

# MiSeq

## 系统指南



本文档及其内容归 Illumina, Inc. 及其附属公司（“Illumina”）所有，并且仅供其客户用于与本文档内所描述的产品用途相关的合同用途，不得用于其他任何目的。在未获得 Illumina 的事先书面同意的情况下，不得出于任何目的使用或分发本文档及其内容，和/或以其他任何方式对其进行传播、披露或复制。Illumina 不通过本文档向第三方授权其任何专利、商标、所有权或习惯法权利或类似权利。

本文档中的说明必须由具备资格且受过相关培训的人员严格且明确执行，以确保本文档中描述的产品能够获得适当且安全的使用。在使用此类产品之前，相关人员必须通读并理解本文档中的所有内容。

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

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

© 2018 Illumina, Inc. 保留所有权利。

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

## 修订历史记录

文档号	日期	更改描述
材料号 20024228 文档号 15027617 v03	2018 年 5 月	<p>删除了登录操作系统所需的默认用户名和密码。Illumina 建议使用站点专用的凭据。</p> <p>在“自定义系统设置”部分添加了有关 Illumina 预防性监控服务的信息。</p> <p>为试剂仓添加了有关所需冷却器温度范围的说明。</p> <p>添加了备用 MiSeq Reporter 并删除了对 Local Run Manager 的引用。</p> <p>将指南的名称从《MiSeq 测序系统指南》更改为《MiSeq 系统指南》。</p> <p>对文本进行了细微的编辑。</p>
材料号 20024228 文档号 15027617 v02	2018 年 1 月	<p>针对 Local Run Manager、样品表和手动测序模式添加了新的运行配置选项。</p> <p>从引用 MiSeq Reporter 改为引用 Local Run Manager。</p> <p>在故障诊断附录中添加了“解决冷却器温度范围”。</p> <p>在“自定义系统设置”主题中，添加了有关收集仪器性能数据的新说明。</p> <p>将指南的名称从《MiSeq 系统指南》更改为《MiSeq 测序系统指南》。</p>
材料号 20000262 文档号 15027617 v01	2015 年 9 月	<p>将指南的名称从《MiSeq 系统用户指南》更改为《MiSeq 系统指南》。</p> <p>MCS v2.6 中新增内容，添加了 BaseSpace Onsite 信息。</p> <p>重新整理了指南信息，以任务为中心而非屏幕。</p> <p>对所有“Welcome（欢迎）”屏幕的引用均更改为对“Home（主页）”屏幕的引用。</p> <p>添加了《MiSeq 试剂盒试剂制备指南》中的信息，包括流动槽类型、试剂夹盒溶液以及试剂夹盒解冻说明。有关所有其他 MiSeq 试剂盒的信息，请访问 Illumina 网站，网址为：<a href="http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.html">support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.html</a>。</p> <p>将维护清洗的预期清洗量从 17.25 毫升更正为 51.75 毫升。</p> <p>更新了工作流程步骤的顺序，首先准备试剂夹盒，然后根据需要对手库进行变性和稀释。</p> <p>将故障诊断信息移至附录 A。</p> <p>将输出文件夹信息和流动槽小区信息移至附录 B。</p> <p>将有关管理文件的信息移至“维护”章节。</p> <p>将运行后清洗说明从“维护”章节移至“测序”章节。</p> <p>“执行运行”章节名称现改为“测序”。</p> <p>将引用初级分析更改为引用 RTA 软件执行的分析。</p> <p>更新了使用模板管路清洗执行运行后清洗过程的稀释说明，将 6% NaOCl 更改为 5% NaOCl。</p> <p>将 5% NaOCl 的部件号添加到用户自备耗材列表。</p>

文档号	日期	更改描述
部件号 15027617 修订版 O	2014 年 9 月	更新了以下信息： <ul style="list-style-type: none"> <li>• MCS v2.5 中新增内容，更新了运行后清洗选项 – 将模板管路清洗包括在内</li> <li>• 更新了使用次氯酸钠执行运行后清洗的说明，更改为模板管路清洗</li> <li>• 添加了运行后清洗的预期清洗量</li> </ul> 添加了关于更多资源、运行选项、二级分析选项、仪器清洗和流动槽盖子颜色的 VeriSeq PGS 工作流程信息。
部件号 15027617 修订版 N	2014 年 6 月	添加了适用于 VeriSeq PGS 工作流程的信息。 更新了簇生成和密度的运行指标信息。 删除了防病毒软件信息。请参见《MiSeq 系统场地准备指南》。
部件号 15027617 修订版 M	2014 年 1 月	更新为 MCS 2.4 版中引入的更改： 添加了用于发送故障诊断文件的打包日志功能。
部件号 15027617 修订版 L	2013 年 10 月	将系统软件的重新启动添加为运行前步骤。 将微量离心机试管添加到用户自备耗材列表。 MiSeq 软件不再是独立章节，而是相关章节内容分散到整个指南中。 删除了自定义配方文件夹的相关信息。 删除了 MiSeq 试剂盒的建议簇密度范围的相关信息。 删除了 MiSeq 试剂盒的相关详细信息并添加了试剂盒功能的概述。有关详细信息，请参见您所使用的试剂盒的试剂制备文档。 添加了商标声明内容。
部件号 15027617 修订版 K	2013 年 8 月	更正了格式错误。
部件号 15027617 修订版 J	2013 年 8 月	添加了 MCS v2.3 和 MiSeq 试剂盒 v3 的运行描述。 更新了以下信息： <ul style="list-style-type: none"> <li>• 试剂盒与版本兼容性，将 MiSeq 试剂盒 v3 包含在内</li> <li>• 自定义配方文件夹描述，将 v3 子文件夹包含在内</li> <li>• 更改了 v2 的簇密度范围；添加了 v3 的范围</li> <li>• 图像文件的输出路径</li> </ul> 更正了纳米流动槽 (D) 和微米流动槽 (G) 的流动槽条形码。 删除了 MiSeq 试剂盒的相关信息，将溶液和流动槽类型包含在内。有关详细信息，请参见《MiSeq 试剂制备指南》（文档号 15044983）。

文档号	日期	更改描述
部件号 15027617 修订版 H	2013 年 3 月	<p>添加了标题为 <i>MiSeq 概念</i> 的小节，介绍了分析工作流程、清单文件和样品表。</p> <p>删除了 FASTQ 文件生成和清单文件格式的信息，以及分析工作流程和样品表的详细信息。有关这些主题的信息，请参见《<i>MiSeq Reporter 用户指南</i>》（部件号 15028784）或《<i>MiSeq 样品表快速参考指南</i>》（部件号 15028392）。</p> <p>删除了制备自定义引物的说明。有关详细信息，请参见在 <i>MiSeq 上使用自定义引物</i>（部件号 15041638）。</p>
部件号 15027617 修订版 G	2013 年 1 月	<p>删除了有关稀释 DNA 文库并使其变性以及制备 Illumina PhiX 对照品的说明。请参见 <i>制备 DNA 文库以在 MiSeq 上测序</i>（部件号 15039740）。</p> <p>更新了仪器清洗说明，即，将 25 毫升的 10% Tween 20 注入到 475 毫升的实验室级用水中，而不是 500 毫升的实验室级用水中。</p>
部件号 15027617 修订版 F	2012 年 11 月	<p>添加了以下新信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 添加了新的 MiSeq 试剂盒的试剂盒描述：MiSeq 纳米试剂盒和 MiSeq 微米试剂盒</li> <li>• 添加了流动槽类型概述</li> <li>• 添加了富集分析工作流程的描述</li> </ul> <p>更新了以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• MCS v2.1 的新增内容包括：更新了“Perform Wash（执行清洗）”屏幕，添加了运行后清洗选项和提起吸管命令</li> <li>• 更新了版本兼容性表格，将纳米和微米试剂盒附属物包含在内</li> <li>• 更新了版本兼容性信息，将新试剂盒包含在内</li> </ul>
部件号 15027617 修订版 E	2012 年 10 月	<p>更新了以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 更正了 PhiX 对照品制备说明，并预计所制备的 PhiX 对照品的簇密度为 1000 – 1200 K/mm<sup>2</sup></li> <li>• 标注了变性并稀释文库过程（<i>制备文库</i>）不适用于 Nextera XT 文库和 TruSeq Amplicon 文库</li> <li>• 将升级名称由“MiSeq 扩展包”更改为“MiSeq 硬件升级”</li> <li>• 在“更多资源”列表内添加了《<i>MiSeq Reporter 用户指南</i>》。</li> </ul>

文档号	日期	更改描述
部件号 15027617 修订版 D	2012 年 7 月	<p>更新了 MCS v2.0 的软件描述。            添加了以下新信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 添加了标题为 <i>MCS 中的新增内容</i> 的小节，用于描述新软件功能、界面更改和 workflow 更改</li> <li>• 添加了 MiSeq 试剂盒 v2 (500 次循环) 的商品目录号和描述</li> <li>• 添加了“版本兼容性和要求”小节</li> <li>• 添加了 14 小区双面流动槽成像所需的 MiSeq 扩展包的描述</li> <li>• 添加了双面流动槽小区编号的描述</li> <li>• 添加了 Nextera XT 文库的 PCR 扩增子分析 workflow</li> <li>• 添加了在清洗过程中使用 10% Tween 20 和预期清洗量</li> <li>• 为 RFID 读取失败过程添加了试剂夹盒版本</li> </ul> <p>更新了以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 将 IMF、CMF 和 AMX 的试剂缩写分别更改为 v2 试剂名称 IMS、CMS 和 AMS</li> <li>• 将 PhiX 浓度从 8 皮摩尔/升更改为 12.5 皮摩尔/升</li> <li>• 将建议的最终溶液的最大 NaOH 浓度更改为 1 纳摩尔/升</li> <li>• 提到需要先进行维护清洗，然后取消仪器的备用模式并开始后续运行的设置步骤</li> <li>• 删除了“样品表参数”部分和 workflow 中的样品表设置步骤；Illumina 建议在样品制备之前创建样品表（请参见《MiSeq 样品表快速参考指南》（部件号 15028392）和《Illumina Experiment Manager 用户指南》（部件号 15031335））。</li> </ul>
部件号 15027617 修订版 C	2012 年 4 月	<p>更新了 MCS v1.2 的软件描述            添加了以下新过程和部分：BaseSpace 概述、使用自定义引物、生成 FASTQ 文件、流速错误故障诊断、执行液量测试、执行维护清洗以及闲置仪器，包括备用清洗。</p> <p>更新了以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 将扩增子 workflow 的名称更新为自定义扩增子；将短序列组装 workflow 的名称更新为组装；添加了生成 FASTQ workflow</li> <li>• 添加了运行文件夹和文件的描述；更新了运行文件夹命名；添加了输出文件大小</li> <li>• 在“样品表参数”中将基因组文件夹列为扩增子测序的必需内容</li> <li>• 添加了有关稀释 NaOH 以使文库变性的说明</li> <li>• 更新了“解决 RFID 读取失败”以包括 MiSeq 自我服务说明</li> <li>• 列出了用于对运行性能进行故障诊断的文件和文件夹</li> </ul>

文档号	日期	更改描述
部件号 15027617 修订版 B	2011 年 12 月	<p>更新了 MCS v1.1 的软件描述            添加了有关防病毒保护的信息            更新了以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 解决 RFID 失败的说明</li> <li>• 制备文库 — 更改为 0.2 摩尔/升 NaOH</li> <li>• 运行文件夹命名约定</li> <li>• 所需磁盘空间和存储容量</li> <li>• 运行设置步骤 — 添加了有关“设置样品表”的更多信息</li> <li>• 运行设置步骤 — 添加了处置剩余 PR2 的注意事项</li> <li>• 分析持续时间 — 添加了分析超过两小时的情况</li> <li>• 分析输入要求 — 将清单文件列为 TruSeq 自定义扩增子文库的必需内容</li> <li>• 更正了“MiSeq 试剂盒溶液”中的 HT1 试管尺寸</li> <li>• 更改了对 Myllumina 的 iCom 参考</li> </ul>
部件号 15027617 修订版 A	2011 年 9 月	初始版本





# 目录

<b>第 1 章概述</b>	<b>1</b>
简介	1
更多资源	1
组件	2
MiSeq 概念	4
系统软件	4
二级分析选项	6
Sequencing Analysis Viewer	7
所需磁盘空间	7
MiSeq 试剂盒概述	7
<b>第 2 章入门</b>	<b>11</b>
启动 MiSeq	11
自定义系统设置	11
配置 BaseSpace 更新的通知	12
设置电子邮件首选项	12
设置默认的文件夹位置	12
用户自备的耗材	13
<b>第 3 章测序</b>	<b>15</b>
简介	15
运行持续时间	15
MiSeq 工作流程	16
解冻试剂夹盒	17
检查试剂夹盒	17
变性和稀释文库	18
装入样品文库	18
使用 MCS 设置运行	18
清洁流动槽	19
装入流动槽	20
装入试剂	21
启动运行	23
监控运行	24
执行运行后清洗	26
<b>第 4 章维护</b>	<b>29</b>
维护频率	29
VeriSeq PGS 工作流程的维护频率	29
执行维护清洗	30
执行备用清洗	32
管理文件	34
软件更新	35
关闭仪器	36

<b>附录 A 故障诊断</b> .....	<b>37</b>
简介 .....	37
用于故障诊断的打包日志 .....	37
执行系统检查 .....	38
暂停或停止运行 .....	38
手动提起试剂夹盒吸管 .....	40
解决运行设置错误 .....	40
解决 RFID 读取失败 .....	40
执行液量测试 .....	41
测量预期的清洗量 .....	42
配置系统设置 .....	42
<b>附录 B 输出文件和文件夹</b> .....	<b>45</b>
运行文件夹 .....	45
MiSeqOutput 文件夹内容 .....	45
RTA 文件夹和文件 .....	46
<b>索引</b> .....	<b>49</b>
<b>技术协助</b> .....	<b>53</b>

# 第 1 章概述

简介 .....	1
更多资源 .....	1
组件 .....	2
MiSeq 概念 .....	4
系统软件 .....	4
二级分析选项 .....	6
Sequencing Analysis Viewer .....	7
所需磁盘空间 .....	7
MiSeq 试剂盒概述 .....	7

## 简介

Illumina® MiSeq® 系统结合了经证明的边合成边测序（sequencing by synthesis，简称 SBS）技术和创新工作流程，这样您只需八小时就能从 DNA 完成数据分析。MiSeq 在一台仪器上集成了簇生成、测序和数据分析。

## 功能

- ▶ **自动化** — 设置运行后（包括装入预先注入溶液的试剂夹盒、缓冲液瓶和流动槽），就不再需要其他手动操作。
- ▶ **预先注入溶液的试剂夹盒** — 经特别设计的一次性试剂夹盒，预先注入了可用于执行簇生成和测序的试剂，包括双末端测序试剂和标签试剂。集成的无线射频识别（Radio-frequency identification，简称 RFID）跟踪，可实现精确耗材跟踪。
- ▶ **界面控件** — MiSeq Control Software (MCS) 界面提供用于配置仪器、设置和监控运行以及执行维护过程的控件。
- ▶ **流动槽方便装载** — 将流动槽装到仪器上时，一种卡紧机械装置会自动定位流动槽。集成的无线射频识别（Radio-frequency identification，简称 RFID）跟踪，可实现精确耗材跟踪。
- ▶ **创新射流体系结构** — MiSeq 射流系统在测序期间的化学循环时间方面的效率极高。
- ▶ **实时分析（Real Time Analysis，简称 RTA）** — 集成分析软件会在测序运行期间执行仪器上的实时数据分析（包括图像分析和碱基检出），节省了宝贵的下游分析时间。
- ▶ **集成的二级分析软件** — MiSeq Reporter 软件可处理 RTA 分析产生的数据，以执行对准并提供有关分析的每个样品的信息。

## 更多资源

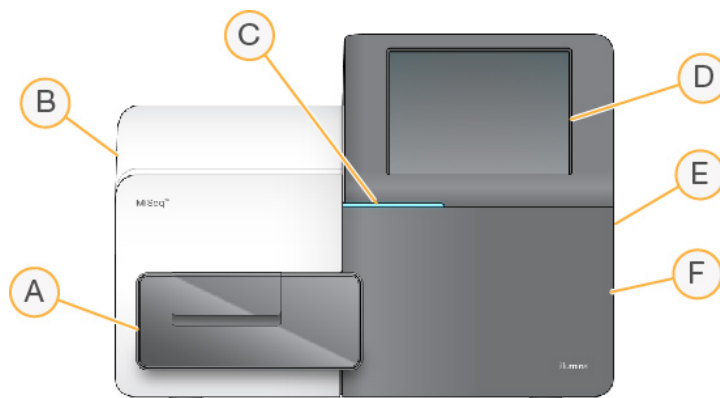
Illumina 网站上的 [MiSeq 系统支持页面](#) 提供了更多资源。这些资源包括软件、培训、兼容产品及以下文档。请务必查看支持页面获取最新版本。

资源	描述
《MiSeq 系统场地准备指南》 (文档号 15027615)	提供实验室空间规范、电气要求和环境注意事项。
《MiSeq 系统安全和合规性指南》 (文档号 15027616)	提供有关仪器标签、合规性证书和安全注意事项的信息。
《Illumina Experiment Manager 用户指南》 (文档号 15031335)	为不同的工作流程和文库类型提供有关如何创建样品板和样品表的说明。
《BlueFuse Workflow Manager 用户指南》 (文档号 1000000028842)	提供有关如何创建适用于 VeriSeq PGS 工作流程的样品板和样品表的说明。

资源	描述
《MiSeq 样品表快速参考指南》 (文档号 15028392)	提供有关在样品表中添加样品表设置的信息。
《MiSeq 系统变性和稀释文库指南》 (文档号 15039740)	提供有关在 MiSeq 上测序之前稀释已制备样品文库并使其变性以及制备 PhiX 对照品的说明。此步骤适用于大多数文库类型。
《MiSeq 自定义引物指南》 (文档号 15041638)	提供有关制备和装入自定义引物以及编辑自定义引物的样品表的说明。
《MiSeq Reporter 用户指南》 (文档号 15042295)	提供对分析过程、分析工作流程和 MiSeq Reporter 生成的输出文件的全面概述，以及计算要求、脱机安装说明和故障诊断信息。
MiSeq Reporter 联机帮助	提供有关使用 MiSeq Reporter 软件的说明。
《BlueFuse Multi 软件指南》 (文档号 15053620)	提供对分析过程、分析工作流程和 BlueFuse Multi 生成的文件的全面概述，以及计算要求和故障诊断信息。该指南适用于 VeriSeq PGS 工作流程。
《BaseSpace 用户指南》 (部件号 15044182)	提供有关使用 BaseSpace 的说明以及为每个分析工作流程生成的图表的描述。
《BaseSpace Onsite 系统指南》 (文档号 15049148)	提供 BaseSpace Onsite 系统的使用说明。

## 组件

MiSeq 由 1 个触摸屏显示器、1 个状态栏、1 个电源按钮（与 USB 端口相邻）和 3 个仓室组成。



- A **流动槽仓** — 内含流动槽台，用于在整个运行过程中放置流动槽。流动槽台发动机会将该平台移出封闭式光学模块以便于装入流动槽，运行开始时会将其移回原位。
- B **封闭式光学仓** — 包含实现流动槽成像的光学组件。
- C **状态栏** — 指出流动槽状态，包括：可供测序（绿色）、处理中（蓝色）或需要引起注意（橙色）。
- D **触摸屏显示器** — 显示用于配置系统和设置运行的控制软件界面。
- E **外部 USB 端口** — 方便通过触摸屏显示器将文件和数据转移到仪器计算机。
- F **试剂仓** — 以适当的温度保存试剂，放置清洗液和废液瓶。使用磁性锁关闭试剂仓门。

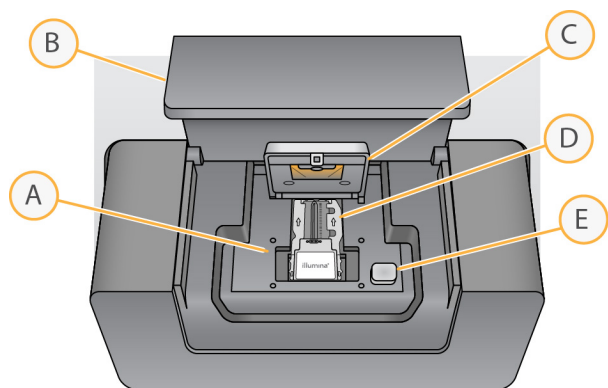
MiSeq 界面使用触摸屏显示器指导您完成运行设置步骤。要装入运行组件需要打开试剂仓和流动槽仓。

## 流动槽仓

流动槽仓中有流动槽台、热力站以及与流动槽的射流连接。流动槽台用于放置流动槽，流动槽夹用于固定流动槽。当流动槽夹锁关闭时，锁链附近的两个定位销会自动定位流动槽。

热力站位于流动槽台下方，控制簇生成和测序所需的流动槽温度变化。

图1 流动槽仓



- A 流动槽台
- B 流动槽仓门
- C 流动槽夹
- D 流动槽
- E 流动槽夹开锁按钮

## 试剂仓

试剂仓内设有试剂冷却器以及供放置清洗缓冲液 (PR2) 瓶和废液瓶的位置。要维持一致的温度, 请仅在指示下打开和关闭试剂冷却器。

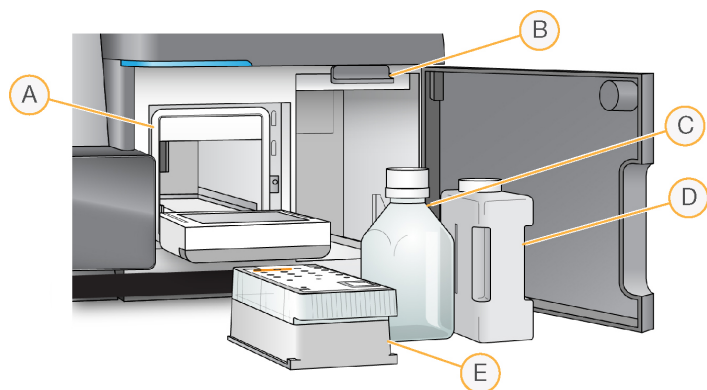
### 注意

试剂冷却器所需的温度范围为 2°C 到 11°C。

在运行期间, 试剂冷却器装有一次性试剂夹盒。在仪器清洗期间, 试剂冷却器装有洗涤塔盘。软件会在运行期间的适当时间自动将吸管降到试剂夹盒的每个槽中, 具体取决于执行的过程。

试剂冷却器的右侧是放置 PR2 瓶和废液瓶的相应插槽。吸管手柄将两个瓶子锁定到位, 并将适当的吸管伸入每个瓶子中。通过吸管和射流管路抽出试剂, 然后输送到流动槽。整个过程中废弃的试剂会传送到废液瓶中。

图2 试剂仓组件



- A 试剂冷却器
- B 吸管手柄 (图上所示为升起位置)
- C PR2 瓶
- D 废液瓶
- E 试剂夹盒

## E 试剂夹盒

## MiSeq 概念

MiSeq 上的运行设置步骤通用以下概念和术语。

概念	描述
分析工作流程	由 MiSeq Reporter 执行的二级分析过程。每次运行的分析工作流程均在样品表中指定或由所选模块指定。
清单	指定比对步骤中要使用的参考基因组和目标参考区域的文件。对于需要清单的工作流程，会在样品表中指定清单文件，并将该文件复制到 MCS 中指定的清单文件夹。
参考基因组	FASTA 格式的文件，包含了分析期间使用的基因组序列。对于大多数分析工作流程，参考基因组文件都在样品表中指定。
运行文件夹	由 RTA 软件填充的文件夹结构 (MiSeqOutput 文件夹) 或由 MiSeq Reporter 填充的文件夹 (MiSeqAnalysis)。有关详细信息，请参见 <a href="#">运行文件夹 (第 45 页)</a> 。
样品表	逗号分隔值 (*.csv) 格式的文件，内含用于设置和分析测序运行的信息，包括样品及其标签序列的列表。 在 MiSeq 上执行运行设置步骤期间必须提供样品表。运行开始后，将样品表重命名为 SampleSheet.csv 并复制到以下运行文件夹：MiSeqTemp、MiSeqOutput 和 MiSeqAnalysis。

有关分析工作流程和清单文件格式的详细信息，请参见《*MiSeq Reporter 软件指南*》(文档号 15042295)。

有关样品表的详细信息，请参见《*MiSeq 样品表快速参考指南*》(文档号 15028392)。

## 系统软件

仪器软件套装包括用于执行测序运行、仪器内分析和相关功能的集成式应用程序。

- ▶ **MiSeq Control Software (MCS)** — 用于控制仪器操作。开始运行之前，MiSeq Control Software (MCS) 界面将引导您完成装入流动槽和试剂的步骤。在运行过程中，还会显示质量统计信息概述。
- ▶ 运行期间，MCS 将操作流动槽台、分配试剂、控制流动槽的温度，并捕获流动槽上簇的图像。MCS 会根据样品表中指定的参数执行运行。
- ▶ **实时分析 (RTA) 软件** — 执行图像分析和碱基检出，并为每次循环的每个碱基分配质量分值。图象会临时存储在运行文件夹中，以供 RTA 处理，并会在 RTA 分析结束后自动删除。
- ▶ **集成的二级分析软件** — 执行二级分析。MiSeq Reporter 用于处理 RTA 软件生成的碱基检出，并为每个请求的基因组生成有关对准、变异和重叠群组装的信息。样品表中指定的分析工作流程决定了所执行的分析类型。有关详细信息，请参见 *MiSeq Reporter 软件 (第 7 页)*。





可独立于仪器使用的可选软件包括 Sequencing Analysis Viewer (SAV)。有关详细信息，请参见 *Sequencing Analysis Viewer (第 7 页)*。

## 状态图标

控制软件界面上的状态图标用于指示运行设置期间或运行期间的状况改变。图标上的数字表示状态的状况编号。

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

可以通过选择窗口上边缘的图标，过滤状态窗口中显示的消息类型。选择图标可在显示和隐藏状况之间进行切换。

状态图标	状态名称	描述
	状态正常	未发生改变。系统正常。
	注意	重要信息。建议您采取措施。
	警告	警告不会使运行停止。但是，某些警告需要您采取措施才能继续后面的流程。
	错误	错误通常会导致运行停止，并且通常需要您采取措施才能继续当前运行。

## 活动指示器

活动指示器图标显示仪器当前正在执行的活动。

图3 活动指示器



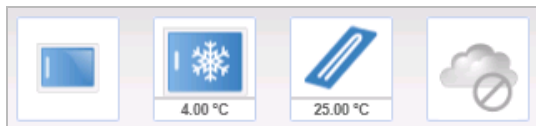
从左到右，活动指示器依次表示以下活动：

- ▶ Y 轴移动
- ▶ Z 轴移动
- ▶ 激活电子功能
- ▶ 使用相机
- ▶ 泵入射流系统

## 传感器指示器

传感器指示器显示于每个界面屏幕的底端，表示仪器组件的状态。

图4 传感器指示器



从左到右，传感器指示器表示以下组件：

- ▶ 流动槽仓门处于关闭或打开位置
- ▶ 试剂冷却器的温度，单位为 °C
- ▶ 流动槽的温度，单位为 °C
- ▶ BaseSpace® 连接状态（图示为未连接）

## 二级分析选项

可以使用 MiSeq Reporter 在仪器计算机上分析 MiSeq 测序数据，也可以使用 BaseSpace™ Onsite 在联网服务器上进行分析，或者使用 BaseSpace 在云端进行分析。这些应用程序会为每个请求的基因组和多个样品运行的每个样品生成有关对准、变异和重叠群组装的信息。如果执行 VeriSeq™ PGS 工作流程，请使用 BlueFuse™ Multi 软件进行分析。

## BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 概述

BaseSpace 是 Illumina 云计算环境。BaseSpace Onsite 在专用服务器上提供计算环境，以及运行设置工具和分析选项。

设置测序运行时，请登录到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite。在使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 时，还可以选择在本地存储运行数据。有关详细信息，请参见 [自定义系统设置（第 11 页）](#)。

当您开始测序运行时，BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 图标将更改为指示 MiSeq 已连接到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite，正在将数据文件转移到指定位置。

图 5 连接到 BaseSpace 图标

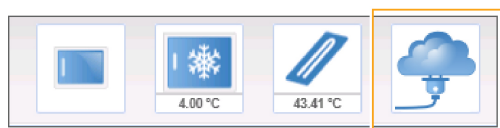
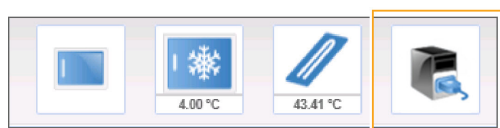


图 6 连接到 BaseSpace Onsite 图标



使用 BaseSpace 时，数据文件将在传送中加密，在分析过程中解密，并在存储时再次加密。使用 BaseSpace Onsite 时，数据文件将在传送中加密，在分析过程中解密，并在存储时选择再次加密（可选）。

在运行结束时或转移完所有 RTA 分析文件时，BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 即会自动断开与 MiSeq 的连接。如果 Internet 连接中断，一旦从发生中断的时间点恢复连接，将继续上载分析文件。

在最后一个碱基检出文件上载到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 后，将立即开始数据的二级分析。在 BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 上支持与使用 MiSeq Reporter 的仪器上分析相同的分析工作流程。

对于 MiSeq Reporter，安装期间会提供若干基因组。BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 仅支持 MiSeq Reporter 随附的基因组。

您可以通过 [basespace.illumina.com](https://basespace.illumina.com) 连接到 BaseSpace。使用您的 MyIllumina 帐户登录名登录。有关 BaseSpace 的详细信息，请参见《*BaseSpace 用户指南*》（文档号 15044182）以及 Illumina 网站上的 BaseSpace 支持页面。

有关 BaseSpace Onsite 的详细信息，请参见《*BaseSpace Onsite 系统指南*》（文档号 15049148）以及 Illumina 网站上的 BaseSpace Onsite 支持页面。



## MiSeq Reporter 软件

MiSeq Reporter 是一个 Windows 服务应用程序，用于处理 RTA 软件生成的碱基检出。当 RTA 软件完成测序运行的分析后，MiSeq Reporter 会立即开始二级分析。

MiSeq Reporter 在仪器计算机上运行。但是，必须通过另一台与 MiSeq Reporter 连接到同一网络的计算机上的 Web 浏览器查看软件界面。

二级分析完成后，会将一个名为 CompletedJobInfo.xml 的文件写入运行文件夹。有关详细信息，请参见《MiSeq Reporter 软件指南》（文档号 15042295）。

## 分析期间测序

MiSeq 系统计算资源专用于测序或分析。

使用 MiSeq Reporter 时，如果之前运行的二级分析尚未完成便在 MiSeq 上启动了新的测序运行，则会自动停止 MiSeq Reporter 分析。

要重新启动 MiSeq Reporter，请在新的测序运行完成后，使用“Requeue（重新排队）”功能。

新运行完成测序后，之前运行的二级分析会自动从头重新开始。

## Sequencing Analysis Viewer

借助 Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV)，您可以在不干扰运行的情况下更细致地监控运行。MiSeq 必须联网后才能使用 SAV 查看初级分析结果。

SAV 可让您在运行期间生成指标时查看指标，还可以稍后于运行结束后查看指标。将 SAV 安装在独立于 MiSeq 的计算机上，且必须能够访问与仪器相连的相同网络。启动软件之后，浏览至运行的输出文件夹。

在模板生成后，SAV 提供由 RTA 生成的指标，并将这些指标绘制成图表、图形和表格。



### 注意

SAV 对 Illumina 测序系统是通用的，这些系统大多数使用 8 通道流动槽。某些视图包含显示通道 1–8 的下拉列表。由于 MiSeq 流动槽为单通道，请选择 All（全部）或 Lane 1（通道 1）。有关详细信息，请参见《Sequencing Analysis Viewer 用户指南》（文档号 15020619）。

## 所需磁盘空间

集成的仪器计算机大约有 550 GB 的存储容量。

在启动运行之前，软件会检查可用磁盘空间。如果没有足够的磁盘空间可供运行，会显示一条消息指出需要的磁盘空间。

如果系统提示需要腾出磁盘空间，请根据具体情况移动或删除较旧的运行文件夹。有关详细信息，请参见 [管理文件](#)（第 34 页）。清理出足够的磁盘空间后，选择 Restart Check（重新启动检查）。

## MiSeq 试剂盒概述

MiSeq 试剂盒是执行测序运行所需的一次性试剂盒。提供不同的类型和规格。每种类型的 MiSeq 试剂盒都包含一个试剂盒专用的流动槽类型和执行一次运行所需的所有试剂。

试剂盒中提供的流动槽、PR2 瓶和试剂夹盒均使用射频识别（radio-frequency identification，简称 RFID）进行精确的耗材跟踪并确保兼容性。

请始终使用与您的流动槽类型相匹配的试剂夹盒。如果试剂夹盒不兼容，运行设置期间会显示一条消息，提示您装入兼容的试剂夹盒。

有关可用试剂盒的描述，请访问 Illumina 网站上的 [MiSeq 试剂盒产品页面](#)。

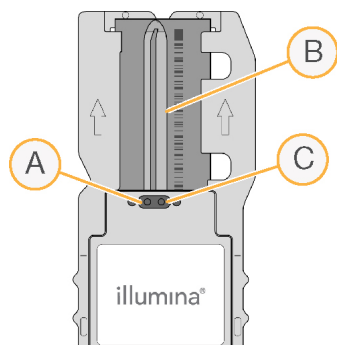
## 流动槽

MiSeq 流动槽是一次性玻璃制底物，其上生成簇及执行测序反应的所在。

试剂通过入口进入流动槽，通过单通道成像区域，然后从出口流出流动槽。从流动槽排出的废液将装入废液瓶中。

文库在设置运行前装入试剂夹盒，运行开始后样品便会自动传送到流动槽。

图 7 MiSeq 流动槽



- A 出口
- B 成像区域
- C 入口

## 流动槽盖子颜色

流动槽容器盖子的颜色可指示流动槽类型：

流动槽	流动槽盖子颜色
标准流动槽 PGS 流动槽	透明
微米流动槽	绿色
纳米流动槽	黄色

## 试剂夹盒概述

MiSeq 试剂夹盒是一次性耗材，由预先装入簇生成和测序试剂的封箔槽组成，这些试剂足够对一个流动槽测序。

夹盒上的每个槽都有编号。在位置 17 上将样品文库装入夹盒，此位置标有 Load Samples（装入样品）。



### 警告

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

## 预留的槽

图 8 带有编号槽的试剂夹盒

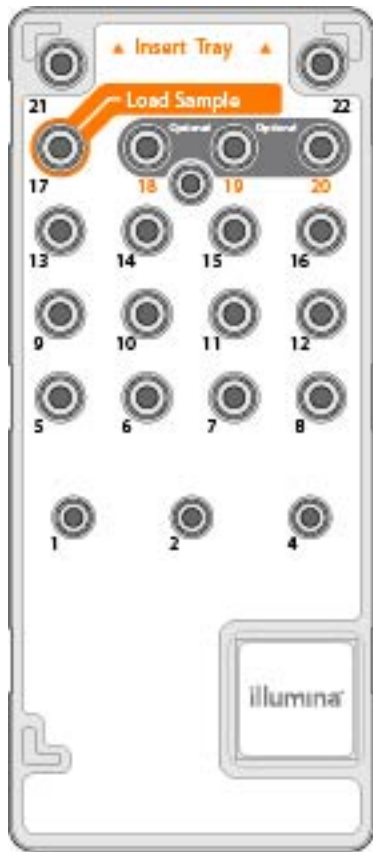


表 1 试剂夹盒槽

位置	试剂名称	描述
8	LDR	变性试剂（含有甲酰胺）
17	预留	<b>装入样品</b> （为样品文库预留）
18	预留	为自定义片段 1 引物预留 <b>[可选]</b>
19	预留	为自定义标签片段引物预留 <b>[可选]</b>
20	预留	为自定义片段 2 引物预留 <b>[可选]</b>



### 注意

有关在 MiSeq 试剂夹盒上使用自定义引物的详细信息，请参见《MiSeq 自定义引物指南》（文档号 15041638）。



## 第2章入门

启动 MiSeq .....	11
自定义系统设置 .....	11
配置 BaseSpace 更新的通知 .....	12
设置电子邮件首选项 .....	12
设置默认的文件夹位置 .....	12
用户自备的耗材 .....	13

### 启动 MiSeq

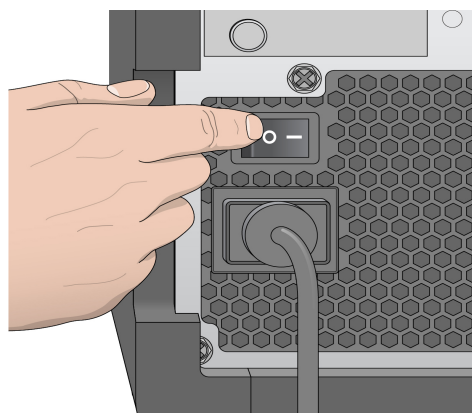
- 1 将仪器后面的电源开关切换到 | (打开) 位置。



#### 注意

为了获得最佳性能，请让仪器持续保持开启状态。但是，如果必须关闭仪器，请参见[关闭仪器](#)（第 36 页）。请至少等待 60 秒，然后再将电源开关切换回“ON（打开）”位置

图9 电源开关位置



- 2 等待系统完成加载，然后登录操作系统。如果需要，可联系您所在机构的管理员获取用户名和密码。操作系统加载后，MiSeq Control Software (MCS) 会自动启动并初始化系统。

### 自定义系统设置

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Run Options（运行选项）。
- 2 选择 Run Settings（运行设置）选项卡。
- 3 选择 Post Run Wash（运行后清洗）或 Maintenance Wash（维护清洗）。  
每次运行之后都需要执行一次仪器清洗。软件要求在设置后续运行前执行一次清洗。“Post-Run Wash（运行后清洗）”选项指定默认执行的清洗类型。运行后清洗大约需要 30 分钟。维护清洗大约需要 1 小时。
- 4 输入 BaseSpace Onsite 服务器位置的地址。  
如果使用 BaseSpace Onsite，则需要 Onsite 服务器设置。
- 5 选择 Send instrument Performance Data to Illumina to aid technical support（将仪器性能数据发送给 Illumina 以为技术支持提供协助），可启用 Illumina 预防性监控服务。软件界面中设置的名称可能会与本指南中的名称有所不同，具体取决于所使用的 MCS 版本。

如果打开此设置，即会将仪器性能数据发送给 Illumina。此数据可帮助 Illumina 更轻松地进行故障诊断以及检测潜在的故障，从而实现预防性维护并最大限度延长仪器正常运行时间。有关此服务的优势的详细信息，请参见 *Illumina 预防性技术说明*（文档号 1000000052503）。

此服务：

- ▶ 不发送测序数据。
- ▶ 要求将仪器连接到可访问互联网的网络。
- ▶ 默认情况下处于打开状态。要想取消此服务，请禁用 **Send Instrument Performance Data to Illumina to aid technical support**（将仪器性能数据发送给 Illumina 以为技术支持提供协助）设置。

- 6 对于 MiSeq Reporter，请选择或清除 **When using BaseSpace or BaseSpace Onsite, replicate analysis locally on MiSeq**（使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 时，本地复制 MiSeq 上的分析）。当使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 时，“Replicate Analysis Locally（在本地复制分析）”设置指定分析处理位置。此设置提供用于在仪器上本地执行分析和在 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 中执行分析的选项。
 

如果使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 时选择了此选项，则 MiSeq Reporter 在运行后自动启动并在本地执行分析。

如果使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 时未选择此选项，则 MiSeq Reporter 在运行后不自动启动，且仅在 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 中执行分析。

如果使用 BlueFuse Multi 执行 VeriSeq PGS 工作流程，请选择此选项。

## 配置 BaseSpace 更新的通知

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 **Manage Instrument**（管理仪器）。
- 2 选择 **Software Update**（软件更新）。
- 3 选择 **Automatically check for new software updates on BaseSpace**（自动检查 BaseSpace 上的新软件更新）。

## 设置电子邮件首选项

可配置 MiSeq 在以下情况下发送电子邮件通知：RTA 分析完成时、仪器上的二级分析完成时或出现严重的 MiSeq 软件错误时。

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 **Run Options**（运行选项）。
- 2 选择 **Email Notifications**（电子邮件通知）选项卡。
- 3 输入以下信息：
  - ▶ **Local SMTP email server address**（本地 SMTP 电子邮件服务器地址）— 使用屏幕键盘输入本地 SMTP 电子邮件服务器地址。必要时，可联系设备管理员获取此信息。
  - ▶ **Sender address**（发件人地址）— 使用屏幕键盘输入发件人电子邮件地址。此地址可以是您的电子邮件地址，也可以是另一个指定用于发送电子邮件通知的地址。
  - ▶ **Recipient addresses**（收件人地址）— 使用屏幕键盘输入每个要接收通知的收件人的电子邮件地址。使用英文逗号将每个电子邮件地址隔开。选择 **Test**（测试）可向通知收件人发送一封测试电子邮件。
  - ▶ **Notify via email when**（发生以下情况时通过电子邮件发出通知）— 针对要触发通知的每个运行事件选中该复选框。

## 设置默认的文件夹位置

文件夹可以位于本地网络，也可以位于仪器计算机上。

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Run Options（运行选项）。
- 2 选择 Folder Settings（文件夹设置）选项卡。
- 3 输入以下文件夹的默认位置。
  - ▶ **配方文件夹** — 设置配方的默认位置。配方是软件用于执行测序运行的 XML 文件。在开始运行时会根据样品表中的参数创建配方，随后将其复制到输出文件夹中。
  - ▶ **样品表文件夹** — 设置样品表的默认位置。样品表在制备文库前创建，其中会包含运行的参数。
  - ▶ **清单文件夹** — 某些文库类型需要提供清单文件。有关样品制备试剂盒的信息，请参见样品制备文档和《样品表快速参考指南》（文档号 15028392）。
  - ▶ **MiSeqOutput** — 针对 MiSeq Reporter 设置分析输出文件的默认位置。将默认输出文件夹更改为网络位置，以便共享、长期存储以及可以选择离线使用 MiSeq Reporter。有关详细信息，请参见[运行文件夹（第 45 页）](#)。

## 用户自备的耗材

开始运行前，确保备妥下列用户自备耗材。

耗材	供应商	用途
备用的 1.0 摩尔/升 NaOH，分子生物学级	一般实验室供应商	将样品文库和 PhiX 对照品 DNA 变性
酒精棉片，70% 甘油 或 70% 乙醇	VWR，商品目录号 95041-714  一般实验室供应商	清洁流动槽支架
一次性无粉手套	一般实验室供应商	一般用途
低尘实验室棉巾纸	VWR，商品目录号 21905-026	清洁流动槽台和盖在装入样品槽上的封箔
擦镜纸，4 x 6 英寸	VWR，商品目录号 52846-001	清洁流动槽
微量离心管	一般实验室供应商	将样品文库和 PhiX 对照品 DNA 变性并稀释
MiSeq 试管	Illumina，部件号 MS-102-9999	清洗模板管路，适用于 VeriSeq PGS 工作流程（对于其他工作流程可选）
浓度为 5% 的 NaOCl	Sigma-Aldrich，商品目录号 239305*	清洗模板管路，适用于 VeriSeq PGS 工作流程（对于其他工作流程可选）
Tween 20	Sigma-Aldrich，商品目录号 P7949	清洗仪器
方头塑料镊子（可选）	McMaster-Carr，商品目录号 7003A22*	从流动槽运输容器中取出流动槽
实验室级用水	一般实验室供应商	清洗仪器

\* 或实验室级等效物

## 实验室级用水准则

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

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





# 第 3 章 测序

简介 .....	15
运行持续时间 .....	15
MiSeq 工作流程 .....	16
解冻试剂夹盒 .....	17
检查试剂夹盒 .....	17
变性和稀释文库 .....	18
装入样品文库 .....	18
使用 MCS 设置运行 .....	18
清洁流动槽 .....	19
装入流动槽 .....	20
装入试剂 .....	21
启动运行 .....	23
监控运行 .....	24
执行运行后清洗 .....	26

## 简介

要在 MiSeq 上执行测序运行，请遵照本章中所述的设置步骤操作。

运行开始后，不需要任何其他用户干预。

可使用 Sequencing Analysis Viewer (SAV) 通过“Sequencing (测序)”屏幕或远程方式监控测序运行。可从 Illumina 网站下载该可选应用程序。

测序运行完成后，请执行仪器清洗。

## 运行持续时间

运行持续时间取决于执行的循环数。借助 MCS v2.3 或更高版本，您最多可将双末端测序运行执行  $2 \times 301$  次测序循环以及任意标签片段。

此外，运行持续时间还取决于您使用的 MiSeq 试剂版本以及仪器上安装的任何性能改进升级。

有关预计的持续时间和其他规格，请访问 Illumina 网站上的 [MiSeq 系统规格页面](#)。

## 一个片段中的循环次数

在一个测序运行中，一个片段中执行的循环次数比分析的循环次数多 1 次。额外多出的这个循环用于定相和预定相计算。

例如，双末端测序 300 次循环运行执行两个 301 次循环片段 ( $2 \times 301$ )，总共 602 次循环。运行结束时，将分析  $2 \times 300$  个循环。

## MiSeq 工作流程



准备要使用的预填充试剂夹盒。



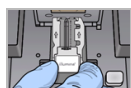
变性和稀释文库（仅适用于部分文库类型）。请参见 *制备文库以在 MiSeq 上测序*（文档号 15039740）。



将文库混合液装到试剂夹盒中的指定槽。



在软件界面中选择 **Sequence（测序）**，开始运行设置步骤。  
**[可选]** 连接到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite。



清洗并彻底干燥流动槽。  
装入流动槽。



装入 PR2 瓶，并确保废液瓶是空的。  
装入试剂夹盒。



复查运行参数和运行前检查结果。  
选择 **Start Run（启动运行）**。



在 MCS 界面或另一台计算机上使用 Sequencing Analysis Viewer (SAV) 监控运行。



执行运行后清洗。

## 簇生成

在簇生成期间，单个 DNA 分子会粘附到流动槽的表面，然后进行桥式扩增以形成簇。

## 测序

簇生成后，会使用特定于四个荧光标记的双脱氧核苷酸的 LED 和过滤组合对簇进行成像。一个小区成像完成后，流动槽会移动到相应位置以曝光下一个小区。此过程会针对测序的每个循环重复进行。图像分析之后，软件会执行碱基检出、过滤和质量评分。

## 分析

运行完成后，MiSeq Reporter 分析软件会自动启动，以执行二级分析，包括对准和变异检出。您可以从其他计算机通过 Internet 连接监控二级分析。有关详细信息，请参见 *MiSeq Reporter 软件* (第 7 页)

### 解冻试剂夹盒

使用室温水槽解冻试剂夹盒。

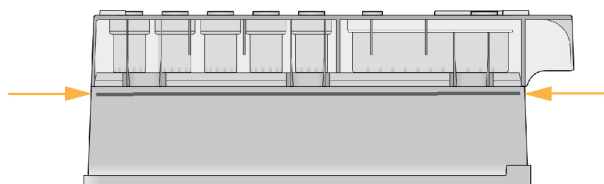


#### 注意

或者，也可以在 2°C 到 8°C 的存储环境中过夜解冻试剂。存储在此温度下的试剂最长稳定时间为一周。

- 1 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出 试剂夹盒。
- 2 将试剂夹盒放入装有足量室温去离子水的水槽中，水要淹没试剂夹盒底部。请勿使水超过试剂夹盒上打印的最高水位线。

图 10 最高水位线



- 3 让试剂夹盒在室温水槽中解冻，直至其完全解冻。
  - ▶ MiSeq v3 夹盒 — 约 60-90 分钟。
  - ▶ MiSeq v2 夹盒 — 约 60 分钟。
- 4 从水槽中取出夹盒，然后在工作台上轻轻拍打夹盒，去除其底部的水分。让夹盒底部变干。

### 检查试剂夹盒

- 1 将试剂夹盒翻转十次以混匀解冻的试剂，然后检查所有位置是否均已解冻。
- 2 检查位置 1、2 和 4 处的试剂以确保其充分混匀且没有沉淀。
- 3 在工作台上轻轻拍打夹盒以减少试剂中的气泡。



#### 注意

MiSeq 吸管会伸到每个槽的底部以吸入试剂，因此请务必使槽中没有气泡。

- 4 将试剂夹盒放在冰上 6 个小时（最多）或置于 2° 到 8°C 的温度下，直到准备好设置运行。为获得最佳结果，请立即装入样品并设置运行。



#### 警告

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

## 变性和稀释文库

如果您的文库类型需要，请稀释文库并使其变性，然后添加可选的 PhiX 对照品。请参见《MiSeq 系统变性和稀释文库指南》（文档号 15039740）。如果要执行 VeriSeq PGS 工作流程，请参见《VeriSeq PGS 文库制备指南》（文档号 15052877）。

**此步骤仅适用于部分文库类型。**某些 Illumina 样品制备方法会生成随时可用的标准浓度混合文库。请参见样品制备指南，了解用于制备样品文库的试剂盒。



### 注意

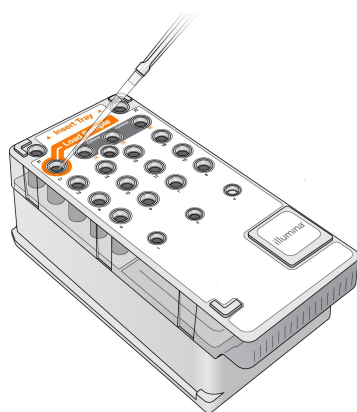
如果您要使用自定义引物，请按照《MiSeq 自定义引物指南》（文档号 15041638）所述制备引物并设置样品表。

## 装入样品文库

当试剂夹盒完全解冻且可供使用时，您即可将已制备好的文库装入夹盒。

- 1 使用无尘实验室棉巾纸将标有 Load Samples（装入样品）的槽封箔口擦拭干净。
- 2 使用洁净的 1 毫升移液器刺穿封箔。
- 3 将 600 微升的已制备文库注入 Load Samples（装入样品）槽。避免接触封箔。

图 11 装入文库



- 4 使用 MiSeq Control Software (MCS) 界面直接继续运行设置步骤。

## 使用 MCS 设置运行

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Manage Instrument（管理仪器）。
- 2 选择 Reboot（重新启动）重新启动系统软件。
- 3 **[可选]** 在“Run Options（运行选项）”屏幕中，检查 MiSeqOutput、配方、样品表和清单的文件夹位置。有关详细信息，请参见[设置默认的文件夹位置（第 12 页）](#)。
- 4 在“Home（主页）”屏幕中，选择 Sequence（测序）开始运行设置步骤。  
在“Home（主页）”屏幕中选择 Sequence（测序）后，会按照下列顺序打开一系列运行设置屏幕：BaseSpace Option（BaseSpace 选项）、Load Flow Cell（装入流动槽）、Load Reagents（装入试剂）、Review（复查）以及 Pre-Run Check（运行前检查）。

## 设置 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 选项

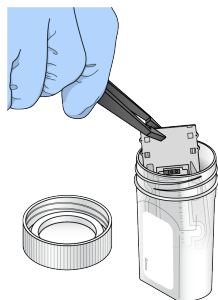
可选择性地使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 运行二级分析。

- 1 从“BaseSpace Options (BaseSpace 选项)”屏幕，选择或清除 Use BaseSpace for storage and analysis (使用 BaseSpace 进行存储和分析) 以及 Use BaseSpace Onsite for storage and analysis (使用 BaseSpace Onsite 进行存储和分析) 复选框。
- 2 选择 Next (下一步)。

## 清洁流动槽

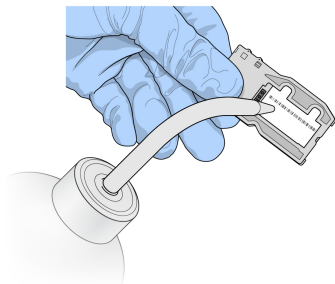
- 1 戴上一副新的无粉手套。
- 2 用塑料镊子夹住流动槽的塑料盒底部，将它从流动槽容器中取出。

图 12 取出流动槽



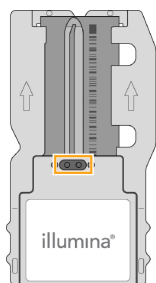
- 3 用实验室级用水轻轻冲洗流动槽，直至完全冲洗掉玻璃盒和塑料盒上的多余盐分。多余盐分会影响流动槽在仪器上的放置。如果盐分在成像区域变干，成像也会受到影响。

图 13 冲洗流动槽



- 4 小心清洁流动槽的黑色端口垫片，使用无绒抹镜布彻底擦干流动槽和夹盒。轻轻拍干垫片和相邻玻璃区域。

图 14 流动槽端口和垫片



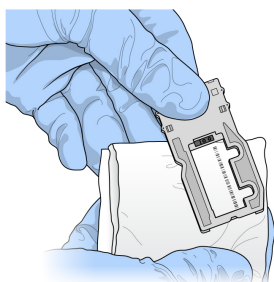
- 5 使用酒精棉片清洁流动槽玻璃。确保玻璃上没有条痕、指印以及线头或组织纤维。



**注意**

请勿使用酒精棉片清洁流动槽端口垫片。

图 15 擦干流动槽

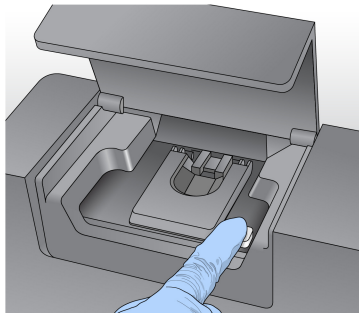


- 6 用无绒抹布擦干多余的酒精。
- 7 确保流动槽端口中没有阻塞物且垫片在流动槽端口周围位置正确。如果垫片看起来离开原位，请轻轻按回使其安全地置于流动槽端口周围。

## 装入流动槽

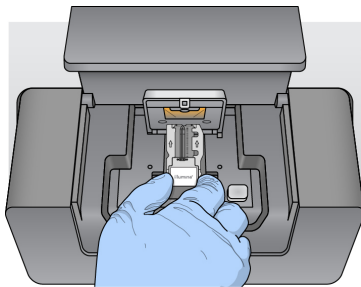
- 1 抬起流动槽仓门，然后按下流动槽夹右侧的开锁按钮。流动槽夹随即打开。

图 16 打开流动槽夹



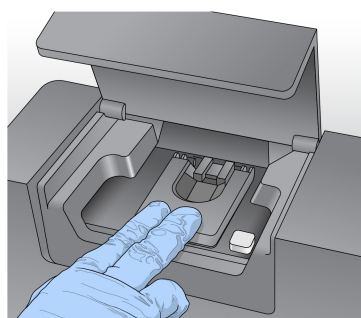
- 2 确保流动槽台无绒毛污物。如果存在绒毛或其他污物，请使用酒精棉片或蘸有乙醇或异丙醇的无绒棉巾擦拭流动槽台。仔细擦拭流动槽台表面，直到其彻底清洁干燥。
- 3 握住流动槽边缘，将流动槽放置在流动槽台上。

图 17 将流动槽放在流动槽台



- 4 轻轻按下流动槽夹以将其合上。  
当流动槽夹合上时，对准定位销会固定流动槽。流动槽夹锁定时，会发出咔哒声。

图 18 合上流动槽夹



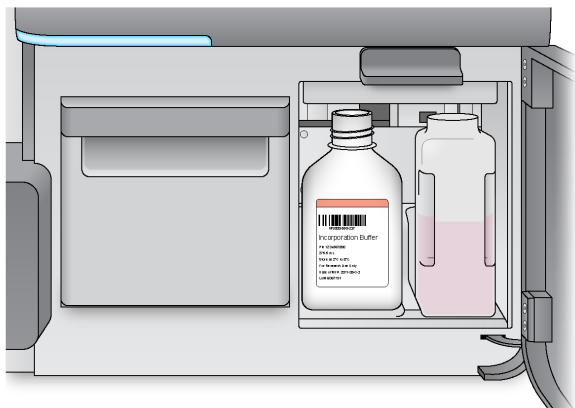
- 5 如果软件无法识别流动槽的 RFID，请参见[解决 RFID 读取失败](#)（第 40 页）。
- 6 关闭流动槽仓门。
- 7 选择 Next（下一步）。

## 装入试剂

### 装入 PR2 并检查废液瓶

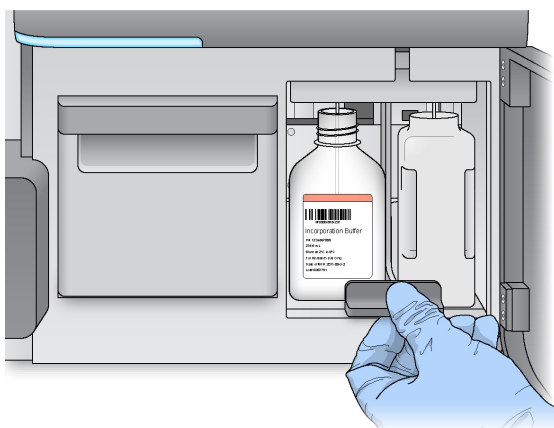
- 1 将 PR2 瓶从 2° 到 8°C 的存储环境中取出。翻转将其混匀，然后取下瓶盖。
- 2 打开试剂仓门。
- 3 拉起吸管手柄直到其锁定到位。
- 4 取出洗瓶并装入 PR2 瓶。

图 19 装入 PR2 瓶



- 5 将废液瓶中的废液全部倒入适当的废液容器中。
- 6 慢慢降低吸管手柄。确保吸管插入到 PR2 瓶和废液瓶中。

图 20 降低吸管手柄



- 7 如果软件无法识别 PR2 瓶的 RFID，请参见[解决 RFID 读取失败 \(第 40 页\)](#)。
- 8 选择 Next (下一步)。

## 装入试剂夹盒

- 1 打开试剂冷却器门。



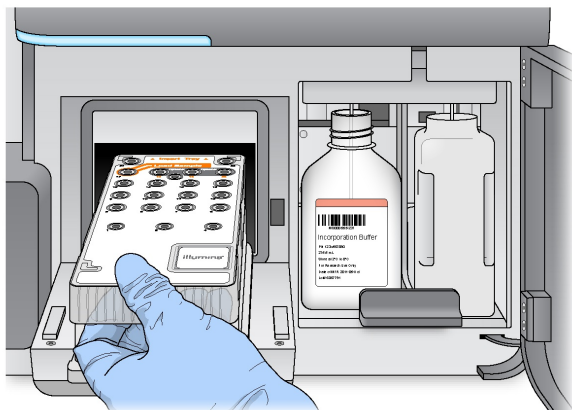
### 注意

请勿将试剂冷却器门打开过长的时间。

- 2 握住试剂夹盒带有 Illumina 标签的一端，然后将试剂夹盒滑入试剂冷却器直到其停止。请始终使用与您装入的流动槽类型相关联的试剂夹盒。如果试剂夹盒不兼容，则屏幕上会显示一条消息。选择 Back (返回)，装入适当的试剂夹盒，或选择 Home (主页)，返回“Home (主页)”屏幕。



图 21 装入试剂夹盒



- 3 关闭试剂冷却器门。
- 4 如果软件无法识别试剂夹盒的 RFID，请参见[解决 RFID 读取失败 \(第 40 页\)](#)。
- 5 如果试剂夹盒与流动槽不兼容，则会显示一条消息。选择 Back (返回)，装入兼容的夹盒，或选择 Exit (退出)，返回“Home (主页)”屏幕。
- 6 关闭试剂仓门。
- 7 选择 Next (下一步)。

## 更改样品表

针对以下情况，使用“Change Sample Sheet (更改样品表)”命令：

- ▶ 要选择名称与试剂夹盒条形码编号不匹配的样品表
- ▶ 当软件提示您在“Review (复查)”屏幕选择另一个样品表时

每次运行都必须有一个样品表。默认情况下，软件会寻找名称与仪器上装入的试剂夹盒条形码编号相匹配的样品表文件。如果未找到样品表，则将显示一条消息，要求您浏览至运行所需的正确样品表位置。

为避免软件搜索失败，请使用“Load Reagents (装入试剂)”屏幕上的 Change Sample Sheet (更改样品表) 命令将软件引导至适用的样品表。

- 1 选择“Load Reagents (装入试剂)”屏幕上的 Change Sample Sheet (更改样品表)。
- 2 选择 Browse (浏览) 以导航至样品表。
- 3 选择 Open (打开)。
- 4 选择 Save and Continue (保存并继续)。
- 5 选择 Next (下一步)。

## 启动运行

装入流动槽和试剂后，在启动运行之前应查看运行参数并执行运行前检查。

## 查看运行参数

- 1 查看实验名称、分析工作流程和片段长度。这些参数都在样品表中指定。
- 2 选择 Change Folder (更改文件夹) 查看文件夹位置。

- 3 根据需要进行修改，然后选择 Save（保存）。
- 4 选择 Next（下一步）。

## 更改文件夹

如果要更改文件夹位置，请选择 Change Folders（更改文件夹），并浏览至首选位置。从“Review（复查）”屏幕使用此选项只能更改当前运行的文件夹位置。

## 查看运行前检查

在启动运行之前，系统会检查所有运行组件、磁盘空间和网络连接。

如果有任何项目未通过运行前检查，则屏幕上将会显示一条消息，说明如何更正错误。有关详细信息，请参见 [解决运行设置错误（第 40 页）](#)。

当所有项目均成功通过运行前检查时，选择 Start Run（启动运行）。

## 启动运行前的重要注意事项



### 警告

MiSeq 对振动很敏感。启动运行后触碰仪器会对测序结果造成不利影响。

在选择 Start Run（启动运行）后，除非暂停运行，否则请勿打开流动槽仓门或试剂仓门，也不要触碰仪器监控器。有关详细信息，请参见 [暂停运行（第 38 页）](#)。



### 警告

启动运行前，请确保关闭 MiSeq 上的所有文件，运行期间不要打开文件。

## 监控运行

- 1 运行期间，监控出现在“Sequencing（测序）”屏幕上的运行进度、强度和质分。 “Sequencing（测序）”屏幕仅供查看。

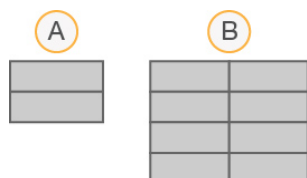
要更为详细地监控运行，请使用独立于仪器计算机的另一台计算机上安装的 Sequencing Analysis Viewer (SAV)。该计算机必须已联网。

或者，如果您已连接到 BaseSpace，则可以使用 BaseSpace 中的 SAV 监控运行。

- ▶ Run Progress（运行进度）— 状态栏中会显示运行进度并列已完成的循环次数。
- ▶ Intensity（强度）— 显示每个小区的第 90 个百分点的簇强度值。

强度区域内的图表代表成像小区和成像表面的数量：

- ▶ 如果流动槽仅在顶面成像，则会显示单柱图表。
- ▶ 如果流动槽在顶面和底面成像，则会显示双柱图表。



- A 表示两个小区，仅在顶面成像
- B 表示四个小区，顶面和底面成像

- ▶ Q-Score All Cycles（Q-Score 所有循环）— 显示大于质量分（Q-score）度量 Q30 的碱基的平均百分比。Q-score 是碱基检出错误概率的预测。Q-score 在循环 25 次后计算。

Q-Score	碱基检出出错的概率
Q40	1/10,000
Q30	1/1,000
Q20	1/100
Q10	1/10

- ▶ **Cluster Density (簇密度) (K/mm<sup>2</sup>)** — 显示运行的每平方毫米簇数。
- ▶ **Clusters Passing Filter (簇通过过滤) (%)** — 显示基于 Illumina 纯度过滤的簇通过过滤百分比, 该值用于测量质量。此数据仅在循环 25 次后出现。



#### 注意

碱基检出的纯度是最大信号的强度除以两个最大信号总和得出的比率。如果在前 25 个循环中存在一个以上纯度值小于 0.6 的碱基检出, 则片段将无法通过质量过滤。

- ▶ **Estimated Yield (估计的产量) (Mb)** — 显示针对运行检出的预计碱基数, 单位为兆碱基 (Mb)。此数据仅在循环 25 次后出现。

2 运行完成时, 显示“Next (下一步)”按钮。继续之前, 请查看“Sequencing (测序)”屏幕上的结果。



#### 注意

“Sequencing (测序)”屏幕一直处于可查看状态, 直到选择“Next (下一步)”。选择“Next (下一步)”之后, 将无法返回“Sequencing (测序)”屏幕。

3 选择 **Next (下一步)** 以退出“Sequencing (测序)”屏幕并继续进行运行后清洗。

## 模板生成

模板生成是根据 X 和 Y 坐标位置来定义簇在整个流动槽表面上位置的过程。实时分析 (RTA) 使用运行的前面几个循环来生成模板。

生成簇位置的模板后, 成像的每个后续循环上生成的图像将对照模板进行比对。将提取所有四个核苷酸颜色通道中的单独簇强度, 并从归一化簇强度中生成碱基检出。

## 运行指标

“Sequencing (测序)”屏幕上会在运行的不同时刻显示运行指标。簇生成步骤期间, 不显示指标。测序开始后, 指定的循环会显示以下指标:

指标	试剂盒	循环
强度	MiSeq 试剂盒 v3	循环 1-7
	MiSeq 试剂盒 v2	循环 1-4
	MiSeq 试剂盒 v1	循环 1-4
强度和簇密度	MiSeq 试剂盒 v3	循环 8-25
	MiSeq 试剂盒 v2	循环 5-25
	MiSeq 试剂盒 v1	循环 5-25
强度、簇密度、% PF、产量和质量分值	MiSeq 试剂盒 v3 MiSeq 试剂盒 v2 MiSeq 试剂盒 v1	运行完成时循环 26 次

有关 MiSeq 运行规格, 请访问 Illumina 网站上的 MiSeq 系统规格页面 ([www.illumina.com/systems/miseq/performance\\_specifications.ilmn](http://www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn))。

## RTA 分析结果

测序运行的 RTA 分析输出一组质量分值的碱基检出文件 (\*.bcl)，这些文件从原始图像文件生成。有关 RTA 文件和文件夹的列表，请参见 [RTA 文件夹和文件 \(第 46 页\)](#)。

## 执行运行后清洗

运行后清洗是在测序运行之间执行的标准仪器清洗。请始终在完成运行之后执行仪器清洗。按照软件提示，装入清洗组件并执行清洗。运行后清洗大约需要 20 分钟。

完成运行之后直接开始清洗。您需要执行仪器清洗，然后才能设置后续运行。要在运行后直接执行清洗以外的其他时间执行运行后清洗，请使用“Perform Wash (执行清洗)”屏幕上的命令启动清洗。



### 注意

将使用过的流动槽留在仪器上。必须将流动槽装在仪器上，然后才能执行仪器清洗。

常规仪器清洗通过以下方式确保性能的持续性：

- ▶ 冲洗掉射流管路和吸管内的任何残留试剂
- ▶ 防止盐分在射流管路和吸管内堆积和结晶
- ▶ 防止来自之前运行的交叉污染

如果您正在使用 MCS v2.5 或更新版本，可以选择执行运行后清洗，这包括采用次氯酸钠的 (NaOCl) 的模板管路清洗。每次清洗大约需要 30 分钟。请参见 [模板管路清洗程序 \(第 27 页\)](#)。



### 注意

如果您使用 VeriSeq PGS 工作流程，请执行包括模板清洗的运行后清洗。请参见 [模板管路清洗程序 \(第 27 页\)](#)。

## 耗材

- ▶ Tween 20
- ▶ 实验室级用水
- ▶ NaOCl (适用于包括模板管路清洗的运行后清洗)
- ▶ MiSeq 试管 (部件号 MS-102-9999) (适用于包括模板管路清洗的运行后清洗)

## 程序

- 1 使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液：
  - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
  - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
  - c 将清洗液翻转五次混匀。
- 2 用新鲜的清洗液准备清洗组件：
  - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
  - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。
- 3 运行完成后，请选择 **Start Wash (开始清洗)**。软件将自动提起试剂冷却器中的吸管。  
**切勿**在“Post-Run wash (运行后清洗)”屏幕上选择 Perform optional template line wash (执行可选的

**模板管路清洗**)。模板管路清洗采用的是其他步骤, 请参见**模板管路清洗程序 (第 27 页)**。

- 4 打开试剂仓门和试剂冷却器门, 将使用过的试剂夹盒从冷却器上滑出。
- 5 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至停止, 然后关闭试剂冷却器门。
- 6 提起位于 PR2 瓶和废液瓶前面的吸管手柄直至锁定到位。
- 7 取出 PR2 瓶并换成洗瓶。



#### 注意

每次运行后丢弃 PR2 瓶。请勿重复使用任何剩余 PR2。

- 8 取出废液瓶并妥善处理掉其中的废液。将废液瓶重新装回试剂仓。



#### 警告

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

- 9 缓慢降下吸管手柄, 确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
- 10 关闭试剂仓门。
- 11 选择 Next (下一步)。


清洗完后, 请将使用过的流动槽、洗涤塔盘和装有剩余清洗液的洗瓶留在仪器上。



#### 注意

吸管会留在低位置处, 这是正常现象。将未使用的清洗液留在洗涤塔盘和洗瓶中, 以防止吸管变干, 让空气进入系统。

## 模板管路清洗程序

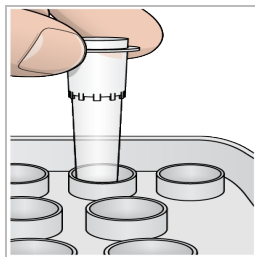
- 1 使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液:
    - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
    - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
    - c 将清洗液翻转五次混匀。
  - 2 使用实验室级用水制备新鲜的 NaOCl 清洗液:
    - a 将 36 微升的 5% NaOCl 注入 864 微升实验室级用水中。两者混合后得到 1:25 的 NaOCl 稀释液。
    - b 将 50 微升的 1:25 NaOCl 稀释液注入 MiSeq 试管 (部件号 MS-102-9999) 中的 950 微升实验室级用水中。
- 

**注意**

请务必使用正确的 NaOCl 浓度。确保核对产品标签上的 NaOCl 比例。如果浓度过高, 可能会导致在后续运行中簇生成失败。如果没有 5% 的 NaOCl, 请用实验室级用水制备 1 毫升含有 0.01% NaOCl 的溶液。**请勿**在维护清洗或备用清洗中使用 NaOCl
- 3 用新鲜的清洗液准备清洗组件:
    - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
    - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。

- 将装有 0.01% NaOCl 清洗液的 MiSeq 试管插入洗涤塔盘中的位置 17，直至试管管颈与塔盘齐平。该试管从位置 17 排出 Tween 20 和实验室级用水清洗液。

图 22 MiSeq 试管插在洗涤塔盘的位置 17 中

**注意**

确保仅将装有 NaOCl 的 MiSeq 试管插入塔盘位置 17。若将其插入其他位置可能会导致后续运行中的簇生成失败，并可能会损坏 MiSeq 仪器的射流系统。

- 运行完成后，请选择 **Start Wash（开始清洗）**。软件将自动提起试剂冷却器中的吸管。
- 在“Post-Run Wash（运行后清洗）”屏幕上选择 **Perform optional template line wash（执行可选的模板管路清洗）**。  
在使用 VeriSeq PGS 工作流程时，已为您预先选择选项 **Perform optional template line wash（执行可选的模板管路清洗）**。MCS 会跟踪每次运行后执行的运行后清洗类型。如果没有为运行后清洗选中 **Perform optional template line wash（执行可选的模板管路清洗）**，则下次启动测序运行时“Run Review（运行复查）”屏幕上会显示一条消息。
- 打开试剂仓门和试剂冷却器门，将使用过的试剂夹盒从冷却器上滑出。
- 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至停止，然后关闭试剂冷却器门。
- 提起位于 PR2 瓶和废液瓶前面的吸管手柄直至锁定到位。
- 取出 PR2 瓶并换成洗瓶。

**注意**

每次运行后丢弃 PR2 瓶。请勿重复使用任何剩余 PR2。

- 取出废液瓶并妥善处理掉其中的废液。将废液瓶重新装回试剂仓。

**警告**

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

- 缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
- 关闭试剂仓门。
- 选择 **Next（下一步）**。  
清洗完后，请将使用过的流动槽、洗涤塔盘和装有剩余清洗液的洗瓶留在仪器上。

**注意**

吸管将留在低位置处。将未使用的清洗液留在洗涤塔盘和洗瓶中，以防止吸管变干，让空气进入系统。

# 第 4 章 维护

维护频率 .....	29
VeriSeq PGS 工作流程的维护频率 .....	29
执行维护清洗 .....	30
执行备用清洗 .....	32
管理文件 .....	34
软件更新 .....	35
关闭仪器 .....	36

## 维护频率

请按建议的间隔执行以下维护过程。



### 注意

如果执行 VeriSeq PGS 工作流程，请确保遵循以下 VeriSeq PGS 维护频率准则。请参见 [VeriSeq PGS 工作流程的维护频率](#)（第 29 页）。

表 2 正常操作中的维护

活动	频率
运行后清洗	每次运行后
维护清洗	每月
备用清洗	为进入闲置模式作好准备（如果 $\geq 7$ 天不使用），并且在仪器处于闲置状态时每隔 30 天执行一次
仪器关闭	需要时

表 3 闲置模式中的维护（ $\geq 7$  天未使用）

活动	频率
备用清洗	每月
仪器关闭	需要时

## VeriSeq PGS 工作流程的维护频率

如果执行 VeriSeq PGS 工作流程，请按建议的间隔执行以下维护程序。

表 4 正常操作中的维护

活动	频率
运行后清洗	每次运行后
维护清洗	每月
运行后清洗（通过“Perform Wash（执行清洗）”屏幕）	处于闲置模式之后（ $> 3$ 天未使用）
备用清洗	为进入闲置模式作好准备（如果 $\geq 7$ 天不使用），并且在仪器处于闲置状态时每隔 30 天执行一次
仪器关闭	需要时

表 5 闲置模式中的维护（ $\geq 7$  天未使用）

活动	频率
备用清洗	每月
仪器关闭	需要时

## 执行维护清洗

请每隔 30 天执行一次维护清洗，以确保最佳的性能。

维护清洗大约需要 90 分钟完成。清洗过程包括三个清洗步骤以彻底冲洗系统。

您可将仪器配置为在运行之间执行维护清洗。有关详细信息，请参见[自定义系统设置（第 11 页）](#)。

### 用户自备的耗材

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, 商品目录号 P7949)
- ▶ 实验室级用水

### 程序

- 1 确保将使用过的流动槽装到仪器上。
- 2 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Perform Wash（执行清洗）。
- 3 从“Perform Wash（执行清洗）”屏幕，选择 Perform Maintenance Wash（执行维护清洗）。软件将自动提起试剂冷却器中的吸管。

### 执行第一次清洗

- 1 使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液：
  - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
  - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
  - c 将清洗液翻转五次混匀。
- 2 用新鲜的清洗液准备清洗组件：
  - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
  - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。
- 3 将洗涤塔盘和洗瓶装到仪器上：
  - a 打开试剂仓门和试剂冷却器门，将使用过的试剂夹盒或洗涤塔盘从冷却器上滑出。
  - b 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至其停止。关闭试剂冷却器门。
  - c 提起位于 PR2 瓶和废液瓶前面的吸管手柄直至锁定到位，然后用洗瓶替换 PR2 瓶。



#### 注意

每次运行后丢弃 PR2 瓶。请勿重复使用任何剩余 PR2。

- a 取出废液瓶并妥善处理掉其中的废液。将废液瓶重新装回试剂仓。
  - b 缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
  - c 关闭试剂仓门。
- 4 选择 Next（下一步）。第一次清洗随即开始。



## 执行第二次清洗

每个清洗步骤请务必使用新鲜的清洗液。重复使用前一个清洗步骤的清洗液可能会将污浊物带回射流管路。

- 1 按如下方式使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液：
  - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
  - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
  - c 将清洗液翻转五次混匀。
- 2 第一次清洗完成后，取出洗涤塔盘和洗瓶并倒掉剩余的清洗液。
- 3 按如下方式将新鲜的清洗液再次注入清洗组件：
  - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
  - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。
- 4 按如下方式装入洗涤塔盘和洗瓶：
  - a 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至其停止。关闭试剂冷却器门。
  - b 装入洗瓶并缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
  - c 关闭试剂仓门。
- 5 选择 **Next（下一步）**。第二次清洗随即开始。

## 执行最终清洗

- 1 使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液：
  - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
  - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
  - c 将清洗液翻转五次混匀。
- 2 第二次清洗完成后，取出洗涤塔盘和洗瓶，并倒掉剩余的清洗液。
- 3 将新鲜的清洗液再次注入清洗组件：
  - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
  - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。
- 4 装入洗涤塔盘和洗瓶：
  - a 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至其停止。关闭试剂冷却器门。
  - b 装入洗瓶并缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
  - c 关闭试剂仓门。
- 5 选择 **Next（下一步）**。最终清洗随即开始。

## 清洗后

清洗完后，请将使用过的流动槽、洗涤塔盘和装有剩余清洗液的洗瓶留在仪器上。

**注意**

吸管会留在低位置处，这是正常现象。将未使用的清洗液留在洗涤塔盘和洗瓶中，以防止吸管变干，让空气进入系统。

## 执行备用清洗

如果仪器在接下来的七天内预计不会使用，请执行备用清洗以做好将仪器及仪器射流管路置于闲置状态的准备。在仪器处于闲置状态时每隔 30 天执行一次备用清洗。

备用清洗约耗时 2 小时完成。清洗过程中将执行两次连续清洗，全面冲洗任何有残余试剂或盐分堆积的每个位置。每次清洗大约需要 60 分钟。

备用清洗完成后，仪器将处于备用模式，并在“Home（主页）”屏幕上显示一条消息，指示仪器的状态。仪器处于备用模式时，必须在启动测序运行前执行维护清洗。

## 用户自备的耗材

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, 商品目录号 P7949)
- ▶ 实验室级用水

## 程序

- 1 确保将使用过的流动槽装到仪器上。
- 2 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Perform Wash（执行清洗）。
- 3 从“Wash Options（清洗选项）”屏幕，选择 Perform Standby Wash（执行备用清洗）。软件将自动提起试剂冷却器中的吸管。

## 执行第一次清洗

- 1 使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液：
  - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
  - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
  - c 将清洗液翻转五次混匀。
- 2 用新鲜的清洗液准备清洗组件：
  - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
  - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。
- 3 将洗涤塔盘和洗瓶装到仪器上：
  - a 打开试剂仓门和试剂冷却器门，将使用过的试剂夹盒或洗涤塔盘从冷却器上滑出。
  - b 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至其停止。关闭试剂冷却器门。
  - c 提起位于 PR2 瓶和废液瓶前面的吸管手柄直至锁定到位，然后用洗瓶替换 PR2 瓶。

**注意**

每次运行后丢弃 PR2 瓶。请勿重复使用任何剩余 PR2。

- a 取出废液瓶并妥善处理掉其中的废液。将废液瓶重新装回试剂仓。
- b 缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。

- c 关闭试剂仓门。
- 4 选择 **Next (下一步)**。第一次清洗随即开始。

## 执行第二次清洗

每个清洗步骤请务必使用新鲜的清洗液。重复使用前一个清洗步骤的清洗液可能会将污浊物带回射流管路。

- 1 按如下方式使用 Tween 20 和实验室级用水制备新鲜的清洗液：
  - a 将 5 毫升的 100% Tween 20 注入 45 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 10% 的 Tween 20。
  - b 将 25 毫升的 10% Tween 20 注入 475 毫升的实验室级用水中。两者混合后得到 0.5% 的 Tween 20 清洗液。
  - c 将清洗液翻转五次混匀。
- 2 第一次清洗完成后，取出洗涤塔盘和洗瓶并倒掉剩余的清洗液。
- 3 按如下方式将新鲜的清洗液再次注入清洗组件：
  - a 在洗涤塔盘的每个槽内注入 6 毫升的清洗液。
  - b 在 500 毫升的洗瓶内注入 350 毫升的清洗液。
- 4 按如下方式装入洗涤塔盘和洗瓶：
  - a 将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至其停止。关闭试剂冷却器门。
  - b 装入洗瓶并缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
  - c 关闭试剂仓门。
- 5 选择 **Next（下一步）**。第二次清洗随即开始。

## 清洗后

清洗完后，请将使用过的流动槽、洗涤塔盘和装有剩余清洗液的洗瓶留在仪器上。



### 注意

吸管会留在低位置处，这是正常现象。将未使用的清洗液留在洗涤塔盘和洗瓶中，以防止吸管变干，让空气进入系统。

## 管理文件

选择“Home（主页）”屏幕上的“Manage Files（管理文件）”，以在仪器计算机上移动、上载、删除文件或重命名样品表。

## 删除文件

- 1 从“Manage Files（管理文件）”屏幕上的任何选项卡，选择 **Browse（浏览）** 以导航到仪器可以访问的文件。
- 2 从下列选项中进行选择：
  - ▶ 选中列表中单个文件或文件夹旁边的复选框。
  - ▶ 选中“Delete（删除）”按钮左侧的复选框以选择列表中的所有文件和文件夹。此选项可用于“Runs（运行）”、“Sample Sheets（样品表）”、“Manifests（清单）”、“Genomes（基因组）”和“Recipes（配方）”。
- 3 选择 **Delete（删除）**。



### 注意

除“Bundle Logs（打包日志）”外的所有选项卡中都包含“Delete（删除）”命令。

## 移动运行文件夹

“Move（移动）”命令会将运行文件夹复制到新位置，然后从原位置删除该文件夹。

- 1 从“Manage Files（管理文件）”屏幕上的“Runs（运行）”选项卡，选择 **Browse（浏览）** 以导航到仪器可以访问的文件。
- 2 选中列表中单个文件或文件夹旁边的复选框。
- 3 选择 **Move（移动）**。
- 4 选择 **Browse Network（浏览网络）**，并为文件或文件夹选择一个新的位置。
- 5 选择 **OK（确定）**。

## 上载文件

“Upload（上载）”命令可用于“Sample Sheets（样品表）”、“Manifests（清单）”、“Genomes（基因组）”和“Recipes（配方）”。如果 MiSeq 未连接至网络，请使用此功能将文件从 USB 驱动器上传至仪器计算机。

- 1 从“Manage Files（管理文件）”屏幕上的选项卡，选择 **Browse（浏览）** 以导航到仪器可以访问的文件。
- 2 选择 **Upload（上传）**。
- 3 选择 **Browse Network（浏览网络）**，浏览至文件所在的 USB 驱动器上的位置。
- 4 选择 **OK（确定）**。  
文件将上载到“Directory（目录）”字段中指定的文件夹。

## 重命名样品表

- 1 从“Manage Files（管理文件）”屏幕上的“Sample Sheets（样品表）”选项卡，选择以下选项：
  - ▶ 选中各样品表旁边的复选框。
  - ▶ 选中“Delete（删除）”按钮左侧的复选框以选择列表中的所有样品表。
- 2 选择 **Rename（重命名）**。
- 3 选择键盘图标并使用屏幕键盘重命名样品表。
- 4 选择 **Next（下一步）**。
- 5 选择 **Back（返回）**。

## 软件更新

如果您的系统连接到具有 Internet 访问权的网络，则可以从“Home（主页）”屏幕自动更新仪器软件。您也可将软件配置为自动检查 BaseSpace 更新。有关详细信息，请参见[配置 BaseSpace 更新的通知（第 12 页）](#)。

如果您的仪器未连接到具有 Internet 访问权的网络，则可以手动更新软件。

## 自动更新软件

有可用的软件更新时，“Home（主页）”屏幕上会显示 **Update Available（可用更新）** 按钮。否则，此按钮将隐藏。要使用此选项，请确保 MiSeq 连接到具有 Internet 访问权的网络。

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 **Update Available（可用更新）**。

- 2 确认对话框中的命令以进行更新。  
需要重新启动仪器。重新启动后，将自动开始安装更新。

## 手动更新软件

使用“Manual Update（手动更新）”功能，能够通过浏览至可安装软件文件的位置，从 MiSeq 界面更新仪器控制软件和分析软件。

- 1 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Manage Instrument（管理仪器）。
- 2 选择 Software Update（软件更新）。
- 3 选择 Browse（浏览）以导航至新软件版本的可安装文件的位置。
- 4 当可安装软件文件的路径显示在屏幕上时，选择 Save and Update（保存并更新）。
- 5 确认对话框中的命令以进行更新。  
需要重新启动仪器。重新启动后，将自动开始安装更新。

## 关闭仪器

最好使仪器始终处于开启状态。但是，如果必须关闭仪器，请使用以下步骤关闭 Windows 并准备射流管路。

- 1 执行维护清洗。有关详细信息，请参见 [执行维护清洗（第 30 页）](#)。
- 2 取出废液瓶并妥善处理掉其中的废液。将废液瓶重新装回试剂仓。
- 3 关闭试剂仓门。
- 4 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Manage Instrument（管理仪器）。
- 5 选择 Shut Down（关闭）。  
此命令会关闭软件。
- 6 将电源开关切换到“OFF（关闭）”位置。



### 注意

每次关闭仪器后，请至少等待 60 秒后，再将电源开关切换回“ON（打开）”位置。

# 附录 A 故障诊断

简介 .....	37
用于故障诊断的打包日志 .....	37
执行系统检查 .....	38
暂停或停止运行 .....	38
手动提起试剂夹盒吸管 .....	40
解决运行设置错误 .....	40
解决 RFID 读取失败 .....	40
执行液量测试 .....	41
测量预期的清洗量 .....	42
配置系统设置 .....	42

## 简介

本部分介绍在联系 Illumina 技术支持之前，可以采取的常见故障诊断步骤。对于大多数错误，屏幕上均会显示消息，提供如何更正错误的说明。

对于技术问题，请访问 Illumina 网站上的 MiSeq 支持页面，查看常见问题解答，或者登录 MyIllumina 帐户，查看支持公告。

对于运行质量或性能方面的问题，请联系 Illumina 技术支持。有关详细信息，请参见 [技术协助 \(第 53 页\)](#)。

Illumina 技术支持代表通常会要求提供特定于运行的文件，以进行故障诊断。您可以使用“Manage Files (管理文件)”屏幕上的“Bundle Logs (打包日志)”选项卡合并及压缩故障诊断所需的文件。请参见 [用于故障诊断的打包日志 \(第 37 页\)](#)。

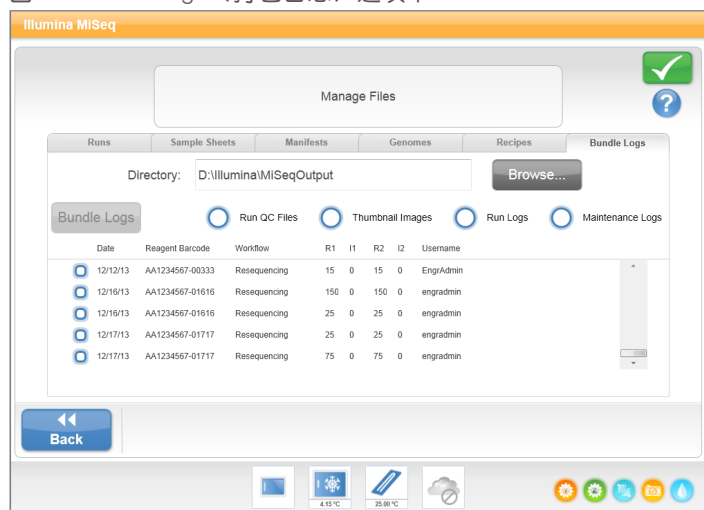
## 用于故障诊断的打包日志

打包日志功能会将文件打包发送给 Illumina 技术支持，以便进行故障诊断。使用“Manage Files (管理文件)”屏幕上的“Bundle Logs (打包日志)”选项卡选择一组文件，称为一个文件包。该文件包会自动进行压缩。

打包日志功能会将某次运行产生的文件一次性分组为一个文件包类型。按 Illumina 技术支持要求对每次运行和每个文件包类型重复打包日志步骤。

- 1 在“Manage Files (管理文件)”屏幕中，选择 **Bundle Logs (打包日志)** 选项卡。
- 2 选择 **Browse (浏览)** 导航至 MiSeqOutput 文件夹所在的位置。
- 3 单击运行旁边的蓝色方框以及 Illumina 技术支持要求的文件包类型旁边的蓝色圆圈。
- 4 选择 **Bundle Logs (打包日志)**。  
“Bundle Files (打包文件)”屏幕即会显示，列出该文件包的相关信息，包括该文件包内含的单个文件列表。  
有关打包日志功能的各文件夹和文件的详细信息，请参见 [MiSeq 输出和分析文件夹快速参考卡 \(文档号 15034791\)](#)。
- 5 选择 **Next (下一步)**。
- 6 导航到您要保存该压缩包文件的位置。
- 7 选择 **Save (保存)**。  
文件打包完成后，“Bundle Logs (打包日志)”选项卡会重新打开。
- 8 将压缩的文件包发送给 Illumina 技术支持。

图 23 Bundle Logs (打包日志) 选项卡



## 执行系统检查

“System Check (系统检查)” 屏幕通常用于在 “Live Help (在线帮助)” 会话中联系 Illumina 技术支持代表。在正常操作或仪器维护中不需要使用此功能。

在联系 Illumina 技术支持之前，您可以执行某些系统检查，例如，Volume Test (容量测试)。容量测试在气泡通过传感器时估计流动容量，从而检查射流系统的运行状况。有关详细信息，请参见[执行液量测试 \(第 41 页\)](#)。

- 1 从 “Home (主页)” 屏幕中，选择 **Manage Instrument (管理仪器)**。
- 2 选择 **System Check (系统检查)**。
- 3 执行下列其中一项操作：
  - ▶ 选择要执行的单个测试。
  - ▶ 选择 **Select All (全选)** 执行所有测试。
- 4 选择 **Next (下一步)**。  
完成后，测试结果会显示在屏幕上。
- 5 **[可选]** 选择 **Show Details (显示详细信息)** 可在软件界面上查看结果摘要。
- 6 **[可选]** 选择 **Export Results (导出结果)** 可将结果以 \*.csv 文件格式导出到 USB 驱动器中。
- 7 选择 **Done (完成)**。

## 暂停或停止运行

MiSeq 设计为从头到尾完成运行，而无需用户干预。但您可以通过 “Sequencing (测序)” 屏幕暂停运行或停止运行。

### 暂停运行

运行完成前，您可以将其暂停。例如，如果您怀疑废液瓶已满，可暂停运行。暂停运行可以恢复。



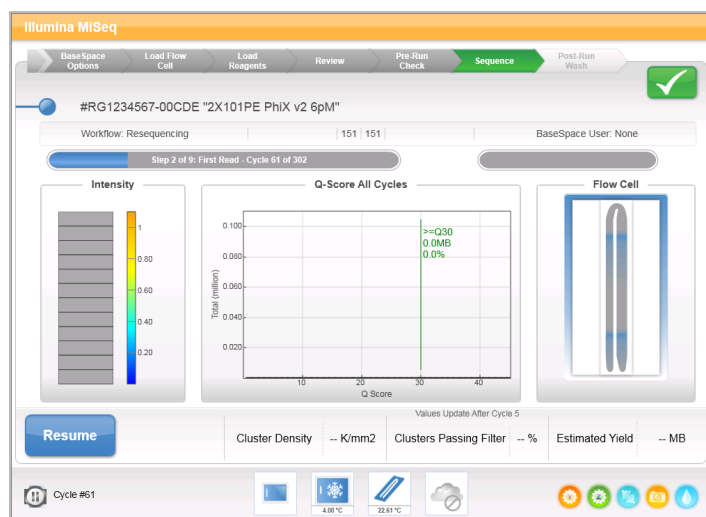
**注意**

请勿在簇生成期间或在测序的前 8 个循环内暂停运行。在此期间暂停的运行无法恢复。请参见 [运行指标 \(第 25 页\)](#) 了解 MiSeq 试剂盒的循环信息。

如果您选择 **Pause (暂停)**，则在完成当前命令之后暂停运行，并将流动槽置于安全的状态。

要从“Sequencing (测序)”屏幕暂停运行，请选择 **Pause (暂停)**。按钮将变为“Resume (恢复)”。当您准备好恢复运行时，请选择 **Resume (恢复)**。

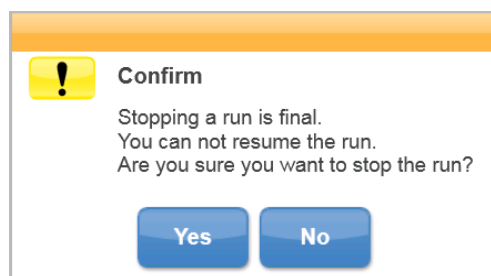
图 24 暂停运行的 Sequence (测序) 屏幕

**停止运行**

借助“Sequencing (测序)”屏幕上的 **Stop (停止)** 按钮，您可以在运行完成之前，在测序时停止运行。可以在运行设置错误、数据质量不佳或发生硬件故障时停止运行。

运行停止时，当前命令未完成，流动槽台会移动到向前的位置。实时分析软件为最后一个已完成的循环继续分析。

图 25 停止运行



**停止运行操作不可逆。** 已停止的运行无法恢复。唯一的选择是继续仪器清洗。

## 手动提起试剂夹盒吸管

如果运行意外中断，或如果在运行过程中发生错误，则试剂夹盒吸管可能无法自动提起。要取下试剂夹盒，请手动提起试剂夹盒吸管。

- 1 在“Home（主页）”屏幕上，选择 Perform Wash（执行清洗）。
- 2 选择 Raise Sippers（提起吸管）。
- 3 取下试剂夹盒。

## 解决运行设置错误

如果运行前检查中有任何一项检查失败，该项旁边会出现一个红色图标 **X**。屏幕上会显示一条消息，说明错误并指出如何纠正错误。

错误	操作
<b>X</b> 测量的流速	<p>打开流速检查屏幕。使用下拉列表或屏幕上的键盘输入以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 溶液：PR2</li> <li>• 剂量：250</li> <li>• 吸入速度：2500</li> <li>• 分发速度：2500</li> </ul> <p>选择 Pump（抽水）。如果错误继续存在，请设置剂量，抽出 500 微升 PR2，然后重复该过程。抽出溶液后，选择 Restart Check（重新启动检查）。</p> <p>运行前检查成功完成后，Start Run（启动运行）按钮将变为可用。</p> <p>如果流速检查再次失败，请重新安装流动槽以确保不是因为未对准而中断了液流。检查流动槽垫片是否有绒毛或不规则物等阻碍物。</p>
<b>X</b> 可用磁盘空间	<p>如果磁盘空间不足，则会显示消息指示需要的磁盘空间。使用 Manage Files（管理文件）功能从仪器计算机清理出所需空间。</p>
<b>X</b> 网络连接有效	<p>确保将网络电缆插入仪器中。</p> <p>如果网络连接未恢复，请选择“Manage Instrument（管理仪器）”屏幕上的 Reboot（重新启动）以重新启动软件。</p> <p>如果连接仍然未恢复，请选择“Manage Instrument（管理仪器）”屏幕上的 Shut Down（关闭），然后使用电源开关关闭仪器。至少等待 60 秒，然后打开仪器并启动软件。</p>
<b>X</b> 初级分析就绪	<p>之前运行的初级分析未完成。初级分析完成的默认允许时间是 1 小时，并且屏幕上会显示倒计时。此时可选择等待 1 小时或选择 Terminate Analysis（终止分析）。如果有任何未完成的循环，二级分析将会停止。</p>
<b>X</b> 样品表显示	<p>如果您未使用运行的试剂夹盒 ID 命名样品表，则仪器无法自动找到正确的样品表。浏览到用于运行的样品表。</p> <p>如果您使用运行的试剂夹盒 ID 命名样品表，请确保样品表位于默认的样品表文件夹中。在“Home（主页）”屏幕的“Run Options（运行选项）”中检查默认的文件夹位置。</p> <p>确保样品表文件扩展名为 *.csv。</p> <p>如果缺少样品表，请创建一个样品表并将其复制到“Run Options（运行选项）”中指定的样品表位置。</p> <p>找到样品表后，选择 Restart Check（重新启动检查）。</p>

## 解决 RFID 读取失败

如果系统无法读取耗材的 RFID，您可以从 Illumina 网站获取临时绕过代码。临时绕过代码七天后到期。

- 1 始终重试 RFID 读取，然后再继续。如果 RFID 第二次失败，请选择 Get Code（获取代码）。
- 2 在可以访问 Internet 的计算机上，转到 [my.illumina.com](http://my.illumina.com) 并从页面顶部的工具栏选择 Sign In（登录）。
- 3 登录您的 MyIllumina 帐户。  
您的姓名将替换工具栏上的“Sign In（登录）”按钮。

- 4 将鼠标悬停在您的姓名上，然后选择 Account（帐户）。在 My Tools（我的工具）列中，单击 MiSeq Self-Service（MiSeq 自助服务）。
- 5 在“MiSeq Self-Service（MiSeq 自助服务）”页面上，输入 MiSeq 序列号。
- 6 从“Type of Override Code（覆盖码类型）”下拉列表中，选择 RFID Override（RFID 覆盖）。
- 7 要生成代码，请选择 Get Code（获取代码）。
- 8 返回到 MCS 界面并选择 Enter Code（输入代码）。
- 9 使用屏幕上的键盘输入临时绕过代码，然后选择 Next（下一步）。
- 10 输入流动槽、PR2 瓶或试剂夹盒的条形码编号。

耗材	条形码编号位置
流动槽	位于流动槽容器标签上的条形码上方。 流动槽条形码编号以 A（标准）、G（微米）或 D（纳米）开头。示例：A0E61
PR2 瓶	位于 PR2 瓶标签上的条形码下方。 示例：MS0011881-PR2
试剂夹盒	位于试剂夹盒标签上的条形码下方。 示例：MS0010744-300

- 11 如果要输入试剂夹盒的绕过代码，请输入试剂盒的版本号。选择 Enter Reagent Kit Barcode（输入试剂盒条形码），手动输入试剂夹盒条形码编号和试剂盒版本号。



#### 注意

若输入的试剂盒版本不正确，可能会对测序数据造成负面影响。

- 12 选择 Enter（输入）。

## 执行液量测试

射流管路阻塞会阻碍试剂传送进而影响测序结果。如果怀疑射流管路阻塞，请执行液量测试。

液量测试通过估计经过传感器的两个气泡之间的液量，检查射流系统的运行状况。要执行液量测试，必须在洗涤塔盘和洗瓶中装入实验室级用水，并且必须将使用过的流动槽放置到位。按照屏幕上的提示执行测试。

- 1 确保将使用过的流动槽装到仪器上。
- 2 从“Home（主页）”屏幕中，选择 Manage Instrument（管理仪器）。
- 3 选择 System Check（系统检查）。
- 4 选择 Conduct Volume Test（执行液量测试），然后选择 Next（下一步）。
- 5 在洗涤塔盘的每个槽内装入 6 毫升的实验室级用水。
- 6 在 500 毫升的洗瓶内装入 350 毫升的实验室级用水。
- 7 将洗涤塔盘和洗瓶装到仪器上。
  - a 打开试剂仓门和试剂冷却器门，将洗涤塔盘滑入试剂冷却器直至停止。关闭试剂冷却器门。
  - b 提起吸管手柄直到它锁定到位，然后装入洗瓶。
  - c 取出废液瓶并妥善处理掉其中的废液。将废液瓶重新装回试剂仓。
  - d 缓慢降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。

- 8 按照屏幕上的提示，去掉洗瓶吸管上的水滴，如下所示。
  - a 缓慢提起吸管手柄，检查洗瓶吸管中是否存在大的水滴。
  - b 缓慢降低吸管手柄，直到吸管浸入水中，通过水的表面张力去除水滴。
  - c 缓慢提起吸管手柄，检查洗瓶吸管中是否存在大的水滴。
  - d 缓慢完全降下吸管手柄，确保吸管伸入洗瓶和废液瓶中。
- 9 选择 **Next (下一步)**。  
液量测试完成后，结果将显示在屏幕上。  
如果测试不通过，请执行维护清洗。请参见 [执行维护清洗 \(第 30 页\)](#)。
- 10 维护清洗完成后，重复液量测试。

## 测量预期的清洗量

测量预期清洗量以确保射流管路工作正常。

- 1 开始清洗之前，清空废液瓶。
- 2 清洗完后，测量废液瓶中的清洗量。

清洗类型	预期清洗量
运行后清洗	17.25 ml
运行后清洗 (包含模板管路清洗)	25.5 ml
备用清洗	46 ml
维护清洗	51.75 ml

## 配置系统设置

MCS 包括可访问系统配置命令的多个屏幕。通常在 MiSeq 安装期间配置软件设置。

### 配置 IP 和 DNS 设置

必要时 (由于网络或设备更改) 配置 IP 地址和 DNS 服务器地址。

- 1 从 “Home (主页)” 屏幕中，选择 **Manage Instrument (管理仪器)**。
- 2 选择 **System Settings (系统设置)**。
  - ▶ 选择 **Obtain an IP address automatically (自动获取 IP 地址)** 或 **Use the following IP address (使用以下 IP 地址)**。  
如果选择 **Use the following IP address (使用以下 IP 地址)**，请输入 IP 地址、子网掩码和默认网关。
  - ▶ 选择 **Obtain DNS address automatically (自动获取 DNS 地址)** 或 **Use the following DNS server addresses (使用以下 DNS 服务器地址)**。  
如果选择 **Use the following DNS server addresses (使用以下 DNS 服务器地址)**，请输入首选和备用的 DNS 服务器地址。
- 3 选择 **Save and Continue (保存并继续)**。

## 更改系统凭据

在“Systems Settings (系统设置)”屏幕更改系统用户名和密码，同时更新 MiSeq Reporter 和 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 的凭据。

- 1 从“Home (主页)”屏幕中，选择 **Manage Instrument (管理仪器)**。
- 2 选择 **System Settings (系统设置)**。
- 3 选择 **Save and Continue (保存并继续)**，进入屏幕系列的第三个屏幕。
- 4 选择 **This account (此帐户)**。
- 5 输入域名（例如 Domain\MiSeq1）和密码。
- 6 选择 **Save and Continue (保存并继续)**。



# 附录 B 输出文件和文件夹

运行文件夹 .....	45
MiSeqOutput 文件夹内容 .....	45
RTA 文件夹和文件 .....	46

## 运行文件夹

MiSeq 上的每次运行都会生成三个运行文件夹，每个都有特定用途：

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp** — 当运行开始时，会将一个临时运行文件夹写入仪器计算机的本地驱动器，并用作 MCS 和 RTA 的工作区域。无需访问 MiSeqTemp 文件夹。此文件夹的内容将在 7 天后删除。
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqOutput** — RTA 会将 MiSeqTemp 文件夹中的文件复制到 MiSeqOutput 文件夹。生成初级分析文件时，RTA 会将文件再复制回 MiSeqTemp 文件夹并填充 MiSeqAnalysis 文件夹。聚焦图像和缩略图不会复制到 MiSeqAnalysis 文件夹。请参见 [RTA 文件夹和文件 \(第 46 页\)](#)。
- ▶ 您可以在“Run Options (运行选项)”屏幕的“Output Folder (输出文件夹)”字段中更改输出文件夹的位置。有关详细信息，请参见 [设置默认的文件夹位置 \(第 12 页\)](#)。
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis** — RTA 分析完成后，MiSeq Reporter 会访问仪器本地驱动器上的 MiSeqAnalysis 文件夹以开始二级分析。写入到 MiSeqAnalysis 文件夹的所有文件都将复制回 MiSeqOutput 文件夹。有关详细信息，请参见 [MiSeqOutput 文件夹内容 \(第 45 页\)](#)。

如果您是使用 BaseSpace 进行分析的，并且没有在本地复制分析，则仪器本地驱动器上的 MiSeqAnalysis 文件夹将为空。

## 根文件夹命名

根运行文件夹名称指示运行的日期、仪器编号和运行使用的流动槽。

默认情况下，该文件夹名称使用以下格式：

YYMMDD\_<仪器编号>\_<运行编号>\_<流动槽条形码>

在指定仪器上每执行一次运行，运行编号就会递增 1。

## MiSeqOutput 文件夹内容

RTA 完成分析之后，MiSeqOutput 文件夹中会填入 MiSeq Reporter 执行二级分析所需的文件。当二级分析完成后，MiSeqOutput 和 MiSeqAnalysis 文件夹几乎完全相同，区别只是 MiSeqOutput 文件夹包含两个用于存放图像文件的子文件夹：Images 和 Thumbnail\_Images。这些子文件夹不用于二级分析。

## 文件

复制到输出和分析文件夹的文件包括：

- ▶ **SampleSheet.csv** — 提供运行和后续分析的参数。运行开始时，将样品表复制到根文件夹并重命名为 SampleSheet.csv。其他副本将写入 Data\Intensities 和 Data\Intensities\BaseCalls 中。
- ▶ **runParameters.xml** — 包含有关运行组件的运行参数和信息的摘要，例如与运行相关的流动槽和试剂的 RFID。
- ▶ **RunInfo.xml** — 包含高级运行信息，例如测序运行中片段和循环的数量，以及是否对片段编制索引。

## 文件夹

复制到输出和分析文件夹的文件夹包括在测序运行期间生成的以下文件夹：

- ▶ **<运行文件夹名称>\Config** — 包含运行的配置文件。

- ▶ **<运行文件夹名称>\Data** — 包含子文件夹 Intensities、BaseCalls 和 Alignment。从 MiSeq Reporter 生成的数据位于 Alignment 子文件夹中。
- ▶ **<运行文件夹名称>\Data\RTA Logs** — 包含描述 RTA 针对每个片段执行的各个步骤的日志文件。
- ▶ **<运行文件夹名称>\Data\Intensities\BaseCalls** — 包含具有碱基检出 (\*.bcl) 文件、矩阵文件和定相文件的子文件夹。二次分析期间，MiSeq Reporter 会将 FASTQ 文件写入此文件夹。有关详细信息，请参见《MiSeq Reporter 软件指南》(文档号 15042295)。
- ▶ **<运行文件夹名称>\Recipe** — 包含用于运行的配方。
- ▶ **<运行文件夹名称>\Logs** — 包含描述仪器为每个循环执行的各个步骤的日志文件。
- ▶ **<运行文件夹名称>\InterOp** — 包含 Sequencing Analysis Viewer (SAV) 使用的二进制文件，总结各种主要的分析指标，例如簇密度、强度、质量分值和整体运行质量。

临时运行文件夹中创建的所有其他文件和文件夹不会复制到输出和分析文件夹。它们包含分析或故障诊断不需要的临时文件。

在二级分析期间，MiSeq Reporter 会添加其他文件夹，例如 Alignment 文件夹。有关详细信息，请参见《MiSeq Reporter 软件指南》(文档号 15042295)。

## RTA 文件夹和文件

下表描述了初级分析期间由实时分析 (Real Time Analysis, 简称 RTA) 生成的文件夹和文件。其中许多文件由 MiSeq Reporter 软件用于二级分析。

关键文件	子文件夹	描述
RTAComplete.txt	根文件夹	碱基检出分析完成时生成的标记文件。存在此文件将触发启动二级分析。
SampleSheet.csv	根文件夹	运行前会将此文件读取并复制到运行文件夹，稍后将此文件用于二级分析。
RunInfo.xml	根文件夹	标识片段 (包括标签片段) 的边界以及选择用于运行的质量表。
*.bcl 文件	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	每个 *.bcl 文件均包含一个循环、一个小区的 RTA 碱基检出和碱基质量分值结果。
*.stats 文件	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	*.stats 文件包含给定循环/小区的 RTA 碱基检出统计信息。
*.filter 文件	Data\ Intensities\BaseCalls	*.filter 文件包含每个小区的过滤结果。
*.txt	Data\RTALogs	初级分析的日志文件。
*.cif 文件	Data\ Intensities\L001\CX.X	每个 *.cif 二进制文件均包含一个循环、一个小区的 RTA 图像分析结果。有关详细信息，请参见 <a href="#">流动槽小区编号 (第 47 页)</a> 。
*.locs 文件	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001	报告簇坐标。每个 *.locs 文件代表一个小区。
*.jpg 文件	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	为每个循环和碱基生成的缩略图，可用于对运行进行故障诊断。这些文件用于图像分析，不会复制到“分析”文件夹。有关图像文件名称，请参见 <a href="#">流动槽小区编号 (第 47 页)</a> 。



## 流动槽小区

测序运行期间，会在称为小区的小成像区域中对流动槽的单通道成像。所有 MiSeq 流动槽均为单通道，但小区数量会因您使用的流动槽类型而异。

流动槽	MiSeq 试剂盒	小区	成像表面	成像小区总计
标准流动槽	MiSeq 试剂盒 v3	19 个小区	顶面和底面	共 38 个小区
PGS 流动槽	MiSeq 试剂盒 v3-PGS	19 个小区	顶面和底面	共 38 个小区
标准流动槽	MiSeq 试剂盒 v2	14 个小区	顶面和底面	共 28 个小区
微米流动槽	MiSeq 微米试剂盒 v2	4 个小区	顶面和底面	共 8 个小区
纳米流动槽	MiSeq 纳米试剂盒 v2	2 个小区	仅顶面	共 2 个小区

测序运行期间对小区进行成像时，会为每个小区生成一个输出文件。有关详细信息，请参见[流动槽小区编号](#)（第 47 页）。

## 流动槽小区编号

测序运行期间对小区进行成像时，会为每个小区生成一个输出文件，并用四位格式的小区编号来命名文件。除纳米流动槽外，其他流动槽均在顶面和底面成像。每个小区的输出文件位于 Data\Intensities\BaseCalls\L001 下的运行文件夹中。

流动槽	MiSeq 试剂盒	小区	成像表面	图像文件名称
标准流动槽 PGS 流动槽	MiSeq 试剂盒 v3	1-19	顶面	1101 到 1119
		1-19	底面	2101 到 2119
标准流动槽	MiSeq 试剂盒 v2	1-14	顶面	1101 到 1114
		1-14	底面	2101 到 2114
微米流动槽	MiSeq 微米试剂盒 v2	1-4	顶面	1101 到 1104
		1-4	底面	2101 到 2104
纳米流动槽	MiSeq 纳米试剂盒 v2	1 - 2	仅顶面	1101 到 1102



# 索引

## B

BaseSpace  
更新 12  
连接 5–6  
凭据 43  
BaseSpace Onsite  
服务器位置 11  
连接 6  
凭据 43  
BlueFuse Multi 软件 6, 11  
帮助, 技术 53  
备用清洗 32

## C

CompletedJobInfo.xml 7  
参考基因组  
文件格式 4  
测序 16  
测序屏幕 24  
初始化 40  
传感器指示器 5  
磁盘空间  
磁盘空间不足 40  
检查 7  
簇生成 16  
错误 5

## D

打包日志 34–35, 37

## E

二级分析 7

## F

废液瓶 3  
分析  
选项 6  
分析工作流程  
定义 4  
复制文件和文件夹 34

## G

更新软件 35–36  
工作流程 16  
运行持续时间 15  
故障诊断  
RFID 40  
打包日志 34–35, 37  
射流 41  
特定于运行的文件 37  
运行设置错误 40  
关闭仪器 36  
光学模块 2

## H

耗材 13  
实验室级用水 13  
活动指示器 5

## I

Illumina 预防性监控服务 11  
InterOp 文件 4  
InterOp 文件夹 45  
IP 地址 42

## J

基因组参考 34  
技术协助 53  
监控运行 24  
警告 5

## K

客户支持 53  
控制软件 4

## L

Local Run Manager 1  
流动槽  
单通道 7  
盖子颜色 8  
概述 8  
清洁 19

- 小区 47
- 小区编号 47
- 字母标示符 40
- 流动槽仓 2
- 流动槽夹 2
- 流动槽门传感器 5

## M

- MiSeq Reporter
  - 概述 7
- MiSeq 自助服务 40
- 密码, 更改 43
- 模板管路清洗 26
- 模板生成 7, 25

## P

- PR2, 装入 21
- 培训 1
- 配方, 管理 34
- 片段长度 15
- 片段中的循环 15

## Q

- 清单文件
  - 定义 4
  - 复制到仪器 34
- 清洗
  - 备用 32
  - 好处 26
  - 维护 30
  - 预期液量 42
  - 运行后 26
  - 运行后清洗设置 11
  - 准备关机 36
  - 准备闲置 32
- 清洗量 42

## R

- RFID
  - PR2 21
  - 跟踪 1
  - 故障诊断 40
  - 试剂夹盒 22
- RTAcomplete.txt 46
- RunInfo.xml 45–46
- runParameters.xml 45

- 软件
  - 磁盘空间检查 7
  - 更新 35–36
  - 运行持续时间 15
- 软件更新 12
- 软件套装 4

## S

- Sequencing Analysis Viewer 7, 24
- status.xml 46
- 删除文件和文件夹 34
- 闪烁图标 5
- 射流
  - 故障诊断 41
  - 清洗 30, 32
- 实时分析 1, 4
  - 结果 46
  - 模板生成 25
  - 运行文件夹 45
- 实验室级用水准则 13
- 试剂
  - 套装 7
- 试剂仓 2–3
- 试剂夹盒 8
  - 检查 17
  - 解冻 17
  - 溶液 9
- 试剂冷却器, 温度 5

## T

- 停止运行 39
- 图标
  - 传感器 5
  - 活动指示器 5
- 图标, 闪烁 5

## U

- Universal Copy Service 4

## V

- VeriSeq PGS 工作流程
  - 本地复制分析 11
  - 二级分析 6
  - 流动槽 8
  - 维护频率 29

## W

- 网络连接 40
- 网络设置 42
- 维护清洗 30
- 文档 1, 53
- 文件夹位置
  - 当前运行 24
  - 默认设置 13

## X

- 吸管手柄 3
- 系统设置 42
- 系统帐户名称 43
- 闲置仪器 32
- 小区编号 47

## Y

- 样品表
  - 定义 4
  - 复制到仪器 34
  - 更改 23
  - 未找到 40
  - 运行文件夹中 46
- 液量测试 41
- 移动文件和文件夹 34
- 域名 42-43
- 运行持续时间 15
- 运行后清洗 26
- 运行设置屏幕 18
- 运行文件夹
  - 初级分析文件 46
  - 定义 4
  - 管理 34
  - 临时, 输出, 分析 45
  - 命名 45
  - 内容 45
- 运行选项 11-13

## Z

- 暂停运行 38
- 支持页面 1
- 装入试剂
  - PR2 21
  - 夹盒 22
- 组件
  - 光学模块 2

- 流动槽 8, 47
- 流动槽仓 2
- 试剂仓 2-3
- 试剂夹盒 8

## 电

- 电子邮件警报 12



# 技术协助

如需技术协助，请与 Illumina 技术支持部门联系。

网站：[www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
电子邮箱：[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Illumina 客户支持部门电话号码

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

**安全数据表 (safety data sheet, 简称 SDS)** — 可通过 Illumina 网站 ([support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html)) 获取。

**产品文档** — 可通过 Illumina 网站下载 PDF 版本。请转到 [support.illumina.com](http://support.illumina.com)，选择一个产品，然后选择 Documentation & Literature (文档与文献)。







Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (北美洲以外地区)

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

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

仅供研究使用，不可用于诊断过程。

© 2018 Illumina, Inc. 留所有权利。

**illumina**<sup>®</sup>