择 **Settings（设置）**。
“Settings（设置）”屏幕会打开，并显示“Mode Selection（模式选择）”选项卡。
- 2 选择 **Manual（手动）**。
- 3 **[可选]** 输入或浏览到输出文件夹的首选网络位置。
不要指定 C:\、D:\ 或 Z:\ 驱动器上的位置。否则会导致出现驱动器无效错误。
此设置为默认位置。输出文件夹位置可在每次运行时更改。
- 4 **[可选]** 选择 **Send Instrument Performance Data to Illumina（将仪器性能数据发送给 Illumina）** 以启用 Illumina Proactive 监控服务。软件界面中的设置名称可能会与本指南中的名称有所不同，具体取决于所使用的 NVCS 版本。
如果打开此设置，即将将仪器性能数据发送给 Illumina。此数据可帮助 Illumina 更轻松地进行故障诊断以及检测潜在的故障，从而实现预防性维护并最大限度延长仪器正常运行时间。有关此服务各项优点的详细信息，请参见《*Illumina Proactive 技术说明*》（文档号 1000000052503）。
此服务：
 - ▶ 不发送测序数据
 - ▶ 要求将仪器连接到可访问互联网的网络
 - ▶ 默认情况下处于打开状态。要想取消此服务，请禁用 **Send Instrument Performance Data to Illumina（将仪器性能数据发送给 Illumina）** 设置。

5 选择 **Save (保存)**。

配置基于文件模式

- 在主菜单中，选择 **Settings (设置)**。
“Settings (设置)” 屏幕会打开，并显示 “Mode Selection (模式选择)” 选项卡。
- 选择 **File-Based (基于文件)**。
- 输入或浏览到运行设置文件夹 (LIMS 文件包含在其中) 的首选网络位置。
确保已将适当的 LIMS 文件添加至运行设置文件夹，然后再设置运行。运行设置期间，该软件会使用文库试管 ID 或流动槽 ID 来查找当前运行的文件。
- [可选]** 输入或浏览到输出文件夹的首选网络位置。
不要指定 C:\、D:\ 或 Z:\ 驱动器上的位置。否则会导致出现驱动器无效错误。
输出文件夹位置可在每次运行时更改。
- [可选]** 选择 **Send Instrument Performance Data to Illumina (将仪器性能数据发送给 Illumina)** 以启用 Illumina Proactive 监控服务。软件界面中的设置名称可能会与本指南中的名称有所不同，具体取决于所使用的 NVCS 版本。
如果打开此设置，即将将仪器性能数据发送给 Illumina。此数据可帮助 Illumina 更轻松地进行故障诊断以及检测潜在的故障，从而实现预防性维护并最大限度延长仪器正常运行时间。有关此服务各项优点的详细信息，请参见《Illumina Proactive 技术说明》(文档号 1000000052503)。
此服务：
 - ▶ 不发送测序数据
 - ▶ 要求将仪器连接到可访问互联网的网络
 - ▶ 默认情况下处于打开状态。要想取消此服务，请禁用 **Send Instrument Performance Data to Illumina (将仪器性能数据发送给 Illumina)** 设置。
 如果启用此选项，则系统需要有外部互联网连接。
- 选择 **Save (保存)**。

配置 LIMS 输出

如果您的系统配置为使用基于文件模式，并且您使用的是 BaseSpace Clarity LIMS 以外的 LIMS 软件，请配置 LIMS 以生成 *.json 格式的运行设置文件。如果使用标准工作流程，文件名必须与文库试管 ID 一致。文件中的流动槽 ID 字段可以保留为空。如果使用 NovaSeq Xp 工作流程，文件名必须与流动槽 ID 一致，并且文件中必须指定流动槽 ID 和文库 ID。文件名和值不区分大小写。

外部 LIMS 软件可以使用 NovaSeq LIMS API 与 NovaSeq 6000 进行交互。有关 API 端点的详细信息，请联系 Illumina 技术支持部门。

字段名称	值
run_name	首选的运行名称，其中包含字母数字字符、连字符和下划线
run_mode	以下任一模式： · SP · S1 · S2 · S4
workflow_type	NoIndex、SingleIndex 或 DualIndex
librarytube_ID	文库试管的 RFID
rehyb*	True 或 False

字段名称	值
sample_loading_type	NovaSeqStandard 或 NovaSeqXp
Flowcell_ID	流动槽的 ID
paired_end	True 或 False
read1	最大为 251 的值（额外 UMI 片段循环数可能为 259）
read2	最大为 251 的值（额外 UMI 片段循环数可能为 259）
index_read1	任意值
index_read2	任意值
output_folder	输出文件夹的路径，含有两个反斜杠表示转义序列
samplesheet	样品表或其他 *.csv 格式的文件的路径，含有两个反斜杠表示转义序列
use_basespace	True 或 False
basespace_mode	RunMonitoringOnly 或 RunMonitoringAndStorage
use_custom_read1_primer	True 或 False
use_custom_read2_primer	True 或 False
use_custom_index_read1_primer	True 或 False
use_custom_index_read2_primer	True 或 False

* NVCS v1.4.0 或更低版本不提供再次杂化功能。

名为 H6655DMXX.json 的示例 *.json 文件：

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

配置默认的标签循环次数

您可以按如下步骤为标准工作流程配置默认的标签循环次数。

- 1 在主菜单中，选择 **Settings（设置）**。
“Settings（设置）”屏幕会打开，并显示“Mode Selection（模式选择）”选项卡。

- 2 选择 **Workflow Selection (工作流程选择)** 选项卡。
- 3 在 **Index Cycles (标签循环)** 文本框中输入默认的标签循环次数。
- 4 选择 **Save (保存)**。

NovaSeq 标准和 NovaSeq Xp 工作流程

NovaSeq 标准工作流程和 NovaSeq Xp 工作流程都使用 Illumina 专有的 ExAmp 化学反应。

▶ 标准工作流程

NovaSeq 标准工作流程会自动在仪器上执行 Illumina 专有 ExAmp 簇化学反应的两个关键步骤。

- ▶ 制备 ExAmp 预先混合液
- ▶ 将预先混合液输送到流动槽

在仪器上制备和输送预先混合液可最大程度减少用户干预，避免所制备混合液发生变化。

在标准工作流程的运行设置步骤中，会将一个装有已变性且已中和混合文库（达到了建议的浓度）的文库试管插入到簇生成夹盒的位置 8 处。有关建议的浓度的详细信息，请参见《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）。运行启动后，无需用户干预便会在仪器上自动执行后续步骤。其中包括将簇生成夹盒中的 ExAmp 试剂移到文库试管、制备试剂和混合文库混合液，以及将制备的混合液输送到流动槽的所有泳道中。

在仪器上完成簇生成后，会执行一系列两个工作流程中都包含的步骤。其中包括对已生成簇的流动槽应用调节混合液，以及准备簇以进行边合成边测序的其他化学反应步骤。调节混合液是在簇生成过程中使用簇生成夹盒中的试剂以及运行设置期间插入的文库试管制备而成。调节混合液有助于提高 NovaSeq 仪器上的簇生成效率。

▶ NovaSeq Xp 工作流程

在 NovaSeq Xp 工作流程中，可使用 NovaSeq Xp 流动槽固定架和流动槽专用的耗材试剂盒（NovaSeq Xp 2 泳道试剂盒或 NovaSeq Xp 4 泳道试剂盒）将不同文库或混合文库装入 NovaSeq 流动槽的单个泳道中。NovaSeq Xp 试剂盒包含簇生成所需的 ExAmp 试剂和泳道装入所需的 NovaSeq Xp 歧管。

ExAmp/文库混合液制备好后，将使用 NovaSeq Xp 流动槽固定架和 NovaSeq Xp 歧管装入到流动槽的单个泳道中。可以使用自动化液体处理程序制备 ExAmp/文库混合液并将其输送到歧管中以待流动槽自动注入。完成流动槽样品装入后，将一个空文库试管插入簇生成夹盒的位置 8 处，然后将流动槽置于仪器上，并启动测序运行。

启动运行后，会执行一系列两个工作流程中都包含的步骤。其中包括对已生成簇的流动槽应用调节混合液，以及准备簇以进行边合成边测序的其他化学反应步骤。调节混合液是在簇生成过程中使用簇生成夹盒中的试剂在运行设置期间插入的空文库试管中进行混合制备而成。调节混合液有助于提高 NovaSeq 仪器上的簇生成效率。

配置 NovaSeq Xp 工作流程

- 1 在主菜单中，选择 **Settings (设置)**。
 - “Settings (设置)” 屏幕会打开，并显示 “Mode Selection (模式选择)” 选项卡。
- 2 选择 **Workflow Selection (工作流程选择)** 选项卡。
- 3 要启用 NovaSeq Xp 工作流程，请选择 **Enable Workflow Selection (启用工作流程选择)**。
- 4 [可选] 要将 NovaSeq Xp 设为默认工作流程，请选择 **NovaSeq Xp**。
- 5 选择 **Save (保存)**。

配置 BaseSpace Sequence Hub

请按照下列说明配置 BaseSpace Sequence Hub 的默认设置。在设置运行期间，您可以对当前运行禁用 BaseSpace Sequence Hub 或更改运行监控和存储的设置。需要有互联网连接才能连接到 BaseSpace Sequence Hub。

- 1 在主菜单中，选择 **Settings (设置)**。
“Settings (设置)” 屏幕会打开，并显示 “Mode Selection (模式选择)” 选项卡。
- 2 选择 **BaseSpace Sequence Hub** 复选框。
- 3 选择配置选项中进行选择：
 - ▶ **Run Monitoring and Storage (运行监控和存储)** — 将运行数据发送到 BaseSpace Sequence Hub 供远程监控和数据分析。此选项要求随运行上传样品表。
 - ▶ **Run Monitoring Only (仅运行监控)** — 将 InterOp、日志及其他非 CBCL 运行文件发送到 BaseSpace Sequence Hub，以便可远程监控运行。
- 4 在 “Hosting Location (服务器位置)” 下拉菜单中，选择 **EU (Frankfurt) (欧盟 (法兰克福))** 或 **USA (N. Virginia) (美国 (北弗吉尼亚))**。
此选项决定数据将上传到何处。
- 5 如果您是 BaseSpace Enterprise 用户：
 - a 选择 **Private Domain (专用域)** 复选框。
 - b 输入用于单点登录到 BaseSpace Sequence Hub 的域名。
- 6 选择 **Save (保存)**。

样品表名称

运行 NVCS v1.3.1 或更低版本时，用于 NovaSeq 6000 运行并上传到 BaseSpace Sequence Hub 的样品表必须命名为 SampleSheet.csv (区分大小写)。如果样品表命名不正确并且系统启用了 “Run Monitoring and Storage (运行监控和存储)”，则 BaseSpace Sequence Hub 会标记运行以引起注意。标记的运行可以排入 FASTQ 生成队列，方法是选择 **More (更多) | Fix Sample Sheet and Requeue (修正样品表并重新排入队列)**，然后输入正确的样品表。仅当提供样品表之后，才能将测序数据转换为 FASTQ 文件。

如果您运行的是 NVCS v1.4 或更高版本，则样品表的名称没有任何限制。

如果您是使用 bcl2fastq2 转换软件 v2.19 或更高版本在本地将数据转换为 FASTQ 文件，则可以使用命令行选项 `--sample-sheet` 来指定任何位置的任何 CSV 文件。命令行允许使用任何文件名。

配置软件更新

默认情况下，系统会启用自动检查软件更新。您可以从 “Settings (设置)” 禁用或启用自动检查更新。

- 1 在主菜单中，选择 **Settings (设置)**。
- 2 选择 **Software Update (软件更新)**。
- 3 选择 **If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available (如果启用，当有可用的软件更新时，仪器将显示通知)** 复选框。
- 4 选择 **Save (保存)**。

用户自备的耗材和设备

准备耗材、进行测序和系统维护需使用以下用户自备的耗材和设备。

耗材

耗材	供应商	用途
1 摩尔/升 NaOH	一般实验室供应商	稀释为 0.2 摩尔/升用于变性文库。
500 毫升离心瓶	一般实验室供应商	稀释 Tween 20 以用于维护清洗。
30 毫升离心管	一般实验室供应商	稀释 NaOCl 以用于维护清洗。
一次性无粉手套	一般实验室供应商	一般用途。
70% 异丙醇酒精棉片 或 70% 乙醇酒精棉片	VWR, 商品目录号 95041-714 (或等效物) 一般实验室供应商	在运行前清洁组件, 以及作一般用途。
低尘实验室棉巾纸	VWR, 商品目录号 21905-026 (或等效物)	擦干流动槽台, 以及作一般用途。
1.5 毫升微量离心管	VWR, 商品目录号 20170-038 (或等效物)	稀释 NaOH 和文库时混合溶液。
5% 的试剂级 NaOCl	Sigma-Aldrich, 商品目录号 239305	执行维护清洗。
NovaSeq 6000 试剂盒	illumina, 请参见 试剂盒概述 (第 9 页)	执行测序运行。
20 微升移液器吸头	一般实验室供应商	移液, 其目的是稀释和装入文库。
200 微升移液器吸头	一般实验室供应商	移液, 其目的是稀释和装入文库。
1000 微升移液器吸头	一般实验室供应商	移液, 其目的是稀释和装入文库。
100 毫升瓶装试剂或分光光度级异丙醇酒精 (99%)	一般实验室供应商	定期清洁光学组件并支持物镜清洁夹盒。
Tween 20	Sigma-Aldrich, 商品目录号 P7949	执行维护清洗。
实验室级用水	一般实验室供应商	稀释 NaOH 以用于变性文库。 稀释 Tween 20 和次氯酸钠以用于维护清洗。
[NovaSeq Xp 工作流程] 以下试剂盒之一: · NovaSeq Xp 2 泳道试剂盒 · NovaSeq Xp 4 泳道试剂盒	illumina: · 商品目录号 20021664 · 商品目录号 20021665	手动将文库装入流动槽: · 双泳道试剂盒适用于 SP、S1 和 S2 流动槽 · 四泳道试剂盒适用于 S4 流动槽
[NovaSeq Xp 工作流程] 以下试剂盒之一: · NovaSeq Xp 2 泳道试剂盒 v1.5 · NovaSeq Xp 4 泳道试剂盒 v1.5	illumina: · 商品目录号 20043130 · 商品目录号 20043131	手动将文库装入流动槽: · 双泳道试剂盒适用于 SP、S1 和 S2 流动槽 · 四泳道试剂盒适用于 S4 流动槽
[NovaSeq Xp 工作流程] 0.5 毫升和 1.7 毫升试管	一般实验室供应商	混合 ExAmp 时需要用到。
[NovaSeq Xp 工作流程] [可选] 以下歧管包之一: · NovaSeq Xp 2 泳道歧管包 · NovaSeq Xp 4 泳道歧管包	illumina: · 商品目录号 20021666 · 商品目录号 20021667	备用 NovaSeq Xp 歧管用于手动将文库装入流动槽。
[可选] PhiX 对照品 v3	illumina, 商品目录号 FC-110-3001	注入 PhiX 对照品。

Illumina 试剂盒中的耗材

对一个流动槽测序需要一个 NovaSeq 6000 试剂盒。每个试剂盒包含多个耗材，请见下表。对于双流动槽运行，请使用两个试剂盒。

表 9 NovaSeq 6000 试剂盒中的耗材

耗材（每种一个）	用途
缓冲液夹盒	为运行提供测序缓冲液。
簇生成夹盒	为运行提供簇生成、标签和双末端测序试剂。
流动槽	簇生成和测序反应在流动槽上发生。
SBS 夹盒	为运行提供测序试剂。
文库试管	用于装入已混合且已变性的文库（客户自备），或制备调节混合液（用于提高测序的簇生成效率）的空试管。

如果您遵照 NovaSeq Xp 工作流程将文库直接装入流动槽，请为每个试剂盒补充一个 NovaSeq Xp 试剂盒。每个 NovaSeq Xp 试剂盒包含以下耗材。



注意

DPX1 和 DPX2 耗材可能标记为 JPX1 和 JPX2。两者均与 v1.0 或 v1.5 试剂盒兼容。

表 10 NovaSeq Xp 试剂盒中的耗材

耗材（每种一个）	用途
DPX1/JPX1	制备 ExAmp 预先混合液。
DPX2/JPX2	
DPX3	
NovaSeq Xp 歧管	将文库装入流动槽。

实验室级用水准则

始终使用实验室级用水或去离子水来执行仪器操作。切勿使用自来水。请仅使用以下等级的水或等效物：

- ▶ 去离子水
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18 兆欧 (MΩ) 水
- ▶ 高纯水
- ▶ 超纯水
- ▶ 分子生物学级用水

设备

物品	来源
冰柜, -25°C 到 -15°C	一般实验室供应商
500 毫升灭菌刻度量筒	一般实验室供应商
冰桶	一般实验室供应商
20 微升移液器	一般实验室供应商
200 微升移液器	一般实验室供应商
1000 微升移液器	一般实验室供应商
冰箱, 2°C 到 8°C	一般实验室供应商
试管, 水槽*	一般实验室供应商
[NovaSeq Xp 工作流程] NovaSeq Xp 流动槽固定架	Illumina, 商品目录号 20021663

* 使用可容纳两个试剂夹盒和相应水位的试管。例如, (61 cm × 91.4 cm × 25.4 cm)(24 in × 36 in × 10 in)。

第 4 章标准工作流程：准备耗材

方法	26
解冻 SBS 和簇生成夹盒	26
清空废试剂瓶	27
准备流动槽	28
混合文库并进行变性以用于测序	28

方法

开始制备样品或准备耗材之前，请确保 NVCS 版本满足下表中列出的最低软件要求。

表 11 最低软件要求

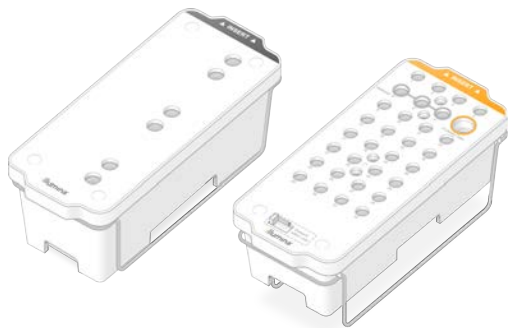
流动槽	v1.0 试剂盒最低软件版本	v1.5 试剂盒最低软件版本
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	全部	1.7
S4	1.2.0	1.7

- ▶ 请确保您已备齐所需的耗材和设备。请参见[用户自备的耗材和设备（第 22 页）](#)。
- ▶ 在准备耗材时，请始终检查标签，以确保组件相互兼容。不要混合搭配使用 SP、S1、S2 和 S4 组件。
- ▶ 不要混用试剂盒版本。
 - ▶ v1.0 SBS 和 CPE 夹盒只能一起配对使用。
 - ▶ v1.5 SBS 和 CPE 夹盒只能一起配对使用。
- ▶ 使用指定的剂量、浓度、温度和持续时间，按所示的顺序遵照说明操作。
- ▶ 除非在说明中指定了停止点，否则请立即执行下一步骤。

解冻 SBS 和簇生成夹盒

- 1 如果正在执行测序运行，请确保解冻完成时仪器两侧均可用。
- 2 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出 SBS 和簇生成夹盒。
- 3 将每个夹盒分别放入一个解冻网架中。
仪器随附有解冻网架，以防夹盒在水槽中翻倒。

图 12 将夹盒置于解冻网架中



- 4 在室温水槽（19°C 至 25°C）中解冻。
大概淹没一半。
- 5 使用下表确定解冻时间。

**注意**

使用热水解冻试剂可能会导致数据质量下降或运行失败。

夹盒	解冻时间
SP、S1 和 S2 SBS 夹盒	4 小时
SP、S1 和 S2 簇生成夹盒	最长 2 小时
S4 SBS 夹盒	4 小时
S4 簇生成夹盒	最长 4 小时

- 6 用纸巾彻底擦干夹盒底座。擦干孔之间的位置，去除所有水渍。
- 7 检查封口口是否有水。如果有水，请用无绒棉巾纸吸干
- 8 检查每个夹盒的底面，确保槽中无冰晶，这表示试剂已解冻。
- 9 将每个夹盒翻转 10 次以混匀试剂。
- 10 在工作台上轻敲每个夹盒的底部以减少气泡。
- 11 如果您不能在 4 小时内将试剂装入仪器中，可以将其在 2°C 到 8°C 的温度下存储最长 24 个小时。

清空废试剂瓶

按照以下说明在**每次**测序运行后清空废试剂瓶。如果您的系统配置为将废试剂排出到外部，小瓶用于收集废试剂，每次测序运行后，必须将其清空。大瓶必须放置到位。

**警告**

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关环境、健康和安全的更多信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

- 1 按以下步骤取出并清空小废试剂瓶。
 - a 提起拉杆并从凹室中取出小废试剂瓶。抓住试剂瓶侧面。
 - b 从试剂瓶前面的盖座中取下螺纹盖。
 - c 用螺纹盖密封瓶口以防液体洒出。
 - d 将这些废液与另一个瓶中的废液分开放置，根据适用标准丢弃。
 - e 将取下瓶盖的小瓶放回凹室，然后放低拉杆。将瓶盖放在盖座中。
- 2 按以下步骤取出并清空大废试剂瓶。
 - a 使用顶部把手从缓冲液抽屉的左侧取出大废试剂瓶。
 - b 从试剂瓶前面的盖座中取下螺纹盖。
 - c 用螺纹盖密封瓶口以防液体洒出。
 - d 根据适用标准丢弃溶液。清空时握紧两个把手。
 - e 将取下瓶盖的大瓶放回缓冲液抽屉。将瓶盖放在盖座中。

图 13 放回空瓶



- 3 戴上一副新的无粉手套，以免污染仪器表面。
- 4 关上缓冲液抽屉，然后关闭液体仓门。

**警告**

不清空废试剂瓶可能会导致运行终止及发生溢液，这会对仪器造成损害并产生安全风险。

准备流动槽

- 1 从 2°C 到 8°C 的存储环境中取出新的流动槽包装。
- 2 将未开封的流动槽放置 10 到 15 分钟，让流动槽达到室温。
从包装中取出流动槽后，应在 12 小时内使用。

混合文库并进行变性以用于测序

装入浓度会因文库制备、定量和标准化方法而异。有关说明，请参见《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）。准备好混合文库之后，继续准备 SBS 夹盒和簇生成夹盒（第 36 页）。

**注意**

请仅在必要时才存储文库试管。长期存储在 -25°C 至 -15°C 的温度下可能会增加重复序列，降低产量。

准备 SBS 夹盒和簇生成夹盒

- 1 检查每个夹盒的底面，确保槽中无冰晶，这表示试剂已解冻。
- 2 将每个夹盒翻转 10 次以混匀试剂。
- 3 在工作台上轻敲每个夹盒的底部以减少气泡。

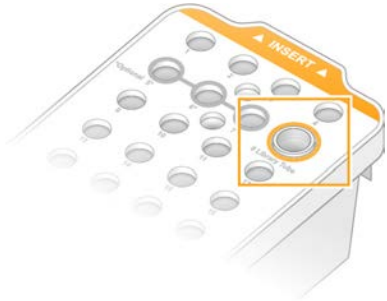
制备自定义引物

如果您的文库需要自定义引物，请按照《NovaSeq 系列自定义引物指南》（文档号 1000000022266）中的说明制备引物。

装入文库试管

- 1 不要摇荡底部的文库，将取下管帽且装有已变性并已稀释好的混合文库的文库试管插入簇生成夹盒的**文库试管位置**（位置 8 处）。

图 14 装入位置 8 处的文库试管（已取下管帽）



第 5 章 NovaSeq Xp 工作流程：准备耗材

NovaSeq Xp 工作流程摘要	30
方法	31
解冻 SBS 和簇生成夹盒	31
清空废试剂瓶	32
准备流动槽	33
解冻 ExAmp 试剂	33
混合、变性并装入文库以进行测序	33

NovaSeq Xp 工作流程摘要

开始制备样品或准备耗材之前，请确保 NVCS 版本满足下表中列出的最低软件要求。

表 12 最低软件要求

流动槽	v1.0 试剂盒最低软件版本	v1.5 试剂盒最低软件版本
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	全部	1.7
S4	1.2.0	1.7

注意

NVCS 支持交错开始新的运行。请参见 [交错开始运行](#)（第 45 页）。

请务必按照指定顺序完成 NovaSeq Xp 工作流程中的所有步骤。

注意

步骤 1 到 4 可并行完成，但必须全部完成才能执行步骤 5。

- 1 解冻 SBS 和簇生成夹盒。
- 2 清空废试剂瓶。
- 3 将未开封的流动槽放置 10 到 15 分钟，让流动槽达到室温。从包装中取出流动槽后，应在 12 小时内使用。
- 4 根据《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）中适用于您的文库的操作流程标准化并混合文库，然后加入 PhiX 对照品（可选）。

注意

按指定顺序完成步骤 5 到 11。

- 5 解冻 ExAmp 试剂。
- 6 根据《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）制备新鲜的 NaOH 稀释液。
- 7 根据《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）对混合文库进行变性和中和。
- 8 准备流动槽和固定架。
- 9 制备 ExAmp 预先混合液。
- 10 将 ExAmp/文库混合液装入流动槽。
- 11 将空文库试管装入簇生成夹盒的位置 8 处。

方法

- ▶ 请确保您已备齐所需的耗材和设备。请参见*用户自备的耗材和设备*（第 22 页）。
- ▶ 确保已打开仪器，且仪器的存储空间足以满足运行需求。请参见*流程管理*（第 7 页）。
- ▶ 在开始 *NovaSeq Xp 工作流程摘要*（第 30 页）的解冻 ExAmp 试剂步骤之前，确保已完成仪器两侧的运行后自动清洗。
- ▶ 在准备耗材时，请始终检查标签，以确保组件相互兼容。不要在仪器的一侧混用 SP、S1、S2 和 S4 组件或双泳道和四泳道组件。
- ▶ 不要混用试剂盒版本。
 - ▶ v1.0 SBS 和 CPE 夹盒只能一起配对使用。
 - ▶ v1.5 SBS 和 CPE 夹盒只能一起配对使用。
- ▶ 使用指定的剂量、温度和持续时间，按所示的顺序遵照说明操作。
- ▶ 不混合试剂时，请将所有试剂和文库置于冰上。
- ▶ 除非在说明中指定了停止点，否则请立即执行下一步骤。
- ▶ 要想成功开始双泳道流动槽测序，必须填满两个泳道。要想成功开始四泳道流动槽测序，其中一个泳道可以不完全填满或不填。
- ▶ 手动混合 ExAmp 试剂的结果发生差异的最常见原因是 ExAmp 组件剂量的输送不准确或混合不充分。请确保混合均匀。



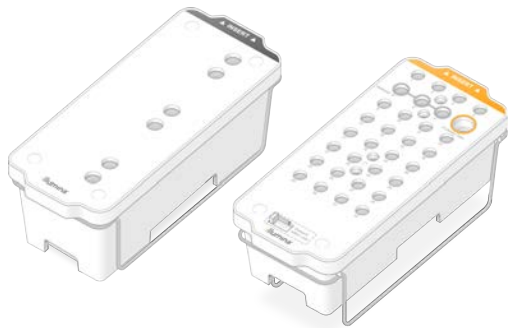
注意

将文库装入流动槽后，请立即开始测序运行（最好在 30 分钟内）。

解冻 SBS 和簇生成夹盒

- 1 如果正在执行测序运行，请确保解冻完成时仪器两侧均可用。
- 2 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出 SBS 和簇生成夹盒。
- 3 将每个夹盒分别放入一个解冻网架中。
仪器随附有解冻网架，以防夹盒在水槽中翻倒。

图 15 将夹盒置于解冻网架中



- 4 在室温水槽（19°C 至 25°C）中解冻。
大概淹没一半。
- 5 使用下表确定解冻时间。

**注意**

使用热水解冻试剂可能会导致数据质量下降或运行失败。

夹盒	解冻时间
SP、S1 和 S2 SBS 夹盒	4 小时
SP、S1 和 S2 簇生成夹盒	最长 2 小时
S4 SBS 夹盒	4 小时
S4 簇生成夹盒	最长 4 小时

- 6 用纸巾彻底擦干夹盒底座。擦干孔之间的位置，去除所有水渍。
- 7 检查封口口是否有水。如果有水，请用无绒棉巾纸吸干
- 8 检查每个夹盒的底面，确保槽中无冰晶，这表示试剂已解冻。
- 9 将每个夹盒翻转 10 次以混匀试剂。
- 10 在工作台上轻敲每个夹盒的底部以减少气泡。
- 11 如果您不能在 4 小时内将试剂装入仪器中，可以将其在 2°C 到 8°C 的温度下存储最长 24 个小时。

清空废试剂瓶

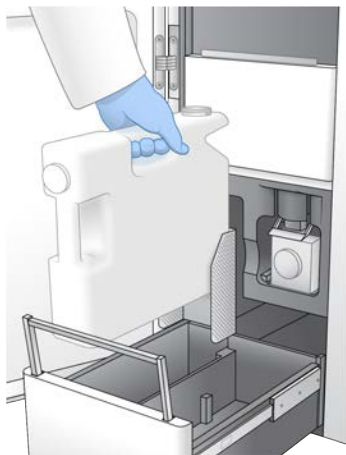
按照以下说明在**每次**测序运行后清空废试剂瓶。如果您的系统配置为将废试剂排出到外部，小瓶用于收集废试剂，每次测序运行后，必须将其清空。大瓶必须放置到位。

**警告**

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关环境、健康和安全的更多信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

- 1 按以下步骤取出并清空小废试剂瓶。
 - a 提起拉杆并从凹室中取出小废试剂瓶。抓住试剂瓶侧面。
 - b 从试剂瓶前面的盖座中取下螺纹盖。
 - c 用螺纹盖密封瓶口以防液体洒出。
 - d 将这些废液与另一个瓶中的废液分开放置，根据适用标准丢弃。
 - e 将取下瓶盖的小瓶放回凹室，然后放低拉杆。将瓶盖放在盖座中。
- 2 按以下步骤取出并清空大废试剂瓶。
 - a 使用顶部把手从缓冲液抽屉的左侧取出大废试剂瓶。
 - b 从试剂瓶前面的盖座中取下螺纹盖。
 - c 用螺纹盖密封瓶口以防液体洒出。
 - d 根据适用标准丢弃溶液。清空时握紧两个把手。
 - e 将取下瓶盖的大瓶放回缓冲液抽屉。将瓶盖放在盖座中。

图 16 放回空瓶



- 3 戴上一副新的无粉手套，以免污染仪器表面。
- 4 关上缓冲液抽屉，然后关闭液体仓门。

**警告**

不清空废试剂瓶可能会导致运行终止及发生溢液，这会对仪器造成损害并产生安全风险。

准备流动槽

- 1 从 2°C 到 8°C 的存储环境中取出新的流动槽包装。
- 2 将未开封的流动槽放置 10 到 15 分钟，让流动槽达到室温。
从包装中取出流动槽后，应在 12 小时内使用。

解冻 ExAmp 试剂

- 1 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中将 DPX1/JPX1、DPX2/JPX2 和 DPX3 各取一试管。
- 2 在室温下解冻 10 分钟。
- 3 放在冰上。

**注意**

如果必须再次冷冻未开封的 ExAmp 试剂，请在解冻后立即进行。ExAmp 试剂只能再次冷冻一次。剩余试剂不能再次冷冻或混合。

混合、变性并装入文库以进行测序

装入浓度会因文库制备、定量和标准化方法而异。有关说明，请参见《NovaSeq 6000 变性和稀释指南》（文档号 1000000106351）。准备好混合文库之后，继续 [准备流动槽和固定架](#)（第 33 页）。

准备流动槽和固定架

- 1 将 NovaSeq Xp 流动槽固定架放在平坦的表面上。装入仪器时，请让流动槽始终保持水平状态。
- 2 检查固定架，确保其上没有微粒。

- 3 戴上一副新的无粉手套以免污染流动槽的玻璃表面。
- 4 将封装着流动槽的箔纸包装放在平坦的表面上，从边角剥开箔纸。
- 5 取下盖住流动槽的透明塑料护圈。
- 6 从包装中取出流动槽。抓住流动槽侧面，以免碰触玻璃或底部的垫片。
- 7 如果在某一面玻璃表面看到微粒，请用无绒酒精棉片清洁观察到微粒的表面，并用低尘实验室棉巾纸擦干。
- 8 妥善丢弃包装。

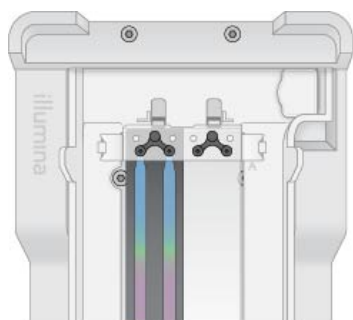


注意

流动槽上有一些划痕及其他轻微外观缺陷属于正常现象，通常不会影响数据质量和产量。Illumina 建议按正常流程使用这些流动槽。

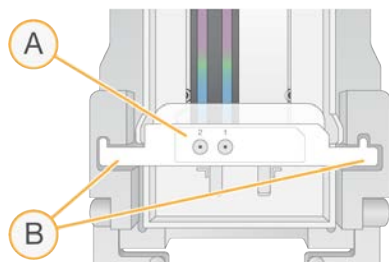
- 9 翻转流动槽，使顶面**朝下**。
- 10 将流动槽的出口端滑入托架下方，然后放到固定架上。请参见[流动槽](#)（第 11 页）和 [NovaSeq Xp 流动槽固定架](#)（第 14 页）。

图 17 流动槽放置



- 11 将 NovaSeq Xp 歧管孔朝上装到流动槽入口端上方。确保 NovaSeq Xp 歧管臂已牢固地放入固定架切口。

图 18 NovaSeq Xp 歧管放置



- A NovaSeq Xp 歧管孔朝上
- B NovaSeq Xp 歧管臂放入固定架切口中

- 12 合上夹子以固定流动槽和 NovaSeq Xp 歧管并密封垫片。
- 13 将混合文库装入流动槽后，丢弃 NovaSeq Xp 歧管。
NovaSeq Xp 歧管为一次性耗材。

制备 ExAmp 预先混合液

制备 ExAmp 预先混合液时，使用容量至少为所需剂量两倍的微量离心管：

- ▶ 对于双泳道流动槽，请使用 0.5 毫升或 1.7 毫升试管。
- ▶ 对于四泳道流动槽，请使用 1.7 毫升试管。

手动混合 ExAmp 试剂的结果发生差异的最常见原因是剂量输送不准确或混合不充分。请确保混合均匀。



注意

DPX1 和 DPX2 耗材可能标记为 JPX1 和 JPX2。两者均与 v1.0 或 v1.5 试剂盒兼容。

- 1 翻转或稍作振荡以混匀 DPX1/JPX1 和 DPX2/JPX2。
- 2 稍作振荡以混匀 DPX3。
ExAmp 试剂可能是分开存储的。ExAmp 试剂具有粘性，DPX2/JPX2 和 DPX3 尤为明显。DPX3 的粘度很高，因此无法通过简单翻转将其混匀。
- 3 对 DPX1/JPX1、DPX2/JPX2 和 DPX3 进行短暂的离心。
- 4 按指定顺序将以下剂量的溶液加入适当的微量离心管中。

加入顺序	试剂*	用于双泳道流动槽 (SP/S1/S2) 的剂量 (微升)	用于四泳道流动槽 (S4) 的剂量 (微升)
1	DPX1/JPX1	126	315
2	DPX2/JPX2	18	45
3	DPX3	66	165

*DPX/JPX 试剂管盖可能使用颜色编码（红色、黄色和蓝色分别代表 DPX1/JPX1、DPX2/JPX2 和 DPX3）。更换管盖时，请务必保留颜色编码。

以上剂量的溶液可制备出 210 微升适用于 SP、S1 或 S2 模式的 ExAmp 预先混合液，或 525 微升适用于 S4 模式的预先混合液。这些剂量足够适用模式使用。制备额外剂量是为了预防将文库装入流动槽时发生移液错误的情况。

- 5 请缓慢移液和分配试剂以免形成气泡，并确保从吸头排出所有剂量。
- 6 振荡 20 到 30 秒，或直到彻底混匀。



注意

振荡时，ExAmp 预先混合液可维持稳定状态。

混合液可能会较为浑浊，这属于正常现象。

- 7 以最高 $280 \times g$ 的转速离心最多 1 分钟。
- 8 为获得最佳测序性能，请立即继续执行下一步。必要时，可将预先混合液置于冰上存储最多 1 小时。如于室温下存储，请在 30 分钟内使用。

将文库装入流动槽

为了获得最佳结果，请按如下所示操作：

- ▶ 始终让装入的流动槽保持在室温环境下。不要冷藏或置于冰上。
- ▶ 长时间孵育可能会降低簇通过过滤的百分比 (%PF)。
- ▶ 将混合文库装入流动槽后，在 30 分钟内开始运行。
- ▶ 立即使用 ExAmp/文库混合液产生的结果最佳。

- 按如下所示将 ExAmp 预先混合液加到每个已变性混合文库中，然后振荡 20 到 30 秒以混匀。如使用联管，请用移液器上下吸打以混匀。

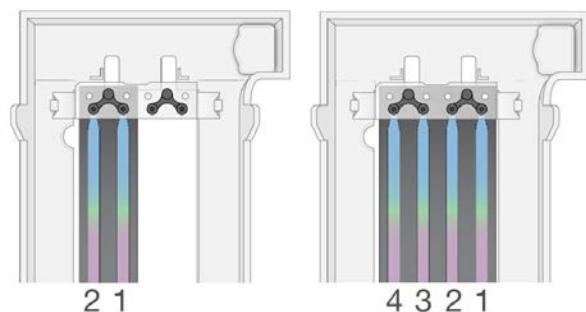
模式	已变性的混合文库 (微升)	ExAmp 预先混合液 (微升)	最终剂量 (微升)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 以最高 $280 \times g$ 的转速离心最多 1 分钟。
- 使用 p200 微升移液器将适当剂量的 ExAmp/文库混合液加到每个 NovaSeq Xp 歧管孔中。
 - 为防止产生气泡，请缓慢装入样品。
 - 确保将混合文库混合液加到预期泳道所对应的孔中。
 - 移液时，避免接触孔底部的过滤。
 - 无需等待泳道完全填满即可将混合液加到其余的歧管孔中。

模式	每个孔中的文库/ExAmp 混合液 (微升)
SP/S1	80
S2	95
S4	130

已编号的 NovaSeq Xp 歧管孔与流动槽泳道的编号对应。流动槽倒放时，泳道编号也会颠倒。

图 19 颠倒的泳道编号



- 将 ExAmp/文库混合液加到所有歧管孔中后，等待大约 2 分钟，以使混合液到达每个泳道的另一端。泳道出口端出现小气泡属于正常现象。泳道填满后，歧管孔中可能会剩余少量混合液。



注意

在确定泳道是否已填满或是否出现气泡时，切勿倾斜流动槽。倾斜流动槽可能会导致 ExAmp/文库混合液从流动槽中漏出。如果泳道未完全填满，不要尝试纠正。泳道未完全填满会导致产生的数据减少。不要尝试从流动槽取回样品。



注意

运送流动槽时，不要倾斜流动槽。

准备 SBS 夹盒和簇生成夹盒

- 检查每个夹盒的底面，确保槽中无冰晶，这表示试剂已解冻。
- 将每个夹盒翻转 10 次以混匀试剂。
- 在工作台上轻敲每个夹盒的底部以减少气泡。

制备自定义引物

如果您的文库需要自定义引物，请按照《NovaSeq 系列自定义引物指南》（文档号 100000022266）中的说明制备引物。

装入空文库试管

- 1 取下 NovaSeq 6000 试剂盒随附的文库试管的管盖。
- 2 将取下管盖的空文库试管插入簇生成夹盒的**文库试管**位置（位置 8 处）。
RFID 扫描和仪器上的试剂混合都必须备好空文库试管。文库试管条形码不会对照 LIMS 文件中指定的条形码进行验证。但系统会对 RFID 进行验证，以确保试管未经使用。

图 20 装入位置 8 处的文库试管（已取下管帽）



第 6 章测序

设置测序运行	38
监控运行进度	44
交错开始运行	45
删除运行	45
拆下位置 30	45
运行后自动清洗	46

设置测序运行

Illumina 建议您在 NVCS 运行期间以及测序运行进行期间保持登录状态。

- 1 除去仪器表面的所有物品。
在测序运行期间保持表面洁净，并避免靠在仪器上。流动槽门受到压力可能会打开，致使运行停止。已停止的运行无法恢复。



注意

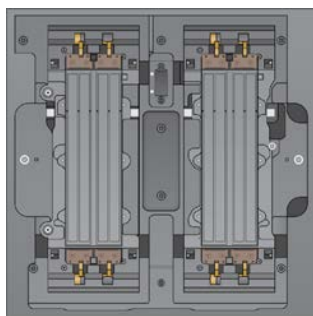
支持交错开始新的运行。交错开始计时器会指示能够启动交错运行的时间。有关详细信息，请参见 [交错开始运行 \(第 45 页\)](#)。

- 2 在“Home (主页)”界面中，选择 **Sequence (测序)**，然后选择单流动槽运行或双流动槽运行：
 - ▶ **A+B** — 设置双流动槽运行。
 - ▶ **A** — 在 A 面上设置单流动槽运行。
 - ▶ **B** — 在 B 面上设置单流动槽运行。该软件会启动一系列运行设置屏幕，第一个是“Load (装入)”屏幕。
- 3 选择 **OK (确定)** 以确认收到警告并打开流动槽门。

将流动槽装入仪器

- 1 如有上次运行留下的流动槽，请将其取出。
- 2 如果在流动槽台上看到微粒，请用酒精棉片清洁整个台面，包括射流接口以及光学对准目标的玻璃表面。用无绒棉巾纸擦干。

图 21 流动槽台



- 3 **[标准工作流程]** 按以下所示从包装中取出流动槽。
 - a 戴上一副新的无粉手套以免污染流动槽的玻璃表面。
 - b 将包装放在平坦的表面上，从边角剥开箔纸。
 - c 取下盖住流动槽的透明塑料护圈。
 - d 从包装中取出流动槽。抓住流动槽侧面，以免碰触玻璃或底部的垫片。

- e 如果在某一面玻璃表面看到微粒，请用无绒酒精棉片清洁观察到微粒的表面，并用低尘实验室棉巾纸擦干。
- f 妥善丢弃包装。



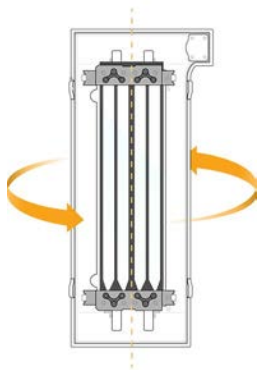
注意

流动槽上有一些划痕及其他轻微外观缺陷属于正常现象，通常不会影响数据质量和产量。Illumina 建议按正常流程使用这些流动槽。

4 [NovaSeq Xp 工作流程] 按以下所示从固定架上取下流动槽。

- a 打开固定流动槽和歧管的夹子。
- b 为避免液体滴到流动槽上，请小心取下并丢弃歧管。
- c 如有液体滴落到流动槽上，请用无绒酒精棉片清洁并用无绒实验室棉巾纸擦干。
- d 抓住流动槽侧面，将其从固定架上取下。确保平拿平放。
- e 如果垫片上有残余物，请用无绒棉巾纸吸干四个流动槽垫片。不要触碰垫片。
- f 将流动槽绕着长轴倒放，使顶面朝上。

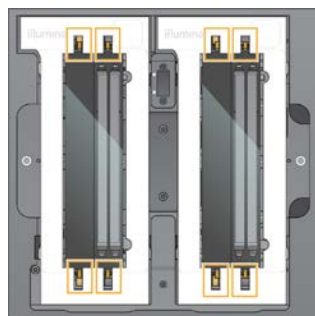
图 22 绕长轴倒放流动槽



- g 重新放回固定架存储之前，请先进行检查确保其上没有微粒。

5 将流动槽对准四个凸出的夹具，然后放置在流动槽台上。

图 23 装入的流动槽（已对准夹具）



6 选择 Close Flow Cell Door（关闭流动槽门）。

系统即会关闭流动槽门，检查传感器和 RFID，并在屏幕上显示流动槽 ID。

装入 SBS 夹盒和簇生成夹盒



注意

如果使用 NovaSeq Xp 工作流程，在装入簇生成夹盒之前，确保已在夹盒中装入取下管盖的空文库试管。

- 1 打开液体仓门，然后打开试剂冷却器门。
- 2 取出用过的 SBS 夹盒和簇生成夹盒。
用过的夹盒上的封箔口已被刺穿。
- 3 按照适用的标准处置未使用的溶液。
有关安全处置簇生成夹盒的位置 30 处的信息，请参见 [拆下位置 30 \(第 45 页\)](#)。
- 4 将准备好的夹盒装入试剂冷却器抽屉中，确保 **Insert (插入)** 标签朝着仪器背面：
 - ▶ 将 SBS 夹盒（灰色标签）放入左边位置。
 - ▶ 将装有已取下管帽的文库试管的簇生成夹盒（橙色标签）放入右边位置。

图 24 装入的试剂夹盒

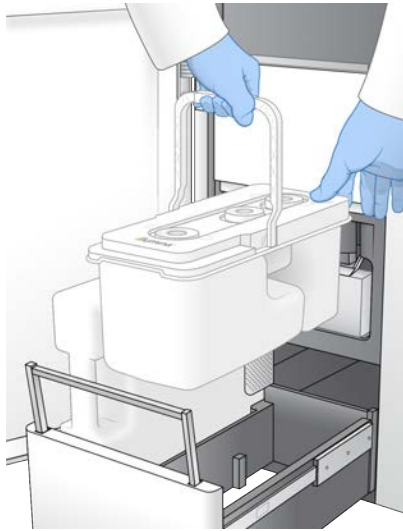


- 5 将抽屉滑入冷却器，然后关闭试剂冷却器门。
系统即会检查传感器和 RFID，并在屏幕上显示文库试管和两个夹盒的 ID。

装入缓冲液夹盒

- 1 拉动金属把手打开缓冲液抽屉。
- 2 从缓冲液抽屉右侧取下用过的缓冲液夹盒。
用过的缓冲液夹盒上的封箔口已被刺穿。
- 3 将新的缓冲液夹盒放入缓冲液抽屉中，确保 **Illumina** 标签面朝抽屉正面。使夹盒对准抽屉底面和侧面凸起的定位点。
正确装入后，缓冲液夹盒会安放平整且抽屉可以关上。

图 25 装入缓冲液夹盒



- 4 如果两个废试剂瓶都已清空，请选择确认两个废试剂瓶都已清空的复选框。

**警告**

不清空废试剂瓶可能会导致运行终止及发生溢液，这会对仪器造成损害并产生安全风险。

- 5 选择可用的按钮：

- ▶ **Log In (登录)** — 打开“Log In (登录)”屏幕以登录到 BaseSpace Sequence Hub。继续 [登录 BaseSpace Sequence Hub](#)。
- ▶ **Run Setup (运行设置)** — 跳过 BaseSpace Sequence Hub，并打开“Run Setup (运行设置)”屏幕以输入运行参数。继续 [输入运行参数 \(第 41 页\)](#)。

可用按钮取决于是否将系统配置为使用 BaseSpace Sequence Hub。

登录 BaseSpace Sequence Hub

打开 NVCS 时，系统会选择您在 BaseSpace Sequence Hub 中的默认工作组作为您的工作组。如果未指定默认工作组，会选择您的个人工作组。

- 1 **[可选]** 为当前运行更新 BaseSpace Sequence Hub 设置：
 - ▶ 要禁用 BaseSpace Sequence Hub，请清除 **BaseSpace Sequence Hub** 复选框，然后选择 **Run Setup (运行设置)**，以便在不登录的情况下继续。
 - ▶ 要将运行数据发送到 BaseSpace Sequence Hub 供远程监控和数据分析，请选择 **Run Monitoring and Storage (运行监控和存储)**。此选项需要样品表。
 - ▶ 要将 InterOp 文件 runinfo.xml 和 runParameters.xml 发送给 BaseSpace Sequence Hub 来远程监控运行，请选择 **Run Monitoring Only (仅运行监控)**。
- 2 输入 BaseSpace Sequence Hub 用户名和密码，然后选择 **Sign In (登录)**。
- 3 如果出现提示，选择要将运行数据上载到的工作组，然后选择 **Run Setup (运行设置)**。只有当您属于多个工作组时才会收到提示。

输入运行参数

- 1 如已启用 NovaSeq Xp 工作流程，请选择工作流程类型。
 - ▶ 如果选择的是 **NovaSeq Xp**，请务必装入空文库试管。
 - ▶ 如果选择的是 **NovaSeq 标准**，请确保文库试管已装入样品。

- 2 在“Run Name（运行名称）”字段中，输入您偏好的名称以标识当前运行。运行名称可包含字母数字字符、连字符和下划线。
- 3 输入测序运行中每个片段的循环次数和标签长度。
标签循环次数没有最大值，但片段循环和标签循环的总次数必须小于试剂盒的循环次数。
 - ▶ **Read 1（片段 1）** — 为 v1.0 300/500 次循环的试剂盒输入最多为 151/251 次循环的值。为 v1.5 300/500 次循环的试剂盒输入最多为 159/259 次循环的值。
 - ▶ **Index 1（标签 1）** — 输入标签 1 (i7) 引物的循环次数。
 - ▶ **Index 2（标签 2）** — 输入标签 2 (i5) 引物的循环次数。
 - ▶ **Read 2（片段 2）** — 为 v1.0 300/500 次循环的试剂盒输入最多为 151/251 次循环的值。为 v1.5 300/500 次循环的试剂盒输入最多为 159/259 次循环的值。此值通常与“Read 1（片段 1）”的值相同。



注意

片段 1 和片段 2 中分析的循环次数比输入的值少一个循环。例如，要执行含 150 次循环的双末端测序运行（2 × 150 碱基对的运行），请为片段 1 和片段 2 输入 151 次循环的值。

对于 v1.0 试剂盒，输入的四个值之和可以超过为所选试剂盒指示的循环次数，双末端测序运行最多可超过 23 次循环，单端测序运行最多可超过 30 次循环。

对于 v1.5 试剂盒，输入的四个值之和可以超过为所选试剂盒指示的循环次数，双末端和单端测序运行均最多可超过 38 次循环。

S4 35 次循环试剂盒总共包含 72 次测序循环。四个值之和可以超过指示的最大循环次数 37。默认的片段值可编辑，循环次数可以分布在 4 个片段中，例如 36、10、10、0。

- 4 展开 **Advanced Options（高级选项）**，为当前运行应用各项设置。
除非另有说明，否则这些设置为可选项。
 - ▶ **v1.0 Custom Primers（v1.0 自定义引物）** — 选择 **Custom Primers（自定义引物）** 复选框，然后选择适合的复选框。如果使用 v1.0 试剂盒，“Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation”文库需要自定义片段 1 (VP10) 测序引物。有关详细信息，请参见《NovaSeq 系列自定义引物指南》（文档号 1000000022266）。
 - ▶ **Read 1（片段 1）** — 为片段 1 使用自定义引物。
 - ▶ **Read 2（片段 2）** — 为片段 2 使用自定义引物。
 - ▶ **Custom Index（自定义标签）** — 为标签 1 使用自定义引物。
 - ▶ **v1.5 Custom Primers（v1.5 自定义引物）** — 选择 **Custom Primers（自定义引物）** 复选框，然后选择适合的复选框。如果使用 v1.5 试剂盒，“Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation”文库不需要自定义引物。有关详细信息，请参见《NovaSeq 系列自定义引物指南》（文档号 1000000022266）。
 - ▶ **Read 1（片段 1）** — 为片段 1 使用自定义引物。
 - ▶ **Read 2（片段 2）** — 为片段 2 使用自定义引物。
 - ▶ **Custom Index（自定义标签）** — 为标签 1 和标签 2 片段使用自定义引物。
 - ▶ **Output Folder（输出文件夹）** — 选择 **Browse（浏览）** 可更改当前运行的输出文件夹。当运行未连接用于存储数据的 BaseSpace Sequence Hub 时，需要指定输出文件夹。
 - ▶ **Samplesheet（样品表）** — 选择 **Browse（浏览）** 上传样品表（使用 BaseSpace Sequence Hub 进行运行监控和存储时需要用到）或其他 CSV 文件。CSV 文件将复制到输出文件夹，不会影响运行参数。根据使用不同策略的 v1.0 和 v1.5 工作流程，确保上传的样品表采用适当的格式（标签片段 2 接头方向）。正链工作流程使用 v1.0 试剂盒执行。反向补充工作流程使用 v1.5 试剂盒执行。
 - ▶ **Custom Recipe（自定义配方）** — 选择 **Custom Recipe（自定义配方）**，然后选择 **Browse（浏览）** 为此运行使用 XML 格式的自定义配方。v1.0 的自定义配方将与 v1.5 的自定义配方不兼容。有关详细信息，请联系 Illumina 技术支持部门。

**注意**

不支持修改自定义配方中的簇生成步骤。

- 5 选择 **Review (复查)**。
软件会确认指定的参数是否适用于该配方。

确认运行参数

- 1 确认“Review (复查)”屏幕上显示的运行参数。
- 2 **[可选]** 选择 **Back (返回)** 回到“Run Setup (运行设置)”屏幕并编辑运行参数。
- 3 选择 **Start Run (启动运行)**。
系统即会自动启动运行前检查。

查看运行前检查

- 1 等待 5 分钟左右，直到运行前检查完成。
检查成功完成后，运行便会自动开始。

**注意**

为避免硬盘驱动器过载，请勿在运行开始后将任何数据复制到 C:\。

- 2 如果运行前检查由于未检测到流动槽等传感器错误而失败，您必须退出工作流程，然后再重新启动。
- 3 如果发生其他运行前检查失败，请选择 **Retry (重试)** 重新启动失败的检查，或选择 **Retry All (全部重试)** 重新启动所有检查。
如有错误，则必须予以解决，之后运行才能开始。有关故障诊断信息，请参见 [运行前检查错误 \(第 51 页\)](#)。
- 4 选择 **Error (错误)** 图标可查看错误详细信息。
- 5 如果对准检查失败，请按以下方式解决错误。
 - a 选择 **Reload (重新装入)**，然后选择 **OK (确定)** 确认返回“Load (装入)”屏幕。
 - b 除去仪器顶部的所有物品，然后选择 **OK (确定)**。
 - c 重新装入流动槽，然后选择 **Run Setup (运行设置)**。
 - d 继续进入每个屏幕以重新读取每个 RFID，然后返回“Pre-Run Checks (运行前检查)”屏幕。
 - e 重新执行检查。

监控运行进度

- 当屏幕上显示指标时，您可以监控运行进度、强度和质分。
- 有关运行指标的详细信息，请参见 *Real-Time Analysis* (第 55 页)。

图 26 测序运行进度和指标



- 完成时间 — 运行完成的日期和时间 (yyyy-mm-dd hh:mm)。
- 运行进度 — 当前运行步骤。进度条的大小与每个步骤的运行率并不成比例。
- Q-Score — 质量分值 (Q-score) 的分布。
- Intensity (强度) — 每个小区的第 90 个百分点的簇强度值。图的颜色指出红色和绿色通道。
- Clusters passing filter (簇通过过滤) (%) — 簇通过过滤的百分比。
- Projected Total Yield (预计总产量) (Gb) — FC 运行的预计产量。如果选择了每泳道指标 (H)，所显示的数字即为当前的每泳道产量，并且这些数字会在整个运行中按循环更新。
- Q30 — Q-score ≥ 30 的运行的碱基检出百分比。
- Per lane breakdown (每泳道明细) — 选择 E、F 和 G 项中的值将显示相应字段的每泳道明细数据。



注意

如果在 NVCS 运行期间执行关机或重新启动操作，用户必须进行确认，之后关机或重新启动才会继续。

运行指标

软件会显示运行期间生成的指标。根据 RTA3 生成并写入 InterOp 文件的数据，这些指标可以图表、图形和表格的形式显示。

簇生成大约需要 2 小时，然后测序会开始第 1 次循环。随着测序的进行，指标会相应更新。第 26 次循环后会显示簇通过过滤、产量和质量分值。在第 26 次循环之前，不会填充任何值，并指定为“N/A (不适用)”。

处理状态

“Process Management (流程管理)” 屏幕会列出每个运行的状态。在主菜单中，选择 **Process Management (流程管理)**。

针对每个运行名称，“Process Management (流程管理)” 屏幕列出了下列流程的状态：

- ▶ **Run Status (运行状态)** — 根据 CBCL 文件的处理情况。

- ▶ **Network (网络)** — 根据使用 Universal Copy Service 进行的文件传输的情况。
 - ▶ **BaseSpace** — 根据向 BaseSpace Sequence Hub 上传文件的情况 (如适用)。
- 流程完成后, 便会显示绿色勾号。有关详细信息, 请参见 [流程管理 \(第 7 页\)](#)。

交错开始运行

当仪器有一侧正在运行时, 您可以在空闲的另一侧设置和开始运行, 这便称为交错开始。交错运行是在某个运行期间的特定时间设置的, 由以下开始倒计时器的状态来指示。

- ▶ **Run Start: Available (运行开始: 可执行)** — 交错开始当前为可执行状态。日期和时间显示交错开始将变为不可执行的时间。选择 **Sequence (测序)** 会在当前循环完成后开始新的交错运行。
- ▶ **Run Start: Unavailable (运行开始: 不可执行)** — 交错开始当前为不可执行状态。日期和时间显示仪器另一侧可以执行交错开始的时间。
- ▶ **Waiting... (正在等待...)** — 如果在交错开始不可执行时尝试开始新运行, 状态会更改为 “Waiting... (正在等待...)”, 日期和时间会显示仪器可以开始新运行的大概时间。当交错开始变为可执行时, 仪器便会进行运行设置。

设置新运行时, 软件会根据需要自动暂停相邻流动槽上的运行, 然后再予以恢复。系统在暂停时将进入安全状态。

程序

- 1 从 “Home (主页)” 界面中, 依次选择 **Sequence (测序)** 和 A 或 B。
所选的必须是当前空闲的那一侧。
- 2 等待相邻流动槽上的运行暂停。要取消新的运行并防止暂停, 请选择 **Cancel (取消)**。
如果相邻的运行在执行簇生成、双末端再合成、成像或清洗, 软件会在暂停之前完成当前的步骤。
- 3 当相邻的运行已暂停且流动槽门打开后, 设置新的运行。
新的运行启动后, 暂停的运行会自动继续, 之后新的运行才会开始。

删除运行

数据传输完成后, 您可以从 “Process Management (流程管理)” 中删除当前运行, 以便为后续运行腾出空间。删除运行时会清理 CE 和 C:\, 而不会移除系统维护文件, 也不会影响网络和 BaseSpace Sequence Hub 复制功能。正在测序的运行无法删除。

- 1 在主菜单中, 选择 **Process Management (流程管理)**。
- 2 **[可选]** 确保运行的每个流程都显示绿色勾号, 这表示数据传输已完成。
您可以删除向网络或 BaseSpace Sequence Hub 的数据传输尚未完成的运行, 但如此一来所有运行数据都会丢失。
- 3 选择 **Delete Run (删除运行)**, 然后选择 **Yes (是)** 以确认。
- 4 选择 **Done (完成)**。

拆下位置 30

簇生成夹盒位置 30 处的槽中含有甲酰胺。需从用过的簇生成夹盒中取出该槽并单独丢弃。

**警告**

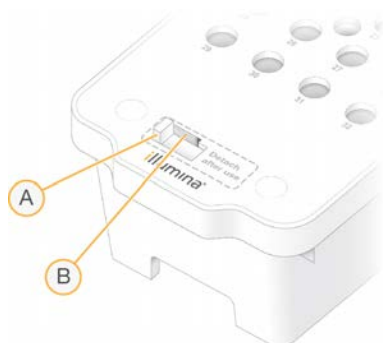
这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关环境、健康和安全的更多信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

- 1 戴上手套，将标有 **Detach after use (用后拆下)** 字样的白色塑料片推到右侧。
- 2 将一只手或一个固体平板托在槽下方，并将透明塑料片向 Illumina 标签方向按，以从簇生成夹盒下面释放出槽。

**注意**

存储簇生成夹盒时请避免叠放。叠放可能会导致盒槽意外解锁。

图 27 可取下的位置 30 处



- A 白色塑料片用于拆下
- B 透明塑料片用于释放

- 3 按照适用的标准处置槽。

运行后自动清洗

测序完成时，软件会启动自动的运行后清洗，该清洗大约需用时 80 分钟。系统会从位置 17 处抽取 0.24% 次氯酸钠 (NaOCl) 并将其稀释为 0.12%。0.12% NaOCl 会抽到 ExAmp 试剂和文库位置，通过流动槽，然后进入废试剂瓶。清洗时会从系统中冲洗模板以防止交叉污染。

清洗完成时，系统即进入安全状态，此时“Home (主页)”按钮将变为可用。将耗材留在原位，直到下次运行。清洗后，吸管应留在 SBS 和簇生成夹盒中，避免空气进入系统。缓冲液夹盒中的吸管将会升起，以便清空废试剂瓶。

**注意**

如果在执行自动的运行后清洗时发生错误，运行后清洗将无法完成，必须进行维护清洗。

第 7 章 维护

预防性维护	47
执行维护清洗	47
软件更新	50

预防性维护

Illumina 建议您每年安排一次预防性维护服务。如果您未签订服务合同，请联系您的区域客户经理或 Illumina 技术支持部门安排收费的预防性维护服务。

执行维护清洗

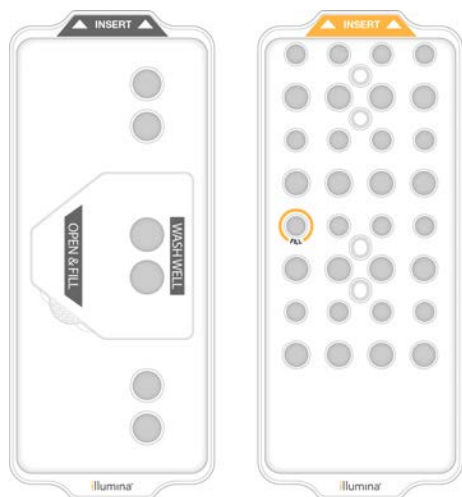
以下情况下，软件会提示您进行维护清洗：

- ▶ 最近 14 天内未进行过 4 泳道运行（及运行后清洗）
- ▶ 最近 14 天内未进行过维护清洗
- ▶ 有运行后清洗失败或未完成。

维护清洗是指使用用户自备的 Tween 20 和 NaOCl 稀释液冲洗系统。稀释液会从清洗夹盒抽吸到流动槽、用过的试剂瓶和每个夹盒槽，以清洗所有吸管。清洗大约持续 80 分钟。

维护清洗需要使用一个用过的缓冲液夹盒，以及仪器随附的 SBS 清洗夹盒、簇生成清洗夹盒和四泳道清洗流动槽（或用过的四泳道流动槽）。与试剂夹盒一样，清洗夹盒也已采用颜色编码，以免发生装入错误。SBS 清洗夹盒有一个中央井，用来装 Tween 20 稀释液。NaOCl 稀释液应加到簇生成清洗夹盒上的槽中。

图 28 SBS 清洗夹盒（左）和簇生成清洗夹盒（右）



制备清洗液

- 1 将 400 毫升实验室级用水加到一个 500 毫升离心瓶中。
- 2 加入 0.2 毫升 100% Tween 20，制成至少 400 毫升 0.05% Tween 20 清洗液。
使用新制备的 Tween 20 稀释液可尽量避免将生物污染物带入射流系统。
- 3 翻转以混匀溶液。
- 4 取下 SBS 清洗夹盒的中央井井盖。

- 将清洗液加到中央井中。装到代表所需最低量的填充线为止。其他槽保持空槽。

图 29 中央井装入量达到最低填充线



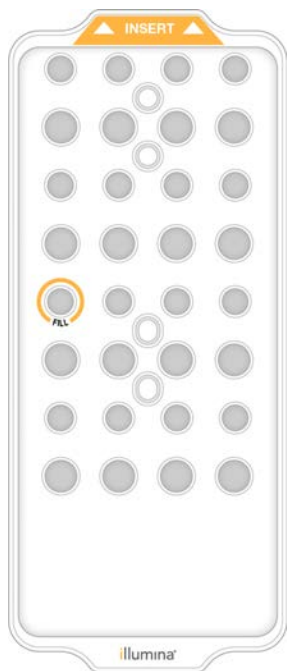
- 在 30 毫升离心管中装入以下剂量的溶液以制备 20 毫升 0.25% 的试剂级 NaOCl:
 - ▶ 5% 的试剂级 NaOCl (1 毫升)
 - ▶ 去离子水 (19 毫升)

**注意**

只能使用试剂级 NaOCl。请避免使用一般用途的漂白剂产品，因为它们可能含有氨化合物，可能会导致运行中通过过滤片段的百分比较低。

- 翻转以混匀溶液。
- 将 5 毫升 0.25% 的试剂级 NaOCl 加到簇生成清洗夹盒中。该位置标为已满，以橙色圆圈圈出。所有其他槽保持空槽。

图 30 用于装 0.25% NaOCl 的位置

**装入清洗流动槽**

- 除去仪器表面的所有物品。

在维护清洗期间保持表面洁净，并避免靠在仪器上。流动槽门受到压力可能会打开，致使清洗停止。

- 2 从“Home（主页）”界面中，选择 **Wash（清洗）**，然后选择要清洗哪一面：
 - ▶ **A+B** — 同时清洗两面。
 - ▶ **A** — 仅清洗 A 面。
 - ▶ **B** — 仅清洗 B 面。
 软件会启动一系列清洗屏幕。



注意

仅当其中一面处于闲置状态或正在执行 SBS 片段循环时，才能对另一面进行维护清洗。NVCS 的交错开始时间指示仪器是否可以开始新的运行或清洗。请参见 [交错开始运行（第 45 页）](#)。

- 3 选择 **OK（确定）** 以确认收到警告并打开流动槽门。
- 4 如果仪器上没有清洗流动槽或用过的 4 泳道流动槽，请装入一个。
- 5 选择 **Close Flow Cell Door（关闭流动槽门）**。
系统即会关闭流动槽门，检查传感器和 RFID，并在屏幕上显示流动槽 ID。

装入清洗夹盒

维护清洗时需要清洗夹盒。不要使用用过的 SBS 夹盒和簇生成夹盒。

- 1 打开液体仓门，然后打开试剂冷却器门。
- 2 取出用过的 SBS 夹盒和簇生成试剂夹盒。按照适用的标准处置未使用的溶液。
有关安全处置簇生成夹盒的位置 30 处的信息，请参见 [拆下位置 30（第 45 页）](#)。
- 3 将清洗夹盒装入试剂冷却器抽屉中，确保 **Insert（插入）** 标签朝着仪器背面：
 - ▶ 将 SBS 夹盒（灰色标签）放入左边位置。
 - ▶ 将簇生成夹盒（橙色标签）放入右边位置。
- 4 将抽屉滑入冷却器，然后关闭试剂冷却器门。
系统即会检查传感器，扫描每个夹盒的 RFID 并显示在屏幕上。
- 5 打开缓冲液抽屉。
- 6 如果其内没有用过的缓冲液夹盒，请装入一个。

清空废试剂瓶

按照以下说明在**每次**维护清洗后清空废试剂瓶。即使您的系统配置为将废试剂排出到外部，用于收集废试剂的小瓶和大瓶也必须放置到位。



警告

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关环境、健康和安全的更多信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

- 1 取出小废试剂瓶并根据适用标准丢弃其中的废液。将这些废液与另一个瓶中的废液分开放置。
- 2 将小废试剂瓶放回凹室。
- 3 取出大废试剂瓶并根据适用标准丢弃其中的废液。
- 4 将大废试剂瓶放回缓冲液抽屉。
- 5 戴上一副新的无粉手套。

- 6 关上缓冲液抽屉，然后关闭液体仓门。
系统即会检查传感器和 RFID，并在屏幕上显示每个清洗组件的 ID。

启动清洗

- 1 选择确认两个废试剂瓶都已清空的复选框，然后选择 **Start Wash（启动清洗）**。
清洗即会开始，并显示预计的清洗完成时间。



警告

不清空废试剂瓶可能会导致清洗终止及发生溢液，这会对仪器造成损害并产生安全风险。

- 2 清洗完成后，请选择 **Home（主页）**。
- 3 在下次运行之前，请保持耗材的位置不变。
吸管仍保留在 SBS 夹盒和簇生成夹盒中，避免空气进入系统。缓冲液夹盒中的吸管将会升起，以便清空废试剂瓶。

软件更新

NVCS v1.4 或更高版本有可用的软件更新。可从 NVCS 下载并安装软件更新。默认情况下，系统会启用自动检查软件更新。您可以从“Settings（设置）”启用或禁用自动更新。



注意

NovaSeq 6000 必须连接到互联网才能检查软件更新并下载更新。

自动检查更新每隔 24 小时执行一次。当有更新时，主菜单上会显示一条通知。所有用户都会看到更新通知，但只有管理员可以下载及安装更新。

对于 NovaSeq Xp 工作流程，在开始制备样品或准备耗材之前，请确保 NVCS 版本满足下表中列出的最低软件要求。

表 13 最低软件要求

流动槽	v1.0 试剂盒最低软件版本	v1.5 试剂盒最低软件版本
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	全部	1.7
S4	1.2.0	1.7



注意

在测序运行、清洗、运行设置或将文件传输到输出文件夹或发送给 BaseSpace Sequence Hub 期间，无法更新软件。如果正在执行 NovaSeq Xp 工作流程，那么请等到文库已装入流动槽且测序已完成后再更新软件。

要手动检查更新或下载并安装更新，请执行以下操作：

- 1 在主菜单中，选择 **Software Update（软件更新）**。
此时会显示“Software Update（软件更新）”屏幕，提供可用更新的发行说明。如果未启用软件更新的自动检查，您可以手动检查更新，或启用自动检查。
- 2 要下载并安装更新，请选择复选框以确认下载并安装需用时大约 30 分钟。
- 3 选择 **Download and Install（下载并安装）**。
当下载完成时，将关闭 NVCS 并启动安装程序。按照安装程序的指示完成安装。
如果在下载或安装过程中发生错误，请联系 Illumina 技术支持部门。

附录 A 故障诊断

故障诊断资源	51
故障诊断文件	51
运行前检查错误	51
流程管理故障诊断	52
簇生成之前运行失败	52
结束运行	53
关闭仪器	53

故障诊断资源

如有技术问题，请访问 [Illumina 网站上的 NovaSeq 6000 测序系统支持页面](#)。通过支持页面可以访问文档、下载内容和常见问题解答。要访问支持公告，请登录您的 MyIllumina 帐户。

如有运行质量或性能方面的问题，请与 Illumina 技术支持部门联系。请参见 [技术协助（第 68 页）](#)。为方便故障诊断，请考虑将指向 BaseSpace Sequence Hub 中的运行摘要的链接共享给 Illumina 技术支持部门。

故障诊断文件

关键文件	文件夹	描述
运行信息文件 (RunInfo.xml)	根文件夹	包含运行设置： <ul style="list-style-type: none">· 运行中的循环次数· 运行中的片段数· 片段是否带标签· 流动槽上测绘带和小区的数目
运行参数文件 (RunParameters.xml)	根文件夹	包含运行名称以及运行参数和运行组件的相关信息，包括以下 RFID 信息：序列号、批次号、到期日期和商品目录号。
InterOp 文件 (*.bin)	InterOp	用于 Sequencing Analysis Viewer 的二进制报告文件。InterOp 文件会在整个运行期间加以更新。
日志文件	Logs	日志文件描述仪器为每次循环执行的每个步骤（包括使用的试剂），并列出于运行的软件和固件版本。名为 [仪器名称]_CurrentHardware.csv 的文件会列出仪器组件的序列号。

运行前检查错误

如果在运行前检查期间发生错误，请使用下列措施予以解决。如果您要设置双流动槽运行而其中一面失败，您可以取消失败的这面，然后继续设置通过的那面。

如果运行前检查失败，系统不会锁定流动槽、试剂和缓冲液的 RFID，以使耗材可用于后续运行。一旦启动运行，吸管便会刺穿试剂夹盒上的封箔口，并且所有 RFID 都会被锁定。

系统检查	失败原因	建议采取的措施
传感器	仓门打开、未正确装入耗材，或者至少有一个传感器无法工作。	选择 Retry（重试） ，然后按照屏幕上的提示解决错误。
磁盘空间	磁盘空间不足，原因是指定的输出文件夹位置已满。	使用“Process Management（流程管理）”屏幕可以清理指定输出文件夹位置的磁盘空间。
系统连接性	与 RTA3、射流系统之间的连接或其他连接已中断。	选择 Retry（重试） ，然后按照屏幕上的提示解决错误。
对准	流动槽的位置导致无法成像。	按照屏幕上的提示重新装入流动槽。

漏液托盘

仪器底座内置了漏液托盘，用于收集泄漏的试剂或冷却剂以及从废试剂瓶溢出的液体。正常情况下，漏液托盘应该是干的。如有漏液，即表明仪器出现问题。此外，如果没有定期清空废试剂瓶，将会出现溢液。

在进行运行前检查时，传感器会检测漏液托盘中是否有任何液体：

- ▶ 如果漏液托盘中还有液体但还未满，运行仍可继续进行，但是您必须联系 Illumina 技术支持部门。请参见 [技术协助（第 68 页）](#)。
- ▶ 如果漏液托盘已满，则运行无法继续进行，您必须联系 Illumina 技术支持部门。



警告

每次运行后，都需要清空废试剂瓶。一旦有一个废试剂瓶装满，运行便会停止。从任一废试剂瓶溢出的液体均会对仪器造成损害，需要 Illumina 代表上门服务，并且会产生安全风险。

流程管理故障诊断

下表提供了“Process Management（流程管理）”屏幕上 N/A 图标的故障诊断选项：

- ▶ N/A 图标显示在 BaseSpace 列中，并且运行配置为上载到 BaseSpace Sequence Hub。
- ▶ N/A 图标显示在“Network（网络）”列中，并且运行配置为上载到网络上的输出文件夹。

运行状态	故障诊断操作
运行正在进行	关闭“Process Management（流程管理）”屏幕，等待大约 5 分钟，然后重新打开该屏幕。
运行未在进行	关闭仪器后重新启动，然后重新打开“Process Management（流程管理）”屏幕。

如果在故障诊断操作完成之后，N/A 图标仍然显示，请与 Illumina 技术支持部门联系。请参见 [技术协助（第 68 页）](#)。

簇生成之前运行失败

如果在簇生成开始之前软件处理运行失败，您可以保存试剂夹盒、文库试管（包括样品）和流动槽（如立即重复使用），以供新的运行使用。一旦开始簇生成，吸管会刺穿封箔口，将试剂传输到文库试管和流动槽，这样耗材和文库便不能用于其他运行。

要使用从失败的运行省下的试剂夹盒、文库试管和流动槽设置新运行，您有以下两个选择：

- ▶ **立即设置新运行** — 在运行失败后 4 小时内设置新运行。试剂夹盒、文库试管和流动槽仍处于装入状态。



注意

为使 NovaSeq Xp 工作流程获得最佳结果，请尽快开始新运行。

- ▶ **以后设置新运行** — 在运行失败后三周内设置新运行。需要从仪器中取出试剂夹盒和文库试管并妥善存储。应为保存的耗材标上日期，并置于原始条件下存储。



注意

流动槽不能重复使用且必须丢弃。请联系 Illumina 技术支持部门获取更换流动槽。

立即设置新运行

如果失败的运行使用的是 NovaSeq Xp 工作流程，那么要想获得最佳结果，应尽快开始新运行。

- 1 如果运行失败且仪器另一侧处于闲置状态，请重新启动仪器。否则，请选择 **Home（主页）**。
- 2 设置新运行。

- 3 将当前流动槽保留在原位。
- 4 打开试剂冷却器门和缓冲液抽屉，然后关闭，以提示 NVCS 重新读取试剂夹盒 RFID。
运行失败后，夹盒、文库试管和流动槽可以在仪器中最多保留 4 小时。
- 5 清空废试剂瓶（如果需要）并放回到仪器中。
- 6 继续运行设置。

以后设置新运行

- 1 运行失败时，选择 **Home（主页）**。
- 2 设置新运行或维护清洗，以将耗材从仪器上取出。
- 3 出现提示时，取出并存储以下耗材：
 - ▶ 盖上文库试管盖，并将试管置于 -25°C 至 -15°C 的温度下存储最长 3 周。
 - ▶ 将 SBS 夹盒和簇生成夹盒放回到 -25°C 至 -15°C 的环境中存储。
 - ▶ 将缓冲液夹盒放回到室温避光处存储。
 如果夹盒未刺穿，则可在新运行中重复使用。
- 4 选择 **End（结束）** 取消运行或维护清洗，然后选择 **Yes（是）** 确认命令。
您也可以不取消维护清洗，而是让其完成。

结束运行

在 NovaSeq 6000 系统上结束运行后，此操作**无法撤销**。软件无法恢复运行或保存测序数据，耗材也不可重复使用。

- 1 选择 **End（结束）**，然后选择 **Yes（是）** 确认命令。
如果运行在片段 1 后结束，则软件会启动自动的运行后清洗。
- 2 如果出现提示，请从以下清洗选项中进行选择：
 - ▶ **End Run Without Wash（不清洗直接结束运行）** — 结束运行并启动维护清洗。
 - ▶ **End Run and Wash（结束运行并清洗）** — 结束运行并执行自动的运行后清洗。
 - ▶ **Cancel（取消）** — 继续当前运行。
 如果在簇生成完成到片段 1 完成之间的时间结束了运行，软件将显示清洗选项。否则，软件将启动自动的运行后清洗。
- 3 如果您选择“End Run Without Wash（不清洗直接结束运行）”，随后软件会提示您设置维护清洗。

关闭仪器

安全地关闭仪器可将所有软件和系统关闭，并关闭仪器的电源。状态栏从绿色褪成白色，表示关闭程序正在进行中。

一般情况下不需要关闭仪器。

任何时候发生软件崩溃事件时，应进行仪器完全关闭和通电。

如果在 NVCS 运行期间执行关机或重新启动操作，用户必须进行确认，之后关机或重新启动才会继续。

- 1 在主菜单中，选择 **Shutdown Instrument（关闭仪器）**。
- 2 屏幕变为空白后，将仪器背面的电源开关切换到关闭位置。
- 3 再次打开仪器前，请至少等待 60 秒。



注意

请勿搬迁仪器。不适当地移动仪器可能会影响光学校准并破坏数据完整性。如需仪器搬迁方面的协助，请与 Illumina 代表联系。

附录 B Real-Time Analysis

Real-Time Analysis 概述	55
Real-Time Analysis 工作流程	56

Real-Time Analysis 概述

NovaSeq 6000 测序系统会在仪器的计算引擎 (CE) 上运行 RTA3，这是 Real-Time Analysis 软件的一种实施。RTA3 会来自相机接收的图像提取强度、执行碱基检出、为碱基检出分配质量分值、比对 PhiX，以及在 InterOp 文件中报告数据，供您在 Sequencing Analysis Viewer 中查看。

为优化处理时间，RTA3 会将信息存储在内存中。RTA3 一旦被终止，处理过程便无法恢复，并且正在处理的运行数据在内存中也将丢失。

RTA3 输入

RTA3 需要在本地系统内存中包含小区图像才能进行处理。RTA3 从 NVCS 接收运行信息和命令。

RTA3 输出

每个颜色通道的图像在内存中均以小区的形式传递给 RTA3。RTA3 根据这些图像输出一组带有质量分值的碱基检出文件和过滤文件。其他所有输出均为支持输出文件。

文件类型	描述
碱基检出文件	所分析的每个小区都包含在一个串联碱基检出 (*.cbcl) 文件中。来自同一泳道和表面的小区会累积到每个泳道和表面对应的 1 个 *.cbcl 文件中。
过滤文件	每个小区生成一个指定簇是否通过过滤的过滤文件 (*.filter)。
簇位置文件	簇位置 (*.locs) 文件包含小区中每个簇的 X、Y 坐标。每次运行都会生成簇位置文件。

输出文件用于 BaseSpace Sequence Hub 中的下游分析。也可以将 bcl2fastq 转换软件用于 FASTQ 转换以及第三方分析解决方案。NovaSeq 文件要求使用 bcl2fastq2 转换软件 v2.19 或更高版本。如需 bcl2fastq2 的最新版本，请访问 Illumina 网站上的 [bcl2fastq 下载页面](#)。

RTA3 提供存储为 InterOp 文件的实时运行质量指标。InterOP 文件为二进制输出，包含小区、循环和片段级别指标。使用 Sequencing Analysis Viewer 软件查看实时指标时需要 InterOp 文件。如需 Sequencing Analysis Viewer 的最新版本，请访问 Illumina 网站上的 [Sequencing Analysis Viewer 下载页面](#)。

错误处理

RTA3 会创建日志文件并将其写入 Logs 文件夹。错误以 *.log 文件格式记录在文本文件中。

在处理结束时，以下日志文件会传送到最终输出目的地：

- ▶ info_00000.log 汇总了重要的运行事件。
- ▶ error_00000.log 列出在运行期间发生的错误。
- ▶ warning_00000.log 列出在运行期间发生的警告。

流动槽小区

小区指流动槽上的小成像区域。相机会为每个测绘带拍摄一张图像，由软件将其分为小区，以进行 RTA3 处理。小区总数量取决于在流动槽上成像的泳道、测绘带及表面数量。

- ▶ SP 流动槽共有 312 个小区。
- ▶ S1 流动槽共有 624 个小区。

- ▶ S2 流动槽共有 1408 个小区。
- ▶ S4 流动槽共有 3744 个小区。

表 14 流动槽小区

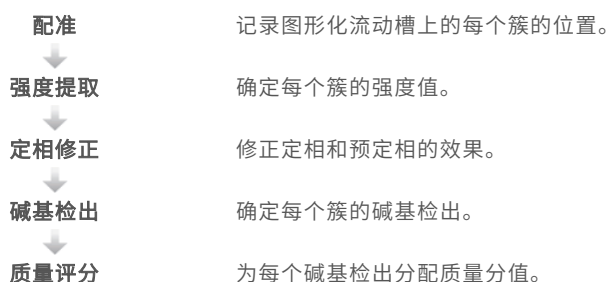
流动槽组件	SP	S1	S2	S4	描述
泳道	2	2	2	4	泳道是指带有输入端口和输出端口的物理通道。
表面	1	2	2	2	S1、S2 和 S4 流动槽会在顶面和底面两个表面成像。小区的顶面先成像。SP 流动槽仅在底面成像。
每泳道测绘带数	2	2	4	6	测绘带是指流动槽泳道中的列，相机会对每个测绘带拍摄一张图像。
每测绘带小区数	78	78	88	78	小区是测绘带的一部分，描述流动槽上的一个成像区域。
生成的小区总计	312	624	1408	3744	泳道数 × 表面数 × 测绘带数 × 每测绘带小区数 = 小区总数。

小区命名

小区名称是一个五位数的数字，代表其在流动槽上的位置。例如，名称 1_1205 表示以下小区：泳道 1，顶面，测绘带 2，小区 5。

- ▶ 第一位数是泳道编号：
 - ▶ SP、S1 或 S2 流动槽是 1 或 2。
 - ▶ S4 流动槽是 1、2、3 或 4。
- ▶ 第二位数代表表面：1 表示顶面，2 表示底面。
SP 流动槽的第二个数字始终是 2，因为此流动槽只有底面。
- ▶ 第三位数代表测绘带编号：
 - ▶ SP 或 S1 流动槽是 1 或 2。
 - ▶ S2 流动槽是 1、2、3 或 4。
 - ▶ S4 流动槽是 1、2、3、4、5 或 6。
- ▶ 最后两位数代表小区编号。小区编号从 01 开始（位于流动槽的出口端），一直到 88 或 78 结束（位于入口端）。
 - ▶ SP、S1 或 S4 流动槽是 01 到 78。
 - ▶ S2 流动槽是 01 到 88。

Real-Time Analysis 工作流程



配准

配准会将图像与图形化流动槽上六边形阵列的纳米孔进行比对。由于纳米孔呈有序排列，因此系统可预先确定小区中每个簇的 X 和 Y 坐标。簇位置将写入每次运行对应的一个簇位置 (s.locs) 文件。

如果某次循环中有任何图像的配准失败，则在该循环中不会为该小区生成碱基检出。使用 Sequencing Analysis Viewer 可识别配准失败的图像。

强度提取

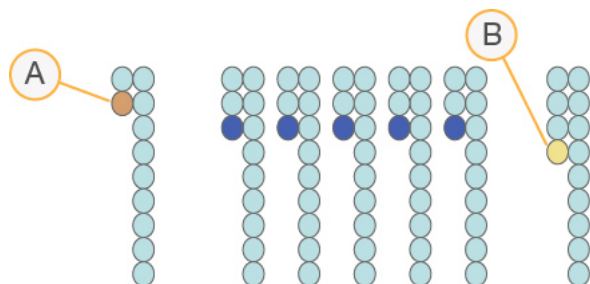
进行配准之后，强度提取便会计算给定图像中每个纳米孔的强度值。如果配准失败，则无法提取相应小区的强度。

定相修正

在测序反应期间，簇中的每个 DNA 链在每次循环中会扩展一个碱基。定相和预定相在 DNA 链与当前结合循环异相时发生。

- ▶ 当碱基落在后面时，便会发生定相。
- ▶ 当碱基跳到前面时，便会发生预定相。

图 31 定相和预定相



- A 具有定相碱基的片段
- B 具有预定相碱基的片段

RTA3 会修正定相和预定相的效果，从而尽可能提高整个运行期间每次循环的数据质量。

碱基检出

碱基检出用于确定特定循环中给定小区的每个簇的碱基（A、C、G 或 T）。NovaSeq 6000 测序系统使用双通道测序，只需要两个图像即可对四种 DNA 碱基的数据进行编码，其中一个图像来自红色通道，一个图像来自绿色通道。

无检出情况标识为 N。当簇未通过过滤、配准失败或簇移出图像时便会发生无检出。

系统会从红色和绿色图像提取每个簇的强度并将它们相互比较，由此产生四个不同的群体。每个群体对应于一个碱基。碱基检出流程决定了每个簇属于哪个群体。

图 32 簇强度展示图

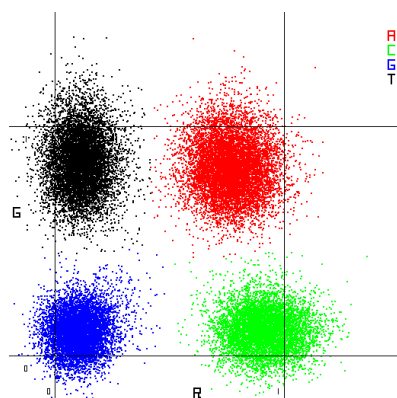


表 15 双通道测序的碱基检出

碱基	红色通道	绿色通道	结果
A	1 (开)	1 (开)	在红色和绿色通道中都显示强度的簇。
C	1 (开)	0 (关)	只在红色通道中显示强度的簇。
G	0 (关)	0 (关)	在已知位置上未显示强度的簇。
T	0 (关)	1 (开)	只在绿色通道中显示强度的簇。

簇通过过滤

在运行期间，RTA3 会过滤原始数据，删除任何不符合数据质量阈值的片段，并会去除重叠和低质量的簇。

对于双通道分析，RTA3 使用基于群体的系统确定碱基检出的纯度（强度纯度度量）。如果在前 25 次循环中，纯度小于固定阈值的碱基检出不超过 1 个，簇将通过过滤 (PF)。对于通过过滤的簇，系统会于第 26 次循环在一部分小区上执行 PhiX 比对。未通过过滤的簇不会检出碱基，也不会进行比对。

质量分值

质量分值 (Q-score) 是对碱基检出不正确概率的预测。Q-score 越高，表示碱基检出的质量越高，正确率也越高。确定 Q-score 之后，结果会记录在碱基检出 (*.cbcl) 文件中。

Q-score 简明地表达了小错误概率。质量分值以 Q(X) 表示，其中 X 是分值。下表显示了质量分值与错误概率之间的关系。

Q-Score Q(X)	错误概率
Q40	0.0001 (万分之一)
Q30	0.001 (千分之一)
Q20	0.01 (百分之一)
Q10	0.1 (十分之一)

质量评分和报告

质量评分会计算每个碱基检出的一组预测因素，然后使用预测因素值在质量表中查找 Q-score。创建质量表的目的是根据特定的测序平台和化学反应版本配置为生成的运行提供最准确的质量预测。



注意

质量评分基于 Phred 算法的修改版本计算。

RTA3 会根据碱基检出的可信度向每个碱基检出分配三个质量分值中的一个。此 Q-score 报告模型可降低存储空间和带宽要求，且不影响准确性或性能。

有关质量评分的详细信息，请参见《NovaSeq™ 6000 系统质量分值和 RTA3 软件》（出版编号 770-2017-010）。

附录 C 输出文件夹和文件

测序输出文件夹结构	59
测序输出文件	60

测序输出文件夹结构

NVCS 会自动生成输出文件夹名称。

 **Config** — 运行的配置设置。


 **Logs** — 描述操作步骤、仪器分析和 RTA3 事件的日志文件。

 **Data**

 **Intensities**


 **BaseCalls**

 **L00[X]** — 碱基检出文件 (*.cbcl)，按泳道、表面和循环累积到一个文件中。

 s.locs — 运行的簇位置文件。

 **InterOp** — Sequencing Analysis Viewer 使用的二进制文件。

 **Recipe** — 特定于运行的配方文件。

 **Thumbnail Images** — 每 10 个小区的缩略图图像。

 **LIMS** — 运行设置文件 (*.json) (如适用)。


 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SampleSheet.csv — 样品表或其他附加文件 (如适用)。

 SequenceComplete.txt

测序输出文件

文件类型	文件描述、位置和名称
碱基检出文件	已分析的每个簇都会纳入一个碱基检出文件，并按循环、泳道和表面累积到一个文件中。累积的文件包含每个簇的碱基检出以及已编码的质量分值。BaseSpace Sequence Hub 或 bcl2fastq2 会使用碱基检出文件。 Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[泳道]_[表面].cbcl，例如 L001_1.cbcl
簇位置文件	对于每个流动槽，二进制簇位置文件包含小区中簇的 X 坐标和 Y 坐标。与流动槽的纳米孔布局匹配的六边形布局预定义了坐标。 Data\Intensities s_[泳道].locs
过滤文件	过滤文件指定簇是否通过过滤。过滤文件在第 26 次循环时使用前 25 次循环的数据生成。对于每个小区，会生成一个过滤文件。 Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[泳道]_[小区].filter
InterOp 文件	用于 Sequencing Analysis Viewer 的二进制报告文件。InterOp 文件会在整个运行期间加以更新。 InterOp 文件夹
运行信息文件	列出运行名称、每个片段中的循环次数、片段是否为标签片段以及流动槽上测绘带和小区的数量。运行信息文件创建于运行开始时。 [根文件夹], RunInfo.xml
缩略图文件	启用此项后，会对每个颜色通道（红色和绿色）中的每 10 个小区生成缩略图图像。 Thumbnail_Images\L001\C[X.1] – 每次循环的文件都存储在子文件夹中。 s_[泳道]_[小区]_[通道].jpg – 缩略图图像包含小区编号。

附录 D Windows 安全

安全配置	61
密码要求	61
Windows 防火墙	61
增强型减灾体验工具包	61
软件限制策略	61

安全配置

运行仪器控制计算机的 Windows 操作系统包括可防止有害软件运行的安全配置。本附录中的信息介绍了这些配置并说明如何自定义它们以满足您的需求。

一般情况下不需要更改默认安全配置。如果需要更改，请确保经验丰富的管理员在经过仔细规划之后再管理更改。



注意

因为这些配置会影响系统性能并可能有损安全性，如果不确定设置是否需要编辑或者不清楚有何影响，请与 Illumina 技术支持部门联系。

密码要求

下表指定需要为控制计算机设置的密码策略。第一次登录时，软件会提示更改密码。

表 16 默认密码策略

策略	安全设置
强制密码历史记录	记住 5 个密码
密码最长使用时间	180 天
密码最短使用时间	0 天
最短密码长度	10 个字符
密码必须符合复杂性要求	已禁用
用可还原的加密来储存密码	已禁用

Windows 防火墙

Windows 防火墙可通过过滤传入流量来剔除潜在的威胁，从而保护控制计算机。默认情况下，防火墙处于启用状态，以阻止所有入站连接。请保持防火墙的启用状态，并允许出站连接。有关出站连接的详细信息，请参见《NovaSeq 系列场地准备指南》（文档号 1000000019360）。

增强型减灾体验工具包

增强型减灾体验工具包 (EMET) 可防止软件漏洞遭到利用并提供“证书信任”功能。该功能可检测并阻止那些利用恶意证书的攻击。

软件限制策略

Windows 软件限制策略 (SRP) 会使用规则，以只允许指定的软件运行。对于 NovaSeq 6000，SRP 规则基于证书、文件名和扩展名以及目录实施。

SRP 默认会打开，以防有害软件在控制计算机上运行。IT 代表或系统管理员可以添加和删除规则，以自定义安全级别。如果将系统添加到域，本地组策略对象 (GPO) 可能会自动修改规则并关闭 SRP。

**注意**

关闭软件限制策略会阻止它提供保护。更改规则会覆盖默认保护。

允许的 SRP 规则

在 NovaSeq 6000 测序系统上，SRP 默认设置为允许以下规则。

证书

DigitalSystems
Illumina, Inc.
NovaSeq

可执行文件

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

文件扩展名

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

目录

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

添加和删除 SRP 规则

添加和删除 SRP 规则以自定义系统安全。修改规则时需要暂时关闭 SRP。



注意

关闭 SRP 会覆盖默认保护设置。

- 1 登录操作系统。
- 2 关闭 SRP:
 - a 导航到 C:\Illumina\Security 目录。
 - b 双击 Disable.reg。
 - c 选择 **Yes (是)** 确认更改。使用触摸屏界面时，按住不放大约 2 秒钟的时间相当于右键单击。
- 3 选择 **Start (开始)**，然后选择 **Run (运行)**。
- 4 在“Open (打开)”字段中，输入 secpol.msc。
- 5 在“Local Security Policy (本地安全策略)”对话框中，展开 **Software Restriction Policies (软件限制策略)**，然后选择 **Additional Rules (其他规则)**。
- 6 要添加规则，请执行以下操作：
 - a 在“Action (操作)”菜单上，选择 **New Path Rule (新建路径规则)**。
 - b 在“Path (路径)”字段中，输入要允许的证书、文件名、文件扩展名或目录。
 - c 在“Security level (安全级别)”列表中，选择 **Unrestricted (不限制)**。
 - d **[可选]** 在“Description (描述)”字段中，输入创建规则的原因。
 - e 选择 **OK (确定)** 添加规则。
- 7 要删除规则，请执行以下操作：
 - a 选择要删除的规则，然后选择 **Delete (删除)**。
 - b 选择 **Yes (是)** 确认删除。
- 8 关闭“Local Security Policy (本地安全策略)”对话框。
- 9 **立即**恢复 SRP:
 - a 导航到 C:\Illumina\Security 目录。
 - b 双击 Enable.reg。
- 10 如果是第一次修改 SRP 规则，请注销然后重新登录，以使规则生效。

索引

%

%PF 58

A

安全 61-62
 自定义 63
安全设置 61
安全数据表 6

B

BaseSpace Enterprise 22
BaseSpace Sequence Hub 1, 22
 连接与断开连接 41
 支持 2
bcl2fastq2 22, 55
白名单, SRP 62
白皮书 58
帮助 51
 文档 2
帮助, 技术 68
保存试剂夹盒 52
保留文库试管 53
编号, 孔 14
标签, 试剂盒组件 9
标签片段 42
标准, 已定义 3
标准工作流程 21
表面编号 56
冰柜规格 25
冰箱规格 25
部件号 15

C

CBCL 文件 2, 44, 58
CE 7, 55
仓室 4
操作系统 17, 61
测绘带 2, 11, 55-56
测序步骤 2
测序耗材 23
测序屏幕 44
测序循环 44
测序运行
 删除 45
产量 44

场地准备 2, 61
成像 2, 11, 55
承滴盘 52
持续时间
 测序运行 44
 簇生成 44
 维护清洗 47
 运行后自动清洗 46
出站连接 61
初始化 17
传感器 5, 49, 51
纯度过滤 58
磁盘空间 7, 51
次氯酸钠 46-47
簇强度 57
簇生成持续时间 44
簇生成夹盒 10
簇通过过滤 44
簇位置 55, 60
存储试剂盒 10, 14
存储数据 41
存储条件 15
错误 7, 51
 概率 58
错误日志 55

D

DPX 试剂, 存储 14
DPX/JPX 试剂, 兼容性 14
打开 17
单端测序运行 42
灯光条 4, 53
第三方 LIMS 19
电源 17
垫片 11, 33, 38
垫片, 溢液 36
叠放夹盒 13
定相和预定相 57
对准失败 51

E

EMET 61
ExAmp 试剂 10, 35
 存储 14
 混合方法 3
 解冻 33
ExAmp 预先混合液 2, 36

F

FASTQ 转换 22, 55
 防火墙 61
 废试剂 6, 27, 32, 40
 废试剂处置 6
 分析 22
 分析方法 2
 分析设置 18
 服务器位置 22

G

GPO 61
 盖座 27, 32
 工作流程 21
 供应商 23
 固定架 33, 38
 组件 14
 关闭电源 53
 关闭后重新启动 53
 管理员帐户 63
 光学 4
 光学对准目标 5, 38
 规格 9
 过滤簇 58
 过滤文件 55, 60
 过期日期 15

H

耗材
 包装 15
 排出 45-46
 取出 50
 实验室级用水 24
 维护清洗 47
 核苷酸 57
 红色通道 57
 划痕, 流动槽 33, 38
 缓冲液仓 40
 缓冲液夹盒 40, 49
 恢复运行 53

I

Illumina Proactive 监控服务 18-19
 InterOp 文件 6, 51, 55, 60

J

JPX 试剂, 存储 14
 计算引擎 7, 45, 55
 技术协助 68
 夹盒
 叠放 13
 夹具, 流动槽 5
 甲酰胺处置 13, 45
 碱基检出文件 55, 60
 交叉污染 6, 46
 解冻架 26, 31
 警告 7

K

可单独寻址的泳道 3, 14
 客户支持 68
 孔编号 36
 控制计算机 61
 控制软件 6
 扩增 2

L

LIMS 1, 18
 LIMS 设置 19
 冷却器 6
 流程管理 44
 流动槽
 标签 9
 存储 10, 33
 规格 9
 划痕 33, 38
 清洁 33, 38
 流动槽台 5, 38
 流动槽支架 38
 漏液 52
 绿色通道 57

M

密码策略 61
 模板生成 56
 模式 9
 默认设置 18, 22

N

NaOCl 46-47
 NovaSeq Xp 工作流程 21
 NovaSeq Xp 固定架 33, 38
 NovaSeq Xp 歧管 33
 存储 14
 NovaSeq Xp 歧管孔, 编号 14
 NovaSeq Xp, 已定义 3
 纳米孔 57

P

PhiX
 比对 55
 商品目录号 23
 Phred 算法 58
 配准失败 56
 批次代码 15
 批号 15
 片段 1 53
 片段, 编号 9

Q

Q-score 44, 58
 气泡 36
 强度值 57
 清洗
 持续时间 46-47
 频率 47
 清洗夹盒 47, 49
 清洗流动槽 47
 清洗液 12
 取下试剂夹盒 40
 权限, 管理员帐户 63

R

Real-Time Analysis 1, 6
 RFID 10, 51
 RunInfo.xml 51, 60
 日志文件 51, 55
 入站连接 61
 软件套装 6

S

Sequencing Analysis Viewer 55-56

SRP 默认值 62
 扫描 2
 闪烁图标 7
 商品目录号 9
 用户自备的耗材 23
 设置, 安全 61
 射流问题 52
 射流系统 6, 47
 实验室级用水准则 24
 试剂盒配置 9
 试剂盒组件 24
 试剂夹盒
 标签 9, 12
 存储 10, 52
 取下 40
 准备 26, 31
 试剂冷却器 6
 手套, 更换 27, 32, 49
 输出文件夹 18-19
 输出文件夹名称 59
 输入孔 14
 数据传输 7, 45
 数据质量 58
 双通道测序 2, 57
 双泳道流动槽 11
 水槽 26, 31
 四泳道流动槽 11
 缩略图 60

T

Tween 20 47
 通过过滤 (PF) 58
 图标 7, 15
 图标, 闪烁 7
 图的颜色 44
 图像 55
 图形化流动槽 1, 11

U

Universal Copy Service 6-7, 44
 USB 端口 4

W

Windows
 安全 61-62
 网架 26, 31
 网站, 支持 51

- 危险化学品 6, 15
- 维护, 预防性 47
- 维护清洗
 - 耗材 23, 47
 - 清洗液 47
- 位置 30 处 45, 49
- 文档 2, 68
- 文件
 - 特定于运行 51
- 文库
 - 存储 53
- 文库试管 13, 52
 - 存储 10, 53
 - 夹盒内存储 52
- 无检出 56-57

X

- 吸管位置 46, 50
- 系统连接性 51
- 相机 1, 5, 55
- 小区 2, 11, 55
- 小区编号 56
- 循环次数 42, 44

Y

- 样品表 22, 41-42
- 样品表格式 22
- 样品跟踪 13
- 液体仓 12
- 仪器搬迁 53
- 仪器性能数据 18-19
- 移动仪器 53
- 移液器 25
- 溢液 27, 32, 52
- 应用程序 1
- 硬盘驱动器 7, 18-19, 45
- 泳道 11, 55
- 泳道编号 14, 36
- 预防性维护 47
- 域, BaseSpace Sequence Hub 22
- 运行
 - 恢复 53
 - 监控 22, 41
 - 交错 45
 - 删除 7
 - 暂停 45
 - 指标 44, 55
- 运行参数, LIMS 19
- 运行持续时间 44

- 运行后活动 46
- 运行模式 18
- 运行前检查 51
- 运行设置 18
- 运行设置文件夹 18-19
- 运行状况数据 18-19

Z

- 再次杂化 19
- 在线培训 2
- 暂停运行 45
- 诊断 5
- 证书信任 61
- 支持公告 51
- 支持页面 51
- 制造商 15
- 质量表 58
- 装入量 2
- 装入浓度 2
- 状态栏 4, 53
- 自定义引物 2, 13, 42
- 自动检查 51
- 组策略对象 61

技术协助

如需技术协助，请与 Illumina 技术支持部门联系。

网站: www.illumina.com
电子邮件: techsupport@illumina.com

Illumina 客户支持部门电话号码

地区	免费电话	区域电话
北美	1.800.809.4566	
爱尔兰	+353 1800936608	+353 016950506
奥地利	+43 800006249	+43 19286540
澳大利亚	+1.800.775.688	
比利时	+32 80077160	+32 34002973
丹麦	+45 80820183	+45 89871156
德国	+49 8001014940	+49 8938035677
法国	+33 805102193	+33 170770446
芬兰	+358 800918363	+358 974790110
韩国	+82 80 234 5300	
荷兰	+31 8000222493	+31 207132960
挪威	+47 800 16836	+47 21939693
日本	0800.111.5011	
瑞典	+46 850619671	+46 200883979
瑞士	+41 565800000	+41 800200442
西班牙	+34 911899417	+34 800300143
新加坡	1.800.579.2745	
新西兰	0800.451.650	
意大利	+39 800985513	+39 236003759
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
中国	400.066.5835	
中国台湾	00806651752	
中国香港特别行政区	800960230	
其他国家/地区	+44.1799.534000	

安全数据表 (safety data sheet, 简称 SDS) — 可通过 Illumina 网站 (support.illumina.com/sds.html) 获取。
产品文档 — 可通过 support.illumina.com 下载。



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (北美以外地区)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

仅供科研使用，不可用于诊断过程。

© 2020 Illumina, Inc. 保留所有权利。

illumina®