

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
1 з 32

1. **Мета:** Дана СОП описує стандартизований лабораторний протокол для повногеномного секвенування бактеріальних організмів на приладі MiSeq, включаючи вимоги до приладу та його обслуговування.
2. **СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ:** Цей документ застосовується до всіх лабораторій, сертифікованих мережею PulseNet WGS, які виконують повногеномне секвенування кишкових бактерій з використанням платформи Illumina MiSeq і бібліотек, створених за допомогою наборів для підготовки бібліотек, прийнятих PulseNet (Таблиця 2) для подання даних про послідовності до PulseNet. Лабораторії-учасниці мережі PulseNet можуть вносити зміни в цю процедуру за необхідності для використання в своїх лабораторіях після валідації згідно з настановами своєї лабораторії.
3. **ВИЗНАЧЕННЯ**
 - 3.1. **BaseSpace:** Хмарне обчислювальне середовище Illumina для аналізу, управління та зберігання даних секвенування наступного покоління, включаючи обмін даними.
 - 3.2. **CD:** щільність кластерів; вказує на кількість кластерів, які генеруються на одиницю площі поверхні проточної кювети на етапі генерації кластерів.
 - 3.3. **CDC:** Центри з контролю та профілактики захворювань США.
 - 3.4. **CPF:** Clusters Passing Filter; відсоток згенерованих кластерів, які пройшли процедуру внутрішньої якісної фільтрації.
 - 3.5. **CSV:** Значення, розділені комами (файл) або розділені комами (файл).
 - 3.6. **ДНК:** Дезоксирибонуклеїнова кислота.
 - 3.7. **dsDNA:** дволанцюгова ДНК/
 - 3.8. **EBT:** Буфер для елюювання з твіном.
 - 3.9. **Fastq:** текстовий формат файлу для зберігання послідовності та відповідних оцінок якості.
 - 3.10. **ГБ:** Гігабайт.
 - 3.11. **GHS:** Гармонізована на глобальному рівні система.
 - 3.12. **HT1:** Буфер для гібридизації.
 - 3.13. **LRM:** Локальний менеджер запуску.
 - 3.14. **MCS:** Програмне забезпечення для керування MiSeq.
 - 3.15. **NaOCl:** Гіпохлорит натрію.
 - 3.16. **NaOH:** Гідроксид натрію.
 - 3.17. **nM:** наномолярний.
 - 3.18. **PhiX:** контрольна бібліотека, отримана з добре охарактеризованого геному бактеріофага. Має середній розмір 500 б.п. та збалансований склад.
 - 3.19. **PHL:** Лабораторія громадського здоров'я.
 - 3.20. **pM:** Пікомольяр.
 - 3.21. **PN:** PulseNet.
 - 3.22. **ЗІЗ:** Засоби індивідуального захисту.
 - 3.23. **PR2:** Буфер включення.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
2 з 32

- 3.24. **PulseNet Central:** Команда PulseNet в CDC, що складається з Групи реагування та управління спалахами PulseNet (PulseNet@cdc.gov) та Основної лабораторної діяльності WGS (PulseNetNGSlab@cdc.gov).
- 3.25. **PulseNet/OutbreakNet SharePoint:** Закритий веб-додаток для спільної роботи, що використовується для спілкування між учасниками мережі PulseNet.
- 3.26. **Q30:** Відсоток зчитувань за весь цикл, які мають оцінку Q >30.0.
- 3.27. **КЯ:** Контроль якості.
- 3.28. **Q Score:** Оцінка якості послідовності для кожної окремої позиції основи в послідовності, що вказує на точність розпізнавання нуклеотидних основ. Використовуються оцінки Phred, де $Q = -10\log(\text{ймовірність помилки})$. Чим вищий показник якості, тим достовірнішим є показник розпізнавання. Q30 означає, що ймовірність неправильного розпізнавання в цій позиції становить 1 до 1000.
- 3.29. **RFID:** радіочастотна ідентифікація.
- 3.30. **RSB:** Буфер для ресуспендування.
- 3.31. **SAV:** Sequencing Analysis Viewer - прикладне програмне забезпечення, яке дозволяє в режимі реального часу переглядати показники якості, що генеруються програмним забезпеченням для аналізу в реальному часі (RTA) на системах секвенування Illumina.
- 3.32. **SDS:** Паспорт безпеки.
- 3.33. **СОП:** Стандартна операційна процедура.
- 3.34. **Tris-HCl:** Трис-гідрохлорид/
- 3.35. **ДБЖ:** Джерело безперебійного живлення/
- 3.36. **VP10:** Праймер Custom Read 1 для секвенування бібліотек Illumina DNA PCR-Free Prep.
- 3.37. **ПГС:** Повногеномне секвенування.

4. ОБОВ'ЯЗКИ

4.1. Лабораторії громадського здоров'я PulseNet:

- 4.1.1. Виділення послідовностей та перевірка якості циклу секвенування і подальших даних про послідовності.
- 4.1.2. Пересіювання всіх ізолятів, які не відповідають пороговим значенням якості.
- 4.1.3. За необхідності інформування команди PulseNet Central про будь-які ускладнення з лабораторними протоколами або підозри на проблеми з інструментами чи реагентами.

4.2. Команда PulseNet Central:

- 4.2.1. Виконання додаткового аналізу якості послідовності, щоб забезпечити зворотній зв'язок і підтримку в усуненні несправностей для ЛГЗ, якщо це необхідно.
- 4.2.2. Інформування ЛГЗ мережі PN, якщо якісь із поданих послідовностей не відповідають пороговим значенням по якості.
- 4.2.3. За необхідності інформування ЛГЗ про будь-які підозри щодо проблем з реагентами.
- 4.2.4. Регулярна підтримка та перегляд СОПів із їх розміщенням на SharePoint.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. №. PNL Doc. 38

Вер. №. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
3 з 32

5. БЕЗПЕКА

- 5.1. **Попередження з біобезпеки:** Цей документ описує поводження з ДНК та пов'язаними з нею продуктами і не описує найкращі практики поводження з біологічними інфекційними матеріалами.
- 5.2. **Попередження щодо хімічної безпеки:** Під час роботи з потенційно небезпечними хімічними речовинами вживайте належних заходів обережності та використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту. Переконайтеся, що хімікати, використані контейнери та невикористаний вміст утилізуються відповідно до місцевих та державних стандартів безпеки. **Додаткову інформацію див. у відповідних паспортах безпеки.**
 - 5.2.1. Картриджі з реактивами MiSeq містять формамід (категорія 1B за класифікацією GHS щодо репродуктивної токсичності), аліфатичний амід, який є потенційним токсином для репродуктивної системи. При його вдиханні, ковтанні, контакті зі шкірою та очима можуть виникати травми та ураження.
 - 5.2.2. Буфер PR2 не слід викидати в каналізацію (категорія 1 за GHS для шкірної сенсibilізації).
 - 5.2.3. Етанол є легкозаймистим (категорія горючості GHS 2).
 - 5.2.4. Гідроксид натрію є корозійно небезпечним (категорія 1A і 1 за GHS, категорія 3 за GHS за гострою небезпекою для водного середовища).

6. РЕАКТИВИ

- 6.1. Варіанти наборів реактивів MiSeq:
 - v2 Nano, 300 циклів - Illumina, кат. № MS-103-1001
 - v2 Nano, 500 циклів - Illumina, кат. № MS-103-1003
 - v2 Micro, 300 циклів - Illumina, кат. № MS-103-1002
 - v2 300 циклів - Illumina, кат. № MS-102-2002 (один), MS-102-2022 (20 упаковок)
 - v2 500 циклів - Illumina, кат. № MS-102-2003 (один), MS-102-2023 (20 упаковок)
 - v3 600 циклів - Illumina, кат. № MS-102-3003

ПРИМІТКА: *PulseNet* за жодних обставин не приймає секвенування хімічних речовин, що мають менше 300 циклів.

- 6.1.1. Коробка 1 з 2. Зберігати при температурі від -15°C до -25°C, в захищеному від світла місці.
 - Картридж MiSeq (див. розділ 5.2.1 для отримання інформації про хімічну безпеку).
 - Буфер для гібридизації (HT1).
- 6.1.2. Коробка 2 з 2. Зберігати при температурі 2-8°C.
 - Буфер для інкорпорації (PR2, див. 5.2.2 для інформації про хімічну безпеку).
 - Проточна комірка.
- 6.2. Етанол, молекулярний, 95-100% (Fisher Scientific, кат. № BP2818-500 або еквівалент).
- 6.3. Етанол, лабораторний, 70% або еквівалент для дезінфекції (Fisher Scientific, кат. № 04-355-309 або еквівалент).
- 6.4. Вода, молекулярна (Fisher Scientific, кат. № BP24701 або еквівалент).
- 6.5. Гіпохлорит натрію, лабораторний, 4 - 8,25% (Fisher Scientific кат. № SS290-1 або еквівалент).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. №. PNL Doc. 38

Вер. №. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
4 з 32

ПРИМІТКА: *Рекомендується використовувати лабораторний гіпохлорит натрію, оскільки гіпохлорит натрію, що продається без рецепта, може містити домішки, які можуть впливати на рідинні властивості приладу.*

- 6.6. Гідроксид натрію, придатний для культури клітин, 1N (Millipore Sigma, кат. № S2770-100ML або еквівалент), рН має бути $\geq 12,5$.

ПРИМІТКА: *Рекомендується використовувати рідину замість порошку. Також рекомендується аліквотувати та заморожувати в одноразових аліквотах по 100 мкл.*

- 6.7. Tween 20, молекулярний, (Millipore Sigma, кат. № P9416-50ML або еквівалент)
- 6.8. **НЕОБОВ'ЯЗКОВО:** 10нМ PhiX Control Kit v3 (Illumina, кат. № FC-110-3001). Зберігати при температурі від -25°C до -15°C .
- 6.9. **При секвенуванні бібліотек Illumina DNA PCR-Free Prep:** Illumina DNA PCR-Free Prep Sequencing and Indexing Primer (Illumina, кат. No. 20041797, 2 x 7,5 мл праймеру V10 Read 1, 2 x 7,5 мл праймеру V14 Read 2). **ПРИМІТКА:** *праймер V14 Read 2 не використовується для цієї процедури.*

7. ЗАСОБИ ПОСТАЧАННЯ

- 7.1. Лід.
- 7.2. Лоток для промивання Illumina MiSeq (n=2, один для промивання хлорним вапном, інший - тільки для водного промивання).
- 7.3. Безворсові серветки (Fisher Scientific, кат. № 06-666 або еквівалент).
- 7.4. Папір для об'єктива (Fisher Scientific, кат. № 11-996 або еквівалент).
- 7.5. Одноразова пробірка для промивання MiSeq (Illumina, артикул MS-102-9999).
- 7.6. Буферна пляшка для промивання MiSeq, контейнер Nalgene, 500 мл (n=2, для 0,5% Tween 20 і молекулярної води, Fisher Scientific, кат. № 15-350-205 або еквівалент).
АЛЬТЕРНАТИВА: можна використовувати використані та промиті пляшки PR2.
- 7.7. Плівка Microseal B (BioRad, кат. № MSB-1001).
- 7.8. Мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл (Fisher Scientific, кат. № 05-408-129 або еквівалент)
- 7.9. Стерильні наконечники для піпеток, відфільтровані: 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл та 1000 мкл збільшеної довжини (Rainin, кат. №№ 30389225, 30389239, 30389212 та 30389223 або еквівалент).
- 7.10. Пляшка для промивання з насадкою (x3, по одній для 0,5% Tween 20, 100% етанолу та молекулярної води (Fisher Scientific, кат. № FB0340922D або еквівалент)).

8. ОБЛАДНАННЯ

- 8.1. Настільний секвенсор MiSeq.
- 8.2. Мікропіпетки об'ємом від 1 мкл до 1000 мкл.
- 8.3. Блок нагрівання (тільки для бібліотек Nextera XT, KAPA HyperPlus, QiaSeq FX та NEB Ultra II FS).
- 8.4. Відра для льоду.
- 8.5. Мікроцентрифуга.
- 8.6. Мікропланшетна центрифуга або еквівалент.
- 8.7. **НЕОБОВ'ЯЗКОВО:** резервне ДБЖ для MiSeq (рекомендується: Staples, Cyberpower AVR Series Line Interactive 1.5 кВА ДБЖ, код CP1500AVRLCD).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
5 з 32

- 8.8. **НЕОБОВ'ЯЗКОВО:** Зовнішній зашифрований жорсткий диск або сервер для передачі та зберігання даних, якщо BaseSpace або мережеве підключення приладу недоступні (рекомендовано: CDW, DataLocker H350 Basic Hard Drive 1 TB USB 3.0, кат. № 4075102)

9. ПРОЦЕДУРА

ПРИМІТКА: *Задokumentовано, що використання миючих засобів на основі амонію поблизу обладнання для секвенування, включаючи лабораторні столи та піпетки, які використовуються для підготовки бібліотеки, може негативно вплинути на щільність кластерів. Не використовуйте сполуки четвертинного амонію або серветки поблизу обладнання для секвенування або на ньому!*

9.1. Підготуйте картридж з реактивами для MiSeq

- 9.1.1. Заплануйте достатньо часу для розморожування реагентів для секвенування (картридж для секвенування, буфер HT1) і праймера V10 (якщо ви секвенуєте бібліотеки Illumina DNA PCR-Free Prep). Буфер HT1 і праймер VP10 можна розморожувати на льоду або при 2-8°C. Вказівки щодо часу, способу та умов зберігання картриджів для секвенування див. у Таблиці 1:

Спосіб розморожування	Час, необхідний для відтаювання	Термін зберігання розмороженого картриджа (2 - 8°C або на льоду)	Після розморожування картридж не можна повторно заморозувати
Водяна баня кімнатної температури (відкрита)	~ 1 година	24 години ¹	
2 - 8°C (невідкритий)	8-12 годин	7 днів	

Таблиця 1. Вказівки щодо розморожування та зберігання наборів реагентів після розморожування.
¹Рекомендація Illumina - 6 год.

- 9.1.2. Після розморожування переверніть картридж з реактивами 10 разів для перемішування, а потім візуально перевірте, щоб переконатися, що всі позиції повністю розморожені і не містять осаду.
- 9.1.3. Обережно постукайте картриджем по столу, щоб зменшити кількість повітряних бульбашок на дні лунок для реагентів і переконатися, що фольговані ущільнювачі, які закривають лунки, не заважають.
- 9.1.4. Помістіть розморожений картридж з реактивами і HT1 на лід або відкладіть при температурі 2 - 8°C, поки зразок не буде готовий до завантаження.

9.2. Хімічна денатурація ДНК об'єднаної бібліотеки

ПРИМІТКА: *Зверніться до доступних СОПів підготовки бібліотек PulseNet для різних варіантів наборів при підготовці та об'єднанні бібліотек. У разі використання*

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
6 з 32

контрольного списку підготовки ДНК (PNL35.W3) об'єднання, денатурація, розведення та завантаження приладу наведені в пунктах 80-94.

- 9.2.1. **Тільки для бібліотек Nextera XT, KAPA HyperPlus, QiaSeq FX і NEB Ultra II FS:** Попередньо нагрійте термоблок до $96^{\circ}\text{C} \pm 1$.
- 9.2.2. Дістаньте об'єднані планшети/пробірки бібліотеки і, якщо вони були заморожені, розморозьте на льоду. Центрифугуйте при 800 - 1200 об/хв (або 280 x g) протягом 1 хвилини.
- 9.2.3. Дістаньте аліквоту 100 мкл 1 N NaOH з морозильної камери і розморозьте на льоду.
- 9.2.4. Розведіть до 0,2 N, додавши 400 мкл молекулярної води до 100 мкл аліквоти 1 N NaOH. Кілька разів переверніть пробірку для перемішування.
ПРИМІТКА: Свіжорозведений NaOH слід використовувати протягом 6 годин після розведення.
- 9.2.5. Змішайте 5 мкл об'єднаної бібліотеки зразків і 5 мкл 0,2 N NaOH в новій мікроцентрифужній пробірці на 1,5 мл (тепер з концентрацією 1 або 2 нМ).
- 9.2.6. Інкубуйте 5 хвилин при кімнатній температурі для денатурації dsDNA.
- 9.2.7. Після інкубації **НЕГАЙНО** додайте 990 мкл попередньо охолодженого HT1 в пробірку, що містить 10 мкл денатурованої об'єднаної бібліотеки. Початкову та денатуровану концентрацію бібліотеки наведено в таблиці 2.

Набір для підготовки бібліотеки	Початкова концентрація бібліотеки	Концентрація денатурованої бібліотеки після додавання 990 мкл HT1
Nextera XT, NEB Ultra II FS, QIAseq FX та KAPA HyperPlus	2 нМ	10 пМ
Illumina DNA Prep, PulseNet Rapid Prep, Nextera XT, NEB Ultra II FS, QIAseq FX та KAPA HyperPlus	4 нМ	20 пМ
Illumina DNA PCR-Free	2 нМ	20 пМ

Таблиця 2. Концентрації для початкового пулу бібліотек та денатурованого пулу для валідованих бібліотечних препаратів PulseNet

9.3. Розведення до бажаної кінцевої концентрації завантаження та термічна денатурація об'єднаної бібліотеки ДНК

- 9.3.1. Визначте бажану кінцеву концентрацію завантаження, виходячи з типу підготовки бібліотеки та набору для секвенування, який буде використано. Див. таблицю 3 нижче для отримання рекомендацій.

ПРИМІТКА: Кінцева концентрація завантаження може також залежати від конкретного інструменту та/або користувача і може бути скоригована вище або

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
7 з 32

нижче рекомендованих концентрацій у Таблиці 3 для досягнення оптимальної щільності кластерів (CD). Однак концентрацію завантаження слід коригувати **лише** після перевірки точності розрахунку молярності шляхом визначення середнього розміру фрагментів бібліотечного пулу за допомогою фрагментного аналізу. Якщо середній розмір фрагмента значно відрізняється від значення за замовчуванням 1000 п.н., яке використовується при розрахунку молярності, це призведе до того, що CD вийде за межі заданого діапазону. У такому випадку коригування розрахунку молярності на основі спостережуваного розміру фрагмента та/або виправлення помилок у підготовці бібліотеки, що призвели до аберантного розміру фрагмента, слід робити ДО коригування концентрації завантаження.

Набір для підготовки бібліотеки	Рекомендована кінцева концентрація завантаження	
	v2 (цільовий CD 800-1200 К/мм ²)	v3 (цільовий CD 1200-1400 К/мм ²)
Nextera XT	10 пМ	15 пМ
Illumina DNA Prep	12 пМ	15 пМ
NEB Ultra II FS & KAPA HyperPlus	10 пМ	ND ¹
QIAseq FX	8 пМ	ND ⁽¹⁾
Illumina DNA PCR-Free, PulseNet Rapid Prep	12 пМ	ND ⁽¹⁾

Таблиця 3. Рекомендовані концентрації завантаження для різних наборів для приготування бібліотек. ¹Не визначено.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38	Вер. No. 04	Дата набуття чинності:	Сторінка 8 з 32
----------------------	-------------	------------------------	--------------------

9.3.2. Зверніться до таблиці 4 нижче, щоб отримати кінцеву концентрацію завантаження об'єднаної бібліотеки і розбавити її відповідно:

Кінцева концентрація завантаження	Концентрація денатурованого пулу = 10 пМ		Концентрація денатурованого пулу = 20 пМ	
	Необхідний об'єм НТ1	Необхідний об'єм денатурованого пулу	Необхідний об'єм НТ1	Необхідний об'єм денатурованого пулу
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

Таблиця 4. Необхідні об'єми пулу та НТ1 для розведення до бажаної кінцевої концентрації.

9.3.3. Ретельно перемішайте розведені бібліотеки.

НЕОБОВ'ЯЗКОВО: На цьому етапі можна додати контроль *PhiX*. Інструкції та додаткову інформацію див. у Додатку PNL38-1.

9.3.4. **Тільки для бібліотек Nextera XT, KAPA HyperPlus, QiaSeq FX та NEB Ultra II FS:** Нагрійте денатурований, розведений пул бібліотек до $96 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 2 хвилин у термоблоці, щоб забезпечити повну денатурацію.

9.3.5. Помістіть пул бібліотеки на лід. Термічно оброблені пули бібліотек необхідно охолодити на льоду одразу після термічної обробки протягом щонайменше 5 хвилин перед завантаженням.

ПРИМІТКА: Бібліотека ДНК може зберігатися на льоду або при температурі $2-8^\circ\text{C}$ до готовності до завантаження (< 30 хвилин). Якщо до початку циклу пройшло більше 30 хвилин, може знадобитися повторна денатурація і розведення пулу.

9.4. Підготовка приладу MiSeq до виконання циклу

9.4.1. Перед налаштуванням циклу переконайтеся, що на приладі достатньо вільного місця на диску (100 ГБ). Якщо доступно менше 100 ГБ, див. Розділ 9.11.3. для отримання інструкцій щодо видалення файлів перед завантаженням приладу і запуском циклу.

9.4.2. Переконайтеся, що налаштування аркуша для зразків (і планшета для зразків, якщо застосовно) завершено в локальному менеджері циклів (LRM) на приладі. Інструкції див. у Додатку PNL38-2.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
9 з 32

ПРИМІТКА: Робочі книги містять окремі вкладки для різних приладів Illumina: MiSeq LRM3 і 4, iSeq LRM, MiniSeq LRM, а також шаблон імпорту зразків для NextSeq.

9.4.3. Відкрийте вікно програмного забезпечення MiSeq Control, виберіть "Sequence" (Послідовність).

9.4.4. Виберіть "Local Run Manager", увійдіть в систему під своїм ім'ям користувача і паролем, виберіть відповідну опцію потокової передачі даних BaseSpace і підтвердіть параметри циклу, перш ніж натиснути "Next" (Далі). Прилад видасть запит на завантаження проточної кювети.

9.5. Підготовка та завантаження проточної кювети

9.5.1. Дістаньте проточну кювету та буфер для інкорпорації (PR2) зі сховища (2 - 8°C).

ПРИМІТКА: Не зберігайте буфер PR2 на льоду, оскільки він може утворювати частинки.

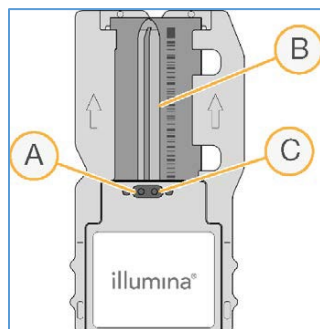
9.5.2. Одягнувши чисті рукавички без пудри, обережно вийміть проточну кювету з контейнера, не торкаючись скла кювети.

9.5.3. Промийте збірку проточної кювети молекулярною водою, переконавшись, що і скло, і пластиковий корпус ретельно промиті від надлишків солей.

9.5.4. Витріть проточну кювету насухо безворсовою серветкою, дотримуючись обережності навколо чорної прокладки порту. Переконайтеся, що видалили всю зайву рідину.

9.5.5. Змочіть чистий шматок паперу для лінз етанолом і очистіть скло проточної кювети, переконавшись, що область зображення на склі (В на рис. 1 нижче) не містить розводів, ворсинок і волокон тканини.

ПРИМІТКА: Не додавайте етанол безпосередньо в проточну кювету. Уникайте потрапляння етанолу на прокладки проточної кювети (А і С на рис. 1).



Малюнок 1. Проточна кювета. Прокладки портів (А і С), канали візуалізації (В)

9.5.6. Витріть надлишки спирту папером для лінз і візуально перевірте, щоб переконатися, що отвори проточної кювети (А і С) не мають перешкод, що прокладка добре прилягає до отворів кювети і що на склі немає плям або сміття.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
10 з 32

- 9.5.7. Підніміть дверцята відсіку проточної кювети на MiSeq і натисніть кнопку розблокування, щоб відкрити затискач і вийняти раніше використану проточну кювету.
- 9.5.8. Переконайтеся, що на планшеті проточної кювети немає ворсу. За необхідності протріть спиртовою серветкою або подібним засобом і дайте висохнути.
- 9.5.9. Помістіть проточну кювету на столик, закрийте затискач кювети (він клацне, коли буде повністю закритий), закрийте дверцята відсіку і виберіть "Next" (Далі) в програмному забезпеченні MiSeq Control. З'явиться запит на завантаження флакона PR2.

9.6. Завантажити буфер змішування

- 9.6.1. Обережно переверніть буфер для змішування (PR2), щоб перемішати, а потім зніміть кришку.
- 9.6.2. Відкрийте дверцята відсіку для реактивів і підніміть ручку сиппера, доки вона не зафіксується на місці.
- 9.6.3. Вийміть пляшку з промивним буфером, закрийте її кришкою і відкладіть для подальшого використання.
- 9.6.4. Помістіть флакон PR2 на місце, де раніше знаходився флакон з промивним буфером MiSeq.
- 9.6.5. Вийміть пляшку з-під відходів і вилийте у відповідний контейнер для хімічних відходів, якщо це необхідно.
ПРИМІТКА: Усю рідину, яка накопичується у пляшці для відходів MiSeq, слід утилізувати як відходи формаміду, включаючи рідину з циклів промивання. Переконайтеся, що хімічні відходи промарковані та утилізовані належним чином.
- 9.6.6. Повільно опустіть ручку сиппера. Переконайтеся, що сиппери повністю опустилися в PR2 і пляшки для відходів.
- 9.6.7. Перевірте правий нижній кут екрану, щоб переконатися, що RFID-мітка пляшки PR2 успішно зчитана.
ПРИМІТКА: Якщо на якомусь етапі система не зчитує RFID-мітку, програмне забезпечення запропонує вам отримати тимчасовий обхідний код і продовжити налаштування циклу. Для отримання додаткової інформації див. розділ "Вирішення проблеми зчитування RFID-мітки" в посібнику користувача системи MiSeq.
- 9.6.8. Натисніть "Далі" на MCS, і на екрані з'явиться запит на встановлення картриджа.

9.7. Підготовка та завантаження картриджа

- 9.7.1. Дістаньте розморожений картридж з реактивами зі сховища, ретельно висушіть його і змішайте реактиви, обережно перевернувши 10 разів.
ПРИМІТКА: Змішування реагентів є дуже важливим етапом! Якщо пул бібліотеки поміщений в картридж до змішування реагентів картриджа, використовуйте подовжений наконечник піпетки, щоб вийняти його, заклейте резервуар для зразка, перемішайте картридж і потім знову завантажте пул.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

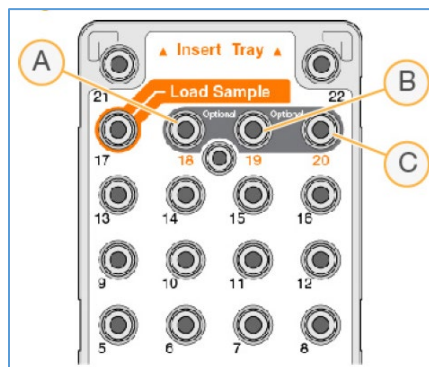
Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
11 з 32

- 9.7.2. Постукайте картриджем з реактивами по твердій поверхні, щоб зібрати вміст на дні резервуарів.
- 9.7.3. Чистим наконечником піпетки на 1000 мкл проколить фольговану пломбу над резервуаром з написом "Load Sample" (завантажити зразок).
- 9.7.4. Завантажте **600 мкл** денатурованої бібліотеки ДНК у резервуар "Load Sample" (рис. 2).

ПРИМІТКА 1: При секвенуванні бібліотек *Illumina DNA PCR-Free Prep* додайте 600 мкл розмороженого праймера VP10 у спеціальний резервуар, позиція 18 (А на рис. 2).



Малюнок 2. Зарезервовані резервуари в картриджі для секвенування: №17 для пулу бібліотек, що секвенується, №18-20 для користувацьких праймерів.

ПРИМІТКА2: Рекомендується завантажувати зразок і праймер до дна резервуара, використовуючи подовжений наконечник піпетки на 1000 мкл, щоб зменшити ризик утворення крапель на стінках. **Будьте обережні, щоб уникнути потрапляння крапель на фольгований ущільнювач під час дозування зразка.**

- 9.7.5. Обережно постукайте по твердій поверхні, щоб висипати весь вміст на дно.
- 9.7.6. Відкрийте дверцята холодильника для реактивів і вийміть мийний лоток. За необхідності висушіть дно холодильної камери за допомогою абсорбуючих серветок.

ПРИМІТКА 1: НЕ тягніть з силою на промивний лоток; якщо він чинить опір, сипери все ще можуть бути опущені. Зачекайте, поки MiSeq видасть запит на завантаження картриджа, і повторіть спробу.

ПРИМІТКА 2: Не залишайте дверцята холодильника для реактивів відчиненими протягом тривалого часу.

- 9.7.7. Вставте картридж з реактивами у відсік охолоджувача до упору.
- 9.7.8. Закрийте дверцята холодильника і перевірте екран, щоб переконатися в успішному зчитуванні RFID-мітки картриджа з реактивами.
- 9.7.9. Закрийте дверцята відсіку для реактивів.
- 9.7.10. Перегляньте параметри запуску і переконайтеся, що вони правильні (назва експерименту, робочий процес аналізу, довжина зчитування тощо), а потім натисніть "Далі", щоб перейти до перевірки перед запуском.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
12 з 32

ПРИМІТКА: Перед запуском система виконує перевірку всіх компонентів циклу, дискового простору і мережесвих з'єднань. Якщо будь-яка частина перевірки перед виконанням циклу не пройшла успішно, на екрані з'явиться повідомлення із загальними інструкціями, що описують помилку або детально пояснюють, як її виправити. Для отримання додаткової інформації див. розділ "Усунення помилок налаштування циклу" в посібнику користувача системи MiSeq. Якщо всі елементи успішно пройшли перевірку перед циклом, система готова до запуску циклу.

9.7.11. Виберіть "Start Run".

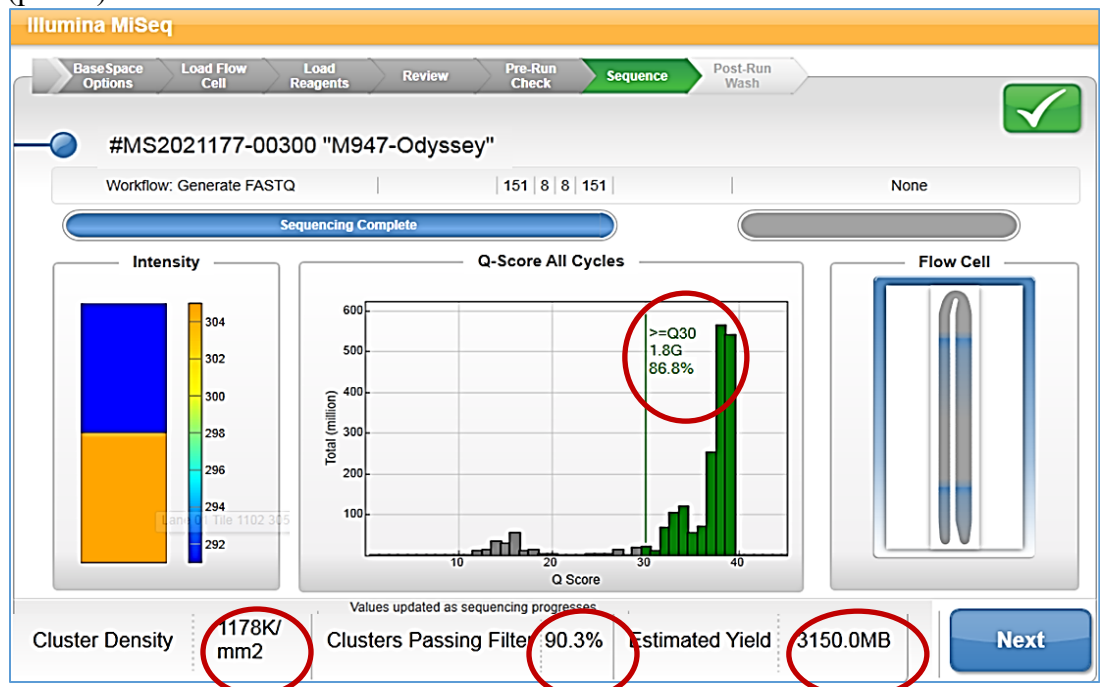
ПРИМІТКА 1: Прилад можна налаштувати на автоматичний запуск циклу після перевірки системи. Це можна вказати в розділі "Run Settings" (Налаштування циклу) програмного забезпечення MiSeq Control, встановивши прапорець "Start run after Pre-Run check (Почати цикл після перевірки перед запуском)". Не запитувати підтвердження".

ПРИМІТКА 2: Після запуску циклу не відкривайте дверцята відсіку проточної кювети або відсіку для реактивів, а також не вмикайте монітор приладу, якщо тільки цикл не потрібно зупинити або поставити на паузу.

ПРИМІТКА 3: Захоплення зображень на приладі MiSeq чутливе до вібрації. Виконання завдань, які спричиняють вібрацію поблизу/на приладі під час циклу, може призвести до зупинки циклу або негативно вплинути на результати секвенування.

9.8. Переглянути показники виконання

9.8.1. Після завершення циклу переконайтеся, що цикл секвенування відповідає основним показникам якості, які будуть показані на MCS після завершення циклу (рис. 3).



ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
13 з 32

Зображення 3. Екран завершення запуску програмного забезпечення MiSeq Control. Первинні показники обведені червоним кольором .

ПРИМІТКА: Ці показники виконання також можна знайти на вкладці " Summary/Зведення" у SAV, див. рис. 4 нижче.

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	86.35
Total	7.45	7.45	0.00	NaN	399	88.76

Lane	Tile	Density (K/mm ²)	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	Tile	Density (K/mm ²)	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	Tile	Density (K/mm ²)	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	Tile	Density (K/mm ²)	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

Малюнок 4. Скріншот вкладки SAV Summary з виділенням ключових метрик циклу, які потрібно переглянути.

9.8.2. Запишіть первинні показники циклу в робочу книгу. Порівняйте Q30, щільність кластерів і кластери, що пройшли фільтр, з рекомендованими PulseNet пороговими значеннями метрик циклу в Таблиці 5.

ПРИМІТКА: Якщо показники циклу не відповідають пороговим значенням, наведеним у Таблиці 5, можливо, деякі з послідовностей все ще відповідають критичним показникам якості, зазначеним у PNQ07. Необхідний подальший аналіз послідовностей, щоб визначити, чи є окремі послідовності прийнятними, чи їх потрібно повторити.

Набір	Q30 (%)	Щільність кластерів ⁽²⁾ (К/мм ²)	Кластери, що пройшли фільтр (%)
v3, 500 цикл ¹	≥ 70	1200-1400	~ 80 або вище
v2, цикл 500	≥ 75	800-1200	
v2, 300 цикл	≥ 80	800-1200	
Nano, v2 300 цикл	≥ 80	800-1200	
Nano, v2 500 цикл	≥ 75	800-1200	
Мікро, v2 300 цикл	≥ 80	800-1200	

Таблиця 5. Метричні порогови для секвенування хімічних реагентів, рекомендовані PulseNet.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
14 з 32

¹Стандартний набір становить 600 циклів, але PulseNet рекомендує секвенування при 500 циклах для кращої якості.

²Рекомендації компанії Illumina: 600-1200 К/мм². Для повного циклу з оптимізованою концентрацією завантаження PulseNet рекомендує 800-1200 К/мм².

9.9. Експорт даних з MiSeq

ПРИМІТКА1: Цей розділ необхідний лише для користувачів, які не мають доступу до BaseSpace, або якщо для локального аналізу чи зберігання даних потрібне вторинне сховище даних (наприклад, локальний сервер).

ПРИМІТКА2: Для кожного ізоляту буде створено 2 файли fastq для парних зчитувань (R1 і R2). Ці дані можна скопіювати на зовнішній жорсткий диск і перенести на робочу станцію комп'ютера. Крім того, прилад MiSeq можна також підключити до локального мережевого диску, щоб безпосередньо передавати файли з приладу.

9.9.1. Дані знаходяться на диску D:\ → Папка виконання (виберіть останню папку виконання) → Alignment_1 → Папка виконання → Fastq.gz).

ПРИМІТКА 1: Після завершення циклу MiSeq може знадобитися до 1 години для створення файлів fastq, оскільки програмне забезпечення для аналізу в реальному часі відстає від циклу секвенування. У разі використання BaseSpace доступ до даних можна отримати під час виконання циклу або у визначеному проєкті.

ПРИМІТКА2: Якщо дані fastq для певного ізоляту (ізолятив) недоступні через неправильне присвоєння індексу або помилку на аркуші зразка, цикл можна запросити для аналізу з використанням LRM або коригувальних опцій в BaseSpace (див. Додаток PNL38-3).

9.10. Промивання після циклу та утилізація реагентів

9.10.1. Після завершення прогону виберіть опцію "Start Wash/Почати промивання" в нижній правій частині екрана.

9.10.2. Переконайтеся, що прапорець "Perform optional template line wash/Виконати опціональну лінію шаблону промивки" встановлено, щоб продовжити післяциклову промивку відбілювачем. **ПРИМІТКА:** Гіпохлорит натрію (NaOCl) використовується для зменшення перенесення нуклеїнової кислоти з попередніх циклів.

9.10.3. Приготуйте свіже розведення молекулярного гіпохлориту натрію (NaOCl), використовуючи молекулярну воду. Зверніться до таблиці 6 нижче для послідовних кроків розведення. Виберіть перше розведення відповідно до концентрації вихідного NaOCl.

ПРИМІТКА 1: Друге розведення (0,01%) можна приготувати безпосередньо в пробірці/резервуарі MiSeq (А на рис. 5).

ПРИМІТКА2: Використання звичайного побутового відбілювача не підтверджено і не рекомендується.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38	Вер. No. 04	Дата набуття чинності:	Сторінка 15 з 32
----------------------	-------------	------------------------	------------------

Розведення	Початкова концентрація NaOCl	Об'єм NaOCl	Об'єм води	Кінцева концентрація NaOCl
Перше розведення:	4%	30 мкл	570 мкл	0.20%
	5%	24 мкл	576 мкл	
	6%	20 мкл	580 мкл	
	8.25%	15 мкл	585 мкл	
Друге розведення:	0.20%	50 мкл	950 мкл	0.01%

Таблиця 6. Розрахунки, необхідні для приготування 0,2% та 0,01% розведень із вихідного NaOCl.

9.10.4. Вставте промивну трубку в позицію 17 в призначену для промивання відбілювачем лоток так, щоб горловина була на одному рівні з лотком (В на мал. 5).

ПРИМІТКА: Рекомендується мати 2 лотки для миття, один з яких призначений для відбілювача і Tween 20, а інший - тільки для миття водою.



Малюнок 5. Вставлення пробірки з 0,01% розчином гіпохлориту натрію в лоток для промивання.

9.10.5. Заповніть решту резервуарів 0,5% промивним розчином Tween 20.

ПРИМІТКА: 0,5% Tween 20 можна приготувати, додавши 5 мл Tween 20 в 995 мл молекулярної води. Готуйте лише 1 л 0,5% Tween 20 за один раз, щоб забезпечити його своєчасне використання. З часом миючий засіб може розкладатися або виділятися з розчину і негативно впливати на якість секвенування. Рекомендується готувати свіжий промивний розчин щомісяця або частіше, якщо це необхідно, щоб зменшити ймовірність забруднення.

9.10.6. Видаліть зайву вологу з поверхні картриджа для прання безворсовою серветкою.

9.10.7. Відкрийте дверцята відсіку для реактивів і дверцята охолоджувача та вийміть використаний картридж. Відкладіть картридж для утилізації.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
16 з 32

ПРИМІТКА: Лунка для реагентів 8 картриджа містить формамід і має бути утилізована як небезпечні хімічні відходи. Докладні відомості про безпеку див. у розділі 5 та в паспорті безпеки.

- 9.10.8. Вставте мийний лоток у холодильну камеру до упору, а потім закрийте дверцята холодильної камери.
- 9.10.9. Підніміть ручку сиппера, вийміть флакон PR2 і замініть його флаконом з промивним буфером MiSeq, що містить 400-500 мл 0,5% розчину Tween 20.
ПРИМІТКА: Рекомендується замінювати пляшку з промивним буфером свіжим 0,5% Tween, приготованим щомісяця або частіше, щоб обмежити потенційну контамінацію.
- 9.10.10. Вийміть контейнер для відходів і утилізуйте вміст відповідно до методів утилізації небезпечних хімічних відходів лабораторії (див. розділ 5.2.1. для отримання інформації про безпеку).
ПРИМІТКА: Усю рідину, яка накопичується у пляшці для відходів MiSeq, слід утилізувати як токсичні формамідні відходи, включаючи рідину з циклів промивання. Усі пляшки з-під формаміду повинні бути чітко позначені як хімічні відходи та утилізовані належним чином.
- 9.10.11. Поверніть порожній контейнер для відходів у відсік для реактивів, опустіть сипперний кронштейн і закрийте дверцята відсіку для реактивів.
- 9.10.12. Натисніть "Далі", щоб почати перше промивання ліній шаблону після прогону. Це займе приблизно 30 хвилин.
- 9.10.13. Після завершення промивання лінії шаблону після циклу натисніть "Готово" на екрані, щоб повернутися до головного екрану програмного забезпечення MiSeq Control.
- 9.10.14. Одразу після промивання лінії шаблону необхідно виконати друге промивання після циклу молекулярною водою, щоб переконатися, що з лінії шаблону видалено будь-яку слідову кількість гіпохлориту натрію. На головному екрані виберіть "Виконати промивку" > "Виконати післяциклову промивку".
- 9.10.15. Виберіть "Start Wash/Почати промивання".
ПРИМІТКА: Прапорець "Template Line Wash/Промивання шаблонних ліній" має бути **знято**.
- 9.10.16. Наповніть усі резервуари спеціального лотка для промивання молекулярною водою.
- 9.10.17. Видаліть зайву вологу з поверхні картриджа для прання безворсовою серветкою.
- 9.10.18. Вийміть лоток для промивання, що містить 0,5% Tween 20, і промивну трубку для відбілювача з холодильної камери та ретельно промийте промивну трубку. Промийте промивний лоток деіонізованою водою (або еквівалентом) і дайте йому висохнути.
- 9.10.19. Помістіть лоток для миття водою в холодильну камеру і закрийте дверцята.
- 9.10.20. Підніміть кронштейн дозатора реагенту, замініть промивну пляшку з 0,5% Tween 20 на промивну пляшку з 300-500 мл молекулярної води і опустіть кронштейн дозатора.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
17 з 32

- 9.10.21. Закрийте дверцята відсіку для реактивів і виберіть "Next/Далі", щоб почати промивання.
- 9.10.22. Після завершення промивання натисніть "Done/Готово", щоб завершити цикл промивання і повернутися на головний екран. Зберігайте проточну кювету, пляшку для промивання, картридж для промивання та контейнер для відходів на місці до наступного циклу секвенування.

9.11. Обслуговування приладів

	Частота технічного обслуговування		
	Після циклу	Щотижня	Щомісяця
Тип обслуговування	Шаблон промивки після циклу, за якою слідує промивка водою	Промивка після циклу із Tween 20 + Промивка водою після циклу	Промивка в якості ТО + Енергетичний цикл
Необхідний час	30 хвилин + 20 хвилин	20 хвилин + 20 хвилин	60 хвилин і більше 20 хвилин
Необхідні реагенти	- 0,5% Tween 20 - 0,01% NaOCl - молекулярна вода	- 0,5% Tween 20 - Молекулярна вода	- 0,5% Tween 20 - Молекулярна вода

Таблиця 7. Короткий опис технічного обслуговування MiSeq.

9.11.1. Щотижневе обслуговування:

9.11.1.1. Промивання: Для забезпечення належної роботи рідинної частини приладу слід виконати післяциклову промивку 0,5% розчином Tween 20. Якщо протягом тижня було виконано цикл секвенування, щотижневого промивання буде достатньо (звичайне промивання після циклу з наступним промиванням водою (Крок 9.10)). Якщо інструмент не використовувався, слід виконати ручне промивання після циклу з використанням 0,5% Tween 20, а потім промити водою.

9.11.2. Щомісячне обслуговування:

9.11.2.1. Промивання для ТО: Виконується щонайменше раз на місяць. Це серія з 3 промивань (два 0,5 % Tween 20 і промивання водою), які вимагають повторного заповнення лотка для промивання після кожного циклу (20 хвилин кожне). Загальний час для технічного обслуговування становить приблизно 60 хвилин.

9.11.2.1.1. У розділі "Параметри промивання" виберіть "Maintenance Wash/Промивання для ТО".

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
18 з 32

- 9.11.2.1.2. Наповніть промивний лоток і пляшку з промивним буфером 0,5% Tween 20.
- 9.11.2.1.3. Після перших двох промивань наповніть резервуари промивного лотка і буферної пляшки молекулярною водою.
- 9.11.2.2. Енергетичний цикл:
 - 9.11.2.2.1. Виберіть пункт меню "Manage Instrument/Керування приладом" на головному екрані, а потім пункт "Shut Down/Вимкнути".
 - 9.11.2.2.2. Після того, як прилад вимкнеться (виразний звук клацання), простягніть руку з правого боку приладу і вимкніть вимикач живлення, розташований біля шнура живлення.
 - 9.11.2.2.3. Дайте приладу вимкнутися принаймні на 5 хвилин, а потім знову увімкніть його. Прилад завантажить MCS приблизно через 10 хвилин.
- 9.11.3. Керування дисковим простором на диску даних (D:\):
 - 9.11.3.1. Перед початком циклу секвенування MiSeq потребує 100 ГБ вільного місця на диску D:\. **Дані слід видаляти лише після завершення будь-якого перенесення/резервування даних і якщо для цього циклу не потрібне усунення несправностей.** Наступні інструкції описують, які файли можна видаляти і де вони знаходяться:
 - 9.11.3.1.1. Перейдіть до папки Data (D:\ Drive)/Illumina/MiSeqOutput/(папка останнього циклу)/. У цій папці виберіть папки "Images" та/або "Thumbnail_images" і видаліть їх (рекомендується для циклів, яким більше одного місяця).
 - 9.11.3.1.2. Перейдіть до папки Data (D:\ Drive)/Illumina/MiSeqAnalysis/. Видаліть усі папки циклів, окрім останньої папки.
 - 9.11.3.1.3. Очистіть кошик для сміття.
 - 9.11.3.1.4. Перезавантажуйте систему після видалення великих обсягів даних.
 - 9.11.3.1.4.1. На головному екрані MCS виберіть "Manage Instrument" (Керування приладом), а потім "Reboot" (Перезавантаження). Перезавантаження системи та запуск програмного забезпечення MiSeq Control займе приблизно 10 хвилин.
ПРИМІТКА: Під час перезавантаження підключений зовнішній жорсткий диск може спричинити помилку під час запуску.
 - 9.11.3.2. **Користувачі BaseSpace:** Рекомендується зберігати дублікат папки «run» локально на приладі в якості резервної копії. Виконання наступних дій забезпечить створення папки run у файлових папках накопичувача даних на додаток до потокової передачі до BaseSpace:
 - 9.11.3.2.1. На головному екрані MCS виберіть "Run Options".
 - 9.11.3.2.2. На вкладці "Run Settings" (Налаштування циклу) встановіть прапорець "When using BaseSpace, replicate analysis locally on MiSeq" (При використанні BaseSpace реплікувати аналіз локально на MiSeq).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

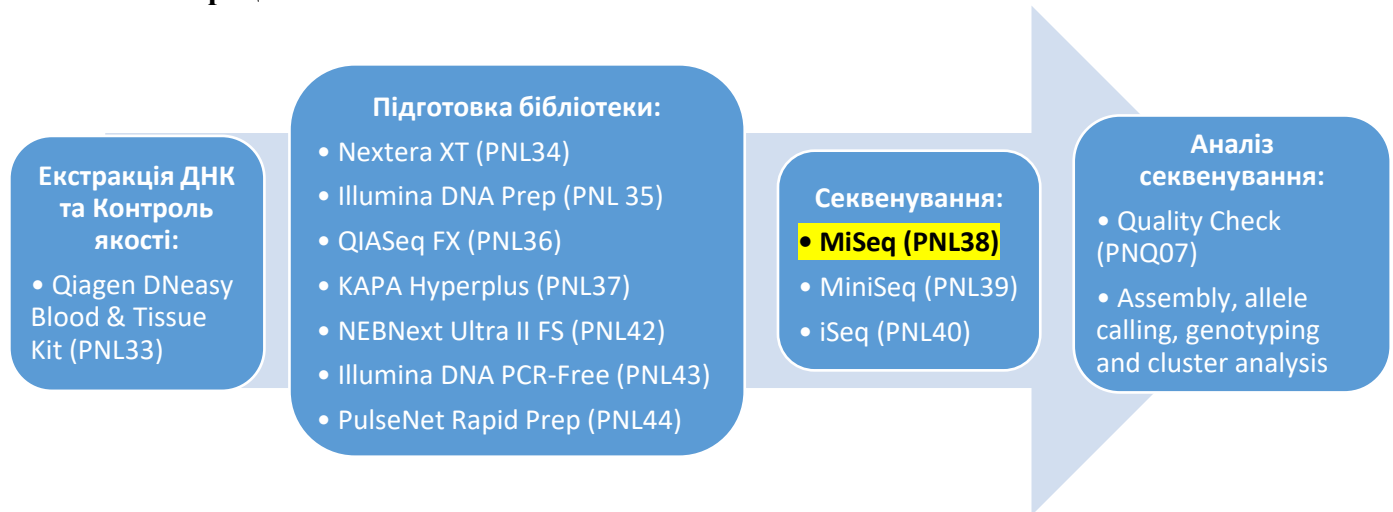
Сторінка
19 з 32

9.11.3.2.3. Натисніть "Зберегти і повернутися", щоб зберегти ці зміни і повернутися на головний екран.

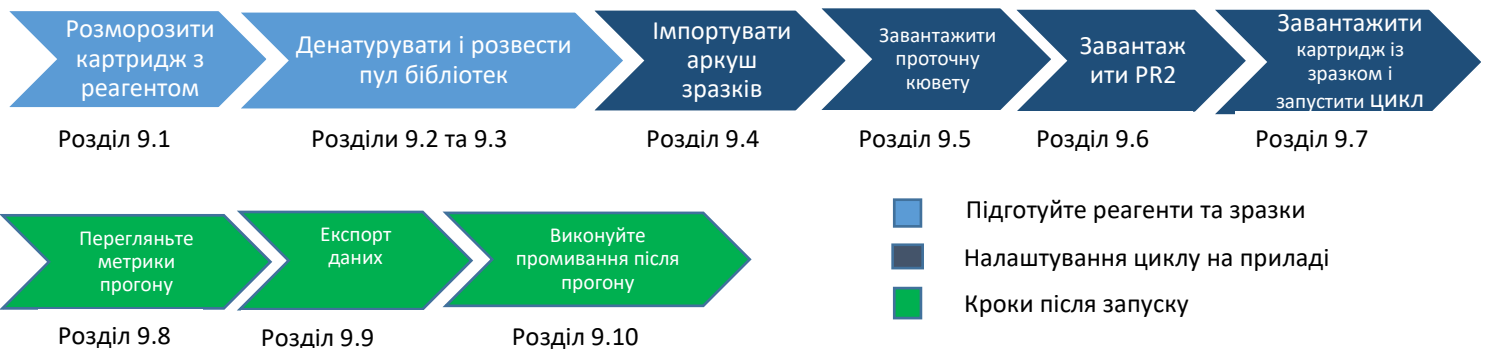
ПРИМІТКА: Цю папку циклу можна видалити, якщо дані циклу успішно передано до BaseSpace і локальне зберігання даних не потрібне.

10. ТЕХНОЛОГІЧНІ СХЕМИ:

10.1. Робочий процес PulseNet WGS



10.2. Робочий процес секвенування MiSeq



11. ПОВ'ЯЗАНІ ДОКУМЕНТИ:

Номер документа	Назва
PNL33	Екстракція ДНК та СОП контролю якості
PNL34	Nextera XT Library Prep SOP

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
20 з 32

PNL34.W1	Робочий зошит для підготовки бібліотеки Nextera XT
PNL35	Illumina DNA Prep SOP
PNL35.W1	Робоча книга Illumina для підготовки ДНК, 96 CD/UD індексів, окремі аркуші для зразків для MiSeq LRM, MiniSeq LRM та iSeq LRM, а також шаблон імпорту зразків для NextSeq LRM
PNL35.W3	Контрольний список підготовки ДНК Illumina
PNL36	СОП підготовки бібліотеки QIAseq FX
PNL36.W1	Робочий зошит для підготовки бібліотеки QIAseq FX
PNL37	KAPA HyperPlus Library Prep SOP
PNL37.W1	Робочий зошит для підготовки до роботи з бібліотекою KAPA HyperPlus
PNL42	NEB Next Ultra II FS SOP підготовки бібліотеки
PNL42.W1	Робочий зошит для підготовки до роботи з бібліотекою NEB Next Ultra II FS
PNL43	Illumina ДНК ПЛР-безкоштовна підготовка СОП
PNL43.W1	Illumina ДНК ПЛР-безкоштовний робочий зошит
PNL43.W2	Контрольний список Illumina для ДНК ПЛР без використання ПЛР
PNL44	PulseNet Rapid Prep SOP
PNL44.W1	Робочий зошит для швидкої підготовки PulseNet
PNL44.W2	Контрольний список швидкої підготовки PulseNet
PNQ07	Illumina Sequence Data QC SOP

12. ЛІТЕРАТУРА:

- 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
- 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
- 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
- 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>
- 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>

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
21 з 32

- 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. Denature 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

13. КОНТАКТИ:

- 13.1. Лабораторія PulseNet NGS: pulsenetngslab@cdc.gov
- 13.2. Технічна підтримка компанії Illumina: techsupport@illumina.com

14. ПОПРАВКИ:

14.1. 01/31/2019:

- Вилучено процедури, що стосуються налаштування циклу на MiSeq, з PNL32 для створення окремого документа (PNL38)

14.2. 02/02/2021

- Додано додаткові визначення
- Оновлені каталожні номери реагентів та витратних матеріалів
- Додано інформацію про підготовку бібліотек NEBNext Ultra II FS і QIAseq FX
- Додано розділ "Перегляд метрик виконання" (9.8.).
- Додані діаграми робочого процесу
- Додані відповідні документи
- Оновлені посилання
- Оновлені інструкції до PhiX
- Оновлені інструкції з експлуатації MiSeq, до яких додано LRM

14.3. 02/01/2023

- Додано інформацію про набір для приготування бібліотеки Д DNA PCR-Free Prep library prep kit
- Оновлена таблиця 1 (розморожування та зберігання картриджа після розморожування)
- Для наочності додано додаткові цифри
- Додано таблицю 7 з підсумками технічного обслуговування приладу
- Оновлені нотатки
- Оновлені посилання
- Колишній додаток PNL38-2 (Налаштування планшету зразків MiSeq) було розділено на два додатки за типом програмного забезпечення: LRM (PNL38-2) та IEM (PNL38-3). Колишній додаток PNL38-3 (що вимагає проведення аналізу) тепер є додатком PNL38-4.
- Вилучено посібник з експлуатації MiSeq LRM PNL38.JA1. Ця інформація тепер міститься в додатку PNL38-2.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
22 з 32

14.4. 07/03/2024

- Вилучено з СОП та PNL35.W1 версії IEM та LRM раніше 3. Відповідно, вилучено Додаток PNL38-3 (інструкції до листа зразків, налаштованого в IEM) та інструкції щодо запиту на проведення аналізу з використанням MSR у Додатку PNL38-4. Додаток PNL38-4 (Запит на проведення аналізу) став PNL38-3.
- Додано формулювання, яке підкреслює, що концентрацію завантаження слід коригувати лише після перевірки розміру фрагмента бібліотеки.
- Додано супутні документи PNL44, PNL44.W1 та PNL.W2 (СОП швидкої підготовки бібліотеки та відповідні робочі книги).
- Оновлений каталожний номер для застарілого продукту [Праймер для секвенування без ПЛР ДНК (cat# 20041496), що містить лише суміш праймерів VP10, знятий з виробництва у жовтні 2023 р.].
- Вилучено крок термічної денатурації з СОП для бібліотек Illumina DNA Prep
- Видалили всі посилання на BioNumerics.
- Оновлена рекомендація готувати свіжий 0,5% буфер для промивання твінів щомісяця або раніше і включати промивання водою після промивання твінів.
- Видалено щотижневе перезавантаження як рекомендацію з обслуговування.
- Скориговано нижній допустимий поріг для CD з рекомендованих 600 до більш реалістичних 800.
- Видалено посилання на застарілі посилання.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
23 з 32

15. ПІДПИСИ ПРО ЗГОДУ:

Затверджено _____ Дата: _____
Персонал PulseNet з ЗЯ/КЯ

Затверджено _____ Дата: _____
Керівник групи реагування та управління спалахами PulseNet

Затверджено _____ Дата: _____
Технічний керівник PulseNet WGS

Затверджено _____ Дата: _____
Керівник групи епіднагляду за спалахами PulseNet

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
24 з 32

16. ДОДАТКИ:

Додаток PNL38-1

Додавання PhiX Control

1. Мета

PhiX - це збалансований геном бактеріофага розміром 500 б.п., рекомендований компанією Illumina в якості контролю приладу, який може допомогти визначити, наскільки добре працює прилад для секвенування. Рекомендується проводити аналіз PhiX після технічного обслуговування або ремонту приладу.

2. Процедура

ПРИМІТКА 1: Згідно з даними компанії Illumina, розведення PhiX 12,5 пМ і 20 пМ забезпечують оптимальну щільність кластерів для реагентів v2 і v3 відповідно.

ПРИМІТКА 2: Якщо ви використовуєте попередньо підготовлене денатуроване розведення PhiX, перейдіть до кроку 2.7.

- 2.1. Приготуйте 0,2 N NaOH, додавши 400 мкл молекулярної води до 100 мкл аліквоти 1 N NaOH і поставте на лід до готовності до використання.
- 2.2. Змішайте 1 мкл 10 нМ PhiX бібліотеки зі складу і 4 мкл RSB (або розчинника, наприклад, EBV, Tris-HCl, який використовується для нормалізації бібліотек/пулу бібліотек), щоб отримати 2 нМ PhiX бібліотеку в новій 1,5 мл мікроцентрифузі.
- 2.3. Змішайте 5 мкл 2 нМ бібліотеки PhiX та 5 мкл 0,2 N NaOH і добре перемішайте.
- 2.4. Інкубуйте 5 хвилин при кімнатній температурі для денатурації бібліотеки PhiX на окремі ланцюги.
- 2.5. Після інкубації **НЕГАЙНО** додайте 490 мкл попередньо охолодженого NT1 до пробірки, що містить 10 мкл денатурованої 1 нМ бібліотеки PhiX, щоб отримати 20 пМ денатурованої бібліотеки PhiX.
- 2.6. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку, поставте дату та ініціали. Денатуровані 20 пМ PhiX бібліотеки можна зберігати до трьох тижнів при температурі від -15° до -25^(o) C.
- 2.7. Якщо ви використовуєте реагенти для секвенування v2, розведіть денатуровану 20 пМ бібліотеку PhiX до 12,5 пМ, додавши 62,5 мкл 20 пМ денатурованої бібліотеки PhiX до 37,5 мкл попередньо охолодженого NT1.
- 2.8. Визначте відсоток PhiX (N%), який потрібно додати до циклу. Загальні вказівки див. нижче:
 - При усуненні несправностей у підготовці бібліотеки: 1-10%.
 - У разі усунення несправностей приладу MiSeq: 5 % або вище (залежно від рекомендацій служби технічної підтримки Illumina).
 - При регулярному використанні PhiX в кожному циклі: Рекомендується 1%.
 - Якщо завантажуються бібліотеки з низькою різноманітністю зразків, або ампліконами, що мають сплески: 5-10%.
- 2.9. Змішайте N x 10 мкл 12,5 пМ (або 20 пМ) PhiX з 1000 - (N x 10) мкл бібліотеки зразків потрібної концентрації.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
25 з 32

- Наприклад: для додавання 1% PhiX додайте 10 мкл 12,5 пМ PhiX до 990 мкл денатурованої бібліотеки зразків 10-20 пМ.

2.10. Помістіть на лід до готовності, щоб перейти до теплової денатурації бібліотеки зразків (див. розділ 9.3.4.) і додавання PhiX.

3. Очікувані результати PhiX

3.1. Значення "Aligned/Вирівняно (%)" у SAV/BaseSpace після завершення циклу має відповідати відсотку PhiX, який було вирівняно в циклі. Якщо це не так, це може свідчити про проблему з інструментом або бібліотекою.

3.1.1. Бібліотеки, розмір яких менший за розмір бібліотеки PhiX (500 п.н.), будуть конкурувати з PhiX, що призведе до нижчого відсотка вирівнювання.

ПРИМІТКА: Бібліотеки з низьким вмістом GC, такі як *Campylobacter*, схильні до надмірного тегування, особливо з препаратом Nextera XT, що призводить до утворення коротших фрагментів.

3.1.2. Бібліотеки, більші за розмір PhiX, призведуть до більшого відсотка вирівнювання PhiX, ніж ті, що були додані.

ПРИМІТКА: Бібліотеки з високим вмістом GX, такі як *Mycobacterium tuberculosis*, мають тенденцію до недостатнього тегування, особливо з препаратом Nextera XT, що призводить до утворення більших фрагментів.

3.2. За необхідності зверніться до служби технічної підтримки Illumina та за адресою pulsenetngslab@cdc.gov для отримання допомоги з усунення несправностей.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
26 з 32

Додаток PNL38-2

Налаштування аркуша зразків MiSeq за допомогою LRM

ПРИМІТКА: Таблицю зразків *MiSeq* можна налаштувати, імпортувавши вкладку *SampleSheet* з робочої книги підготовки бібліотеки (розділ 1) або ввівши інформацію вручну (розділ 2).

1. Створення та імпорт зразка аркуша з робочої книги PulseNet

1.1. Переконайтеся, що вкладка "Початкове розведення" (Nextera XT) або "Підготовка бібліотеки" (DNA Prep) заповнена належним чином. Ці вкладки автоматично заповнять аркуші зразків необхідною інформацією. Перевірте кожне поле на вкладці Sample Sheet, щоб переконатися, що всі дані були точно заповнені на основі вкладки Initial Dilution (Nextera XT) або Library Prep (Illumina DNA Prep). Поля Description і Sample_Project можуть бути порожніми.

ПРИМІТКА: Послідовності індексів автоматично заповнюються з вкладки Індeksi. Не змінюйте і не видаляйте цю вкладку.

1.2. Перетворіть відповідну вкладку "Зразок аркуша" у формат .csv (зберігши або експортувавши файл у форматі .csv з розділенням комами).

1.2.1. Зберегти у форматі .csv:

1.2.1.1. Відкрийте пункт меню "File/Файл" і виберіть "Save As/Зберегти як".

1.2.1.2. Змініть "Save as type/Зберегти як тип:" на "CSV (Розділено комами)".

1.2.1.3. Перейдіть до потрібної папки з файлами і збережіть файл, використовуючи ідентифікатор пластини як ім'я файлу (наприклад, LabID-MXXXX-YYMMDD).

1.2.1.4. Натисніть "ОК", щоб зберегти лише активний аркуш, і "Так" у наступному вікні, щоб продовжити використання формату CSV.

АБО

1.2.2. Для експорту у форматі .csv:

1.2.2.1. Відкрийте пункт меню "File/Файл" і виберіть "Export/Експорт".

1.2.2.2. Виберіть "Змінити тип файлу".

1.2.2.3. Виберіть "CSV (з розділенням комами)".

1.2.2.4. Збережіть і натисніть "ОК", щоб зберегти тільки активний аркуш.

1.3. Відкрийте CSV-файл у програмі WordPad або NotePad і видаліть усі коми, що стоять після кінцевого зразка. Див. рис. 6 нижче.

ПРИМІТКА: Це необхідно зробити, щоб уникнути помилок при імпорті зразка.

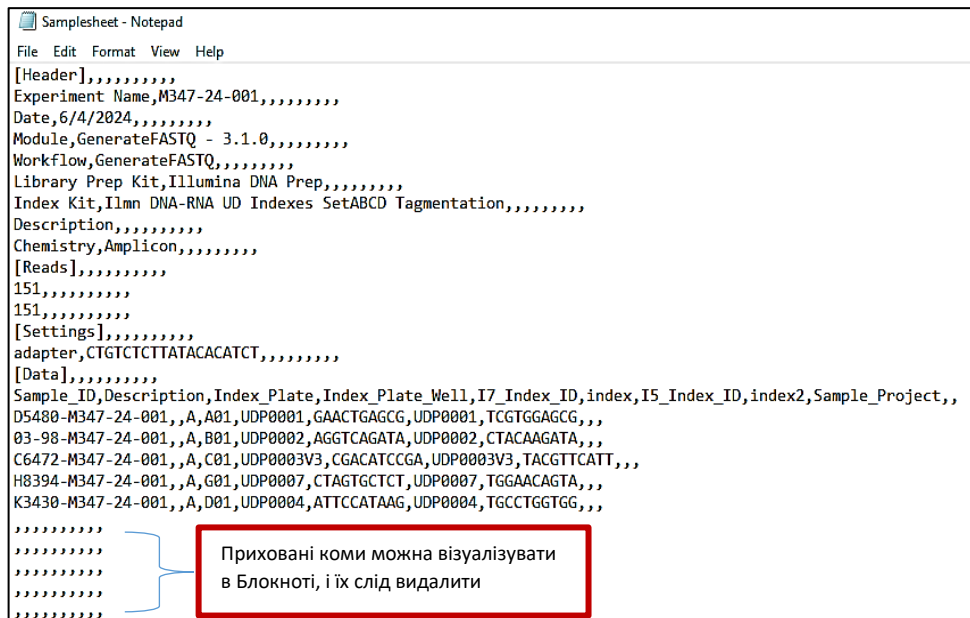
ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
27 з 32



```
Samplesheet - Notepad
File Edit Format View Help
[Header],,,,,,,,,,
Experiment Name,M347-24-001,,,,,,,,,
Date,6/4/2024,,,,,,,,,
Module,GenerateFASTQ - 3.1.0,,,,,,,,,
Workflow,GenerateFASTQ,,,,,,,,,
Library Prep Kit,Illumina DNA Prep,,,,,,,,,
Index Kit,Illm DNA-RNA UD Indexes SetABCD Tagmentation,,,,,,,,,
Description,,,,,,,,,
Chemistry,Amplicon,,,,,,,,,
[Reads],,,,,,,,,,
151,,,,,,,,,
151,,,,,,,,,
[Settings],,,,,,,,,,
adapter,CTGTCTTTATACATCT,,,,,,,,,
[Data],,,,,,,,,,
Sample_ID,Description,Index_Plate,Index_Plate_Well,I7_Index_ID,index,I5_Index_ID,index2,Sample_Project,,
D5480-M347-24-001,,A,A01,UDP0001,GAAGTCAGCG,UDP0001,TCGTGGAGCG,,
03-98-M347-24-001,,A,B01,UDP0002,AGGTCAGATA,UDP0002,CTACAAGATA,,
C6472-M347-24-001,,A,C01,UDP0003V3,CGACATCCGA,UDP0003V3,TACGTTTCATT,,
H8394-M347-24-001,,A,G01,UDP0007,CTAGTGCTCT,UDP0007,TGGAACAGTA,,
K3430-M347-24-001,,A,D01,UDP0004,ATTCCATAAG,UDP0004,TGCTGTGTGG,,
,,,,,,,,,
,,,,,,,,,
,,,,,,,,,
,,,,,,,,,
,,,,,,,,,
,,,,,,,,,
,,,,,,,,,
} Приховані коми можна візуалізувати
в Блокноті, і їх слід видалити
```

Зображення 6. Зразок вкладки аркуша в Блокноті, де показано зайві коми, які потрібно видалити.

- 1.4. Перенесіть файл .csv на прилад за допомогою флеш-накопичувача або аналогічного пристрою:
 - 1.4.1. На MiSeq відкрийте Chromium і увійдіть до LRM.
 - 1.4.2. На головній сторінці LRM виберіть "Create Run/Створити цикл".
 - 1.4.3. Виберіть модуль аналізу "GenerateFASTQ" (рис. 7).

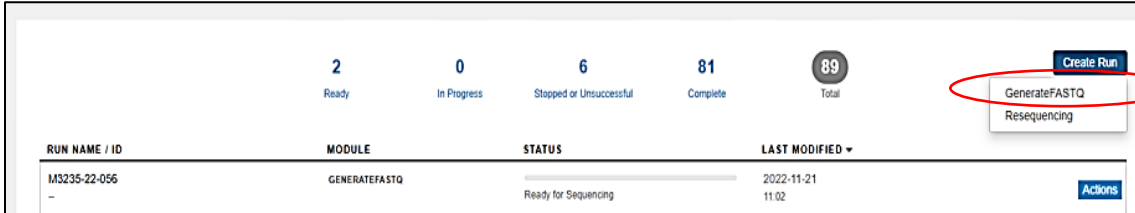


Рисунок 7. Опція "Згенерувати модуль FASTQ" у диспетчері локальних запусків.

- 1.4.4. Виберіть "Import Sample Sheet/Імпортувати зразок аркуша" і перейдіть до файлу .csv, згенерованого з книги.
- 1.4.5. Переконайтеся, що ВСІ параметри циклу, зразки та інформація про індекси імпортовані правильно (Рис. 8). Сюди входять ідентифікатор циклу, набір для підготовки бібліотеки, індексний набір, **обрізка адаптера**, довжина зчитування, **користувацькі праймери (якщо ви секвенуєте бібліотеки Illumina DNA PCR-Free Prep)** тощо.

ПРИМІТКА: Якщо за замовчуванням для комплекту підготовки бібліотеки встановлено значення "Custom/Користувацький" (як у прикладі на рис. 9 нижче), не продовжуйте. Переконайтеся, що коми на експортованому аркуші зразків було видалено (Крок 1.3).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
28 з 32

	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	PLATE *	INDEX WELL *	INDEX 1 (I7)	INDEX 2 (I5)	SAMPLE PROJECT	
1	D5480-M347-24-001		A	A01	UDP0001	UDP0001		✘
2	03-98-M347-24-001		A	B01	UDP0002	UDP0002		✘

Зображення 8. Знімок екрана LRM з правильно заповненими параметрами циклу для циклу Illumina DNA Prep 300c.

Малюнок 9. Знімок екрана локального диспетчера запусків з типом набору бібліотечної підготовки за замовчуванням "Custom".

- 1.4.6. Переконавшись, що всі параметри циклу та інформація про зразок правильні, а параметр **Adapter Trimming увімкнено**, виберіть "Save Run" (Зберегти цикл). Тепер цикл буде відображено на домашній сторінці LRM.
- 1.4.7. Закрийте Chromium. Цикл буде збережено в LRM і відображено на домашній сторінці програмного забезпечення MiSeq Control для секвенування.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 04

Дата набуття чинності:

Сторінка
29 з 32

2. Вручну введіть інформацію про цикл у LRM:

- 2.1. На MiSeq відкрийте Chromium.
- 2.2. На головній сторінці LRM виберіть "Create Run/Створити цикл", щоб налаштувати параметри циклу.
- 2.3. Виберіть модуль аналізу "GenerateFASTQ".
- 2.4. Вручну введіть інформацію про цикл:
 - 2.4.1. Назва циклу: введіть ідентифікатор планшета (наприклад, LabID-MXXXX-YYMMDD)
 - 2.4.2. Опис запуску
 - 2.4.3. Запустити налаштування:
 - 2.4.3.1. Набір для підготовки бібліотеки: виберіть відповідний набір у випадяючому списку
 - 2.4.3.2. Тип читання: виберіть "Парний кінець"
 - 2.4.3.3. Читання індексу: виберіть "2"
 - 2.4.3.4. Довжина зчитування: введіть бажану кількість циклів, залежно від набору.
 - 2.4.3.4.1. Для 500 циклів введіть "251" для READ 1 і READ 2.
 - 2.4.3.4.2. Для 300 циклів введіть "151" для READ 1 і READ 2.
 - 2.4.3.5. **При секвенуванні ДНК бібліотеки Illumina DNA PCR-Free:**
Користувацькі праймери: "CustomRead1PrimerMix (C1)".
 - 2.4.4. **Adapter Trimming:** підтвердіть, що прапорець стоїть у положенні "Увімкнено".
 - 2.4.5. Введіть інформацію про зразок, включаючи ідентифікатор зразка та використані індекси.
- 2.5. Виберіть "Зберегти цикл". Тепер цикл буде відображено на головній сторінці LRM.
- 2.6. Закрити Chromium.

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ СЕКВЕНУВАННЯ ВСЬОГО ГЕНОМУ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 02

Дата набуття чинності:

Сторінка 30 від 32

Додаток PNL38-3

Запит прогону для аналізу

1. Мета

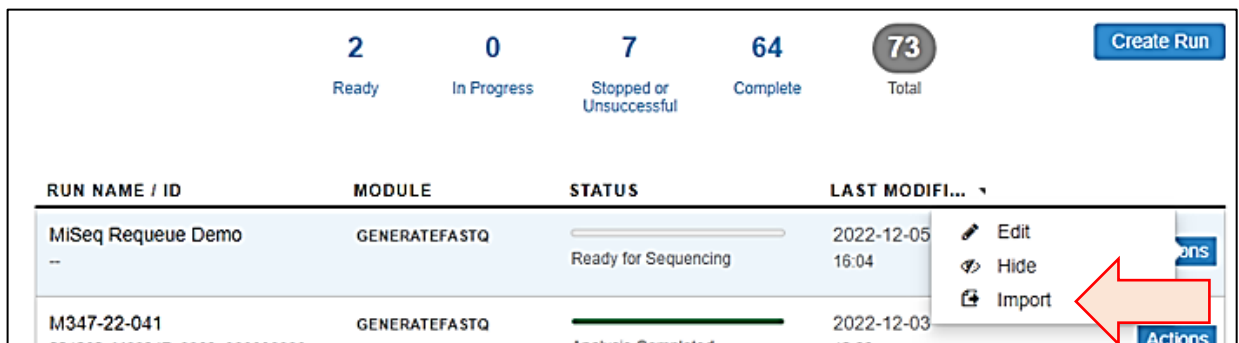
Повторний цикл може знадобитися, якщо виявлено помилку в індексації або назві зразка (наприклад, невірно вказані індекси в бланку зразка). Перед тим, як подавати запит на повторний аналіз, підготуйте виправлений лист для зразків. Він буде використаний приладом для нового аналізу, повторного аналізу даних і перейменування пов'язаних файлів fastq. Запит на аналіз можна зробити за допомогою LRM (розділ 2.1.) або BaseSpace (розділ 2.2.).

2. Процедура

2.1. Запит на виконання за допомогою LRM та MCS v3.0 або новішої версії

- 2.1.1. Відкрийте Chromium, щоб увійти до LRM.
- 2.1.2. Знайдіть цикл, який потрібно запросити.
- 2.1.3. Натисніть "Actions/Дії".
- 2.1.4. Натисніть "Queue/Поставити в чергу".
- 2.1.5. Виберіть "Edit Setup/Змінити налаштування", коли програма запитає про це.
- 2.1.6. Імпортуйте новий аркуш і продовжуйте.
- 2.1.7. Повторно проаналізовані дані (тобто файли fastq) будуть збережені в папці "Alignment_2" папки аналізу циклу та вихідних даних.

ПРИМІТКА: Якщо цикл було випадково завершено з використанням набору для підготовки бібліотеки, зазначеного як "Custom/Користувацький", індекси та обрізки адаптерів не можна відредагувати за допомогою запиту на аналіз, як описано вище. Замість цього створіть новий цикл в LRM (рекомендується використовувати той самий ідентифікатор циклу, що і для циклу, який потрібно відправити запит, з "v2" в кінці) та імпортуйте виправлений лист зразків (з новим ідентифікатором циклу "v2"). Після налаштування цього циклу в LRM клацніть правою кнопкою миші і виберіть "Імпорт" на головному екрані LRM (Рис. 10). Скопіюйте каталог файлів циклу, який потрібно повторно проаналізувати, у діалогове вікно (Рис. 11); переконайтеся, що вихідна папка вказана правильно, і виберіть "Import Run" (Імпортувати цикл). В результаті буде отримано правильно демультіплексовані та обрізані адаптером fastq-файли.



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	Import

**ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ СЕКВЕНУВАННЯ
ВСЬОГО ГЕНОМУ НА MISEQ**

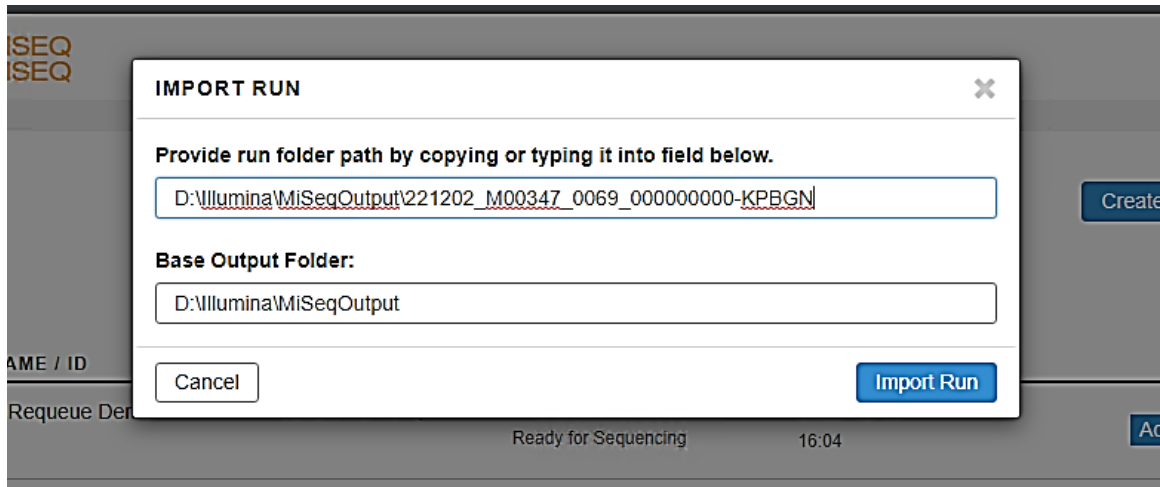
Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 02

Дата набуття чинності:

Сторінка 31 від
32

Зображення 10. У випадаючому меню виберіть "Імпорт" для ручного повторного аналізу даних циклу.



Малюнок 11. Вибір циклу для повторного аналізу та вихідної папки у спливаючому вікні "Імпортувати цикл".

2.2. Запит на виконання циклу за допомогою хабу секвенування BaseSpace

ПРИМІТКА 1: Щоб подати запит на аналіз у BaseSpace, ви маєте бути власником циклу. Спільний цикл не дає права на запит аналізу. Крім того, **повторний запит на аналіз можна подавати не більше п'яти разів у хаб послідовностей BaseSpace.** Якщо вам потрібна допомога з додатковими запитами, напишіть електронною поштою в службу технічної підтримки Illumina і будьте готові надати ідентифікатор циклу і лист зі зразками.

ПРИМІТКА 2: LRM і BaseSpace запитують новий аркуш зразків незалежно один від одного. Якщо LRM запитує новий аркуш зразків, це не призведе до оновлення інформації в BaseSpace.

ПРИМІТКА 3: Дотримуйтесь загальних інструкцій щодо створення запиту в BaseSpace на веб-сайті компанії Illumina: https://knowledge.illumina.com/software/cloud-software/software-cloud-software-reference_material-list/000001321.

- Щоб закріпити **аркуш зі зразком**, зверніться до наступних інструкцій на веб-сторінці Illumina: <https://help.basespace.illumina.com/runs/fix-sample-sheet>.
- Щоб зафіксувати **призначення індексу**, зверніться до наступних інструкцій на веб-сторінці Illumina: <https://help.basespace.illumina.com/sequence/fix-indexes>.

- 2.2.1. Увійшовши до свого облікового запису BaseSpace, виберіть вкладку "Runs/Цикли".
- 2.2.2. Виберіть синє гіперпосилання на цикл, який ви хочете запросити.
- 2.2.3. Натисніть на іконку "Status/Статус" і з випадаючого меню виберіть "Requeue/Черга" і "Sample Sheet/Аркуш зразків" (Рис. 12).

ЛАБОРАТОРНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА ДЛЯ СЕКВЕНУВАННЯ ВСЬОГО ГЕНОМУ НА MISEQ

Док. No. PNL Doc. 38

Вер. No. 02

Дата набуття чинності:

Сторінка 32 від 32

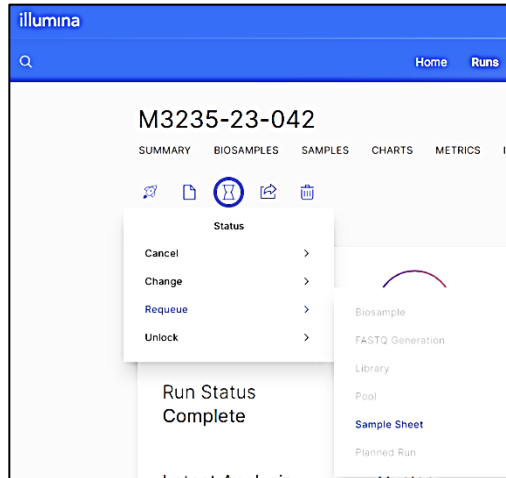
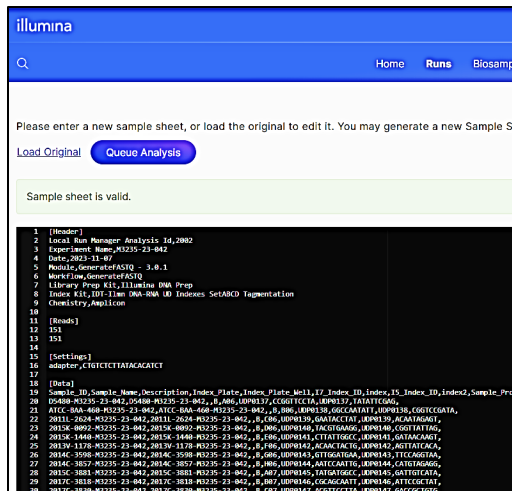


Рисунок 12. Пошук зразка аркуша для прогону на вимогу.

2.2.4. Виберіть "Load Original/Завантажити оригінал", щоб завантажити оригінальний аркуш зразків (Рис. 13).



Малюнок 13. Скопіюйте та вставте виправлений зразок аркуша для циклу, який потрібно замовити.

2.2.5. Скопіюйте та вставте з простого текстового редактора виправлений зразок і натисніть на кнопку "Queue Analysis/Аналіз черги" (Рис. 13).

2.2.6. Статус на вкладці "Summary/Підсумки" показуватиме "Analyzing/Аналізую" під час процесу повторного аналізу і "Complete/Завершено" після завершення.