

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38	Вер. № 04	Дата вступления в силу:	Страница 1 из 33
--------------	-----------	-------------------------	------------------

1. **ЦЕЛЬ:** В данном СОП описывается стандартизированный лабораторный протокол для полногеномного секвенирования бактериальных организмов на приборе MiSeq, включая требования к прибору и его обслуживанию.
2. **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:** Настоящий документ распространяется на все сертифицированные PulseNet WGS лаборатории, выполняющие полногеномное секвенирование энтеральных бактерий с использованием платформы Illumina MiSeq и библиотек, созданных с помощью наборов для подготовки библиотек, принятых PulseNet (Таблица 2), для представления данных о последовательностях в PulseNet. Лаборатории-участники PulseNet могут вносить необходимые изменения в данную процедуру для использования в своих лабораториях после валидации в соответствии с рекомендациями своей лаборатории.
3. **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**
  - 3.1. **BaseSpace:** Облачная вычислительная среда Illumina для анализа, управления и хранения данных секвенирования следующего поколения, включая совместное использование данных.
  - 3.2. **CD:** плотность кластеров; указывает на количество кластеров, образующихся на площади поверхности проточной кюветы на этапе генерации кластеров.
  - 3.3. **CDC:** Центры по контролю и профилактике заболеваний США.
  - 3.4. **CPF:** Clusters Passing Filter; процент сгенерированных кластеров, прошедших внутреннюю процедуру фильтрации качества.
  - 3.5. **CSV:** значения, разделенные запятыми (файл) или разделенные запятыми (файл).
  - 3.6. **ДНК:** Дезоксирибонуклеиновая кислота.
  - 3.7. **dsDNA:** двухцепочечная ДНК.
  - 3.8. **EBT:** элюирующий буфер с твином.
  - 3.9. **Fastq:** текстовый формат файла для хранения последовательности и соответствующих ей оценок качества.
  - 3.10. **ГБ:** гигабайт.
  - 3.11. **GHS:** Согласованная на глобальном уровне система.
  - 3.12. **HT1:** гибридизационный буфер 1.
  - 3.13. **LRM:** менеджер локальных запусков.
  - 3.14. **MCS:** Программное обеспечение для управления прибором MiSeq.
  - 3.15. **NaOCl:** Гипохлорит натрия.
  - 3.16. **NaOH:** Гидроксид натрия.
  - 3.17. **nM:** наномолярная единица.
  - 3.18. **PhiX:** контрольная библиотека, полученная из хорошо охарактеризованного генома бактериофага. Она имеет средний размер 500 п.н. и сбалансированный состав оснований.
  - 3.19. **PHL:** Лаборатория общественного здравоохранения.
  - 3.20. **pM:** пикомолярный.
  - 3.21. **PN:** PulseNet.
  - 3.22. **PPE:** средства индивидуальной защиты (СИЗ).

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 2 из 33

- 3.23. **PR2:** Инкорпоративный буфер PR2.
- 3.24. **PulseNet Central:** Группа PulseNet в CDC, состоящая из Группы реагирования и управления вспышками PulseNet ([PulseNet@cdc.gov](mailto:PulseNet@cdc.gov)) и Основной лаборатории WGS ([PulseNetNGSlab@cdc.gov](mailto:PulseNetNGSlab@cdc.gov)).
- 3.25. **PulseNet/OutbreakNet SharePoint:** Закрытое веб-приложение для совместной работы, используемое для общения между участниками PulseNet.
- 3.26. **Q30:** процент чтений во всем прогоне, имеющих Q-баллы >30,0.
- 3.27. **QC:** Контроль качества (КК).
- 3.28. **Q Score:** Оценка качества последовательности для каждой отдельной позиции основания в последовательности, указывающая на точность вызова основания. Используются оценки Phred, где  $Q = -10\log(\text{вероятность ошибки})$ . Чем выше балл качества, тем надежнее базовый вызов. Q30 означает, что вероятность неправильного вызова базы в данной позиции составляет 1 к 1000.
- 3.29. **RFID:** радиочастотная идентификация.
- 3.30. **RSB:** буфер для ресуспендирования RSB.
- 3.31. **SAV:** Sequencing Analysis Viewer; прикладное программное обеспечение, позволяющее в режиме реального времени просматривать показатели качества, генерируемые программным обеспечением для анализа в реальном времени (RTA) на системах секвенирования Illumina.
- 3.32. **SDS:** паспорт безопасности.
- 3.33. **SOP:** Стандартная операционная процедура (СОП).
- 3.34. **Tris-HCl:** Трис гидрохлорид.
- 3.35. **UPS:** Источник бесперебойного питания.
- 3.36. **VP10:** пользовательский праймер Read 1 для секвенирования библиотек Illumina DNA PCR-Free Prep.
- 3.37. **WGS:** Полногеномное секвенирование.

## 4. ОБЯЗАННОСТИ

- 4.1. **Лаборатории общественного здравоохранения PulseNet:**
  - 4.1.1. Секвенировать изоляты и проводить проверку качества секвенирования и последующих данных о последовательности.
  - 4.1.2. Повторно секвенировать все изоляты, которые не соответствуют пороговым значениям качества.
  - 4.1.3. При необходимости информировать PulseNet Central о любых сложностях с лабораторными протоколами или подозрениях на проблемы с приборами или реагентами.
- 4.2. **Группа PulseNet Central:**
  - 4.2.1. Проводит дополнительный анализ качества последовательностей, чтобы обеспечить обратную связь и поддержку лабораторий общественного здоровья (PHL) в устранении неполадок, если это необходимо.
  - 4.2.2. Уведомление PN PHL, если представленные последовательности не соответствуют пороговым значениям качества.
  - 4.2.3. При необходимости сообщайте PHL о любых предполагаемых проблемах с

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38	Вер. № 04	Дата вступления в силу:	Страница 3 из 33
--------------	-----------	-------------------------	------------------

реагентами.

4.2.4. Регулярно поддерживать и пересматривать СОПы и размещать их в SharePoint.

## 5. БЕЗОПАСНОСТЬ

- 5.1. **Предупреждение о биобезопасности:** Данный документ описывает работу с ДНК и сопутствующими продуктами и не описывает передовые методы работы с биологическим инфекционным материалом.
- 5.2. **Предупреждение о химической безопасности:** Соблюдайте надлежащие меры предосторожности и надевайте соответствующие СИЗ при работе с потенциально опасными химическими веществами. Убедитесь, что химикаты, использованные контейнеры и неиспользованное содержимое утилизируются в соответствии с местными и государственными стандартами безопасности. **Дополнительную информацию см. во всех соответствующих SDS.**
  - 5.2.1. Картриджи с реагентами MiSeq содержат формамид (категория 1B по классификации СГС по репродуктивной токсичности), алифатический амид, являющийся потенциальным репродуктивным токсином. Травмы могут возникнуть при вдыхании, проглатывании, попадании на кожу и в глаза.
  - 5.2.2. Буфер PR2 не следует выбрасывать в канализацию (категория 1 GHS по сенсibilизации кожи).
  - 5.2.3. Этанол легко воспламеняется (категория воспламеняемости 2 по GHS).
  - 5.2.4. Гидроксид натрия является коррозионным (GHS Категория 1A и 1, GHS Категория 3 для острой опасности для водной среды).

## 6. РЕАГЕНТЫ

- 6.1. Варианты набора реагентов MiSeq:
  - v2 Nano, 300 циклов - Illumina, кат# MS-103-1001
  - v2 Nano, 500 циклов - Illumina, кат# MS-103-1003
  - v2 Micro, 300 циклов - Illumina, кат# MS-103-1002
  - v2 300 циклов - Illumina, кат# MS-102-2002 (один), MS-102-2022 (20 упаковок)
  - v2 500 циклов - Illumina, кат# MS-102-2003 (один), MS-102-2023 (20 упаковок)
  - v3 600 циклов - Illumina, кат# MS-102-3003

**ПРИМЕЧАНИЕ: *PulseNet* ни при каких обстоятельствах не принимает химические препараты для секвенирования с числом циклов менее 300.**

  - 6.1.1. Коробка 1 из 2. Хранить при температуре от -15°C до -25°C, в защищенном от света месте.
    - Картридж MiSeq (информацию о химической безопасности см. в разделе 5.2.1).
    - Буфер для гибридизации (HT1).
  - 6.1.2. Вставка 2 из 2. Хранить при температуре 2-8°C.
    - Буфер для инкорпорации (PR2, информацию о химической безопасности см. в разделе 5.2.2).
    - Проточная кювета.
- 6.2. Этанол, молекулярный класс, 95-100% (Fisher Scientific, cat# BP2818-500 или эквивалент).

## СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 4 из 33

- 6.3. Этанол, лабораторный, 70% или эквивалент для целей дезинфекции (Fisher Scientific, кат# 04-355-309 или эквивалент).
- 6.4. Вода, молекулярный класс (Fisher Scientific, кат# BP24701 или эквивалент).
- 6.5. Гипохлорит натрия, лабораторный сорт, 4-8,25% (Fisher Scientific, кат# SS290-1 или эквивалент).  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется использовать гипохлорит натрия лабораторного качества из-за возможных добавок в гипохлорите натрия безрецептурного качества, которые могут нарушить работу жидкостных систем прибора.*
- 6.6. Гидроксид натрия, подходящий для клеточных культур, 1N (Millipore Sigma, кат# S2770-100ML или эквивалент), pH должен быть  $\geq 12.5$ .  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется использовать жидкие, а не порошкообразные вещества. Также рекомендуется аликвотировать и замораживать в одноразовых аликвотах объемом 100 мкл.*
- 6.7. Tween 20, молекулярный класс, (Millipore Sigma, кат# P9416-50ML или эквивалент)
- 6.8. **ВАРИАНТ:** 10nM PhiX Control Kit v3 (Illumina, кат# FC-110-3001). Хранить при температуре от  $-25^{\circ}\text{C}$  до  $-15^{\circ}\text{C}$ .
- 6.9. **При секвенировании библиотек Illumina DNA PCR-Free Prep:** Illumina DNA PCR-Free Prep Sequencing and Indexing Primer (Illumina, кат. № 20041797, 2 x 7,5 мл праймера V10 Read 1 Primer, 2 x 7,5 мл праймера V14 Read 2 Primer). **ПРИМЕЧАНИЕ:** *праймер V14 Read 2 не используется для данной процедуры.*

### 7. ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

- 7.1. Лед.
- 7.2. Лоток для промывки Illumina MiSeq (n=2, один для промывки отбеливателем, другой - только для промывки водой).
- 7.3. Безворсовые салфетки (Fisher Scientific, кат# 06-666 или эквивалент).
- 7.4. Бумага для линз (Fisher Scientific, кат# 11-996 или эквивалент).
- 7.5. Одноразовая промывочная пробирка MiSeq (Illumina, кат# MS-102-9999).
- 7.6. Бутылка с промывочным буфером для MiSeq, контейнер Nalgene, 500 мл (n=2, для 0,5% Tween 20 и воды молекулярного класса, Fisher Scientific, cat# 15-350-205 или эквивалент).  
**АЛЬТЕРНАТИВА:** Можно использовать отработанные и промытые бутылки PR2.
- 7.7. Пленка Microseal B (BioRad, кат# MSB-1001).
- 7.8. Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (Fisher Scientific, кат# 05-408-129 или эквивалент).
- 7.9. Стерильные наконечники для пипеток, фильтрованные: 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл и 1000 мкл увеличенного объема (Rainin, кат# 30389225, 30389239, 30389212 и 30389223 или эквивалент).
- 7.10. Промывочный флакон с насадкой (x3, по одному для 0,5% Tween 20, 100% этанола и воды молекулярного класса (Fisher Scientific, кат# FB0340922D или эквивалент)).

### 8. ОБОРУДОВАНИЕ

- 8.1. Настольный секвенатор MiSeq.
- 8.2. Микропипетки объемом от 1 мкл до 1000 мкл.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 5 из 33

- 8.3. Тепловой блок (только для препаратов библиотек Nextera XT, KAPA HyperPlus, QiaSeq FX и NEB Ultra II FS).
- 8.4. Ведерки для льда.
- 8.5. Микроцентрифуга.
- 8.6. Микропланшетная центрифуга или эквивалент.
- 8.7. **ВАРИАНТ:** резервный источник бесперебойного питания для MiSeq (рекомендуется: Staples, Cyberpower AVR Series Line Interactive 1.5 kVA UPS, кат# CP1500AVRLCD).
- 8.8. **ВАРИАНТ:** Внешний зашифрованный жесткий диск или сервер для передачи и хранения данных, если BaseSpace или сетевое подключение прибора недоступны (Рекомендуется: CDW, DataLocker H350 Basic Hard Drive 1 TB USB 3.0, кат# 4075102).

## 9. ПРОЦЕДУРА

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Документально подтверждено, что на плотность кластеров может негативно повлиять использование чистящих средств на основе аммония вблизи оборудования для секвенирования, включая лабораторные столы и пипетки, используемые для подготовки библиотек. Не используйте четвертичные аммониевые соединения или салфетки рядом с оборудованием для секвенирования или на нем!

### 9.1. Подготовка картриджа с реагентами для MiSeq

- 9.1.1. Запланируйте достаточно времени для размораживания реагентов для секвенирования (картридж для секвенирования, буфер HT1) и праймера V10 (при секвенировании библиотек Illumina DNA PCR-Free Prep). Буфер HT1 и праймер VP10 можно размораживать на льду или при температуре 2-8°C. См. таблицу 1, в которой приведены рекомендации по времени оттаивания, методу и хранению картриджа для секвенирования:

Метод оттаивания	Время, необходимое для оттаивания	Срок хранения размороженного картриджа (2-8°C или на льду)	Картридж не следует повторно замораживать после оттаивания
Водяная баня комнатной температуры (открытая)	~ 1 час	24 часа <sup>1</sup>	
2 - 8°C (без вскрытия)	8-12 часов	7 дней	

Таблица 1. Рекомендации по размораживанию и хранению наборов реагентов после размораживания.

<sup>1</sup>Рекомендация Illumina - 6 ч.

- 9.1.2. После размораживания переверните картридж с реагентами 10 раз для перемешивания, а затем визуально проверьте, чтобы убедиться, что все позиции полностью разморожены и не содержат осадка.
- 9.1.3. Слегка постучите картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха на дне лунок с реагентами и убедиться в отсутствии препятствий для закрытия лунок фольгой.

## СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 6 из  
33

9.1.4. Поместите размороженный картридж с реагентами и НТ1 на лед или отложите в сторону при температуре 2 - 8°C до тех пор, пока образец не будет готов к загрузке.

### 9.2. Химическая денатурация ДНК объединенной библиотеки

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Обратитесь к имеющимся СОПам по подготовке библиотек PulseNet для различных вариантов наборов для подготовки и объединения библиотек. При использовании контрольного списка подготовки ДНК (PNL35.W3) объединение, денатурация, разбавление и загрузка прибора перечислены как шаги № 80-94.

9.2.1. **Только для библиотек Nextera XT, KAPA HyperPlus, QiaSeq FX и NEB Ultra II FS:** Предварительно нагрейте термоблок до 96°C ± 1.

9.2.2. Извлеките планшеты/пробирки с объединенными библиотеками и, если они заморожены, оттайте на льду. Центрифугируйте при 800 - 1200 об/мин (или 280 x g) в течение 1 минуты.

9.2.3. Извлеките из морозильной камеры 100 мкл аликвоты 1 N NaOH и оттайте на льду,

9.2.4. Разбавьте до 0,2 N, добавив 400 мкл воды молекулярного класса к 100 мкл аликвоты 1 N NaOH. Несколько раз переверните пробирку для перемешивания.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Свежеразведенный NaOH должен быть использован в течение 6 часов после разведения.

9.2.5. Соедините 5 мкл объединенной библиотеки образцов и 5 мкл 0,2 N NaOH в новой микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл (теперь в концентрации 1 или 2 нМ).

9.2.6. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре для денатурации dsDNA.

9.2.7. **НЕЗАМЕДЛИТЕЛЬНО** добавьте 990 мкл предварительно охлажденного НТ1 в пробирку с 10 мкл денатурированной объединенной библиотеки после инкубации. Исходные и денатурированные концентрации библиотек см. в Таблице 2.

Набор для подготовки библиотек	Исходная концентрация пула библиотек	Концентрация денатурированной библиотеки после добавления 990 мкл НТ1
Nextera XT, NEB Ultra II FS, QIAseq FX и KAPA HyperPlus	2 нМ	10 пМ
Illumina DNA Prep, PulseNet Rapid Prep, Nextera XT, NEB Ultra II FS, QIAseq FX, & KAPA HyperPlus	4 нМ	20 пМ
Illumina DNA PCR-Free	2 нМ	20 пМ

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 7 из  
33

**Таблица 2.** Концентрации для исходного пула библиотек и денатурированного пула для валидированных библиотечных препов PulseNet

### 9.3. Разбавление до желаемой конечной загрузочной концентрации и тепловая денатурация пула библиотечной ДНК

- 9.3.1. Определите желаемую конечную концентрацию загрузки, исходя из типа подготовки библиотеки и используемого набора для секвенирования. Рекомендации см. в Таблице 3 ниже.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Конечная концентрация загрузки также может зависеть от конкретного прибора и/или пользователя и может быть скорректирована выше или ниже рекомендуемых концентраций в Таблице 3 для достижения оптимальной плотности кластеров (CD). Однако концентрацию загрузки следует регулировать **только в том** случае, если точность расчета молярности была предварительно проверена путем определения среднего размера фрагмента пула библиотек с помощью фрагментного анализа. Средний размер фрагмента, значительно отличающийся от 1000 п.н., используемого по умолчанию при расчете молярности, приведет к выходу CD за пределы целевого диапазона. В этом случае корректировка расчета молярности на основе наблюдаемого размера фрагмента и/или исправление ошибок в подготовке библиотеки, приведших к отклонениям в размере фрагмента, должны быть выполнены ДО корректировки концентрации загрузки.

Набор для подготовки библиотек	Рекомендуемая конечная концентрация загрузки	
	v2 (целевой CD 800-1200 К/мм <sup>2</sup> )	v3 (целевой CD 1200-1400 К/мм <sup>2</sup> )
Nextera XT	10 пМ	15 пМ
Illumina DNA Prep	12 пМ	15 пМ
NEB Ultra II FS и KAPA HyperPlus	10 пМ	ND <sup>1</sup>
QIAseq FX	8 пМ	ND <sup>1</sup>
Illumina DNA PCR-Free, PulseNet Rapid Prep	12 пМ	ND <sup>1</sup>

**Таблица 3.** Рекомендуемые концентрации загрузки для различных наборов для подготовки библиотек.

<sup>1</sup>Не определено.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 8 из 33

- 9.3.2. Обратитесь к Таблице 4 ниже, чтобы получить конечную концентрацию загрузки объединенной библиотеки, и разбавьте ее соответствующим образом:

Конечная концентрация загрузки	Концентрация денатурированного пула = 10 пМ		Концентрация денатурированного пула = 20 пМ	
	Необходимый объем НТ1	Необходимый объем денатурированного пула	Необходимый объем НТ1	Необходимый объем денатурированного пула
8 пМ	200 мкл	800 мкл	600 мкл	400 мкл
10 пМ	NA	NA	500 мкл	500 мкл
12 пМ	NA	NA	400 мкл	600 мкл
15 пМ	NA	NA	250 мкл	750 мкл

Таблица 4. Необходимые объемы пула и НТ1 для разведения до желаемой конечной концентрации.

- 9.3.3. Тщательно перемешайте разбавленные библиотеки.

**ВАРИАНТ:** На этом этапе можно добавить контроль *PhiX*. Инструкции и дополнительную информацию см. в Приложении PNL38-1.

- 9.3.4. **Только для библиотек Nextera XT, KAPA HyperPlus, QiaSeq FX и NEB Ultra II FS:** нагрейте денатурированный пул разбавленных библиотек до  $96 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 2 минут в термоблоке для обеспечения полной денатурации.

- 9.3.5. Поместите пул библиотек на лед. Пулы библиотек, прошедшие тепловую обработку, необходимо охладить на льду сразу после тепловой обработки в течение не менее 5 минут перед загрузкой.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Библиотека ДНК может находиться на льду или при температуре  $2 - 8^\circ\text{C}$  до готовности к загрузке ( $< 30$  минут). Если до начала работы проходит более 30 минут, может потребоваться повторная денатурация и разбавление пула.

## 9.4. Подготовка прибора MiSeq к запуску

- 9.4.1. Перед запуском убедитесь, что на приборе достаточно свободного дискового пространства (100 ГБ). Если доступно менее 100 ГБ, см. раздел 9.11.3. для получения инструкций по удалению файлов перед загрузкой прибора и запуском прогона.

- 9.4.2. Убедитесь, что настройка листа пробы (и планшеты, если применимо) завершена в локальном менеджере прогонов (LRM) на приборе. Инструкции см. в Приложении PNL38-2.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 9 из 33

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Рабочие книги содержат отдельные вкладки для разных приборов Illumina: MiSeq LRM3&4, iSeq LRM, MiniSeq LRM и Шаблон импорта образцов для NextSeq.

- 9.4.3. Откройте окно программы MiSeq Control Software, выберите "Sequence".
- 9.4.4. Выберите "Local Run Manager", войдите в систему под своим именем пользователя и паролем, выберите соответствующую опцию потоковой передачи данных BaseSpace и подтвердите параметры запуска, прежде чем выбрать "Next". Прибор выдаст запрос на загрузку проточной кюветы.

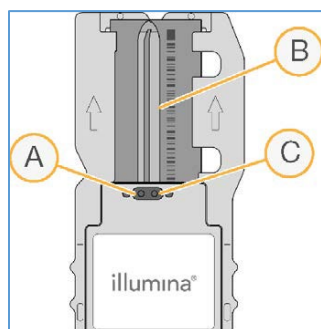
## 9.5. Подготовьте и загрузите проточную кювету

- 9.5.1. Извлеките проточную кювету и инкорпорационный буфер (PR2) из хранилища (2 - 8°C).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Не храните буфер PR2 на льду, так как в нем могут образоваться твердые частицы.

- 9.5.2. Надев чистые неопудренные перчатки, осторожно извлеките проточную кювету из контейнера, не касаясь стекла проточной кюветы.
- 9.5.3. Промойте сборку проточной кюветы молекулярной водой, следя за тем, чтобы стекло и пластиковый корпус были тщательно промыты от избытка солей.
- 9.5.4. Вытрите проточную кювету насухо безворсовой салфеткой, соблюдая осторожность вокруг черной прокладки порта. Обязательно удалите всю лишнюю жидкость.
- 9.5.5. Смочите чистый лист бумаги для линз этанолом и очистите стекло проточной кюветы, убедившись, что в зоне визуализации стекла (В на рис. 1 ниже) нет разводов, ворсинок и волокон ткани.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Не добавляйте этанол непосредственно в проточную кювету. Избегайте попадания этанола на прокладки проточной кюветы (А и С на рис. 1).



**Рисунок 1.** Проточная кювета. Прокладки портов (А и С), каналы для визуализации (В)

- 9.5.6. Вытрите излишки спирта бумагой для линз и визуально убедитесь, что порты проточной кюветы (А и С) не засорены, что прокладка хорошо прилегает к портам проточной кюветы и что на стекле нет пятен или мусора.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 10 из 33

- 9.5.7. Поднимите дверцу отсека проточной кюветы на приборе MiSeq и нажмите кнопку фиксатора, чтобы открыть зажим и извлечь ранее использованную проточную кювету.
- 9.5.8. Убедитесь в том, что на ступени проточной кюветы нет ворса. При необходимости протрите ее спиртовой или аналогичной салфеткой и дайте высохнуть.
- 9.5.9. Установите проточную кювету на ступень, закройте зажим проточной кюветы (при полном закрытии он щелкнет), закройте дверцу отсека и выберите "Next" в программе MiSeq Control Software. Появится запрос на загрузку бутылки PR2.

## 9.6. Загрузите инкорпорационный буфер

- 9.6.1. Аккуратно переверните инкорпорационный буфер (PR2), чтобы перемешать, а затем снимите крышку.
- 9.6.2. Откройте дверцу отсека для реагентов и поднимите ручку сиппера, пока она не зафиксируется.
- 9.6.3. Извлеките флакон с промывочным буфером, заново укупорьте его и отложите для дальнейшего использования.
- 9.6.4. Поместите бутылку с PR2 туда, где ранее находилась бутылка с промывочным буфером MiSeq.
- 9.6.5. Извлеките бутылку для отходов и при необходимости перелейте ее в соответствующий контейнер для химических отходов.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Вся жидкость, которая накапливается в бутылке для отходов MiSeq, должна быть утилизирована как отходы формамида, включая жидкость из циклов промывки. Убедитесь, что химические отходы промаркированы и утилизированы соответствующим образом.*
- 9.6.6. Медленно опустите ручку сиппера. Убедитесь, что сипперы полностью опустились в PR2 и бутылки для отходов.
- 9.6.7. Проверьте правый нижний угол экрана, чтобы убедиться, что RFID-метка бутылки PR2 была успешно считана.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Если RFID-метка не считывается системой на каком-либо этапе, программа предложит вам выполнить действия, чтобы получить временный код обхода и продолжить настройку прогона. Дополнительные сведения см. в разделе "Решение проблемы сбоя считывания RFID" в руководстве пользователя системы MiSeq.*
- 9.6.8. Выберите "Далее" на экране MCS, и на экране появится запрос на загрузку картриджа.

## 9.7. Подготовьте и загрузите картридж

- 9.7.1. Извлеките размороженный картридж с реагентами из хранилища, тщательно высушите его и смешайте реагенты, аккуратно перевернув 10 раз.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Перемешивание реагентов очень важно! Если пул библиотек был помещен в картридж до смешивания реагентов, используйте удлиненный наконечник пипетки, чтобы удалить его, заклейте резервуар для образцов, смешайте картридж, а затем снова загрузите пул.*

## СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

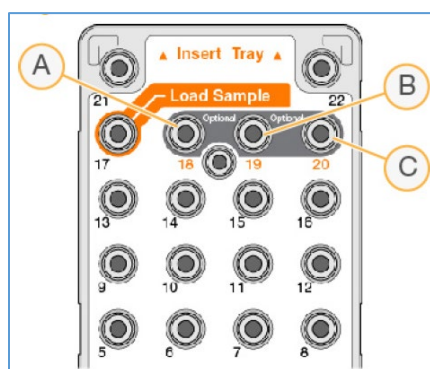
Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 11 из 33

- 9.7.2. Постучите картридж с реагентами по твердой поверхности, чтобы собрать содержимое на дне резервуаров.
- 9.7.3. Чистым наконечником пипетки объемом 1000 мкл проткните фольговую пломбу на резервуаре с надписью "Загрузить образец".
- 9.7.4. Загрузите **600 мкл** библиотеки денатурированной ДНК в резервуар "Load Sample" (рис. 2).

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** При секвенировании библиотек *Illumina DNA PCR-Free Prep* добавьте 600 мкл размороженного праймера VP10 в пользовательский резервуар, позиция 18 (А на рис. 2).



**Рисунок 2.** Зарезервированные резервуары в картридже для секвенирования: № 17 для пула библиотек, подлежащих секвенированию, № 18-20 для пользовательских праймеров.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Рекомендуется загружать образец и праймер в нижнюю часть резервуара с помощью удлиненного наконечника пипетки объемом 1000 мкл, чтобы снизить риск образования капель по бокам. Следите за тем, чтобы капли не попадали на фольговую прокладку при дозировании образца.

- 9.7.5. Осторожно постучите по твердой поверхности, чтобы все содержимое опустилось на дно.
- 9.7.6. Откройте дверцу охладителя реагентов и извлеките промывочный лоток. При необходимости протрите дно отсека охладителя впитывающими салфетками.  
**ПРИМЕЧАНИЕ1:** НЕ тяните лоток для промывки с силой; если есть сопротивление, сипперы могут быть еще опущены. Дождитесь, пока MiSeq выдаст запрос на загрузку картриджа, и повторите попытку.  
**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Не оставляйте дверцу охладителя реагентов открытой в течение длительного времени.
- 9.7.7. Задвиньте картридж с реагентом в отсек охладителя до упора.
- 9.7.8. Закройте дверцу охладителя и проверьте экран, чтобы убедиться, что RFID-картридж с реагентом был успешно считан.
- 9.7.9. Закройте дверцу отсека для реагентов.
- 9.7.10. Просмотрите параметры запуска и убедитесь в их правильности (название эксперимента, рабочий процесс анализа, длина считывания и т. д.), затем выберите "Далее", чтобы перейти к проверке перед запуском.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 12 из 33

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Перед запуском система выполняет проверку всех компонентов запуска, дискового пространства и сетевых соединений. Если какая-либо часть предзапускной проверки окажется неудачной, на экране появится сообщение с общими инструкциями, описывающими ошибку или указывающими, как ее исправить. Дополнительные сведения см. в разделе "Устранение ошибок настройки запуска" в руководстве пользователя системы MiSeq. Если все элементы успешно прошли предпрогонную проверку, система готова к запуску прогона.*

9.7.11. Выберите "Start Run".

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Прибор можно настроить на автоматический запуск после проверки системы. Это можно сделать в разделе "Run Settings" (Настройки запуска) в ПО MiSeq Control, установив флажок "Start run after Pre-Run check/Не запрашивать подтверждения".*

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** *После запуска прогона не открывайте двери отсека проточной кюветы или отсека для реагентов, а также не включайте монитор прибора, если прогон не должен быть остановлен или приостановлен.*

**ПРИМЕЧАНИЕ3:** *Захват изображений на приборе MiSeq чувствителен к вибрации. Выполнение задач, вызывающих вибрацию вблизи/на приборе во время прогона, может привести к остановке прогона или негативно повлиять на результаты секвенирования.*

9.8. **Просмотр показателей выполнения**

9.8.1. По завершении цикла убедитесь, что цикл секвенирования соответствует основным показателям качества, которые будут показаны на экране MCS после завершения цикла (рис. 3).

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 13 из 33

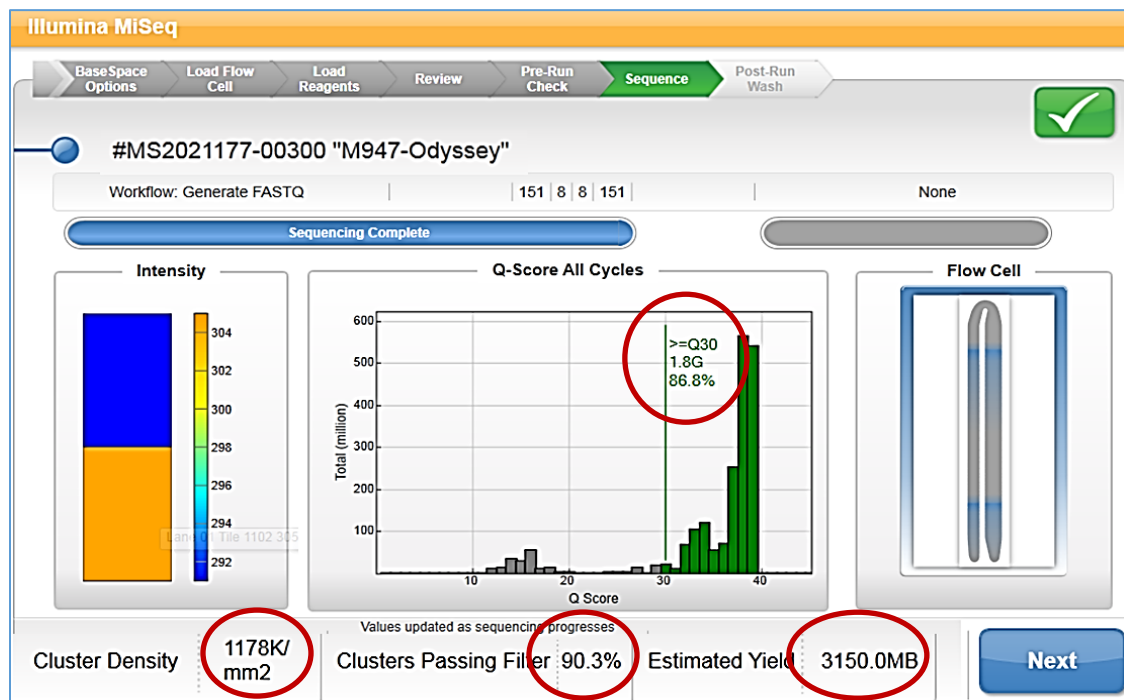


Рисунок 3. Экран завершения прогона в ПО MiSeq Control. Основные показатели обведены красным.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Эти показатели также можно найти на вкладке "Сводка" в SAV, см. рис. 4 ниже.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 14 из 33

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% >= Q30
Read 1	3.62	3.62	0.00	NaN	172	94.31
Read 2 (I)	0.10	0.10	0.00	NaN	851	97.90
Read 3 (I)	0.10	0.10	0.00	NaN	445	96.10
Read 4	3.62	3.62	0.00	NaN	126	82.74
Non-Indexed Total	7.24	7.24	0.00	NaN	149	86.33
<b>Total</b>	<b>7.45</b>	<b>7.45</b>	<b>0.00</b>	<b>NaN</b>	<b>399</b>	<b>88.76</b>

Lane	Tiles	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)	Cluster Count PF (M)	% >= Q30	Yield (G)	Cycles Err Rated	Aligned (%)	Error Rate (%)	Error Rate 35 cycle (%)	Error Rate 75 cycle (%)
1	28	781 ± 18	95.06 ± 0.26	0.059 / 0.048	NaN / NaN	NaN / NaN	15.24	14.49	94.31	3.62	0	0.00 ± 0.00	NaN ± NaN	NaN ± NaN	NaN ± NaN

Lane	Tiles	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)	Cluster Count PF (M)	% >= Q30	Yield (G)	Cycles Err Rated	Aligned (%)	Error Rate (%)	Error Rate 35 cycle (%)	Error Rate 75 cycle (%)
1	28	781 ± 18	95.06 ± 0.26	0.000 / 0.000	NaN / NaN	NaN / NaN	15.24	14.49	97.90	0.10	0	NaN ± NaN	NaN ± NaN	NaN ± NaN	NaN ± NaN

Lane	Tiles	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)	Cluster Count PF (M)	% >= Q30	Yield (G)	Cycles Err Rated	Aligned (%)	Error Rate (%)	Error Rate 35 cycle (%)	Error Rate 75 cycle (%)
1	28	781 ± 18	95.06 ± 0.26	0.000 / 0.000	NaN / NaN	NaN / NaN	15.24	14.49	96.10	0.10	0	NaN ± NaN	NaN ± NaN	NaN ± NaN	NaN ± NaN

Lane	Tiles	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)	Cluster Count PF (M)	% >= Q30	Yield (G)	Cycles Err Rated	Aligned (%)	Error Rate (%)	Error Rate 35 cycle (%)	Error Rate 75 cycle (%)
1	28	781 ± 18	95.06 ± 0.26	0.103 / 0.043	NaN / NaN	NaN / NaN	15.24	14.49	82.74	3.62	0	0.00 ± 0.00	NaN ± NaN	NaN ± NaN	NaN ± NaN

Рисунок 4. Снимок экрана вкладки "Сводка" SAV, на котором выделены ключевые показатели выполнения, подлежащие рассмотрению.

9.8.2. Запишите основные показатели в рабочую книгу. Сравните Q30, плотность кластеров и кластеры, прошедшие фильтр, с рекомендованными PulseNet пороговыми значениями метрик выполнения, приведенными в таблице 5. **ПРИМЕЧАНИЕ:** Если метрики выполнения не соответствуют пороговым значениям, указанным в таблице 5, возможно, некоторые последовательности все еще проходят критические метрики качества, описанные в PNQ07. Для определения приемлемости отдельных последовательностей или необходимости их повторного анализа требуется дальнейший анализ.

Химия набора	Q30 (%)	Плотность кластеров <sup>(2)</sup> (К/мм <sup>2</sup> )	Кластеры, прошедшие фильтр (%)
v3, 500 циклов <sup>1</sup>	≥ 70	1200-1400	~ 80 или выше
v2, 500 цикл	≥ 75	800-1200	
v2, 300 цикл	≥ 80	800-1200	
Нано, v2 300 цикл	≥ 80	800-1200	
Нано, v2 500 цикл	≥ 75	800-1200	
Микро, v2 300 цикл	≥ 80	800-1200	

Таблица 5. Пороговые значения метрики выполнения для химических препаратов для секвенирования, рекомендованные PulseNet.

<sup>1</sup>Стандарт набора - 600 циклов, но PulseNet рекомендует проводить секвенирование при 500 циклах для повышения качества.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 15 из 33

<sup>2</sup>Рекомендация Illumina 600-1200 К/мм<sup>2</sup>. Для полного цикла с оптимизированной концентрацией загрузки рекомендация PulseNet составляет 800-1200 К/мм<sup>2</sup>.

## 9.9. Экспорт данных из MiSeq

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Этот раздел необходим только для пользователей, не имеющих возможности потоковой передачи данных в BaseSpace, или если для локального анализа или хранения данных требуется вторичное хранилище данных (например, локальный сервер).

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Для парных чтений (R1 и R2) на изолят будет приходиться 2 файла fastq. Эти данные можно скопировать на внешний жесткий диск и перенести на компьютерную рабочую станцию. Кроме того, прибор MiSeq можно подключить к общему диску локальной сети для прямой передачи файлов с прибора.

- 9.9.1. Данные находятся на диске D:\ → Папка Run (выберите самую последнюю папку Run) → Alignment\_1 → Папка Run → Fastq.gz).

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Генерация файлов fastq после выполнения MiSeq может занять до 1 часа, так как программное обеспечение для анализа в реальном времени отстает от хода секвенирования. При использовании BaseSpace доступ к данным можно получить в процессе работы или в специально созданном проекте.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Если fastq-данные недоступны для данного изолята (изолятов) из-за неправильного присвоения индекса или ошибки в листе образцов, прогон можно повторно отправить на анализ с помощью LRM или корректирующих опций в BaseSpace (см. приложение PNL38-3).

## 9.10. Послепрогонные промывки и удаление реагентов

- 9.10.1. После завершения цикла выберите опцию "Начать промывку" в правой нижней части экрана.

- 9.10.2. Убедитесь, что флажок "Выполнить дополнительную промывку линии шаблона" установлен, чтобы продолжить послепрогонную отбеливающую промывку.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Гипохлорит натрия (NaOCl) используется для уменьшения переноса нуклеиновой кислоты из предыдущих прогонов.

- 9.10.3. Приготовьте свежее разведение гипохлорита натрия (NaOCl) молекулярного класса, используя воду молекулярного класса. Шаги последовательного разведения см. в таблице 6 ниже. Выберите первое разведение в соответствии с концентрацией исходного NaOCl.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Второе разведение (0,01%) можно приготовить непосредственно в промывочной пробирке/резервуаре MiSeq (А на рис. 5).

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Использование обычного бытового отбеливателя не подтверждено и не рекомендуется.

## СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 16 из  
33

Разбавление	Начальная концентрация NaOCl	Объем NaOCl	Объем воды	Конечная концентрация NaOCl
<b>Первое разбавление:</b>	4%	30 мкл	570 мкл	<b>0.20%</b>
	5%	24 мкл	576 мкл	
	6%	20 мкл	580 мкл	
	8.25%	15 мкл	585 мкл	
<b>Второе разбавление:</b>	0.20%	50 мкл	950 мкл	<b>0.01%</b>

Таблица 6. Расчеты, необходимые для приготовления 0,2% и 0,01% разведений из исходного NaOCl.

9.10.4. Вставьте промывочную пробирку в позицию 17 в назначенном лотке для промывки отбеливателем, пока горлышко не окажется заподлицо с лотком (В на рис. 5).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Рекомендуется иметь 2 лотка для промывки, один из которых предназначен для промывки отбеливателем и Tween 20, а другой - только для промывки водой.



- A. Вставьте пробирку в позицию 17 промывочного картриджа MiSeq.
- B. Убедитесь, что горлышко пробирки MiSeq находится заподлицо с промывочным картриджем.

Рисунок 5. Вставка трубки для промывки 0,01% гипохлоритом натрия в лоток для промывки.

9.10.5. Заполните оставшиеся резервуары 0,5%-ным промывочным раствором Tween 20.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** 0,5% Tween 20 можно приготовить, добавив 5 мл Tween 20 в 995 мл воды молекулярного класса. За один раз готовьте только 1 л 0,5% Tween 20, чтобы обеспечить его своевременное использование. Со временем моющее средство может разрушиться или отделиться от раствора, что негативно скажется на качестве секвенирования. Рекомендуется готовить свежий промывочный раствор ежемесячно или раньше, если это необходимо, чтобы снизить вероятность загрязнения.

9.10.6. Удалите излишки влаги с поверхности промывочного картриджа с помощью безворсовой салфетки.

## СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 17 из 33

- 9.10.7. Откройте дверцу отсека для реагентов и дверцу охладителя и извлеките использованный картридж. Отложите картридж в сторону для утилизации.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Реагентная лунка 8 картриджа содержит формамид и должна быть утилизирована как опасный химический отход. См. раздел 5 и SDS для получения подробной информации о безопасности.
- 9.10.8. Задвиньте промывочный лоток в отсек охладителя до упора, затем закройте дверцу охладителя.
- 9.10.9. Поднимите ручку сиппера, извлеките бутылку PR2 и замените ее бутылкой с промывочным буфером MiSeq, содержащей 400-500 мл 0,5% раствора Tween 20.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Рекомендуется заменять флакон с промывочным буфером свежим 0,5% Tween, приготовленным ежемесячно или раньше, чтобы ограничить возможное загрязнение.
- 9.10.10. Извлеките контейнер для отходов и удалите его содержимое в соответствии с принятыми в лаборатории методами утилизации опасных химических отходов (см. раздел 5.2.1. для получения информации о безопасности).  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Вся жидкость, которая накапливается в бутылке для отходов MiSeq, должна быть утилизирована как токсичные отходы формамида, включая жидкость из циклов промывки. Все бутылки с формамидом должны быть четко промаркированы как химические отходы и утилизированы соответствующим образом.
- 9.10.11. Верните опорожненный контейнер для отходов в отсек для реагентов, опустите рычаг сиппера и закройте дверцу отсека для реагентов.
- 9.10.12. Выберите "Next", чтобы начать первую слепопрогонную промывку линии шаблонов. Это займет примерно 30 минут.
- 9.10.13. После завершения промывки шаблонной линии выберите "Done" на экране, чтобы вернуться на главный экран MiSeq Control Software.
- 9.10.14. Сразу после промывки линии шаблонов необходимо выполнить вторую слепопрогонную промывку молекулярной водой, чтобы убедиться, что из линии шаблонов удалены все следы гипохлорита натрия. На главном экране выберите "Perform Wash" > "Perform Post-Run Wash".
- 9.10.15. Выберите "Start Wash" (Начать промывку).  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Флажок "Template Line Wash" должен оставаться **не отмеченным**.
- 9.10.16. Заполните все резервуары указанного лотка для промывки молекулярной водой.
- 9.10.17. Удалите излишки влаги с поверхности промывочного картриджа безворсовой салфеткой.
- 9.10.18. Извлеките лоток для промывки, содержащий 0,5% Tween 20, и пробирку для промывки с отбеливателем из холодильного отделения и тщательно промойте пробирку для промывки. Ополосните лоток для промывки деионизированной водой (или эквивалентной) и дайте ей высохнуть.
- 9.10.19. Поместите лоток для промывки водой в холодильную камеру и закройте дверцу.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ**

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 18 из 33

- 9.10.20. Поднимите рычаг отстойника реагентов, замените бутылку для промывки 0,5% Tween 20 на бутылку для промывки, содержащую 300-500 мл воды молекулярного класса, и опустите рычаг отстойника.
- 9.10.21. Закройте дверцу отсека для реагентов и выберите "Далее", чтобы начать промывку.
- 9.10.22. По окончании промывки выберите "Готово", чтобы завершить цикл промывки и вернуться на главный экран. Держите проточную кювету, бутылку для промывки, промывочный картридж и емкость для отходов на месте до следующего цикла секвенирования.

**9.11. Обслуживание прибора**

	Частота обслуживания		
	После пробежки	Еженедельно	Ежемесячно
<b>Тип технического обслуживания</b>	Послезапусковая мойка по шаблону, затем послезапусковая мойка водой	Послепроцедурная стирка Tween 20 + Послепроцедурная стирка водой	Поддерживающая мойка + цикл питания
<b>Необходимое время</b>	30 минут + 20 минут	20 минут + 20 минут	60 минут + 20 минут
<b>Необходимые реактивы</b>	- 0,5% Tween 20 - 0,01% NaOCl - Молекулярная вода	- 0,5% Твин 20 - Вода молекулярного класса	- 0,5% Твин 20 - Молекулярная вода

Таблица 7. Сводная информация о техническом обслуживании MiSeq.

**9.11.1. Еженедельное обслуживание:**

- 9.11.1.1. Промывка: Послепрогонная промывка с 0,5% Tween 20 должна быть выполнена для обеспечения надлежащей работы жидкостных систем прибора. Если на этой неделе проводилось секвенирование, то в качестве еженедельной промывки достаточно выполнить обычную послепрогонную промывку, а затем промывку водой (шаг 9.10.). Если прибор не использовался, следует провести ручную послепрогонную промывку с использованием 0,5% Tween 20, а затем промывку водой.

**9.11.2. Ежемесячное обслуживание:**

- 9.11.2.1. Техническая промывка: Выполняется не реже одного раза в месяц. Это серия из 3 промывок (две промывки 0,5 % Tween 20 и промывка водой), требующих долива воды в промывочный лоток после каждого цикла промывки (по 20 минут). Общее время промывки составляет примерно 60 минут.

- 9.11.2.1.1. В разделе "Параметры промывки" выберите "Техническая промывка".

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 19 из 33

- 9.11.2.1.2. Заполните промывочный лоток и бутылку с промывочным буфером 0,5% Tween 20.
- 9.11.2.1.3. После первых двух промывок долейте в резервуары промывочного лотка и бутылки с промывочным буфером воду молекулярного класса.
- 9.11.2.2. Включите цикл питания:
  - 9.11.2.2.1. Выберите пункт меню "Управление прибором" на главном экране, а затем пункт "Выключение".
  - 9.11.2.2.2. Как только прибор выключится (это будет отмечено отчетливым звуком щелчка), дотянитесь до правой стороны прибора и выключите выключатель питания, расположенный рядом со шнуром питания.
  - 9.11.2.2.3. Дайте прибору отключиться не менее 5 минут, а затем снова включите выключатель. Прибор загрузит MCS примерно через 10 минут.
- 9.11.3. Управление дисковым пространством на диске данных (D:):
  - 9.11.3.1. Перед запуском секвенирования MiSeq требуется 100 ГБ свободного дискового пространства на диске D:\. **Данные следует удалять только после завершения переноса/резервного копирования данных и в случае отсутствия необходимости устранения неполадок в данном цикле.** В следующих инструкциях описаны файлы, которые можно удалить, и их местоположение:
    - 9.11.3.1.1. Перейдите в папку Data (D:\ Drive)/Illumina/MiSeqOutput/(папка последнего прогона)/. В этой папке выберите папки "Images" и/или "Thumbnail\_images" и удалите их (рекомендуется для прогонов, возраст которых превышает один месяц).
    - 9.11.3.1.2. Перейдите в папку Data (D:\ Drive)/Illumina/MiSeqAnalysis/. Удалите все папки с прогонами, кроме самой последней папки.
    - 9.11.3.1.3. Опустошите корзину.
    - 9.11.3.1.4. После удаления большого количества данных перезагрузите систему.
      - 9.11.3.1.4.1. На главном экране MCS выберите "Manage Instrument" ("Управление прибором"), затем "Reboot" ("Перезагрузка"). Перезагрузка системы и запуск программного обеспечения MiSeq Control займет около 10 минут.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** При выполнении перезагрузки наличие подключенного внешнего жесткого диска может привести к ошибке при запуске.
  - 9.11.3.2. **Пользователи BaseSpace:** Рекомендуется сохранять дубликат папки запуска локально на приборе в качестве резервной копии. Выполнение следующих действий обеспечит создание папки запуска в файловых папках диска Data, а также ее передачу в BaseSpace:
    - 9.11.3.2.1. На главном экране MCS выберите "Run Options".
    - 9.11.3.2.2. На вкладке "Run Settings" установите флажок "When using BaseSpace, replicate analysis locally on MiSeq".

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

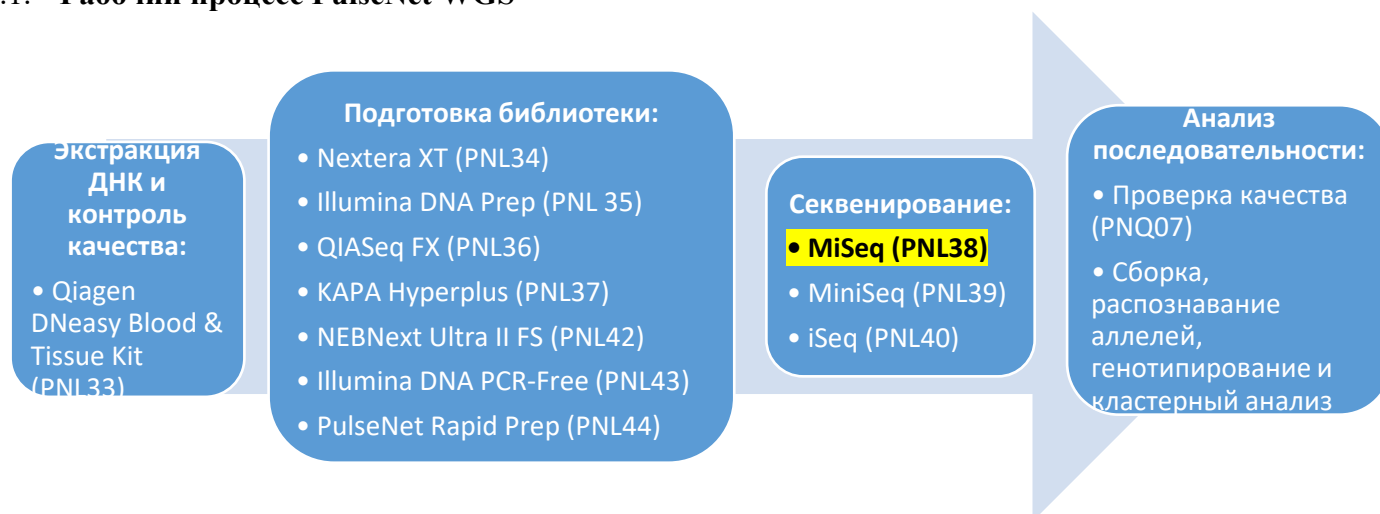
Страница 20 из 33

9.11.3.2.3. Выберите "Сохранить и вернуться", чтобы сохранить изменения и вернуться на главный экран.

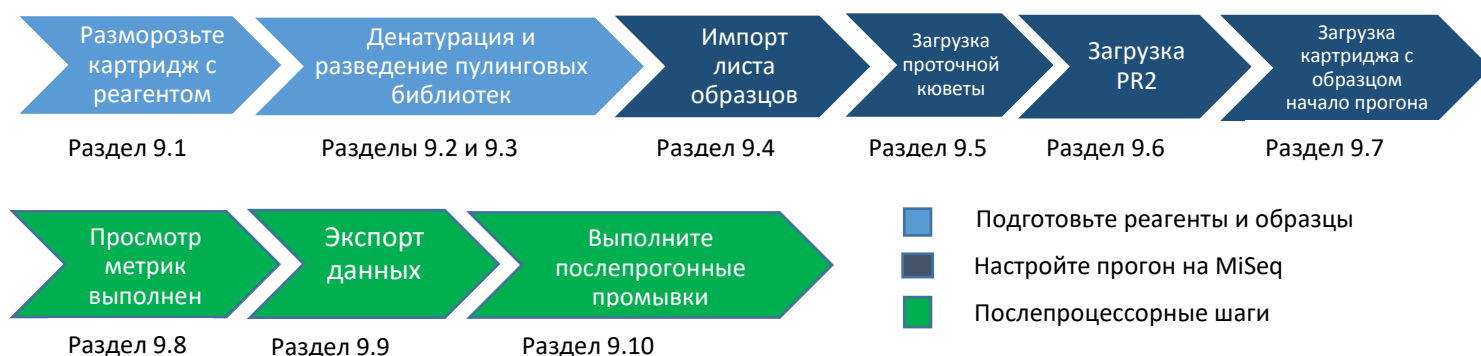
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Эту папку можно удалить, если данные были успешно переданы в BaseSpace и локальное хранение данных не требуется.

## 10. БЛОК-СХЕМЫ:

### 10.1. Рабочий процесс PulseNet WGS



### 10.2. Рабочий процесс секвенирования MiSeq



## 11. СОПУТСТВУЮЩИЕ ДОКУМЕНТЫ:

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО  
СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ**

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 21 из  
33

Номер документа	Название
PNL33	СОП по экстракции ДНК и контролю качества
PNL34	СОП по подготовке библиотек Nextera XT
PNL34.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотеки Nextera XT
PNL35	СОП по подготовке ДНК Illumina
PNL35.W1	Illumina DNA Prep Workbook, 96 CD/UD Indexes, отдельные листы образцов для MiSeq LRM, MiniSeq LRM и iSeq LRM, а также шаблон импорта образцов для NextSeq LRM
PNL35.W3	Контрольный список подготовки ДНК Illumina
PNL36	СОП по подготовке библиотек QIAseq FX
PNL36.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотек QIAseq FX
PNL37	СОП по подготовке библиотек KAPA HyperPlus
PNL37.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотеки KAPA HyperPlus
PNL42	СОП подготовки библиотеки NEB Next Ultra II FS
PNL42.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотеки NEB Next Ultra II FS
PNL43	Illumina DNA PCR-Free Prep SOP
PNL43.W1	Illumina DNA PCR-Free Workbook
PNL43.W2	Контрольный список Illumina DNA PCR-Free
PNL44	PulseNet Rapid Prep SOP
PNL44.W1	PulseNet Rapid Prep Workbook
PNL44.W2	Контрольный список для быстрой подготовки PulseNet
PNQ07	СОП по контролю качества данных последовательностей Illumina

**12. ПОЛЕЗНЫЕ ДОКУМЕНТЫ:**

- 12.1. Illumina, Inc. MiSeq Product Documentation. Instructions for Operating and Maintaining the MiSeq Instrument. (Document # 200046664 v00). November 2023.  
[https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_instruments/miseq/documentation.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html)
- 12.2. Illumina, Inc. Local Run Manager v3 Software Guide (Document # 1000000111492 v01). March 2022. [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software\\_documentation/local-run-manager/local-run-manager-v3-software-guide-1000000111492\\_01.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/local-run-manager/local-run-manager-v3-software-guide-1000000111492_01.pdf)
- 12.3. Illumina, Inc. MiSeq RUO Software System Customer Release Notes (Document Number: 200049209 Rev. 00). Effective Date: 17-NOV-2023.  
[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/downloads/software/miseq/200049209\\_00\\_MiSeq%20RUO%20Software%20System%20v4.1.0%20Customer%20Release%20Notes.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/downloads/software/miseq/200049209_00_MiSeq%20RUO%20Software%20System%20v4.1.0%20Customer%20Release%20Notes.pdf)
- 12.4. Illumina, Inc. MiSeq System Custom Primers Guide (15041638 v01). March 2016.  
<https://emea.support.illumina.com/downloads/miseq-system-custom-primers-guide-15041638.html>

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 22 из 33

- 12.5. Illumina, Inc. Impact of Ammonium Based Cleaning Products on Sequencing Run Performance. November 10, 2021. <https://support.illumina.com/bulletins/2019/09/impact-of-ammonium-based-cleaning-products-on-sequencing-run-per.html>
- 12.6. Illumina, Inc. How to edit a sample sheet and requeue an analysis in BaseSpace Sequence Hub (illumina.com). <https://support.illumina.com/bulletins/2018/03/how-to-edit-a-sample-sheet-and-requeue-a-miseq--hiseq--or-novase.html>
- 12.7. Illumina, Inc. MiSeq System. Denaturate and Dilute Libraries Guide. (Document # 15039740 v10). February 2019. [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system\\_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-10.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-10.pdf)

## 13. КОНТАКТЫ:

- 13.1. Лаборатория PulseNet NGS: [pulsenetngslab@cdc.gov](mailto:pulsenetngslab@cdc.gov)
- 13.2. Техническая поддержка Illumina: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## 14. ПОПРАВКИ:

### 14.1. 01/31/2019:

- Процедуры, относящиеся к настройке прогона на MiSeq, перенесены из PNL32 в отдельный документ (PNL38).

### 14.2. 02/02/2021

- Добавлены дополнительные определения.
- Обновлено каталожные номера реагентов и расходных материалов.
- Добавлена информация о подготовке библиотек NEBNext Ultra II FS и QIAseq FX.
- Добавлен раздел "Review Run Metrics" (9.8.).
- Добавлены диаграммы рабочего процесса.
- Добавлены сопутствующие документы.
- Обновлено ссылки.
- Обновлено инструкции для PhiX.
- Обновлено инструкции к листу образцов MiSeq с добавлением LRM.

### 14.3. 02/01/2023

- Добавлена информация о наборе для подготовки библиотеки DNA PCR-Free Prep.
- Обновлено таблица 1 (оттаивание и хранение картриджа после оттаивания).
- Добавлены дополнительные рисунки для наглядности.
- Добавлена таблица 7 с кратким описанием технического обслуживания прибора.
- Обновлено примечания.
- Обновлено ссылки.
- Прежнее приложение PNL38-2 (Набор листов образцов MiSeq) было разделено на два приложения по типу программного обеспечения: LRM (PNL38-2) и ИЕМ (PNL38-3). Бывшее приложение PNL38-3 (повторная постановка анализа на очередь) теперь является приложением PNL38-4.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО  
СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ**

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 23 из  
33

- Убрано руководство по работе с MiSeq LRM PNL38.JA1. Теперь эта информация включена в приложение PNL38-2.

**14.4. 07/03/2024**

- Удалены версии IEM и LRM ранее 3 из SOP и PNL35.W1. Соответственно, приложение PNL38-3 (инструкции по настройке листа проб в IEM) и инструкции по повторному запросу анализа с помощью MSR в приложении PNL38-4 были удалены. Приложение PNL38-4 (Повторное проведение анализа) стало PNL38-3.

- Добавлена формулировка, подчеркивающая, что концентрацию загрузки следует регулировать только после проверки размера фрагмента библиотеки.

- Добавлены сопутствующие документы PNL44, PNL44.W1 и PNL.W2 (Rapid Library Prep SOP и соответствующие рабочие книги).

- Обновлен каталожный номер устаревшего продукта [DNA PCR-Free Prep Sequencing Primer (cat# 20041496), содержащий только праймерную смесь VP10, снят с производства в октябре 2023 года].

- Удален этап тепловой денатурации из SOP для библиотек Illumina DNA Prep.

- Удалены все ссылки на BioNumerics.

- Обновлена рекомендация готовить свежий 0,5% Tween промывочный буфер ежемесячно или раньше и включать промывку водой после промывки Tween.

- Убрана рекомендация о еженедельной перезагрузке в качестве технического обслуживания

- Скорректирован нижний допустимый порог для CD с рекомендованных Illumina 600 до более реалистичных 800.

- Удалены ссылки на устаревшие ссылки.

<b>СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ</b>			
Док. № PNL38	Вер. № 04	Дата вступления в силу:	Страница 24 из 33

**15. ПОДПИСИ ДЛЯ УТВЕРЖДЕНИЯ:**

Утверждено: \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Персонал PulseNet КК/ОК

Утверждено: \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Руководитель группы реагирования и управления вспышками PulseNet

Утверждено \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Технический руководитель группы PulseNet WGS

Утверждено \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Руководитель группы по надзору за вспышками заболеваний PulseNet

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 25 из 33

## 16. ПРИЛОЖЕНИЯ:

### Приложение PNL38-1

#### Добавление контроля PhiX

##### 1. Назначение

PhiX представляет собой сбалансированный геном бактериофага размером 500 п.н. и рекомендуется компанией Illumina в качестве инструментального контроля, который может помочь определить, насколько хорошо работает прибор для секвенирования. Рекомендуется проводить прогон PhiX после обслуживания или ремонта прибора.

##### 2. Процедура

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** По данным компании Illumina, разведения PhiX 12,5 пМ и 20 пМ дают оптимальную плотность кластеров для реагентов v2 и v3 соответственно.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Если вы используете ранее приготовленное денатурированное разведение PhiX, перейдите к шагу 2.7.

- 2.1. Приготовьте 0,2 N NaOH, добавив 400 мкл воды молекулярного класса к 100 мкл аликвоты 1 N NaOH и поместите на лед до готовности к использованию.
- 2.2. Объедините 1 мкл 10 нМ библиотеки PhiX из запаса и 4 мкл RSB (или разбавителя, например, EBТ, Tris-HCl, который используется в вашем наборе для подготовки библиотек для нормализации библиотек/пула библиотек), чтобы получить 2 нМ библиотеки PhiX в новой микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл.
- 2.3. Соедините 5 мкл 2 нМ библиотеки PhiX и 5 мкл 0,2 N NaOH и хорошо перемешайте.
- 2.4. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре, чтобы денатурировать библиотеку PhiX в отдельные нити.
- 2.5. **НЕЗАМЕДЛИТЕЛЬНО** добавьте 490 мкл предварительно охлажденного HT1 в пробирку с 10 мкл денатурированной 1 нМ библиотеки PhiX после инкубации, чтобы получить 20 пМ денатурированной библиотеки PhiX.
- 2.6. Наклейте этикетку, поставьте дату и инициалы на микроцентрифужной пробирке. Денатурированные 20 пМ библиотеки PhiX могут храниться до трех недель при температуре от -15°C до -25°C.
- 2.7. При использовании реагентов для секвенирования v2 разбавьте денатурированную библиотеку PhiX 20 пМ до 12,5 пМ, добавив 62,5 мкл денатурированной библиотеки PhiX 20 пМ к 37,5 мкл предварительно охлажденного HT1.
- 2.8. Определите процентное содержание PhiX (N%) для добавления в прогон. Общие рекомендации см. ниже:
  - При возникновении проблем с подготовкой библиотеки: 1-10%.
  - При устранении неполадок в работе прибора MiSeq: 5% или выше (в зависимости от рекомендаций техподдержки Illumina).
  - При регулярном использовании PhiX в каждом цикле: 1% рекомендуется.
  - При загрузке библиотек с низким разнообразием образцов или при использовании ампликонов: 5-10%.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 26 из 33

2.9. Объедините N x 10 мкл 12,5 пМ (или 20 пМ) PhiX с 1000 - (N x 10) мкл библиотеки образцов нужной концентрации.

- Например: для добавления 1% PhiX добавьте 10 мкл 12,5 пМ PhiX к 990 мкл денатурированной 10-20 пМ библиотеки образцов.

2.10. Поместите на лед до тех пор, пока не будете готовы приступить к тепловой денатурации библиотеки образцов (см. раздел 9.3.4.) и добавлению PhiX.

### 3. Ожидаемые результаты PhiX

3.1. Показатель "Выровнено (%)" в SAV/BaseSpace по завершении цикла должен соответствовать процентному содержанию PhiX, добавленного в цикл. Если это не так, это может свидетельствовать о проблемах с прибором или библиотекой.

3.1.1. Библиотеки, размер которых меньше размера библиотеки PhiX (500 п.н.), будут конкурировать с PhiX, что приведет к снижению процента выравнивания.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Библиотеки с низким содержанием GC, такие как *Samruloacter*, склонны к избыточной тагментации, особенно при использовании прена Nextera XT, что приводит к образованию более коротких фрагментов.

3.1.2. Библиотеки, размер которых превышает PhiX, приведут к большему проценту выравнивания PhiX по сравнению с тем, что было добавлено.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Библиотеки с высоким содержанием ГЦК, такие как *Mycobacterium tuberculosis*, склонны к недостаточной таргетности, особенно при использовании прена Nextera XT, что приводит к образованию более крупных фрагментов.

3.2. При необходимости обратитесь в службу технической поддержки Illumina и по адресу [pulsenetngslab@cdc.gov](mailto:pulsenetngslab@cdc.gov) за помощью в устранении неполадок.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 27 из 33

## Приложение PNL38-2

### Настройка листа образцов MiSeq с помощью LRM

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Лист образцов MiSeq можно настроить либо путем импорта вкладки *SampleSheet* из рабочей книги подготовки библиотеки (раздел 1), либо путем ввода информации вручную (раздел 2).

#### 1. Создание и импорт листа образцов из рабочей книги PulseNet

1.1. Убедитесь, что вкладка Initial Dilution (Nextera XT) или вкладка Library Prep (DNA Prep) заполнены правильно. Эти вкладки автоматически заполняют листы образцов необходимой информацией. Проверьте каждое поле на вкладке Sample Sheet, чтобы убедиться, что все данные были точно заполнены на основе вкладки Initial Dilution (Nextera XT) или Library Prep (Illumina DNA Prep). Поля Description и Sample\_Project могут быть пустыми.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Последовательности индексов автоматически заполняются с вкладки *Indices*. Не изменяйте и не удаляйте эту вкладку.

1.2. Преобразуйте соответствующую вкладку Sample Sheet в файл .csv (либо сохранив как, либо экспортировав как файл .csv с разделителями-запятыми).

1.2.1. Чтобы сохранить файл в формате .csv:

1.2.1.1. Откройте пункт меню "Файл" и выберите "Сохранить как".

1.2.1.2. Измените "Сохранить как тип:" на "CSV (с разделителями-запятыми)".

1.2.1.3. Перейдите в нужную папку и сохраните файл, используя идентификатор пластины в качестве имени файла (например, LabID-MXXXX-YYMMDD).

1.2.1.4. Нажмите "ОК", чтобы сохранить только активный лист, и "Yes" в следующем окне, чтобы продолжить использование формата CSV.

#### **ИЛИ**

1.2.2. Чтобы экспортировать в формат .csv:

1.2.2.1. Откройте меню "Файл" и выберите "Экспорт".

1.2.2.2. Выберите "Изменить тип файла".

1.2.2.3. Выберите "CSV (с разделителями-запятыми)".

1.2.2.4. Сохраните и выберите "ОК", чтобы сохранить только активный лист.

1.3. Откройте CSV-файл в WordPad или NotePad и удалите все запятые, указанные после последнего образца. См. рис. 6 ниже.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Это необходимо сделать, чтобы избежать ошибок при импорте листа с образцами.



# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 29 из 33

Убедитесь, что запятые в экспортированном листе образцов были удалены (шаг 1.3).

	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	PLATE *	INDEX WELL *	INDEX 1 (I7)	INDEX 2 (I5)	SAMPLE PROJECT	
1	DS460-M347-24-001		A	A01	UDP0001	UDP0001		✘
2	03-98-M347-24-001		A	B01	UDP0002	UDP0002		✘

Рисунок 8. Снимок экрана LRM с правильно заполненными параметрами для запуска Illumina DNA Prep 300c.

Рисунок 9. Снимок экрана менеджера локальных запусков с типом набора Library Prep, установленным по умолчанию на "Custom".

1.4.6. Убедившись, что все параметры прогона и информация об образцах верны, а **функция Adapter Trimming переключена в положение on**, выберите "Save Run". Теперь прогон будет отображаться на главной странице LRM.

# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 04

Дата вступления в силу:

Страница 30 из 33

1.4.7. Закройте Chromium. Теперь прогон будет сохранен в LRM и отобразится на главной странице программы MiSeq Control Software для секвенирования.

## 2. Ручной ввод информации о прогоне в LRM:

2.1. На приборе MiSeq откройте Chromium.

2.2. На главной странице LRM выберите "Создать прогон", чтобы задать параметры прогона.

2.3. Выберите модуль анализа "GenerateFASTQ".

2.4. Введите информацию о прогоне вручную:

2.4.1. Имя прогона: введите идентификатор пластины (например, LabID-MXXXX-YYMMDD).

2.4.2. Описание прогона.

2.4.3. Настройки прогона:

2.4.3.1. Library Prep Kit: выберите соответствующий набор в раскрывающемся списке.

2.4.3.2. Тип считывания: выберите "Парный конец".

2.4.3.3. Индексные считывания: выберите "2".

2.4.3.4. Длительность считывания: введите желаемое количество циклов, в зависимости от набора.

2.4.3.4.1. Для 500 циклов введите "251" для READ 1 и READ 2.

2.4.3.4.2. Для 300 циклов введите "151" для READ 1 и READ 2.

2.4.3.5. **При секвенировании библиотек Illumina DNA PCR-Free:**

Пользовательские праймеры: "CustomRead1PrimerMix (C1)".

2.4.4. **Обрезка адаптера:** убедитесь, что флажок **установлен в положение "Вкл."**.

2.4.5. Введите информацию об образце, включая идентификатор образца и используемые индексы.

2.5. Выберите "Сохранить прогон". Теперь прогон будет отображаться на главной странице LRM.

2.6. Закройте программу Chromium.

<b>СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦЕЛЫХ ГЕНОМОВ НА ПРИБОРЕ MISEQ</b>			
Док. № PNL38	Вер. № 02	Дата вступления в силу:	Страница 31 из 33

### Приложение PNL38-3

#### Запрос прогона для анализа

#### 1. Цель

Повторный запуск может потребоваться, если была обнаружена ошибка индексации или именования образца (т. е. присвоение индекса в листе образца не является точным). Перед тем как повторно запустить анализ, подготовьте исправленный лист с образцами. Он будет использоваться прибором для нового анализа, повторного разбора данных и переименования соответствующих файлов fastq. Повторный запуск анализа может быть выполнен либо с помощью LRM (раздел 2.1.), либо с помощью BaseSpace (раздел 2.2.).

#### 2. Процедура

##### 2.1. Повтор прогона с помощью LRM и MCS версии 3.0 или более поздней

- 2.1.1. Откройте Chromium для входа в LRM.
- 2.1.2. Найдите прогон, который необходимо повторить.
- 2.1.3. Нажмите "Действия".
- 2.1.4. Нажмите "Перезагрузить".
- 2.1.5. Выберите "Редактировать настройку", когда программа предложит это сделать.
- 2.1.6. Импортируйте новый лист с образцами и продолжите работу.
- 2.1.7. Повторно проанализированные данные (т. е. файлы fastq) будут сохранены в папке "Alignment\_2" в папках анализа и вывода прогона.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Если прогон был случайно завершен с набором для подготовки библиотек, указанным как "Custom/Пользовательский", индексы и обрезку адаптеров нельзя будет отредактировать с помощью функции "requeue" для анализа, как описано выше. Вместо этого создайте новый прогон в LRM (рекомендуется использовать тот же идентификатор прогона, что и для прогона, требующего повторной обработки, с приставкой "v2" в конце) и импортируйте исправленный лист образцов (с новым идентификатором прогона "v2"). После настройки прогона в LRM щелкните правой кнопкой мыши и выберите "Импорт" на главном экране LRM (рис. 10). Скопируйте каталог файлов прогона, который необходимо повторно проанализировать, в диалоговое окно (рис. 11); убедитесь, что выходная папка указана правильно, и выберите "Import Run". В результате будут получены правильно демультиплексированные и обрезанные по адаптерам fastq-файлы.

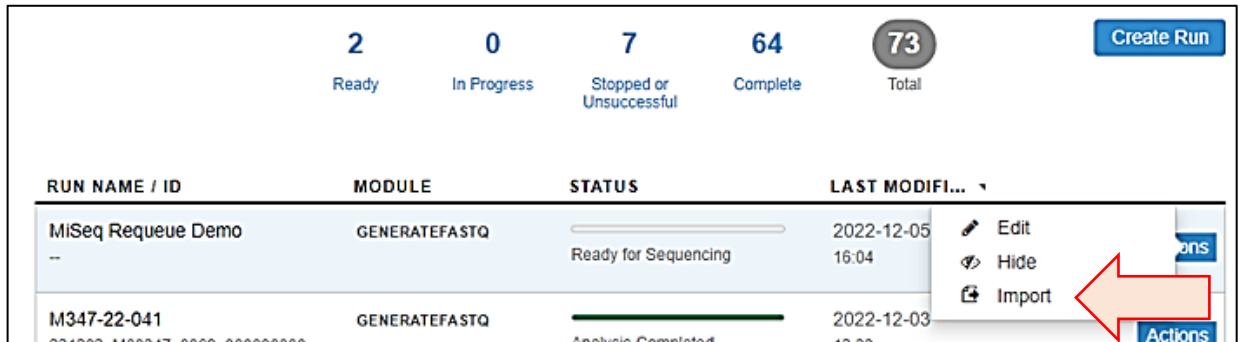
# СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦЕЛЫХ ГЕНОМОВ НА ПРИБОРЕ MISEQ

Док. № PNL38

Вер. № 02

Дата вступления в силу:

Страница 32 из 33



RUN NAME / ID	MODULE	STATUS	LAST MODIFI...	
MiSeq Requeue Demo	GENERATEFASTQ	Ready for Sequencing	2022-12-05 16:04	Edit, Hide, Import
M347-22-041	GENERATEFASTQ	Analysis Completed	2022-12-03 12:00	

Рисунок 10. Выпадающее меню для выбора пункта "Импорт" при ручном повторном анализе данных прогона.

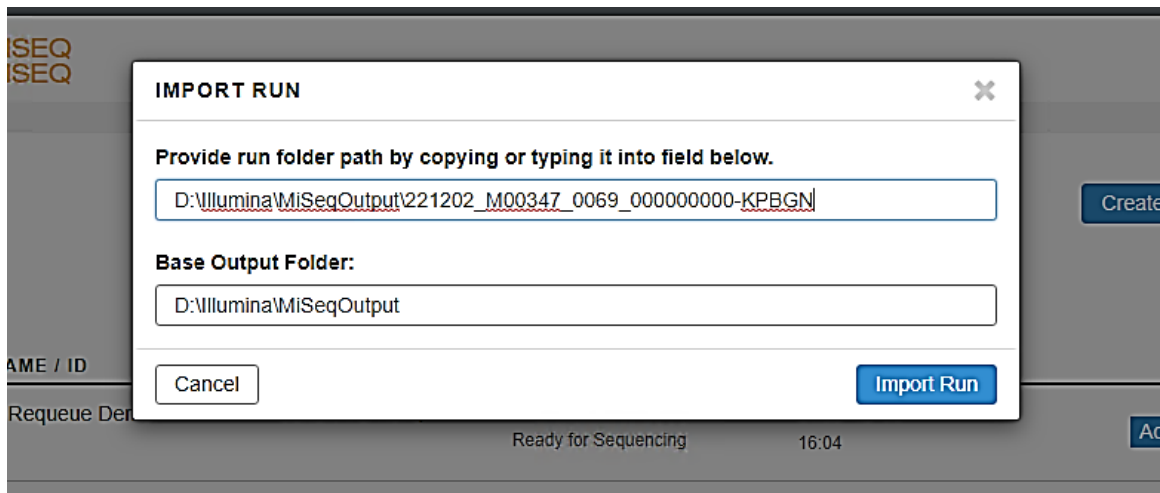


Рисунок 11. Выбор прогона для повторного анализа и выходной папки во всплывающем окне "Import run".

## 2.2. Перезапуск прогона с помощью BaseSpace Sequence Hub

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Чтобы повторно назначить анализ в BaseSpace, вы должны быть владельцем прогона. Общий прогон не дает прав на повторное проведение анализа.

Кроме того, в **BaseSpace Sequence Hub повторный анализ может быть представлен не более пяти раз**. Если требуется помощь с дополнительными повторами, напишите в службу технической поддержки Illumina и будьте готовы предоставить идентификатор прогона и лист с образцами.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** LRM и BaseSpace запрашивают новый лист образца независимо друг от друга. Если новый лист образца запрашивается в LRM, это не приведет к обновлению информации в BaseSpace.

**ПРИМЕЧАНИЕ3:** Следуйте общим инструкциям по запросу в BaseSpace на веб-сайте Illumina: [https://knowledge.illumina.com/software/cloud-software/software-cloud-software-reference\\_material-list/000001321](https://knowledge.illumina.com/software/cloud-software/software-cloud-software-reference_material-list/000001321).



<b>СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦЕЛЫХ ГЕНОМОВ НА ПРИБОРЕ MISEQ</b>			
<b>Док. № PNL38</b>	<b>Вер. № 02</b>	<b>Дата вступления в силу:</b>	<b>Страница 34 из 34</b>

лист для повторного прогона.

- 2.2.5. Скопируйте и вставьте из текстового редактора исправленный лист с образцами и нажмите на кнопку "Queue Analysis" (рис. 13).
- 2.2.6. Статус на вкладке "Сводка" прогона будет отображать "Анализируется" во время процесса повторного анализа и "Завершено" по его окончании.