

MiSeq

系統指南



此文件與其內容專屬於 Illumina, Inc. 與其分支機構 (IlluminaJ)，僅供客戶針對此處所述產品用途進行契約規範內的使用，不得移作他用。此文件與其內容不得基於其他用途而使用或散播，和/或在未事先取得 Illumina 的書面同意下，以任何方式流通、揭露或複製。Illumina 並未藉由本文件傳遞其專利、商標、版權或任何普通法權利或任何第三方之類似權利的任何授權。

本文件的指示必須由受過適當訓練的合格人員嚴格且明確地遵守，以確保此處所述之產品的適當與安全使用。在使用該產品之前，必須完整閱讀與了解文件的所有內容。

若未全文閱讀並明確遵守此處的所有指示，可能造成產品損壞、人員受傷 (包括使用者或其他人)，以及其他財產損壞，並導致產品保固失效。

對於不當使用本文所述產品 (包括其零件或軟體) 而造成的損失，Illumina 不承擔任何責任。

©2018 Illumina, Inc. 保留一切權利。

所有商標均為 Illumina, Inc. 或其各自所有權人所擁有。如需特定商標資訊，請參閱 www.illumina.com/company/legal.html。

修訂記錄

文件 #	日期	變更內容說明
材料 # 20024228 文件 # 15027617 v03	2018 年 5 月	已移除登入作業系統所須的預設使用者名稱和密碼。 Illumina 建議您使用網站專用的憑據。 在 [Customize System Settings (自訂系統設定)] 區段新增有關 Illumina 主動監控服務的資訊。 在 [Reagent Compartment (試劑室)] 新增有關冷卻槽溫度範圍要求的註解。 在 [Local Run Manager (本機執行管理員)] 新增回復 MiSeq 通報器與移除的參考資料。 將指南名稱由「MiSeq 定序系統指南」變更為「MiSeq 系統指南」。 進行內容文字微調。
材料 # 20024228 文件 # 15027617 v02	2018 年 1 月	為本機執行管理員、樣本工作表和手動定序模式新增新的執行組態選項。 將 MiSeq 通報器的參考取代為本機執行管理員。 新增解決冷卻槽溫度範圍至疑難排解附錄。 在自訂系統設定主題中新增收集儀器效能資料的新說明。 將指南名稱由「MiSeq 系統指南」變更為「MiSeq 定序系統指南」。
材料 # 20000262 文件 # 15027617 v01	2015 年 9 月	將指南名稱由「MiSeq 系統使用指南」變更為「MiSeq 系統指南」。 MCS v2.6 新增內容，新增 BaseSpace Onsite 資訊。 重新安排的指南資訊，以任務 (而不是畫面) 為中心。 [Welcome (歡迎)] 畫面中的所有參考變更為 [Home (首頁)] 畫面。 在 MiSeq 試劑組試劑準備指南中新增內容，包括流通池類型、試劑匣內容，以及解凍試劑匣的說明。如需了解其他 MiSeq 試劑組資訊，請造訪 Illumina 網站： support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.html 。 將維修清洗的預期清洗容量從 17.25 毫升更正為 51.75 毫升。 更新了工作流程步驟：首先準備試劑匣，如有需要，再變性和稀釋基因庫。 將疑難排解資訊移至附錄 A。 將輸出資料夾及流通池基因模版資訊移至附錄 B。 將管理檔案相關資訊移至維修一章。 將執行後清洗指示從維修一章移至定序一章。 進行一次執行一章的名稱變更為定序。 將主要分析的參考變更為 RTA 軟體的分析。 更新執行後清洗程序的稀釋說明，模板線清洗從 6% NaOCl 變更為 5% NaOCl。 新增 NaOCl、5% 零件編號至使用者提供的耗材清單。

文件 #	日期	變更內容說明
章節 # 15027617 修訂版 O	2014 年 9 月	更新以下資訊： <ul style="list-style-type: none"> • MCS v2.5 新增內容，更新執行後清洗選項以包括模板線清洗 • 更新執行後清洗程序的稀釋說明，模板線清洗中使用次氯酸鈉 • 為執行後清洗新增預期的清洗容量 新增關於額外資源、執行選項、次要分析選項、儀器清洗和流通池上蓋顏色的 VeriSeq PGS 工作流程資訊。
章節 # 15027617 修訂版 N	2014 年 6 月	新增適用於 VeriSeq PGS 工作流程的資訊。 更新了叢集生成與密度的執行標準。 已刪除防毒保護軟體資訊。請參閱「 <i>MiSeq 系統現場準備指南</i> 」。
章節 # 15027617 修訂版 M	2014 年 1 月	更新至 MCS v2.4 加入的變更： 已新增可傳送疑難排解檔案的彙整記錄功能。
章節 # 15027617 修訂版 L	2013 年 10 月	將系統軟體的重新開機新增為執行前步驟。 在使用者提供的耗材清單中新增微量離心管。 不再將 <i>MiSeq</i> 軟體獨立作為一個章節，並將章節內容分散至整份指南之中。 移除自訂處方資料夾的相關資訊。 移除 <i>MiSeq</i> 試劑組的建議叢集密度範圍資訊。 移除 <i>MiSeq</i> 試劑組的詳細資料並新增試劑組功能的概覽。如需更多詳細資訊，請參閱您所使用之組件的試劑準備說明書。 針對商標公告新增內容。
章節 # 15027617 修訂版 K	2013 年 8 月	修正格式錯誤。
章節 # 15027617 修訂版 J	2013 年 8 月	新增 MCS v2.3 與 <i>MiSeq</i> 試劑組 v3 的執行說明。 更新以下資訊： <ul style="list-style-type: none"> • 試劑組與版本相容性以包括 <i>MiSeq</i> 試劑組 v3 • 自訂配方資料夾說明以包括 v3 子資料夾 • 變更 v2 的叢集密度範圍，新增 v3 的範圍 • 影像檔的輸出路徑 奈米流通池 (D) 與微流通池 (G) 的修正流通池條碼。 關於 <i>MiSeq</i> 試劑組的移除資訊，包括內容物與流通池類型。如需詳細資訊，請參閱「 <i>MiSeq 試劑準備指南</i> 」(文件 # 15044983)。
章節 # 15027617 修訂版 H	2013 年 3 月	新增標題為 <i>MiSeq</i> 概念的章節，介紹分析工作流程、資訊清單檔案與樣本工作表。 移除關於 FASTQ 檔案生成、資訊清單檔案格式、分析工作流程細節與樣本工作表細節等資訊。關於這些主題的資訊，請參閱「 <i>MiSeq 通報器使用手冊</i> 」，章節 # 15028784，或「 <i>MiSeq 樣本工作表快速參考指南</i> 」，章節 # 15028392。 移除準備自訂引子的指示。如需詳細資訊，請參閱「 <i>在 MiSeq 上使用自訂引子</i> 」，章節 # 15041638。

文件 #	日期	變更內容說明
章節 # 15027617 修訂版 G	2013 年 1 月	<p>移除變性與稀釋 DNA 基因庫，以及準備 Illumina PhiX 對照的指示。請參閱「準備 DNA 基因庫以便在 MiSeq 上定序」，章節 # 15039740。</p> <p>更新儀器清洗指示，增加 25 毫升的 10% Tween 20 到 475 毫升實驗室等級的水，而不是 500 毫升實驗室等級的水。</p>
章節 # 15027617 修訂版 F	2012 年 11 月	<p>新增以下新資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 新增全新 MiSeq 試劑組的組件說明：MiSeq 試劑奈米組件和 MiSeq 試劑微組件 • 新增流通池類型概覽 • 新增富集分析工作流程的說明 <p>更新以下資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • MCS v2.1 新增，更新 [Perform Wash (執行清洗)] 畫面，以新增執行後清洗選項與升高吸管的指令 • 更新版本相容性表，包括奈米與微組件相依性 • 更新版本相容性資料，包括新的試劑組
章節 # 15027617 修訂版 E	2012 年 10 月	<p>更新以下資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 修正 PhiX 對照準備指示，並預期已準備的 PhiX 對照叢集密度達 1000–1200 K/mm² • 注意變性與稀釋基因庫的程序，[<i>Preparing Your Libraries (準備您的載體)</i>]，不要套用到 Nextera XT 基因庫與 TruSeq Amplicon 基因庫 • 將升級名稱從 MiSeq 擴充套件變更為 MiSeq 硬體升級 • 新增 <i>MiSeq 通報器使用指南</i> 到 [Additional Resources (額外的資源)] 清單。

文件 #	日期	變更內容說明
章節 # 15027617 修訂版 D	2012 年 7 月	<p>更新軟體說明到 MCS v2.0。 新增以下新資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 新增標題為 <i>MCS 新功能</i> 的章節，說明新的軟體功能、介面變更與工作流程變更 • 新增 MiSeq 試劑組 v2,500 循環的目錄號碼與說明 • 新增版本相容性與要求章節 • 新增 MiSeq 擴充套件的說明，這是 14 基因模版雙介面流通池影像所需的 • 新增雙介面流通池基因模版編號的說明 • 新增 Nextera XT 基因庫的 PCR Amplicon 分析工作流程 • 在清洗程序與預期的清洗容量內，加入使用 10% Tween 20 • 將試劑匣版本新增到 RFID 讀取故障程序 <p>更新以下資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 將 IMF、CMF 與 AMX 的試劑縮寫分別變更為 v2 試劑名稱 IMS、CMS 與 AMS • 將 PhiX 濃度從 8 微微莫耳變更為 12.5 微微莫耳 • 將最終溶液的建議最高 NaOH 濃度變更為 1 mM • 注意維修清洗是從待機模式移除儀器，並開始後續執行的設定步驟所必要的 • 移除樣本工作表參數章節與工作流程中的樣本工作表設定步驟；Illumina 建議在樣本準備之前先建立樣本工作表 (請參閱「MiSeq 樣本工作表快速參考指南」，章節 # 15028392 與「Illumina Experiment Manager 使用指南」，章節 # 15031335)
章節 # 15027617 修訂版 C	2012 年 4 月	<p>更新軟體說明到 MCS v1.2。 新增下列新程序和章節：BaseSpace 概覽、使用自訂引子、生成 FASTQ 檔案、流率誤差的疑難排解、執行容積檢測、執行維修清洗與儀器空載，其中包括待機清洗。</p> <p>更新以下資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 將 Amplicon 工作流程的名稱變更為自訂 Amplicon；將 DenovoAssembly 工作流程的名稱變更為 Assembly；新增 GenerateFASTQ 工作流程 • 新增執行資料夾與檔案的說明；更新執行資料夾的命名；新增輸出檔案尺寸 • 條列基因組資料夾為樣本工作表參數中的 Amplicon 定序所必要的 • 將稀釋 NaOH 的說明新增到變性基因庫 • 將解決 RFID 讀取失敗更新以包括 MiSeq 自助服務說明 • 條列用於執行操作疑難排解所用的檔案與資料夾

文件 #	日期	變更內容說明
章節 # 15027617 修訂版 B	2011 年 12 月	<p>更新軟體說明到 MCS v1.1 新增關於防毒保護的資訊 更新以下資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 解決 RFID 故障的指示 • 準備基因庫 — 變更為 0.2 mol/L NaOH • 執行資料夾命名慣例 • 必要的磁碟空間與儲存容量 • 執行設定步驟 — 將更多資訊新增到設定樣本工作表 • 執行設定步驟 — 新增處置剩餘 PR2 的注意事項 • 分析期間 — 新增分析超過二小時的情況 • 分析輸入要求 — 針對 TruSeq 自訂 Amplicon 基因庫，依要求列出資訊清單檔案 • 修正 MiSeq 試劑組內容物中的 HT1 管子尺寸 • 將 iCom 參考變更為 Myllumina
章節 # 15027617 修訂版 A	2011 年 9 月	初版

目錄

章節 1 概覽	1
簡介	1
額外的資源	1
元件	2
MiSeq 概念	4
系統軟體	4
次要分析選項	6
定序分析檢視器	7
必要的磁碟空間	7
MiSeq 試劑組概覽	8
章節 2 開始使用	11
開始 MiSeq	11
自訂系統設定	11
BaseSpace 更新的設定通知	12
設定電子郵件喜好	12
設定預設資料夾位置	12
使用者提供的耗材	13
章節 3 定序	15
簡介	15
執行期間	15
MiSeq 工作流程	16
解凍試劑匣	17
檢查試劑匣	17
變性及稀釋基因庫	17
載入樣本基因庫	18
使用 MCS 設定執行	18
清潔流通池	19
裝載流通池	20
載入試劑	21
開始執行	23
監視執行	24
進行執行後清洗	25
章節 4 維護	29
維修頻率	29
VeriSeq PGS 工作流程的維修頻率	29
執行維修清洗	30
執行待機清洗	32
管理檔案	34
軟體更新	35
儀器關機	36

附錄 A 疑難排解	37
簡介	37
彙整記錄進行疑難排解	37
執行系統檢查	38
暫停或停止執行	38
手動升高試劑匣吸管	40
解決執行設定錯誤	40
解決 RFID 讀取失敗	40
執行容積檢測	41
測量預期的清洗容量	42
設定系統設定	42
附錄 B 輸出檔案與資料夾	45
執行資料夾	45
MiSeqOutput 資料夾內容	45
RTA 資料夾與檔案	46
索引	49
技術協助	55

章節 1 概覽

簡介	1
額外的資源	1
元件	2
MiSeq 概念	4
系統軟體	4
次要分析選項	6
定序分析檢視器	7
必要的磁碟空間	7
MiSeq 試劑組概覽	8

簡介

Illumina® MiSeq® 系統結合合成 (SBS) 技術驗證的定序與革命性工作流程，只要短短的 8 小時，就能讓您從 DNA 進展到已分析的資料。MiSeq 整合叢集生成、定序及資料分析於同一儀器。

功能

- ▶ **無人自動化** — 設定執行後，包括載入預先充填的試劑匣、緩衝瓶和流通池，如此便不需要其他的手動操作時間。
- ▶ **預先充填的試劑匣** — 特別設計的單次使用預先充填的試劑匣提供叢集生成與定序，包括雙端定序試劑與索引試劑。整合的無線電頻率識別 (RFID) 追蹤啟用精確的耗材追蹤。
- ▶ **介面控制** — MiSeq 控制軟體 (MCS) 介面提供可用來設定儀器、設定和監視執行，以及執行維護程序的控制。
- ▶ **便利的流通池載入** — 在載於儀器上時，夾鉗機制自動定位流通池。整合的無線電頻率識別 (RFID) 追蹤啟用精確的耗材追蹤。
- ▶ **創新的流控架構** — MiSeq 流控系統可在定序期間實現無與倫比的化學週期效率。
- ▶ **即時分析 (RTA)** — 在定序執行時，整合的主要分析軟體執行即時儀器上資料分析，此包括影像分析、鹼基判定，以及儲存寶貴的下游分析時間。
- ▶ **整合的次要分析軟體** — MiSeq 通報器軟體處理 RTA 分析的資料，以執行校準與提供關於所分析之每個樣本的資訊。

額外的資源

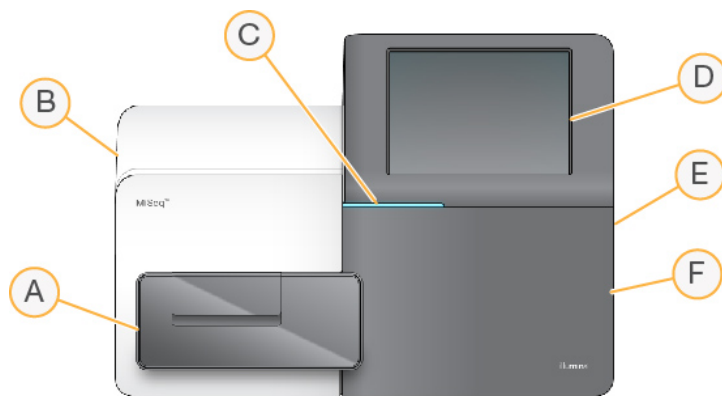
Illumina 網站的 [MiSeq 系統支援頁面](#) 可提供額外資源。其中包括軟體、訓練、相容產品及下列文件。請務必查看支援頁面取得最新版本。

資源	說明
MiSeq 系統機構準備指南 (文件 # 15027615)	提供實驗室空間、電力要求與環境考量的規格。
MiSeq 系統安全及合規指南 (文件 # 15027616)	提供關於儀器標籤、合規認證與安全考量的資訊。
Illumina 實驗管理員使用指南 (文件 # 15031335)	提供為不同工作流程和基因庫類型建立樣本板和樣本工作表的說明。
BlueFuse 工作流程管理員使用指南 (文件 # 1000000028842)	提供建立用於 VeriSeq PGS 工作流程的樣本板和樣本工作表的說明。

資源	說明
MiSeq 樣本工作表 快速參考指南 (文件 # 15028392)	提供關於新增樣本工作表設定至您的樣本工作表的資訊。
MiSeq 系統變性與稀釋基因庫指南 (文件編號 # 15039740)	在 MiSeq 上定序與準備 PhiX 對照之前，提供關於變性與稀釋備妥之樣本基因庫的指示。此步驟適用於大部份的基因庫類型。
MiSeq 自訂引子指南 (文件 # 15041638)	提供準備與載入自訂基底液的指示，以及編輯自訂基底液的樣本工作表。
MiSeq 通報器 使用指南 (文件 # 15042295)	提供分析程序、分析工作流程及 MiSeq 通報器生成之輸出檔案的綜合概覽，以及運算要求、儀器外安裝指示及疑難排解資訊。
MiSeq 通報器 線上協助	提供使用 MiSeq 通報器軟體的指示。
BlueFuse Multi 軟體指南 (文件 # 15053620)	提供分析程序、分析工作流程以及 BlueFuse Multi 生成檔案的綜合概覽、運算要求及疑難排解資訊。使用本指南執行 VeriSeq PGS 工作流程。
BaseSpace 使用指南 (文件 # 15044182)	提供使用 BaseSpace 的指示，以及每次分析工作流程生成的圖形說明。
BaseSpace Onsite 系統指南 (文件 # 15049148)	提供關於使用 BaseSpace Onsite 系統的說明。

元件

MiSeq 由一個觸控螢幕監視器、一個狀態列、一個電源按鈕和相鄰的 USB 連接埠及三個室所組成。



- A **流通池室** — 含有在執行時固定流通池的流通池台架。流通池台架馬達將台架移出有機殼的光學模組，用於流通池載入，並在開始執行時放回台架。
- B **機殼內的光學室** — 含有可以讓流通池成像的光學零組件。
- C **狀態列** — 指出流通池狀態：準備定序 (綠色)、處理中 (藍色) 或需要注意 (橘色)。
- D **觸控螢幕監視器** — 顯示控制軟體介面以供配置系統及執行設定用。
- E **外部 USB 連接埠** — 便於將檔案與資料從觸控螢幕監視器轉移到儀器電腦。
- F **試劑室** — 包含溫度適中的試劑、清洗溶液，和用來裝使用過試劑的瓶子。磁性栓鎖固定試劑室門。

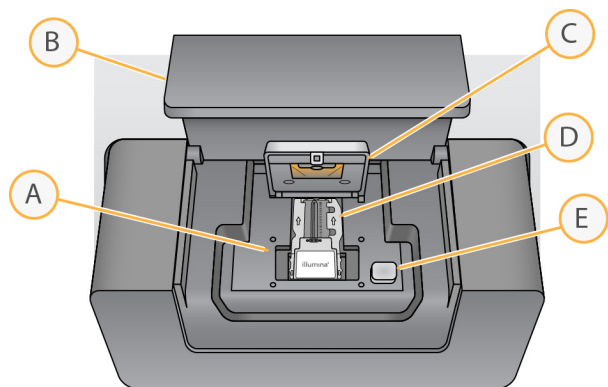
MiSeq 介面將引導您完成使用觸控螢幕監視器進行設定的步驟。載入執行零組件需要用到試劑室與流通池室。

流通池室

流通池室包含流通池台架、熱電站與到流通池的流控連接。流通池台架固定流通池，而流通池夾將流通池牢固定位。當流通池夾關閉時，靠近夾鉗絞接處的兩個插銷會自動定位流通池。

位於流通池台架下方的熱電站控制流通池溫度的變化，這是叢集生成與定序所必須的。

圖 1 流通池室



- A 流通池台架
- B 流通池室門
- C 流通池夾
- D 流通池
- E 流通池夾釋出按鈕

試劑室

試劑室包含試劑冷卻槽，以及清洗緩衝 (PR2) 瓶與廢棄物瓶的位置。為維持恆定溫度，請只在指示時打開和關閉試劑冷卻槽。



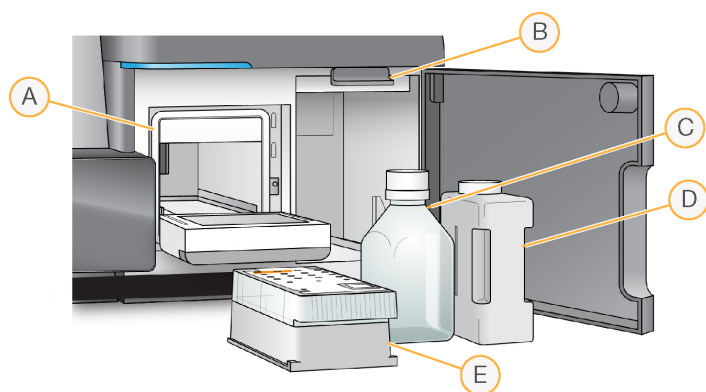
註

試劑冷卻槽的溫度範圍必須介於 2°C 至 11°C。

在執行期間，試劑冷卻槽固定一個單次使用試劑匣。在儀器清洗期間，試劑冷卻槽固定清洗托盤。在執行期間，軟體護會依所執行的程序，在適當的時間點自動將吸管降低進入試劑匣的每個貯池。

在試劑冷卻槽的右邊是兩個大小適合的插槽，用來裝 PR2 瓶和廢棄物瓶。吸管把手將瓶鎖住定位，並將適當的吸管降低至每個瓶中。試劑經吸管及流控管線被抽吸至流通池。在整個過程，試劑廢棄物被傳輸到廢棄物瓶。

圖 2 試劑室元件



- A 試劑冷卻槽
- B 吸管把手 (顯示於升起位置)
- C PR2 瓶
- D 廢棄物瓶
- E 試劑匣

MiSeq 概念

以下是執行 MiSeq 設定步驟時常見的概念與詞彙。

概念	說明
分析工作流程	由 MiSeq 通報器執行的次要分析程序。每次執行的分析工作流程明訂於樣本工作表或由特定模組明訂。
資訊清單	此檔案註明參考基因組與在校準步驟中要使用的標的參考區域。對需要資訊清單的工作流程，資訊清單檔案明訂於樣本工作表內，並複製到 MCS 中指定的資訊清單資料夾。
參考基因組	FASTA 格式檔案含有分析期間所使用的基因組序列。對於大部分的分析工作流程，參考基因組檔案明訂於樣本工作表。
執行資料夾	RTA 軟體 (MiSeqOutput 資料夾) 所擴展的資料夾結構或 MiSeq 通報器 (MiSeqAnalysis) 所擴展的資料夾。如需更多資訊，請參閱第 1 頁的 第 45 頁 執行資料夾 。
樣本工作表	逗點分隔的數值檔案 (*.csv) 內含用於設定及分析定序執行的資訊，包括樣本與其索引序列的清單。 樣本工作表必須在執行 MiSeq 的設定步驟期間提供。在執行開始時，樣本工作表重新命名為 SampleSheet.csv，並複製到執行資料夾：MiSeqTemp、MiSeqOutput 和 MiSeqAnalysis。

如需關於分析工作流程和資訊清單檔案的詳細資訊，請參閱 [「MiSeq 通報器軟體指南」](#)(文件 #15042295)。

如需關於樣本工作表的詳細資訊，請參閱 [「MiSeq 樣本工作表快速參考指南」](#)(文件 #15028392)。

系統軟體

儀器軟體套件包括可執行定序執行、儀器上分析和相關功能的整合應用程式。

- ▶ **MiSeq 控制軟體 (MCS)**—控制儀器的作業。MiSeq 控制軟體 (MCS) 介面可引導您完成步驟，載入流通池和試劑，然後再開始執行。進行執行時，品質統計概覽也會隨之出現。

- ▶ 在執行期間，MCS 會操作流通池台架、分發試劑、控制流通池溫度及拍攝流通池上的叢集影像。MCS 會根據樣本工作表所指定的參數進行執行。
- ▶ **即時分析 (RTA) 軟體**—進行影像分析和鹼基判定，並針對各循環各鹼基指派品質評分。影像會暫時儲存於執行資料夾供 RTA 進行處理，完成 RTA 分析後便會自動刪除。
- ▶ **整合的次要分析軟體**—執行次要分析。MiSeq 通報器處理 RTA 軟體產生的鹼基判定，並針對每個要求的基因組，產生校準、變異和重疊群片段組的相關資訊。樣本工作表所指定的分析工作流程會決定要執行的分析類型。如需詳細資訊，請參閱第 1 頁的 [第 7 頁 MiSeq 通報器軟體](#)。

使用儀器外的自選軟體包括「定序分析檢視器 (SAV)」。如需更多資訊，請參閱第 7 頁 [定序分析檢視器](#)。

狀態圖示

控制軟體介面上的狀態圖示，會表示執行設定期間或執行期間的條件變化。圖示上的數字代表該狀態的條件數量。

當執行狀態改變時，圖示會閃爍以提醒您注意。選擇圖示，以檢視條件的說明。選擇 **[Acknowledge (確認)]** 清除訊息，然後選擇 **[Close (關閉)]** 以關閉對話方塊。

選擇視窗頂端邊緣的圖示，篩選出現在狀態視窗的訊息類型。選擇一個圖示，切換顯示或隱藏情況。

狀態圖示	狀態名稱	說明
	狀態 OK	沒有變化，系統正常。
	注意	重要資訊，建議採取行動。
	警告	警告不會停止執行。然而，有些警告要求在繼續之前採取行動。
	錯誤	錯誤通常會停止執行，一般會在繼續執行之前要求採取行動。

活動指示器

活動指示器圖示顯示儀器目前正在進行的活動。

圖 3 活動指示器



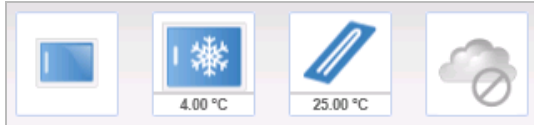
從左到右，活動指示器代表以下的活動：

- ▶ 移到 Y 階段
- ▶ 移到 Z 階段
- ▶ 啟動電子功能
- ▶ 使用攝影機
- ▶ 透過流控系统抽吸

感應器指示燈

感應器指示燈顯示在各介面畫面底部，用於表示儀器零組件的狀態。

圖 4 感應器指示燈



從左到右，感應器指示燈代表以下的零組件：

- ▶ 在關閉或打開位置的流通池室門
- ▶ 試劑冷卻槽的溫度 (°C)
- ▶ 流通池的溫度 (°C)
- ▶ BaseSpace® 連線的狀態 (圖示為未連線)

次要分析選項

可以在儀器電腦上使用 MiSeq 通報器，在有網路連線的伺服器上使用 BaseSpace™，或在雲端使用 BaseSpace 分析 MiSeq 定序資料。這些應用程式可針對每個要求的基因組及多樣本執行的各個樣本，產生校準、變異和重疊群片段組的相關資訊。如果執行 VeriSeq™ PGS 工作流程，則使用 BlueFuse™ 進行分析。

BaseSpace 與 BaseSpace Onsite 概覽

BaseSpace 是 Illumina 雲端運算環境。BaseSpace Onsite 提供專用伺服器的電腦環境，含有執行設定工具與分析選項。

設定定序執行時登入 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite。使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 時，您可以在本機儲存執行資料。如需更多資訊，請參閱第 11 頁 [自訂系統設定](#)。

在開始您的定序執行時，圖示變更為指示 MiSeq 連線到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite，且資料檔案將被傳輸到特定的位置。

圖 5 連線到 BaseSpace 圖示

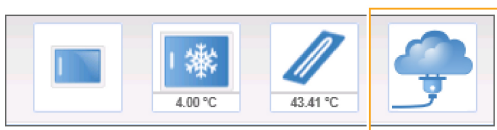


圖 6 連線到 BaseSpace Onsite 圖示



使用 BaseSpace 時，資料檔案在傳輸時加密、在分析時解密，於儲存時再度加密。使用 BaseSpace Onsite 時，資料檔案在傳輸時加密、在分析時解密，於儲存時可以自選再度加密。

在執行結束時或是所有的 RTA 分析檔案已經傳輸完成時，BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 自動切斷與 MiSeq 的連線。如果網路連線中斷，分析檔案在網路連線恢復之後，從中斷處繼續上傳。

在最後的鹼基判定檔案上傳到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 之後，馬上就開始資料的次要分析。BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 支援相同的分析工作流程，如同使用 MiSeq 通報器進行儀器上分析。

針對 MiSeq 通報器，安裝時會提供數種基因組。BaseSpace 和 BaseSpace Onsite 僅支援 MiSeq 通報器涵蓋的基因組。

您可連線到 basespace.illumina.com 的 BaseSpace。使用您的 MyIllumina 帳號登入。如需關於 BaseSpace 的詳細資訊，請參閱「*BaseSpace 使用指南 (文件 #15044182)*」與 Illumina 網站上的 BaseSpace 支援頁面。

如需關於 BaseSpace 的詳細資訊，請參閱「*BaseSpace Onsite 系統指南 (文件 #15049148)*」與 Illumina 網站上的 BaseSpace Onsite 支援頁面。

MiSeq 通報器軟體

MiSeq 通報器是 Windows Service 應用程式，處理 RTA 軟體所產生的鹼基判定。在 RTA 軟體完成定序執行的分析後，MiSeq 通報器會立即開始次要分析。

MiSeq 通報器在儀器電腦上執行。然而，軟體介面必須要透過和 MiSeq 通報器連接於同一網路的另一台電腦，從網路瀏覽器檢視。

在完成次要分析時，一個名為 CompletedJobInfo.xml 的檔案寫入到執行資料夾。如需詳細資訊，請參閱「*MiSeq 通報器軟體指南 (文件 #15042295)*」。

在分析期間的定序

MiSeq 系統運算資源專門用於定序或分析。

使用 MiSeq 通報器時，如果在先前執行的次要分析完成前，即在 MiSeq 開始一項新定序執行，MiSeq 通報器分析會自動停止。

若要重新啟動 MiSeq 通報器，請在完成新定序執行後使用 [Requeue (重新佇列)] 功能。

新執行完成定序後，先前執行的次要分析會自動重頭開始。

定序分析檢視器

使用 Illumina「定序分析檢視器 (SAV)」可以更詳盡地監測您的執行，而不會對執行造成干擾。MiSeq 必須連上網路，才能用 SAV 檢視主要分析的結果。

SAV 讓您在執行期間當計量生成時，以及在執行完成之後檢視計量。將 SAV 安裝在與 MiSeq 不同，但能存取儀器所連線相同網路的電腦上。在啟用軟體之後，瀏覽到您的執行輸出資料夾。

在模板生成之後，SAV 提供 RTA 生成的計量，並將計量組織成繪圖、圖表與表格。



註

SAV 對 Illumina 定序系統而言皆通用，且多數使用 8 通道的流通池。一些視圖包括下拉式清單，顯示通道 1-8。因為 MiSeq 流通池具有單通道，請選擇 [All (全部)] 或 [Lane 1 (通道 1)]。如需詳細資訊，請參閱「*定序分析檢視器使用指南 (文件 #15020619)*」。

必要的磁碟空間

整合式儀器電腦有大約 550 GB 的儲存容量。

在開始執行之前，軟體會檢查可用的磁碟空間。如果磁碟空間不足而無法執行，則會顯示指出需要多少磁碟空間的訊息。

如果被提示需要可用的磁碟空間，請適當移動或刪除舊的執行資料夾。如需更多資訊，請參閱第 34 頁 [管理檔案](#)。清出足夠的磁碟空間之後，選擇 **[Restart Check (重新啟動檢查)]**。

MiSeq 試劑組概覽

MiSeq 試劑組為進行定序執行所需的單次使用試劑組。您可以選擇不同的類型與大小。每種 MiSeq 試劑組均包括一個該組件專用的流通池類型與單次執行所需的所有試劑。

組件提供的流通池、PR2 瓶與試劑匣使用無線電頻率識別 (RFID)，以精確追蹤耗材與相容性。

一定要使用與流通池類型相容的試劑匣。如果試劑匣不相容，在執行設定時會出現訊息，提示您載入相容的試劑匣。

如需可用試劑組的說明，請造訪 Illumina 網站上的 [MiSeq 試劑組產品頁面](#)。

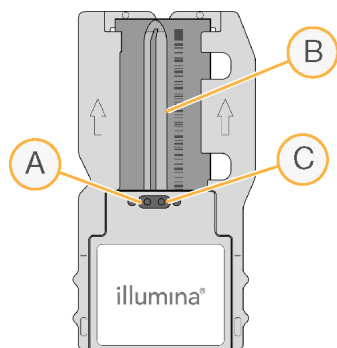
流通池

MiSeq 流通池為單次使用的玻璃底盤，是執行叢集生成與定序反應的地方。

試劑透過進料口進入流通池，通過單通道影像區域，然後透過出料口排出流通池。排出流通池的廢棄物被傳輸到廢棄物瓶。

基因庫在設定執行之前載入試劑匣，然後在開始執行之後，自動傳輸到流通池。

圖 7 MiSeq 流通池



- A 出料口
- B 影像區域
- C 進料口

流通池上蓋顏色

流通池容器上蓋顏色表示流通池的類型：

流通池	流通池上蓋顏色
標準流通池 PGS 流通池	澄清
微流通池	綠色
奈米流通池	黃色

試劑匣概覽

MiSeq 試劑匣為單次使用的耗材，當中包含以錫箔密封的貯池，並預先充填足供定序一個流通池的叢集和定序試劑。

匣上的每個貯池都有編號。樣本基因庫在標示 **[Loading Samples (載入樣本)]** 的位置 17 載入匣上。



警告

這組試劑可能含有危險的化學物質。吸入、誤食、皮膚接觸與眼睛接觸都可能造成人員傷害。為避免暴露於危險之中，請穿戴適當的保護設備，包括護眼罩、手套和實驗衣。將使用過的試劑視為化學廢棄物處理，並按照適用的地區、國家和當地法律與規定棄置。如需其他環境、健康和 safety 資訊，請參閱 SDS，網址是：support.illumina.com/sds.html。

預備貯池

圖 8 附已編號貯池的試劑匣

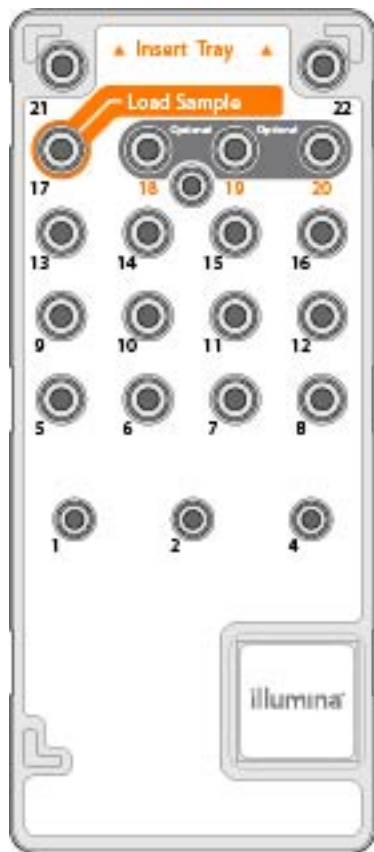


表 1 試劑匣貯池

位置	試劑名稱	說明
8	LDR	變性試劑 (包含 formamide)
17	預備的	載入樣本 (預備用於樣本基因庫)
18	預備的	預備用於自訂讀數 1 引子 [自選]
19	預備的	預備用於自訂索引讀數引子 [自選]
20	預備的	預備用於自訂讀數 2 引子 [自選]



註

如需在 MiSeq 試劑匣上使用自訂引子的詳細資訊，請參閱「*MiSeq 自訂引子指南*」(文件 # 15041638)。

章節 2 開始使用

開始 MiSeq	11
自訂系統設定	11
BaseSpace 更新的設定通知	12
設定電子郵件喜好	12
設定預設資料夾位置	12
使用者提供的耗材	13

開始 MiSeq

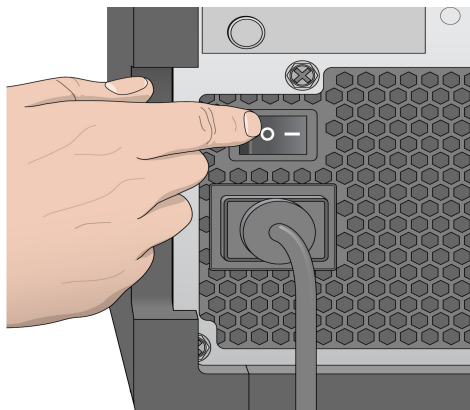
- 1 將儀器背面的電源開關切換至 | (開啟) 位置。



註

為了獲得最佳性能，請讓儀器持續運行。如必須關閉儀器，請參閱第 36 頁 [儀器關機](#)。等待至少 60 秒之後，再將電源開關轉回到 [ON (開)] 位置。

圖 9 電源開關位置



- 2 請等候系統載入，然後登入至作業系統。若有需要，請洽詢您的設施管理員，以取得使用者名稱和密碼。
載入作業系統後，MiSeq 控制軟體 (MCS) 將自動啟動並初始化系統。

自訂系統設定

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Run Options (執行選項)]**。
- 2 選擇 **[Run Settings (執行設定)]** 標籤。
- 3 選擇 **[Post Run Wash (執行後清洗)]** 或 **[Maintenance Wash (維修清洗)]**。
每次執行之後皆必須清洗儀器。在設定後續的執行之前，軟體要求進行清洗。執行後清洗選項會指定預設執行的清洗類型。執行後清洗需要大約 30 分鐘。維修清洗需要大約 1 小時。
- 4 輸入 BaseSpace Onsite 伺服器位置的位址。
如果您要使用 BaseSpace Onsite，則需要設定 Onsite 伺服器。
- 5 選取 **[Send instrument health information to Illumina to aid technical support (將儀器健康資訊傳送至 Illumina 以協助其提供技術支援)]** 以啟用 Illumina 主動監控服務。軟體介面的設定名稱可能與本指南內的設定名稱有所不同，視使用的 MCS 版本而定。

開啟此設定後，系統會將儀器效能資料傳送至 Illumina。此資料可協助 Illumina 更輕鬆地進行疑難排解並偵測潛在故障，以便執行主動維護作業並充分提高儀器正常運作時間。如需此服務優勢的更多資訊，請參閱 *Illumina 主動技術說明 (文件編號 100000052503)*。

本服務：

- ▶ 不會傳送定序資料。
- ▶ 需將儀器連線至可存取網際網路的網路。
- ▶ 預設為開啟。若要選擇退出此服務，請停用 **[Send Instrument Performance Data to Illumina to aid technical support (將儀器效能資料傳送至 Illumina 以協助其提供技術支援)]** 設定。

- 6 針對 MiSeq 通報器，選擇或清除 **[When using BaseSpace or BaseSpace Onsite, replicate analysis locally on MiSeq (使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 時，在 MiSeq 執行本機複製分析)]**。Replicate Analysis Locally (本機複製分析) 設定會指定使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 時的分析處理位置。該設定提供了同時在儀器本機與 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 執行分析的選項。
- 如果在使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 時選擇此選項，MiSeq 通報器會自動在執行之後開啟並進行本機分析。
- 如果在使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 時未選擇此選項，MiSeq 通報器不會在執行之後自動開啟，且分析只會在 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 中進行。
- 如果使用 BlueFuse Multi 執行 VeriSeq PGS 工作流程，則選擇此選項。

BaseSpace 更新的設定通知

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Manage Instrument (管理儀器)]**。
- 2 選擇 **[Software Update (軟體更新)]**。
- 3 選擇 **[Automatically check for new software updates on BaseSpace (在 BaseSpace 上自動檢查新的軟體更新)]**。

設定電子郵件喜好

MiSeq 可以設定為在完成 RTA 分析、完成儀器上次要分析，或發生重大的 MiSeq 軟體錯誤時，傳送電子郵件通知。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Run Options (執行選項)]**。
- 2 選擇 **[Email Notifications (電子郵件通知)]** 標籤。
- 3 輸入以下資訊：
 - ▶ **[Local SMTP email server address (本機 SMTP 電子郵件伺服器位址)]** — 使用畫面上的鍵盤輸入本機 SMTP 電子郵件伺服器位址。必要時，請聯絡設施管理員以取得該資訊。
 - ▶ **[Sender address (寄件人電子郵件位址)]** — 使用畫面上的鍵盤輸入寄件人電子郵件位址。此位址可以是您的電子郵件位址，或是指定為寄送電子郵件通知的不同位址。
 - ▶ **[Recipient addresses (收件人位址)]** — 使用畫面上的鍵盤輸入要接收通知的每位收件人之電子郵件位址。以逗號區隔每個不同的電子郵件位址。選擇 **[Test (測試)]** 以傳送測試電子郵件給通知收件人。
 - ▶ **[Notify via email when (透過電子郵件通知的時機)]** — 選擇觸發通知之每個執行事件的勾選方塊。

設定預設資料夾位置

資料夾可以在本機網路或是儀器電腦上。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 [Run Options (執行選項)]。
- 2 選擇 [Folder Settings (資料夾設定)] 標籤。
- 3 輸入以下資料夾的預設位置。
 - ▶ **[Recipe Folder (處方資料夾)]** – 設定處方的預設位置。處方是軟體用於執行定序的 XML 檔案。處方是在根據樣本工作表參數的執行開始時所建立的，之後處方會被複製到輸出資料夾。
 - ▶ **[Sample Sheets (樣本工作表)]** – 設定樣本工作表的預設位置。樣本工作表是在基因庫準備之前所建立的，包含用於執行的參數。
 - ▶ **[Manifest Folder (資訊清單資料夾)]** – 有些基因庫類型需要資訊清單檔案。請參閱樣本準備說明書的樣本準備組件，以及「樣本工作表快速參考指南」(文件 #15028392)。
 - ▶ **[MiSeqOutput]** – MiSeq 通報器適用，設定分析輸出檔案的預設位置。將預設輸出資料夾變更為網路位置，以利共享、長期儲存與自選離線使用 MiSeq 通報器。如需更多資訊，請參閱第 1 頁的 [第 45 頁 執行資料夾](#)。

使用者提供的耗材

在開始執行之前，確定備有以下使用者提供的耗材。

耗材	供應商	用途
庫存 1.0 mol/L NaOH, 分子生物等級	一般實驗室供應商	變性樣本庫與 PhiX 對照 DNA
酒精棉球, 70% 異丙基或乙醇, 70%	VWR, 目錄 #95041-714* 一般實驗室供應商	清潔流通池固定座
無粉末的拋棄式手套	一般實驗室供應商	一般用途
低棉絮實驗室拭紙	VWR, 目錄 #21905-026*	清洗流通池台架和覆蓋載入樣本貯池的錫箔封環
拭鏡紙, 4 x 6 英寸	VWR, 目錄 #52846-001*	清潔流通池
微量離心管	一般實驗室供應商	變性與稀釋樣本庫以及 PhiX 對照 DNA
MiSeq 試管	Illumina, 零件 # MS-102-9999	清洗模板線, 用於 VeriSeq PGS 工作流程 (其他工作流程自選)
NaOCl, 5%	Sigma-Aldrich, 目錄 #239305*	清洗模板線, 用於 VeriSeq PGS 工作流程 (其他工作流程自選)
Tween 20	Sigma-Aldrich, 目錄 #P7949	清洗儀器
鑷子, 方頭塑膠 (自選)	McMaster-Carr, 目錄 #7003A22*	從流通池運送容器移出流通池
水, 實驗室等級	一般實驗室供應商	清洗儀器

* 或者相等的實驗室等級

實驗室等級的用水指導原則

執行儀器的程序請一律使用實驗室等級的水或者去離子水。切勿使用自來水。僅使用以下等級或相同等級的水：

- ▶ 去離子水
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18 Megohms (MΩ) 水

- ▶ Milli-Q 水
- ▶ Super-Q 水
- ▶ 分子生物學等級的用水

章節 3 定序

簡介	15
執行期間	15
MiSeq 工作流程	16
解凍試劑匣	17
檢查試劑匣	17
變性及稀釋基因庫	17
載入樣本基因庫	18
使用 MCS 設定執行	18
清潔流通池	19
裝載流通池	20
載入試劑	21
開始執行	23
監視執行	24
進行執行後清洗	25

簡介

若要在 MiSeq 上執行定序執行，請依照本章中所述的設定步驟進行。

在開始執行之後，不需要其他的使用者介入。

定序執行可從 [Sequencing (定序)] 畫面或遠端使用定序分析檢視器 (SAV) 進行監控。此自選應用程式可從 Illumina 網站下載。

在完成定序執行之後，執行儀器清洗。

執行期間

執行期間依進行的循環數而定。您可執行雙端執行最多 2×301 定序循環，加上搭配 MCS v2.3 以上版本的任何索引讀數取。

此外，執行期間依您所使用的 MiSeq 試劑版本，以及安裝於儀器上的效能強化升級而定。

對於預期的時間與其他規格，造訪 Illumina 網站上的 [MiSeq 系統規格網頁](#)。

讀數中的循環數

在一個定序執行中，一個讀數中執行的循環數比所分析循環數多一循環。額外的循環為定相與預定相計算所需。

例如，雙端 300 循環執行進行兩個 301 循環的讀數 (2×301)，總共是 602 循環。在執行結束時，分析 2×300 個循環。

MiSeq 工作流程



準備預先充填的試劑匣以供使用。



變性與稀釋基因庫 (不適用於所有的基因庫類型)。請參閱「準備基因庫以便在 MiSeq 上定序」(文件 #15039740)。



將基因庫混合物載入指定貯池的試劑匣。



從軟體介面選擇 **[Sequence (定序)]** 以開始執行設定步驟。
[自選] 連線到 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite。



清洗與徹底乾燥流通池。
載入流通池。



載入 PR2 瓶並確定廢棄物瓶是空的。
載入試劑匣。



檢視執行參數與執行前檢查結果。
選擇 **[Start Run (開始執行)]**。



從 MCS 介面或是從另一台電腦使用定序分析檢視器 (Sequencing Analysis Viewer, 簡稱 SAV) 監視您的執行。



進行執行後清洗。

叢集生成

在叢集生成期間，單一 DNA 分子凝固在流通池表面，然後橋式放大以形成叢集。

定序

在叢集生成之後，使用 LED 與四個螢光標示的雙去氧核苷酸各自專屬的濾網組合，進行叢集的成像。在一個基因模版成像完成之後，流通池移入固定位置，以曝露下一個基因模版。定序的每個循環重覆此流程。分析影像後，軟體會執行鹼基判定、過濾與品質評分。

分析

在執行完成時，MiSeq 通報器分析軟體會自動執行次要分析，包括校準和變異判定。您可以使用另一台電腦的網路連線監視次要分析。如需詳細資訊，請參閱第 1 頁的 [第 7 頁 MiSeq 通報器軟體](#)

解凍試劑匣

請用室溫水浴槽解凍試劑匣。

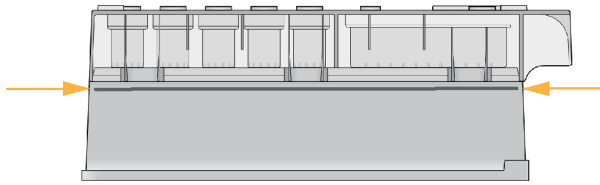


註

或者您也可以將試劑放在 2°C 至 8°C 儲存庫中整晚來將之解凍。放在該溫度下時，試劑最長可保持穩定一週。

- 1 將試劑匣從 -25°C 儲存庫中取出，移至 -15°C 儲存庫。
- 2 將試劑匣放在裝有充足室溫去離子水的水浴槽中，以浸沒試劑匣的底部。水量請勿超過試劑匣上所指示的最高水位線。

圖 10 最高水位線



- 3 讓試劑匣在室溫水浴槽中解凍，直到其完全解凍。
 - ▶ MiSeq v3 匣 — 約 60-90 分鐘。
 - ▶ MiSeq v2 匣 — 約 60 分鐘。
- 4 將試劑匣移出水浴槽並在工作台上輕輕拍打，去除試劑匣底部的水份。擦乾匣底。

檢查試劑匣

- 1 反轉試劑匣十次以混合解凍後的試劑，隨後檢查是否所有位置均已解凍。
- 2 檢查位置 1、2 和 4 的試劑，確定混合均勻且不含沉澱。
- 3 在工作台上輕輕拍打試劑匣以減少試劑內的氣泡。



註

MiSeq 吸管會伸至各貯池底部以吸取試劑，所以貯池內務必不含氣泡。

- 4 將試劑匣放到冰上最長六小時，或者暫置於 2°C 至 8°C 中，直到準備好設定執行。若要獲得最佳效果，請直接進入載入樣本和設定執行的步驟。



警告

這組試劑可能含有危險的化學物質。吸入、誤食、皮膚接觸與眼睛接觸都可能造成人員傷害。為避免暴露於危險之中，請穿戴適當的保護設備，包括護眼罩、手套和實驗衣。將使用過的試劑視為化學廢棄物處理，並按照適用的地區、國家和當地法律與規定棄置。如需其他環境、健康和 safety 資訊，請參閱 SDS，網址是：support.illumina.com/sds.html。

變性及稀釋基因庫

如果您的基因庫類型有需要，請變性及稀釋基因庫，並添加自選的 PhiX 對照。請參閱「MiSeq 系統變性及稀釋基因庫指南」(文件編號 #15039740)。如果您在執行 VeriSeq PGS 工作流程，請參閱「VeriSeq PGS 基因庫準備指南」(文件 #15052877)。

本步驟並不適用於所有的基因庫類型。有些 Illumina 樣本準備方法可產生隨時可用的匯聚基因庫標準化濃度。參考樣本準備指南，以了解用於準備樣本基因庫的組件。



註

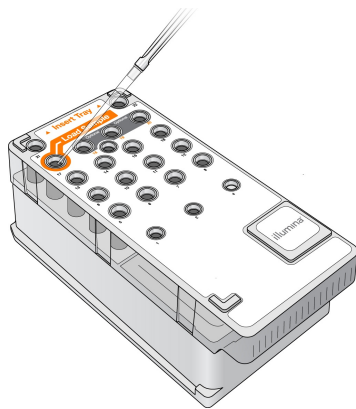
如果使用的是自訂引子，請準備引子並依照 *MiSeq 自訂引子指南* (文件 #15041638) 中所述來設定樣本工作表。

載入樣本基因庫

在試劑匣完全解凍並可以備用時，請將備妥的基因庫載入匣上。

- 1 使用低棉絮實驗室拭紙，清潔標示為 **[Load Samples (載入樣本)]** 的貯池所包覆的錫箔封環。
- 2 使用乾淨的 1 毫升吸量管刺穿錫箔封環。
- 3 用吸管吸取 600 µl 備妥的基因庫，放入 **[Load Samples (載入樣本)]** 的貯池。避免接觸錫箔封環。

圖 11 載入基因庫



- 4 使用 MiSeq 控制軟體 (MCS) 介面直接跳至執行設定步驟。

使用 MCS 設定執行

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Manage Instrument (管理儀器)]**。
- 2 選擇 **[Reboot (重新開機)]** 重新啟動系統軟體。
- 3 **[自選]** 在 [Run Options (執行選項)] 畫面上，檢查 MiSeqOutput、處方、樣本工作表和資訊清單的資料夾位置。如需更多資訊，請參閱第 1 頁的第 12 頁 [設定預設資料夾位置](#)。
- 4 從 [Home (首頁)] 畫面中，選擇 **[Sequence (定序)]** 以開始執行設定步驟。
從 [Home (首頁)] 畫面中，選擇 **[Sequence (定序)]**，一系列的執行設定畫面將按下列順序開啟：BaseSpace 選項、載入流通池、載入試劑、檢視和執行前檢查。

設定 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 選項

使用 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 自選執行次要分析。

- 1 從 [BaseSpace Options (BaseSpace 選項)] 畫面選擇或清除 **[Use BaseSpace for storage and analysis (使用 BaseSpace 進行儲存與分析)]** 及 **[Use BaseSpace Onsite for storage and analysis (使用 BaseSpace Onsite 進行儲存與分析)]** 核取方塊。
- 2 選擇 **[Next (下一步)]**。

清潔流通池

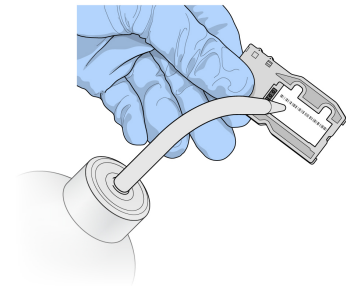
- 1 戴上一雙無粉末的新手套。
- 2 使用塑膠鑷子從塑膠匣底部夾住流通池，並從流通池容器中移出。

圖 12 移除流通池



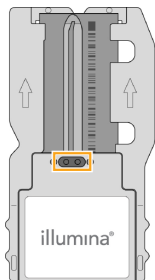
- 3 以實驗室等級的水輕輕沖洗流通池，直到已經徹底清除玻璃和塑膠匣多餘的鹽分。多餘的鹽分會影響流通池在儀器的定位。如果鹽分凝結於影像區域，成像也會受到影響。

圖 13 沖洗流通池



- 4 留意黑色的流通池口墊片，使用無棉絮鏡片清潔拭紙徹底擦乾流通池與匣子。輕輕拍乾墊片與相鄰的玻璃區域。

圖 14 流通池口與墊片



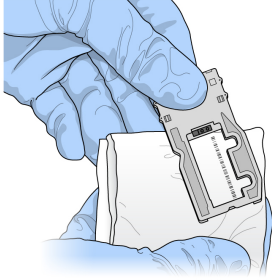
- 5 使用酒精棉球清潔流通池玻璃。確定玻璃沒有條痕、指紋與棉絮或拭紙纖維。



註

流通池口墊片避免使用酒精棉球。

圖 15 乾燥流通池

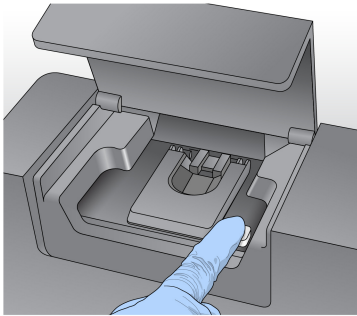


- 6 以無棉絮鏡片清潔拭紙擦乾多餘的酒精。
- 7 確定流通池口沒有阻塞，且墊片完好地固定在流通池口。
如果墊片移位，輕輕壓回固定，直到穩固地位於流通池口。

裝載流通池

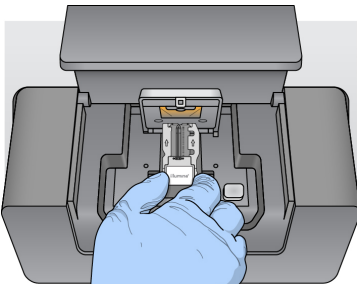
- 1 升起流通池室門，然後將釋出按鈕壓向流通池夾的右邊。
流通池夾會打開。

圖 16 打開流通池夾



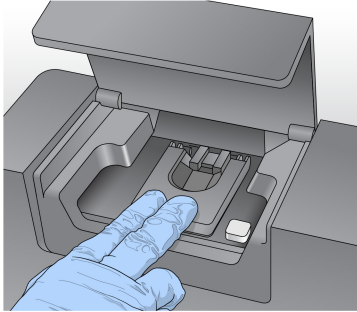
- 2 確保流通池台架沒有棉絮。如果有棉絮或其他碎片，使用酒精棉球或以乙醇或異丙醇浸濕的無棉絮拭紙清潔流通池台架。仔細擦拭流通池台架的表面，直到潔淨且乾燥為止。
- 3 握著流通池的邊緣，將其放到流通池台架上。

圖 17 將流通池置於台架上



- 4 輕輕壓下流通池夾，以關閉流通池。
流通池夾關閉時，將插銷位置與流通池對齊。聽到卡住的聲音表示流通池夾已固定。

圖 18 關閉流通池夾



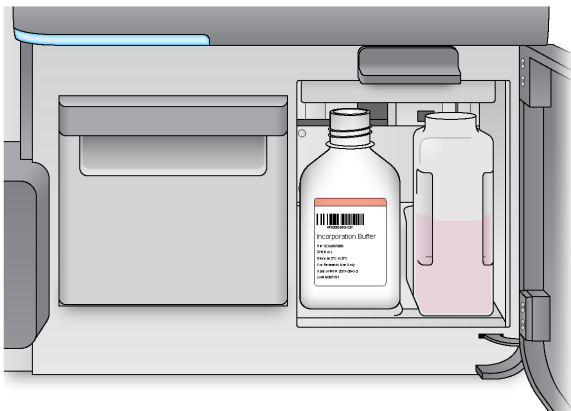
- 5 如果軟體無法辨識流通池的 RFID，請參閱第 40 頁 [解決 RFID 讀取失敗](#)。
- 6 關閉流通池室門。
- 7 選擇 [Next (下一步)]。

載入試劑

載入 PR2 並檢查廢棄物瓶

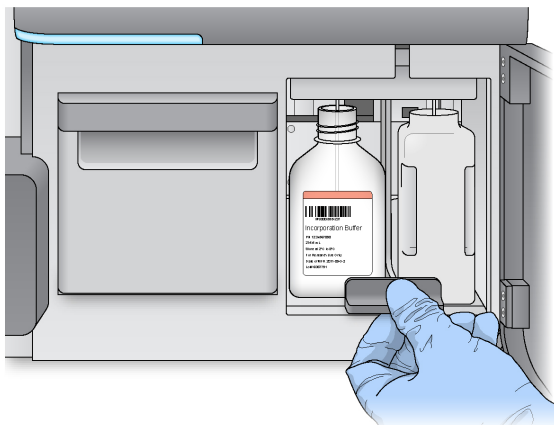
- 1 將 PR2 瓶從 2°C 儲存庫中取出，移至 8°C 儲存庫。翻轉以混合，然後移除蓋子。
- 2 打開試劑室門。
- 3 升起吸管把手直到鎖定為止。
- 4 移除清洗瓶並載入 PR2 瓶。

圖 19 載入 PR2 瓶



- 5 將廢棄物瓶的內容物倒入適當的廢棄物容器中。
- 6 慢慢降低吸管把手。確定吸管降低進入 PR2 與廢棄物瓶。

圖 20 降低吸管把手



- 7 如果軟體無法辨識 PR2 瓶的 RFID，請參閱第 40 頁 [解決 RFID 讀取失敗](#)。
- 8 選擇 **[Next (下一步)]**。

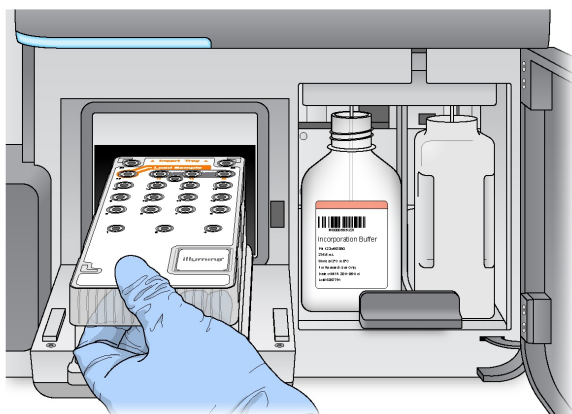
載入試劑匣

- 1 打開試劑冷卻槽門。

 **註**
不要讓試劑冷卻槽門長期開著。

- 2 握住末端有 Illumina 標籤的試劑匣，並將試劑匣滑入試劑冷卻槽，直到試劑匣停止為止。一定要使用與您所載入的流通池類型相容的試劑匣。如果試劑匣不相容，畫面上會出現訊息。選擇 **[Back (返回)]** 以載入適當的試劑匣，或選擇 **[Home (首頁)]**，以返回 **[Home (首頁)]** 畫面。

圖 21 載入試劑匣



- 3 關閉試劑冷卻槽門。
- 4 如果軟體無法辨識試劑匣的 RFID，請參閱第 40 頁 [解決 RFID 讀取失敗](#)。
- 5 如果試劑匣與流通池不相容，會出現一個訊息。選擇 **[Back (返回)]** 以載入相容的匣，或選擇 **[Exit (離開)]**，以返回 **[Home (首頁)]** 畫面。
- 6 關閉試劑室門。

7 選擇 **[Next (下一步)]**。

變更樣本工作表

請為下列項目使用 **[Change Sample Sheet (變更樣本工作表)]** 指令：

- ▶ 選擇一個名稱與試劑匣的條碼編號不符的樣本工作表
- ▶ 軟體在 **[Review (檢視)]** 畫面上提示您選擇不同的樣本工作表

每次執行皆必須有一份樣本工作表。根據預設，軟體會搜尋名稱符合載入儀器上之試劑匣條碼編號的樣本工作表檔案。如果未發現樣本工作表，會出現一道訊息提示您瀏覽到執行的正確樣本工作表位置。

為了避免軟體搜尋不成功，在 **[Load Reagents (載入試劑)]** 畫面使用 **[Change Sample Sheet (變更樣本工作表)]** 指令，以導引軟體到適當的樣本工作表。

- 1 在 **[Load Reagents (載入試劑)]** 畫面，選擇 **[Change Sample Sheet (變更樣本工作表)]**。
- 2 選擇 **[Browse (瀏覽)]** 前往樣本工作表。
- 3 選擇 **[Open (開啟)]**。
- 4 選擇 **[Save and Continue (儲存並繼續)]**。
- 5 選擇 **[Next (下一步)]**。

開始執行

在載入流通池與試劑之後，檢視執行參數，並在開始執行之前進行執行前檢查。

檢視執行參數

- 1 檢視實驗名稱、分析工作流程與讀取長度。這些參數註明於樣本工作表。
- 2 選擇 **[Change Folder (變更資料夾)]** 以檢視資料夾位置。
- 3 視需要修改，然後選擇 **[Save (儲存)]**。
- 4 選擇 **[Next (下一步)]**。

變更資料夾

如要變更資料夾位置，選擇 **[Change Folders (變更資料夾)]**，然後瀏覽到偏好的位置。在 **[Review (檢視)]** 畫面使用此選項，只會改變目前執行的資料夾位置。

檢視執行前檢查

系統在開始執行之前，會進行所有零組件、磁碟空間與網路連線的檢查。

如果有任何項目未通過執行前檢查，螢幕上會出現指示如何修正錯誤的訊息。如需更多資訊，請參閱第 40 頁 **解決執行設定錯誤**。

在所有的項目成功通過執行前檢查時，選擇 **[Start Run (開始執行)]**。

開始執行之前的重要事項



警告

MiSeq 對震動敏感。在開始執行之後碰觸儀器，可能對定序結果有不良的影響。

在選擇 **[Start Run (開始執行)]** 之後，請勿打開流通池室或試劑室的門，除了暫停執行之外，也不要碰觸儀器監視器。如需更多資訊，請參閱第 38 頁 **暫停執行**。



警告

開始執行前務必先關閉 MiSeq 上所有的檔案，且請勿在執行期間開啟檔案。

監視執行

- 1 在執行時，監視在 [Sequencing (定序)] 畫面上出現的執行進度、強度與品質評分。[Sequencing (定序)] 畫面是唯視。

如要以更精密的細節監視執行，請使用安裝於與儀器電腦不相依之電腦上的定序分析檢視器 (Sequencing Analysis Viewer, 簡稱 SAV)。網路連線是必要的。

或者，若您連線至 BaseSpace，則可在 BaseSpace 內使用 SAV 監視執行。

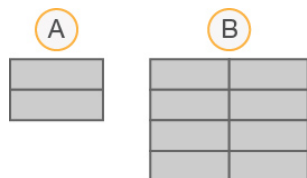
▶ **[Run Progress (執行進度)]** – 在狀態列顯示執行進度，並列出已完成的循環數目。

▶ **[Intensity (強度)]** – 顯示每個基因模版的第 90 個百分點的叢集強度數值。

強度區域的圖形代表基因模版的數量與成像的表面數量：

▶ 如果流通池僅在頂端表面成像，畫面會出現一個單列圖形。

▶ 如果流通池在頂端表面與底部表面成像，則會出現一個 2 欄圖形。



A 表示 2 個基因模版，僅有頂端表面

B 表示 4 個基因模版，頂端與底部表面

- ▶ **[Q-Score All Cycles (Q-評分所有循環)]** – 顯示鹼基大於 Q30 的平均百分比，這是品質評分 (Q-評分) 衡量。Q-評分是錯誤鹼基判定的或然率預測。Q-評分在循環 25 之後才會開始計算。

Q-評分	錯誤鹼基判定的或然率
Q40	1/10,000
Q30	1/1,000
Q20	1/100
Q10	1/10

▶ **[Cluster Density (K/mm²) (叢集密度 (K/mm²))]** – 顯示該執行每平方毫米的叢集數量。

▶ **[Clusters Passing Filter (%) (通過濾網的叢集 (%))]** – 根據測量品質的 Illumina 純度濾網，顯示通過濾網的叢集百分比。此資料僅在循環 25 後出現。



註

鹼基判定的純度是最大訊號的強度比率除以 2 個最大訊號的總和。如果在前 25 循環中，1 個以上的鹼基判定具有小於 0.6 的純度數值，讀數不會通過品質濾網。

- ▶ **[Estimated Yield (Mb) (估計的收益 (Mb))]** – 顯示該執行所判定的預測鹼基數量，測量單位為百萬鹼基。此資料僅在循環 25 後出現。
- 2 在執行完成時，會出現 [Next (下一步)] 的按鈕。在進行之前，審查 [Sequencing (定序)] 畫面上的結果。



註

在選擇 [Next (下一步)] 之前，都可以檢視 [Sequencing (定序)] 畫面。在選擇 [Next (下一步)] 之後，無法返回 [Sequencing (定序)] 畫面。

- 3 選擇 **[Next (下一步)]** 離開 [Sequencing (定序)] 畫面，並進入執行後清洗。

模板生成

模板生成是一個流程，其中整個流通池表面的叢集位置是根據 X 與 Y 座標位置而定義。即時分析 (RTA) 將執行的前幾個循環用於模板生成。

在生成叢集位置的模板之後，在成像的每個後續循環所製造的影像，都會根據模板校準。萃取四個核苷酸顏色通道內的每個叢集強度，並從標準化的叢集強度產生鹼基判定。

執行計量

在執行期間的不同時間點，[Sequencing (定序)] 畫面出現執行計量。在叢集生成步驟時，沒有計量會出現。

在定序開始之後，以下的計量會出現在指定的循環：

計量	組件	循環
強度	MiSeq 試劑組, v3	循環 1-7
	MiSeq 試劑組, v2	循環 1-4
	MiSeq 試劑組, v1	循環 1-4
強度與叢集密度	MiSeq 試劑組, v3	循環 8-25
	MiSeq 試劑組, v2	循環 5-25
	MiSeq 試劑組, v1	循環 5-25
強度, 叢集密度, % PF, 收益與 Q 評分	MiSeq 試劑組, v3	循環 26 到執行結束
	MiSeq 試劑組, v2	
	MiSeq 試劑組, v1	

對於 MiSeq 執行規格，造訪 Illumina 網站 (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn) 上的 MiSeq 系統規格網頁。

RTA 分析結果

定序執行的 RTA 分析輸出是一組品質評分的鹼基判定檔案 (*.bcl)，這是由原影像檔所生成的。如需 RTA 檔案和資料夾的清單，請參閱第 46 頁 **RTA 資料夾與檔案**。

進行執行後清洗

執行後清洗是定序執行之間進行的標準儀器清洗程序。在完成一次執行之後，一定要進行儀器清洗。依照軟體提示以載入沖洗零組件並進行清洗。執行後清洗需要大約 20 分鐘。

在完成執行後直接開始清洗。在設定後續的執行之前，儀器清洗是必要的。若不是在完成執行後直接進行執行後清洗，請使用 [Perform Wash (進行清洗)] 畫面上的指令來啟動清洗。



註

將用過的流通池留在儀器上。流通池必須載於儀器之上，以執行儀器清洗。

以下列方式的定期儀器清洗，確保持續的效能：

- ▶ 從流控管線與吸管沖洗任何剩餘的試劑
- ▶ 避免流控管線與吸管中的鹽分累積與結晶
- ▶ 避免前一次執行的交叉汙染

如果您使用 MCS v2.5 或稍後清洗，您可以進行一次執行後清洗，包括使用次氯酸鈉溶液 (NaOCl) 進行模板線清洗。清洗需時大約 30 分鐘。請參閱第 27 頁 [模板線清洗程序](#)。



註

如果您使用 VeriSeq PGS 工作流程，請進行包括一次模板清洗的執行後清洗。請參閱第 27 頁 [模板線清洗程序](#)。

耗材

- ▶ Tween 20
- ▶ 實驗室等級的水
- ▶ NaOCl (進行包括一次模板清洗的執行後清洗時使用)
- ▶ MiSeq 試管 (零件 # MS-102-9999)(用於包括一次模板線清洗的執行後清洗)

程序

- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮清洗溶液：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水。這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 以新鮮的清洗溶液準備沖洗零組件：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 3 在執行完成時，選擇 **[Start Wash (開始清洗)]**。
軟體自動升起試劑冷卻槽中的吸管。
請勿選擇 [Post-Run Wash (執行後清洗)] 畫面上的 **[Perform optional template line wash (進行選擇性模板線清洗)]**。模板線清洗需要不同的程序。請參閱第 27 頁 [模板線清洗程序](#)。
- 4 打開試劑室門與試劑冷卻槽門，並從冷卻槽滑出用過的試劑匣。
- 5 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止，然後關閉試劑冷卻槽門。
- 6 升起 PR2 瓶與廢棄物瓶前面的吸管把手，直到鎖定就位。
- 7 移除 PR2 瓶，並以清洗瓶取代。



註

在每次執行之後棄置 PR2 瓶。不要重覆使用任何剩餘的 PR2。

- 8 移除廢棄物瓶，並適當棄置內容物。將廢棄物瓶放回試劑室。

**警告**

這組試劑可能含有危險的化學物質。吸入、誤食、皮膚接觸與眼睛接觸都可能造成人員傷害。為避免暴露於危險之中，請穿戴適當的保護設備，包括護眼罩、手套和實驗衣。將使用過的試劑視為化學廢棄物處理，並按照適用的地區、國家和當地法律與規定棄置。如需其他環境、健康和 safety 資訊，請參閱 SDS，網址是：support.illumina.com/sds.html。

- 9 慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
- 10 關閉試劑室門。
- 11 選擇 [Next (下一步)]。

在清洗完成之後，將使用過的流通池、清洗托盤，以及含有剩餘清洗溶液的清洗瓶留在儀器上。

**註**

吸管留在下方位置是正常的。將未使用的清洗溶液留在清洗托盤與清洗瓶之內，以避免吸管乾掉，並讓空氣進入系統。

模板線清洗程序

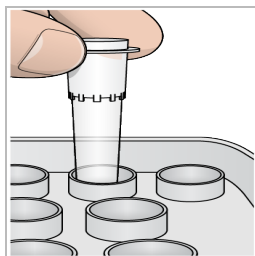
- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮清洗溶液：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水。這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 以實驗室等級的水製準備新鮮 NaOCl 清洗溶液：
 - a 將 36 μ l 的 5% NaOCl 添加至 864 μ l 實驗室等級的水中。這形成 1:25 的 NaOCl 稀釋溶液。
 - b 將 50 μ l 的 1:25 NaOCl 稀釋溶液添加至裝在 MiSeq 試管中的 950 μ l 實驗室等級水中 (章節 # MS-102-9999)。

**註**

請務必使用正確濃度的 NaOCl。請確定有檢查產品標籤上的 NaOCl 百分比。如果濃度過高，可能會使後續執行的叢集生成失敗。如果 5% NaOCl 不可用，請使用實驗室等級的水製備 1 毫升的 0.01% NaOCl 溶液。**請勿**在維修清洗或待機清洗中使用 NaOCl。

- 3 以新鮮的清洗溶液準備沖洗零組件：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 4 將含有 0.01% NaOCl 清洗溶液的 MiSeq 試管插入清洗托盤 的位置 17，直到試管頸部受到托盤沖洗。該管會取代位置 17 的 Tween 20 和實驗室等級用水清洗溶液。

圖 22 MiSeq 管在清洗托盤的位置 17



**註**

請確定只將含 NaOCl 的 MiSeq 試管插入托盤的位置 17。將試管插入其他位置可能造成後續執行的叢集生成失敗，並可能損害 MiSeq 儀器的流控系統。

- 5 在執行完成時，選擇 **[Start Wash (開始清洗)]**。軟體自動升起試劑冷卻槽中的吸管。
- 6 在 **[Post-Run Wash (執行後清洗)]** 畫面上選擇 **[Perform optional template line wash (進行選擇性模板線清洗)]**。
使用 VeriSeq PGS 工作流程時，已為您預選了 **[Perform optional template line wash (進行自選模板線清洗)]**。MCS 會追蹤每次執行後所執行的執行後清洗類型。如果「執行後清洗」程序沒有選擇 **[Perform optional template line wash (進行選擇性模板線清洗)]**，下次您開始定序執行時，**[Run Review (執行檢視)]** 畫面上會顯示訊息提醒您。
- 7 打開試劑室門與試劑冷卻槽門，並從冷卻槽滑出用過的試劑匣。
- 8 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止，然後關閉試劑冷卻槽門。
- 9 升起 PR2 瓶與廢棄物瓶前面的吸管把手，直到鎖定就位。
- 10 移除 PR2 瓶，並以清洗瓶取代。

**註**

在每次執行之後棄置 PR2 瓶。不要重覆使用任何剩餘的 PR2。

- 11 移除廢棄物瓶，並適當棄置內容物。將廢棄物瓶放回試劑室。

**警告**

這組試劑可能含有危險的化學物質。吸入、誤食、皮膚接觸與眼睛接觸都可能造成人員傷害。為避免暴露於危險之中，請穿戴適當的保護設備，包括護眼罩、手套和實驗衣。將使用過的試劑視為化學廢棄物處理，並按照適用的地區、國家和當地法律與規定棄置。如需其他環境、健康和 safety 資訊，請參閱 SDS，網址是：support.illumina.com/sds.html。

- 12 慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
- 13 關閉試劑室門。
- 14 選擇 **[Next (下一步)]**。

在清洗完成之後，將使用過的流通池、清洗托盤，以及含有剩餘清洗溶液的清洗瓶留在儀器上。

**註**

吸管會留在下方位置。將未使用的清洗溶液留在清洗托盤與清洗瓶之內，以避免吸管乾掉，並讓空氣進入系統。

章節 4 維護

維修頻率	29
VeriSeq PGS 工作流程的維修頻率	29
執行維修清洗	30
執行待機清洗	32
管理檔案	34
軟體更新	35
儀器關機	36

維修頻率

依建議的間隔執行以下的維修程序。



註

如果執行 VeriSeq PGS 工作流程，請確保遵守 VeriSeq PGS 的維修頻率指南。請參閱第 29 頁 *VeriSeq PGS 工作流程的維修頻率*。

表 2 在正常操作期間維修

活動	頻率
執行後清洗	在每次執行之後
維修清洗	每月
待機清洗	準備閒置模式 (如果未使用 ≥ 7 天), 且每 30 天儀器保持閒置
儀器關機	依情況需要

表 3 在空載模式維修 (≥ 7 天未使用)

活動	頻率
待機清洗	每月
儀器關機	依情況需要

VeriSeq PGS 工作流程的維修頻率

如果執行 VeriSeq PGS 工作流程，請依建議的間隔執行以下的維修程序。

表 4 在正常操作期間維修

活動	頻率
執行後清洗	在每次執行之後
維修清洗	每月
在 [Perform Wash (執行清洗)] 畫面進行 [Post-Run Wash (執行後清洗)]	在空載模式之後 (未使用 > 3 天)
待機清洗	準備閒置模式 (如果未使用 ≥ 7 天), 且每 30 天儀器保持閒置
儀器關機	依情況需要

表 5 在空載模式維修 (≥ 7 天未使用)

活動	頻率
待機清洗	每月
儀器關機	依情況需要

執行維修清洗

每 30 天執行一次維修清洗，以確保最佳的性能。

維修清洗大約需要 90 分鐘完成。該清洗包括三個清洗步驟，其可徹底沖洗系統。

您可以設定儀器在兩次執行之間進行維修清洗。如需更多資訊，請參閱第 11 頁 *自訂系統設定*。

使用者提供的耗材

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, 目錄 # P7949)
- ▶ 實驗室等級的水

程序

- 1 確定使用過的流通池載於儀器之上。
- 2 從 [Home (首頁)] 畫面，選擇 **[Perform Wash (執行清洗)]**。
- 3 在 [Perform Wash (執行清洗)] 畫面上，選擇 **[Perform Maintenance Wash (執行維修清洗)]**。
軟體自動升起試劑冷卻槽中的吸管。

執行首次清洗

- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮清洗溶液：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水，這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 以新鮮的清洗溶液準備沖洗零組件：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 3 將清洗托盤與清洗瓶載於儀器之上：
 - a 打開試劑室門與試劑冷卻槽門，從冷卻槽滑出用過的試劑匣或清洗托盤。
 - b 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止。關閉試劑冷卻槽門。
 - c 升起 PR2 瓶與廢棄物瓶前方的吸管把手，直到鎖定為止，並以清洗瓶取代 PR2 瓶。



註

在每次執行之後棄置 PR2 瓶。不要重覆使用任何剩餘的 PR2。

- a 移除廢棄物瓶，並適當棄置內容物。將廢棄物瓶放回試劑室。
 - b 慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
 - c 關閉試劑室門。
- 4 選擇 **[Next (下一步)]**。開始首次清洗。

執行第二次清洗

每個清洗步驟一定要使用新鮮的清洗溶液。重覆使用前一次清洗的清洗溶液，會讓廢棄物再次進入流控管線。

- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮的清洗溶液如下：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水。這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 在首次清洗完成時，移除清洗托盤與清洗瓶，並棄置剩餘的清洗溶液。
- 3 以新鮮的清洗溶液重新裝填清洗零組件如下：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 4 載入清洗托盤與清洗瓶，如下：
 - a 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止。關閉試劑冷卻槽門。
 - b 載入清洗瓶並慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
 - c 關閉試劑室門。
- 5 選擇 **[Next (下一步)]**。開始第二次清洗。

執行最後清洗

- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮清洗溶液：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水。這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 在第二次清洗完成時，移除清洗托盤與清洗瓶，並棄置剩餘的清洗溶液。
- 3 以新鮮的清洗溶液重新裝填沖洗零組件：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 4 載入清洗托盤與清洗瓶：
 - a 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止。關閉試劑冷卻槽門。
 - b 載入清洗瓶並慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
 - c 關閉試劑室門。
- 5 選擇 **[Next (下一步)]**。開始最後清洗。

清洗後

在清洗完成之後，將使用過的流通池、清洗托盤，以及含有剩餘清洗溶液的清洗瓶留在儀器上。



註

吸管留在下方位置是正常的。將未使用的清洗溶液留在清洗托盤與清洗瓶之內，以避免吸管乾掉，並讓空氣進入系統。

執行待機清洗

如果不計劃在接下來的七天內使用儀器，則進行一次待機清洗，準備好讓儀器與儀器流控管線閒置。儀器每閒置 30 天就要進行一次待機清洗。

待機清洗大約需要兩小時完成。待機清洗需執行兩次連續的清洗，沖洗每個有任何殘餘試劑或鹽分累積的位置。每次清洗需時大約 60 分鐘。

在完成待機清洗時，儀器處於待機模式，[Home (首頁)] 畫面上出現顯示儀器狀態的訊息。在儀器處於待機模式時，啟用定序執行之前，必須進行維修清洗。

使用者提供的耗材

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, 目錄 # P7949)
- ▶ 實驗室等級的水

程序

- 1 確定使用過的流通池載於儀器之上。
- 2 從 [Home (首頁)] 畫面，選擇 **[Perform Wash (執行清洗)]**。
- 3 在 [Wash Options (清洗選項)] 畫面上，選擇 **[Perform Standby Wash (執行待機清洗)]**。
軟體自動升起試劑冷卻槽中的吸管。

執行首次清洗

- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮清洗溶液：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水，這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 以新鮮的清洗溶液準備沖洗零組件：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 3 將清洗托盤與清洗瓶載於儀器之上：
 - a 打開試劑室門與試劑冷卻槽門，從冷卻槽滑出用過的試劑匣或清洗托盤。
 - b 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止。關閉試劑冷卻槽門。
 - c 升起 PR2 瓶與廢棄物瓶前方的吸管把手，直到鎖定為止，並以清洗瓶取代 PR2 瓶。



註

在每次執行之後棄置 PR2 瓶。不要重覆使用任何剩餘的 PR2。

- a 移除廢棄物瓶，並適當棄置內容物。將廢棄物瓶放回試劑室。
- b 慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。

- c 關閉試劑室門。
- 4 選擇 **[Next (下一步)]**。開始首次清洗。

執行第二次清洗

每個清洗步驟一定要使用新鮮的清洗溶液。重覆使用前一次清洗的清洗溶液，會讓廢棄物再次進入流控管線。

- 1 以 Tween 20 與實驗室等級的水準備新鮮的清洗溶液如下：
 - a 將 5 毫升的 100% Tween 20 添加到 45 毫升的實驗室等級的水。這形成 10% 的 Tween 20。
 - b 將 25 毫升的 10% Tween 20 添加到 475 毫升的實驗室等級的水。這形成 0.5% 的 Tween 20 清洗溶液。
 - c 翻轉五次混合。
- 2 在首次清洗完成時，移除清洗托盤與清洗瓶，並棄置剩餘的清洗溶液。
- 3 以新鮮的清洗溶液重新裝填清洗零組件如下：
 - a 將 6 毫升的清洗溶液添加到清洗托盤的每個貯池內。
 - b 將 350 毫升清洗溶液添加到 500 毫升清洗瓶。
- 4 載入清洗托盤與清洗瓶，如下：
 - a 將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止。關閉試劑冷卻槽門。
 - b 載入清洗瓶並慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
 - c 關閉試劑室門。
- 5 選擇 **[Next (下一步)]**。開始第二次清洗。

清洗後

在清洗完成之後，將使用過的流通池、清洗托盤，以及含有剩餘清洗溶液的清洗瓶留在儀器上。



註

吸管留在下方位置是正常的。將未使用的清洗溶液留在清洗托盤與清洗瓶之內，以避免吸管乾掉，並讓空氣進入系統。

管理檔案

選擇 **[Home (首頁)]** 畫面中的 **[Manage Files (管理檔案)]**，在儀器電腦上移動、上傳、刪除檔案或重新命名樣本工作表。

刪除檔案

- 1 從 **[Manage Files (管理檔案)]** 畫面的任意標籤中，選擇 **[Browse (瀏覽)]** 以導覽到儀器可存取的任何檔案。
- 2 從以下選項中選擇：
 - ▶ 勾選清單中的各個檔案或資料夾旁的核取方塊。
 - ▶ 勾選 **[Delete (刪除)]** 按鈕左側的核取方塊以選擇清單中所有的檔案與資料夾。此選項可用於 **[Runs (執行)]**、**[Sample Sheets (樣本工作表)]**、**[Manifests (資訊清單)]**、**[Genomes (基因組)]** 與 **[Recipes (處方)]**。
- 3 選擇 **[Delete (刪除)]**。



註

除了 **[Bundle Logs (彙整記錄)]** 之外，在所有標籤都可以使用 **[Delete (刪除)]** 功能。

移動執行資料夾

[Move (移動)] 指令會將執行資料夾複製到新的位置，然後從舊的位置刪除資料夾。

- 1 從 [Manage Files (管理檔案)] 畫面的 [Runs (執行)] 標籤中，選擇 **[Browse (瀏覽)]** 以導覽到儀器可存取的任何檔案。
- 2 勾選清單中的各個檔案或資料夾旁的核取方塊。
- 3 選擇 **[Move (移動)]**。
- 4 選擇 **[Browse Network (瀏覽網路)]**，並且為檔案或資料夾選擇新的位置。
- 5 選擇 **[OK (確定)]**。

上傳檔案

[Upload (上傳)] 指令可用於 [Sample Sheets (樣本工作表)]、[Manifests (資訊清單)]、[Genomes (基因組)] 與 [Recipes (處方)]。如果 MiSeq 未連線到網路，使用此功能從 USB 隨身碟上傳檔案到儀器電腦。

- 1 從 [Manage Files (管理檔案)] 畫面的標籤中，選擇 **[Browse (瀏覽)]** 以導覽到儀器可存取的任何檔案。
- 2 選擇 **[Upload (上傳)]**。
- 3 選擇 **[Browse Network (瀏覽網路)]** 並瀏覽到檔案在 USB 隨身碟的所在位置。
- 4 選擇 **[OK (確定)]**。
檔案會上傳到 [Directory (目錄)] 欄位所指定的資料夾。

重新命名樣本工作表

- 1 從 [Manage Files (管理檔案)] 畫面的 [Sample Sheets (樣本工作表)] 標籤中，選擇下列選項：
 - ▶ 勾選各個樣本工作表旁邊的核取方塊。
 - ▶ 勾選 [Delete (刪除)] 按鈕左側的核取方塊以選擇清單中所有的樣本工作表。
- 2 選擇 **[Rename (重新命名)]**。
- 3 選擇鍵盤圖示，並使用畫面上的鍵盤重新命名樣本工作表。
- 4 選擇 **[Next (下一步)]**。
- 5 選擇 **[Back (上一步)]**。

軟體更新

如果您的系統透過網際網路連線到網路，您可以從 [Home (首頁)] 畫面自動更新儀器軟體。您還可以將軟體設定為自動檢查 BaseSpace 更新。如需更多資訊，請參閱第 12 頁 [BaseSpace 更新的設定通知](#)。

如果您的儀器未連線到網際網路，您可以手動更新軟體。

自動更新軟體

在有軟體更新可用時，[Home (首頁)] 畫面會出現 **[Update Available (有更新可用)]** 按鈕。否則此按鈕是看不到的。確定您的 MiSeq 連線至可存取網際網路的網路以便啟用此選項。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Update Available (有更新可用)]**。
- 2 確認指令，在對話方塊中進行更新。

需要將儀器重新開機。更新會在重新開機時自動開始安裝。

手動更新軟體

使用手動更新功能瀏覽至可安裝軟體檔案的位置，以從 MiSeq 介面更新儀器控制軟體和分析軟體。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Manage Instrument (管理儀器)]**。
- 2 選擇 **[Software Update (軟體更新)]**。
- 3 選擇 **[Browse (瀏覽)]** 以導覽到新版軟體可安裝檔案的位置。
- 4 當可安裝軟體檔案的路徑出現於畫面上，選擇 **[Save and Update (儲存並更新)]**。
- 5 確認指令，在對話方塊中進行更新。
需要將儀器重新開機。更新會在重新開機時自動開始安裝。

儀器關機

儀器最好一直維持開機狀態。如必須關閉儀器，請用下列程序關閉 Windows 並準備流控管線。

- 1 執行維修清洗。如需更多資訊，請參閱第 30 頁 **執行維修清洗**。
- 2 移除廢棄物瓶，並適當棄置內容物。將廢棄物瓶放回試劑室。
- 3 關閉試劑室門。
- 4 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Manage Instrument (管理儀器)]**。
- 5 選擇 **[Shut down (關閉)]**。
此指令關閉軟體。
- 6 將電源開關撥到 [OFF (關)] 位置。



註

在任何時間進行儀器關機時，等待**至少** 60 秒，再將電源開關轉回到 [ON (開)] 位置。

附錄 A 疑難排解

簡介	37
彙整記錄進行疑難排解	37
執行系統檢查	38
暫停或停止執行	38
手動升高試劑匣吸管	40
解決執行設定錯誤	40
解決 RFID 讀取失敗	40
執行容積檢測	41
測量預期的清洗容量	42
設定系統設定	42

簡介

本小節說明聯絡 Illumina 技術支援之前應採取的常見疑難排解步驟。針對多數錯誤，螢幕上會出現指示如何修正錯誤的訊息。

對於技術問題，請造訪 Illumina 網站的 MiSeq 支援網頁，以存取常見問題集，或是登入您的 MyIllumina 帳號以存取支援公佈欄。

如有執行品質或效能上的問題，請聯絡 Illumina 技術支援。如需更多資訊，請參閱第 55 頁 [技術協助](#)。

Illumina 技術支援代表一般會要求特定執行檔案的複本，以進行疑難排解。您可以使用 [Manage Files (管理檔案)] 畫面中的 [Bundle Logs (彙整記錄)] 標籤，彙集並壓縮疑難排解所需的檔案。請參閱第 37 頁 [彙整記錄進行疑難排解](#)。

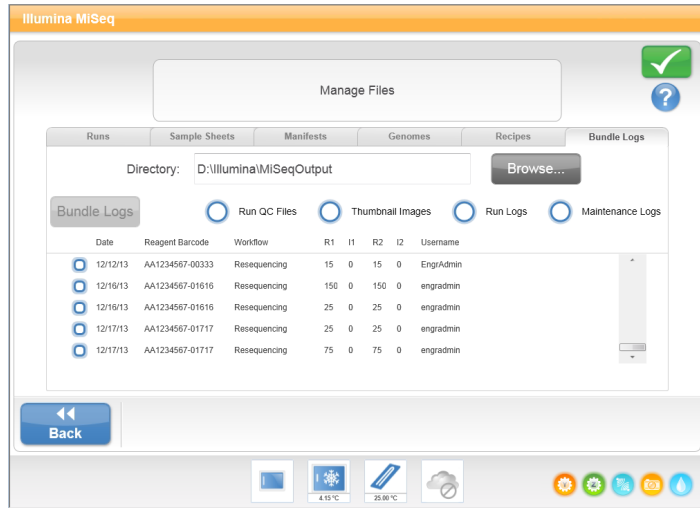
彙整記錄進行疑難排解

彙整記錄這項功能會彙整檔案並傳送至 Illumina 技術支援，以協助進行疑難排解。從 [Manage Files (管理檔案)] 畫面的 [Bundle Logs (彙整記錄)] 標籤中，選擇多個檔案，組成一個彙整檔案。彙整將自動壓縮。

彙整記錄功能一次可以將單次執行的多個檔案彙整為一個彙整類型。針對每次執行和 Illumina 技術支援要求的彙整類型重複進行彙整記錄程序。

- 1 從 [Manage Files (管理檔案)] 畫面選擇 **[Bundle Logs (彙整記錄)]** 標籤。
- 2 選擇 **[Browse (瀏覽)]**，前往 MiSeqOutput 資料夾的所在位置。
- 3 依照 Illumina 技術支援的要求，按一下執行旁的藍色方框，以及彙整類型旁的藍色圓圈。
- 4 選擇 **[Bundle Logs (彙整記錄)]**。
[Bundle Files (彙整檔案)] 畫面會隨即開啟並顯示彙整檔案的相關資訊，包括包裹中所包含的個別檔案清單。
如欲瞭解彙整記錄功能中個別資料夾與檔案的更多資訊，請參閱「[MiSeq 輸出與分析資料夾快速參考卡](#)」(文件 #15034791)。
- 5 選擇 **[Next (下一步)]**。
- 6 瀏覽至您想要儲存壓縮彙整檔案的位置。
- 7 選擇 **[Save (儲存)]**。
檔案完成彙整之後，[Bundle Logs (彙整記錄)] 標籤會重新開啟。
- 8 將壓縮的彙整檔案傳送至 Illumina 技術支援。

圖 23 彙整記錄標籤



執行系統檢查

[System Check (系統檢查)] 畫面一般是在 [Live Help (即時協助)] 工作階段中，用於和 Illumina 技術支援代表連線。在正常操作或儀器維修時不需要使用此功能。

您可在聯絡 Illumina 技術支援之前先執行某些系統檢查，例如容積檢測。容積檢測透過估算氣泡在通過感應器時的流通容積，以檢查流控系統的狀況。如需更多資訊，請參閱第 41 頁 [執行容積檢測](#)。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Manage Instrument (管理儀器)]**。
- 2 選擇 **[System Check (系統檢查)]**。
- 3 執行下列其中之一：
 - ▶ 選擇您要執行的個別測試。
 - ▶ 選擇 **[Select All (全選)]** 執行所有檢測。
- 4 選擇 **[Next (下一步)]**。
完成後，測試結果將顯示在畫面上。
- 5 **[自選]** 選擇 **[Show Details (顯示詳細資料)]** 以便在軟體介面上查看結果摘要。
- 6 **[自選]** 選擇 **[Export Results (匯出結果)]** 以 *.csv 檔案格式將結果匯出到 USB 隨身碟。
- 7 選擇 **[Done (完成)]**。

暫停或停止執行

MiSeq 的設計可在沒有使用者介入下從頭到尾完成執行。然而，還是可以從 [Sequencing (定序)] 畫面暫停或停止執行。

暫停執行

在完成之前，您可以暫停執行。例如，假如您認為廢棄物瓶已滿，便能暫停執行。暫停的執行可再恢復。

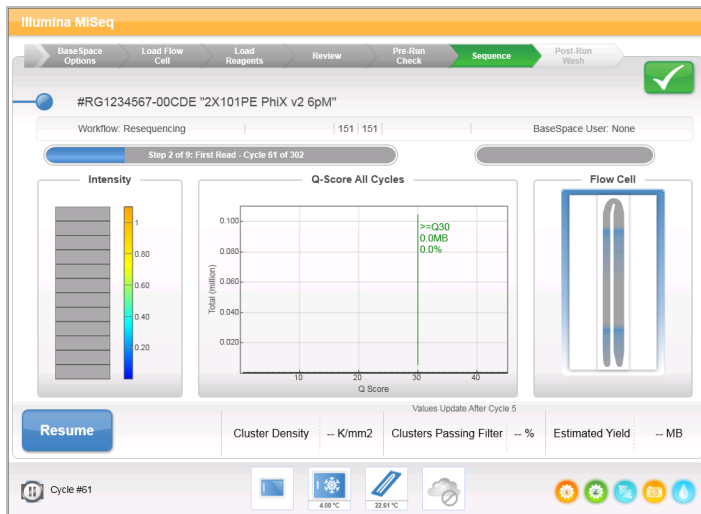
**警告**

在叢集生成期間或在定序的前八個週期之間，不要暫停執行。在這段期間暫停的執行無法恢復。關於 MiSeq 試劑匣試劑組的循環資訊，請參閱第 1 頁的 [第 25 頁 執行計量](#)。

當您選擇 **[Pause (暫停)]** 時，系統會先完成目前的指令，接著暫停執行，然後安全放置流通池。

如要從 [Sequencing (定序)] 畫面暫停執行，選擇 **[Pause (暫停)]**。按鈕變更為 **[Resume (復原)]**。在準備恢復執行時，選擇 **[Resume (復原)]**。

圖 24 暫停執行的 [Sequence (定序)] 畫面

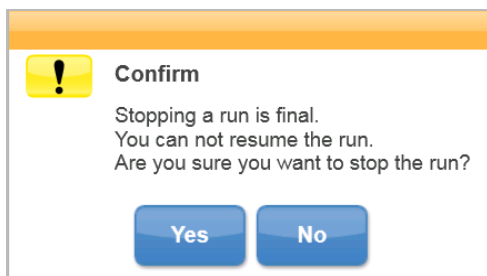


停止執行

在執行完成之前，您可以使用 [Sequencing (定序)] 畫面上的 **[Stop (停止)]** 按鈕停止定序的執行。如果執行設定不正確、資料品質不佳或是遭遇硬體錯誤，您也可以停止執行。

在停止執行時，目前的指令並未完成，流通池台架移到往前的位置。即時分析軟體會持續分析至最後一個完整循環。

圖 25 停止執行



停止執行是最終結果。 停止的執行無法復原。唯一的選項是進行儀器清洗。

手動升高試劑匣吸管

如果執行被意外中斷，或者在執行過程中發生錯誤，則試劑匣吸管可能不會自動升高。要移除試劑匣，請手動升高試劑匣吸管。

- 1 在 [Home (首頁)] 畫面中選擇 **[Perform Wash (執行清洗)]**。
- 2 選擇 **[Raise Sippers (升高吸管)]**。
- 3 移除試劑匣。

解決執行設定錯誤

如果執行前檢查的任何檢查失敗，該項目旁邊會出現一個紅色的圖示 **✘**。螢幕上出現說明錯誤與如何矯正的訊息。

錯誤	行動
✘ 測量的流率	<p>流率檢查畫面開啟。使用下拉清單或螢幕上的鍵盤輸入以下資訊：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 溶液：PR2 • 容積：250 • 吸液率：2500 • 擴散率：2500 <p>選擇 [Pump (幫浦)]。如果誤差持續存在，請將容積設定為抽吸 500 µl 的 PR2，並再次重複流程。在抽吸液體時，選擇 [Restart Check (重新啟動檢查)]。</p> <p>在執行前檢查成功之後，[Start Run (開始執行)] 按鈕會啟用。</p> <p>如果流量檢查再度失敗，重新定位流通池，以確定流量不會因為偏差而中斷。檢查流通池墊片是否有棉絮或不規則。</p>
✘ 可用的磁碟空間	<p>如果磁碟空間太少，會出現指示需要多少磁碟空間的訊息。使用 [Manage Files (管理檔案)] 功能從儀器電腦清除所需的空間。</p>
✘ 網路連線啟用	<p>確定網路線插入儀器。</p> <p>如果沒有恢復網路連線，選擇 [Manage Instrument (管理儀器)] 畫面上的 [Reboot (重新開機)]，以進行軟體的重新開機。</p> <p>如果還是沒有恢復網路連線，選擇 [Manage Instrument (管理儀器)] 畫面上的 [Shut Down (關機)]，然後使用電源開關關閉儀器。等待至少 60 秒之後，再打開儀器電源與啟用軟體。</p>
✘ 主要分析就緒	<p>從前一次執行的主要分析不完整。允許主要分析完成的預設時間是 1 小時，螢幕上出現倒數計時。選項是等待 1 小時或選擇 [Terminate Analysis (終止分析)]。次要分析因為任何未完成的循環而停止。</p>
✘ 現在的樣本工作表	<p>如果執行時沒有使用試劑匣 ID 命名您的樣本工作表，則儀器將無法自動找到適當的樣本工作表。瀏覽您的執行樣本工作表。</p> <p>如果執行時使用試劑匣 ID 命名您的樣本工作表，要確定樣本工作表位於預設的樣本工作表資料夾。檢查 [Home (歡迎)] 畫面上 [Run Options (執行選項)] 中的預設資料夾位置。</p> <p>確定樣本工作表的副檔名是 *.csv。</p> <p>如果樣本工作表遺失，建立一份簡單的工作表並複製到 [Run Options (執行選項)] 所指定的樣本工作表位置。</p> <p>在找到樣本工作表時，選擇 [Restart Check (重新啟動檢查)]。</p>

解決 RFID 讀取失敗

如果系統無法讀取耗材的 RFID，可以從 Illumina 網站取得一個臨時的略過編碼。臨時的略過編碼在七天後過期。

- 1 在進行之前，一定要重試 RFID 讀取。如果 RFID 第二次也失敗，請選擇 **[Get Code (取得編碼)]**。

- 2 在能夠存取網際網路的電腦上，前往 my.illumina.com，並選擇頁面頂端工具列中的 **[Sign In (登入)]**。
- 3 登入您的 MyIllumina 帳號。
您的名稱將取代工具列上的登入按鈕。
- 4 將滑鼠移到您的名稱上方，並選擇 **[Account (帳號)]**。在 **[My Tools (我的工具)]** 欄中，按一下 **[MiSeq Self-Service (MiSeq 自助服務)]**。
- 5 在 **[MiSeq Self-Service (MiSeq 自助服務)]** 網頁上，輸入 **[MiSeq serial number (MiSeq 序號)]**。
- 6 從 **[Type of Override Code (覆寫編碼類型)]** 下拉清單中選擇 **[RFID Override (RFID 覆寫)]**。
- 7 如要生成編碼，選擇 **[Get Code (取得編碼)]**。
- 8 返回 MCS 介面，並選擇 **[Enter Code (輸入編碼)]**。
- 9 使用螢幕上的鍵盤輸入臨時的略過編碼，然後選擇 **[Next (下一步)]**。
- 10 輸入流通池、PR2 瓶或試劑匣的條碼編號。

耗材	條碼編號位置
流通池	在流通池容器標籤的條碼上方。 流通池條碼編號開頭為 A (標準流通池)、G (微流通池) 或 D (奈米流通池)。範例：A0E61
PR2 瓶	在 PR2 瓶標籤上的條碼下方。 範例：MS0011881-PR2
試劑匣	在試劑匣標籤上的條碼下方。 範例：MS0010744-300

- 11 如果您要輸入試劑匣的略過編碼，請輸入組件的版本號碼。選擇 **[Enter Reagent Kit Barcode (輸入試劑組條碼)]**，以手動輸入試劑匣條碼編號與組件版本號碼。



警告

輸入不正確的試劑組版本對定序資料會有不良的影響。

- 12 選擇 **[Enter (輸入)]**。

執行容積檢測

流控管線阻塞會造成試劑傳送不良，因而影響定序結果。假如懷疑流控管線阻塞，請執行容積檢測。

容積檢測透過估算兩個氣泡在通過感應器時之間的容積，以檢查流控系統的健康狀態。如要執行容積檢測，清洗托盤與清洗瓶必須裝入實驗室等級的水，且用過的流通池必須就定位。依照螢幕上的指示執行檢測。

- 1 確定使用過的流通池載於儀器之上。
- 2 從 **[Home (首頁)]** 畫面中選擇 **[Manage Instrument (管理儀器)]**。
- 3 選擇 **[System Check (系統檢查)]**。
- 4 選擇 **[Conduct Volume Test (進行容積檢測)]**，接著選擇 **[Next (下一步)]**。
- 5 以 6 毫升的實驗室等級的水填入清洗托盤的每個貯池。
- 6 以 350 毫升的實驗室等級的水填入 500 毫升的清洗瓶。
- 7 將清洗托盤與清洗瓶載於儀器之上。

- a 打開試劑室門與試劑冷卻槽門，將清洗托盤滑入試劑冷卻槽，直到停止為止。關閉試劑冷卻槽門。
 - b 升起吸管把手直到鎖定為止，並載入清洗瓶。
 - c 移除廢棄物瓶，並適當棄置內容物。將廢棄物瓶放回試劑室。
 - d 慢慢降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
- 8 依照螢幕上的指示，移除清洗瓶吸管的任何液滴，如下所述：
- a 慢慢升起吸管把手並檢查清洗瓶吸管是否有出現大水滴。
 - b 慢慢降低吸管把手到進入水裡，讓表面張力移除液滴。
 - c 慢慢升起吸管把手並檢查清洗瓶吸管是否有出現大水滴。
 - d 慢慢完全降低吸管把手，確定吸管降低進入清洗瓶與廢棄物瓶。
- 9 選擇 **[Next (下一步)]**。
在容積檢測完成時，螢幕上會出現結果。
如果檢測未通過，請執行維修清洗。請參閱第 1 頁第 30 頁 **執行維修清洗**。
- 10 在完成維修清洗時，重複容積檢測。

測量預期的清洗容量

測量預期的清洗容量，確認有效執行清洗流控。

- 1 在開始清洗之前，清空廢棄物瓶。
- 2 在清洗完成時，測量廢棄物瓶的清洗容量。

清洗類型	預期的清洗容量
執行後清洗	17.25 毫升
執行後清洗 (包括模板線清洗)	25.5 毫升
待機清洗	46 毫升
維修清洗	51.75 毫升

設定系統設定

MCS 有幾個畫面可以存取設定系統的指令。軟體設定通常會在安裝 MiSeq 期間進行。

設定 IP 與 DNS 設定

假如因網路或設備變更而有所需要，請設定 IP 位址與 DNS 伺服器位址。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 [Manage Instrument (管理儀器)]。
- 2 選擇 [System Settings (系統設定)]。
 - ▶ 選擇 [Obtain an IP address automatically (自動獲取 IP 位址)] 或 [Use the following IP address (使用以下 IP 位址)]。
如果您選擇 [Use the following IP address (使用以下 IP 位址)]，則輸入 IP 位址、子網路遮罩與預設閘道。
 - ▶ 選擇 [Obtain DNS address automatically (自動獲取 DNS 位址)] 或 [Use the following DNS server address (使用以下 DNS 伺服器位址)]。
如果您選擇 [Use the following DNS server address (使用以下 DNS 伺服器位址)]，請輸入首選與替代的 DNS 伺服器位址。
- 3 選擇 [Save and Continue (儲存並繼續)]。

變更系統資格

在 [System Settings (系統設定)] 畫面上，變更系統使用者名稱及密碼，也更新 MiSeq 通報器及 BaseSpace 或 BaseSpace Onsite 的資格。

- 1 從 [Home (首頁)] 畫面中選擇 [Manage Instrument (管理儀器)]。
- 2 選擇 [System Settings (系統設定)]。
- 3 選擇 [Save and Continue (儲存並繼續)] 前往系列畫面中的第三個畫面。
- 4 選擇 [This account (本帳號)]。
- 5 輸入網域名稱 (例如網域\MiSeq1) 與密碼。
- 6 選擇 [Save and Continue (儲存並繼續)]。

附錄 B 輸出檔案與資料夾

執行資料夾	45
MiSeqOutput 資料夾內容	45
RTA 資料夾與檔案	46

執行資料夾

MiSeq 上的每次執行都會生成 3 個執行資料夾，每個皆有特定用途：

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp**—開始執行時，會將臨時執行資料夾寫入儀器電腦的本機磁碟，並將其做為 MCS 與 RTA 的工作區域。不需要存取 MiSeqTemp 資料夾。此資料夾的內容會在 7 天後刪除。
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqOutput**—RTA 會將 MiSeqTemp 資料夾的檔案複製到 MiSeqOutput 資料夾。在生成主要分析檔案時，RTA 將檔案複製回到 MiSeqTemp 資料夾並擴展 MiSeqAnalysis 資料夾。焦點影像與縮圖影像並不會複製到 MiSeqAnalysis 資料夾。請參閱第 46 頁 **RTA 資料夾與檔案**。
- ▶ 您可以在 [Run Options (執行選項)] 畫面上的 [Output Folder (輸出資料夾)] 欄位變更輸出資料夾的位置。如需更多資訊，請參閱第 12 頁 **設定預設資料夾位置**。
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis** — RTA 分析完成後，MiSeq 通報器會存取儀器本機磁碟上的 MiSeqAnalysis 資料夾，開始次要分析。寫入 MiSeqAnalysis 資料夾的所有檔案都複製回到 MiSeqOutput 資料夾。如需更多資訊，請參閱第 45 頁 **MiSeqOutput 資料夾內容**。

如果您使用 BaseSpace 進行分析，但並未在本機複製分析，儀器本機磁碟上的 MiSeqAnalysis 資料夾是空的。

根資料夾命名

根執行目錄名稱識別執行的日期、儀器號碼與執行所使用的流通池。

根據預設，資料夾名稱使用以下格式：

YYMMDD_<InstrumentNumber>_<Run Number>_<FlowCellBarcode>

每次在特定儀器上執行一次，執行號碼隨之漸增。

MiSeqOutput 資料夾內容

RTA 完成分析後，MiSeq 通報器會在 MiSeqOutput 資料夾內放入次要分析所需要的檔案。在次要分析完成時，MiSeqOutput 與 MiSeqAnalysis 資料夾是相同的，例外是 MiSeqOutput 資料夾包含 2 個影像檔案的子資料夾：Images 和 Thumbnail_Images。這些子資料夾不是次要分析所需。

檔案

複製到輸出與分析資料夾的檔案包括以下：

- ▶ **SampleSheet.csv** — 提供執行與後續分析的參數。開始執行後，樣本工作表會複製到根資料夾並重新命名為 SampleSheet.csv。複製會寫入至 Data\Intensities 和 Data\Intensities\BaseCalls。
- ▶ **runParameters.xml** — 包含執行參數的摘要以及執行零組件的相關資訊，例如流通池的 RFID 及執行的相關試劑。
- ▶ **RunInfo.xml** — 包含高階執行資訊，例如定序執行中的讀數與循環的數量，以及讀數是否有索引。

資料夾

複製到輸出與分析資料夾的資料夾，包括在定序執行期間生成的以下資料夾：

- ▶ **<執行資料夾名稱>\Config**—包含執行的設定檔案。
- ▶ **<執行資料夾名稱>\Data**—包含 Intensities、BaseCalls 與 Alignment 等子資料夾。從 MiSeq 通報器生成的資料位於 Alignment 子資料夾。
- ▶ **<執行資料夾名稱>\Data\RTA Logs**—包含記錄檔說明 RTA 在每個基因序列所執行的每個步驟。
- ▶ **<執行資料夾名稱>\Data\Intensities\BaseCalls**—包含含有鹼基判定 (*.bcl) 檔案、矩陣檔案和定相檔案的子資料夾。MiSeq 通報器會在次要分析期間將 FASTQ 檔案寫入此資料夾。如需詳細資訊，請參閱「[MiSeq 通報器軟體指南](#)」(文件 #15042295)。
- ▶ **<執行資料夾名稱>\Recipe**—包含執行所使用的處方。
- ▶ **<執行資料夾名稱>\Logs**—包含記錄檔說明儀器在每個循環所執行的每個步驟。
- ▶ **<執行資料夾名稱>\InterOp**—包含定序分析檢視器 (SAV) 所使用的二進位檔案，摘述不同的主要分析計量，例如叢集密度、強度、品質評分與整體的執行品質。

在臨時執行資料夾內所建立的所有其他檔案與資料夾，並未複製到輸出與分析資料夾。它們包含分析或疑難排解時不需要的臨時資料夾。

MiSeq 通報器會新增其他的資料夾，例如次要分析期間的 Alignment 資料夾。如需詳細資訊，請參閱「[MiSeq 通報器軟體指南](#)」(文件 #15042295)。

RTA 資料夾與檔案

下表說明在主要分析期間，即時分析 (RTA) 生成的資料夾與檔案。其中許多檔案是供 MiSeq 通報器軟體用於次要分析。

關鍵檔案	子資料夾	說明
RTAComplete.txt	根資料夾	在完成鹼基判定分析時，生成一個標記檔。此檔案的出現會觸發次要分析並使之開始。
SampleSheet.csv	根資料夾	在執行之前，會讀取並將此檔案複製到執行資料夾，之後用於次要分析。
RunInfo.xml	根資料夾	辨識讀數的邊界 (包括索引讀數) 與為執行選取的品質表。
*.bcl 檔案	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	每個 *.bcl 檔案包含 1 個循環 1 基因模版的 RTA 鹼基判定與鹼基品質評分結果。
*.stats 檔案	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	*.stats 檔案包含特定循環/基因模版的 RTA 鹼基判定統計。
*.filter 檔案	Data\ Intensities\BaseCalls	*.filter 檔案包含每個基因模版的過濾結果。
*.txt	Data\RTALogs	主要分析的記錄檔案。
*.cif 檔案	Data\ Intensities\L001\CX.X	每個二進位 *.cif 檔案包含 1 循環 1 基因模版的 RTA 影像分析結果。如需更多資訊，請參閱第 47 頁 流通池基因模版編號 。
*.locs 檔案	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001	報告叢集座標。每個 *.locs 檔案代表 1 個基因模版。
*.jpg 檔案	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	每個循環與鹼基會生成半版的影像，可以用於每次執行的疑難排解。這些檔案用於進行影像分析，且未複製到 [Analysis (分析)] 資料夾。如需影像檔案名稱，請參閱第 47 頁 流通池基因模版編號 。

流通池基因模版

在定序執行期間，流通池的單通道在稱為基因模版的小影像區域內成像。所有的 MiSeq 流通池都有單通道，但是基因模板的數量依您所使用的流通池類型而異。

流通池	MiSeq 試劑組	基因模版	成像表面	成像基因模版總數
標準流通池	MiSeq 試劑組, v3	19 個基因模版	頂端與底部	總共 38 個基因模版
PGS 流通池	MiSeq 試劑組 v3-PGS	19 個基因模版	頂端與底部	總共 38 個基因模版
標準流通池	MiSeq 試劑組, v2	14 個基因模版	頂端與底部	總共 28 個基因模版
微流通池	MiSeq 試劑微組件, v2	4 個基因模版	頂端與底部	總共 8 個基因模版
奈米流通池	MiSeq 試劑奈米組件, v2	2 個基因模版	僅頂端	總共 2 個基因模版

在定序執行過程中基因模版成像時，每個基因模版生成 1 個輸出檔案。如需更多資訊，請參閱第 47 頁 [流通池基因模版編號](#)。

流通池基因模版編號

當基因模版在定序執行成像時，每個基因模版都會生成一個輸出檔案，並以四個數字的格式命名基因模版編號。除了奈米流通池，流通池在頂端與底部表面成像。每個基因模板的輸出檔案位於執行資料夾內：Data\Intensities\BaseCalls\L001。

流通池	MiSeq 試劑組	基因模版	成像表面	影像檔案名稱
標準流通池 PGS 流通池	MiSeq 試劑組, v3	1-19	頂端	1101 至 1119
		1-19	底部	2101 至 2119
標準流通池	MiSeq 試劑組, v2	1-14	頂端	1101 至 1114
		1-14	底部	2101 至 2114
微流通池	MiSeq 試劑微組件, v2	1-4	頂端	1101 至 1104
		1-4	底部	2101 至 2104
奈米流通池	MiSeq 試劑奈米組件, v2	1-2	僅頂端	1101 至 1102

索引

B

BaseSpace

更新 12

連線 6

資格 43

BaseSpace Onsite

伺服器位址 11

連線 6

資格 43

BlueFuse Multi 軟體 6, 11

C

CompletedJobInfo.xml 7

I

Illumina 主動監控服務 11

InterOp 資料夾 45

InterOp 檔 4

IP 位址 43

M

MiSeq 自助服務 40

MiSeq 通報器

概覽 7

P

PR2, 載入 21

R

RFID

PR2 21

追蹤 1

試劑匣 22

疑難排解 40

RTAcomplete.txt 46

RunInfo.xml 45-46

runParameters.xml 45

S

status.xml 46

V

VeriSeq PGS 工作流程 11

次要分析 6

流通池 8

維修頻率 29

工

工作流程 16

執行時間 15

元

元件

光學模組 2

流通池 8, 47

流通池室 2-3

試劑匣 8

試劑室 2-3

分

分析

選項 6

分析工作流程

定義 4

支

支援頁面 1

文

文件 1, 55

本

本機執行管理員 1

本機複製分析 11

光

光學模組 2

次

次要分析 7

刪

刪除檔案和資料夾 34

即

即時分析 1, 4
執行資料夾 45
結果 46
模板生成 25

吸

吸管把手 3

技

技術協助 55

更

更新軟體 35-36

系

系統帳號名稱 43
系統設定 43

初

初始化 40

定

定序 16
定序分析檢視器 7, 24
定序畫面 24

空

空載儀器 32

客

客戶支援 55

待

待機清洗 32

活

活動指示器 5

流

流控

清洗 30, 32
疑難排解 41

流通池

上蓋顏色 8
字母指定人 40
基因模版 47
基因模版編號 47
單通道 7
概覽 8
清潔 19

流通池夾 3

流通池門感應器 6

流通池室 2-3

容

容積檢測 41

耗

耗材 13

實驗室等級的水 13

訓

訓練 1

閃

閃爍圖示 5

停

停止執行 39

參

參考基因組
檔案格式 4

執

執行後清洗 25
執行時間 15
執行設定畫面 18
執行資料夾
temp, output, analysis 45
內容 45
主要分析檔案 46
命名 45
定義 4
管理 34
執行選項 11-13

基

基因組參考 34
基因模版編號 47

密

密碼、變更 43

控

控制軟體 4

清

清洗
好處 25
待機 32
執行後 25
執行後清洗設定 11
準備空載 32
準備關閉 36
預期容積 42
維修 30
清洗容量 42

移

移動檔案和資料夾 34

處

處方, 管理 34

軟

軟體
更新 35-36
執行時間 15
磁碟空間檢查 7
軟體更新 12
軟體套件 4

通

通用複製服務 4

彙

彙整記錄 34-35, 37

感

感應器指示燈 6

試

試劑
成套試劑 8
試劑冷卻槽, 溫度 6
試劑匣 8
內容 9
解凍 17
檢查 17
試劑室 2-3

資

資料夾位置
針對目前執行 23
預設設定 13
資訊清單檔案
定義 4

載

載入試劑
PR2 21
匣 22

電

電子郵件警示 12

圖

圖示
活動指示器 5
感應器 6
圖示, 閃爍 5

實

實驗室等級的水準則 13

疑

疑難排解 34-35, 37
RFID 40
流控 41
特定執行的檔案 37
執行設定錯誤 40

監

監視執行 24

磁

磁碟空間
磁碟空間太少 40
檢查 7

維

維修清洗 30

網

網域名稱 43
網路設定 43
網路連線 40

說

說明, 技術 55

廢

廢棄物瓶 3

暫

暫停執行 38

模

模板生成 7, 25
模板線清洗 25

樣

樣本工作表
未發現 40
在執行資料夾內 46
定義 4
複製到儀器 34
變更 23

複

複製檔案和資料夾 34

錯

錯誤 5

叢

叢集生成 16

關

關閉儀器 36

警

警告 5

讀

讀數中的循環 15
讀數長度 15

技術協助

如需技術協助，請聯絡 Illumina 技術支援。

網站：www.illumina.com
電子郵件：techsupport@illumina.com

Illumina 客戶支援電話號碼

地區	免付費專線	區域專線
北美	+1.800.809.4566	
中國	400.066.5835	
日本	0800.111.5011	
比利時	+32 80077160	+32 34002973
法國	+33 805102193	+33 170770446
芬蘭	+358 800918363	+358 974790110
英國	+44 8000126019	+44 2073057197
紐西蘭	0800.451.650	
荷蘭	+31 8000222493	+31 207132960
奧地利	+43 800006249	+43 19286540
愛爾蘭	+353 1800936608	+353 016950506
新加坡	+1.800.579.2745	
瑞士	+41 565800000	+41 800200442
瑞典	+46 850619671	+46 200883979
義大利	+39 800985513	+39 236003759
臺灣	00806651752	
德國	+49 8001014940	+49 8938035677
香港	800960230	
挪威	+47 800 16836	+47 21939693
西班牙	+34 911899417	+34 800300143
丹麥	+45 80820183	+45 89871156
澳大利亞	+1.800.775.688	
其他國家	+44.1799.534000	

安全資料表 (SDS) – 可從 Illumina 網站 support.illumina.com/sds.html 取得。

產品文件 – 可從 Illumina 網站下載 PDF 格式的檔案。請前往 support.illumina.com、選擇產品，然後選擇 [Documentation & Literature (文件和文獻)]。



Illumina

5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (北美以外)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

僅供研究使用。不可用於診斷程序。

© 2018 Illumina, Inc. 保留一切權利。

illumina®