



Chargement et fonctionnement du MiSeq d'Illumina

Fournitures

Matériel :

- Séquenceur Illumina MiSeq
- Pipette P20
- Pipette P200
- Pipette P1000
- Vortex
- Mini centrifugeuse
- Bain-marie

Consommables :

- Pointes de pipettes stériles à filtre : P20, P200, P1000
- Tubes de microcentrifugation de 1,5 ml
- cryotubes à bouchon à vis sans RNase
- lingettes non pelucheuses

Réactifs :

- Kit de réactifs Illumina MiSeq
- Eau exempte de nucléase
- Eau de qualité laboratoire
- Tween 20
- NaOH (pastilles ou solution aqueuse)



Création des feuilles d'échantillons

Une feuille d'échantillons est utilisée pour indiquer à Illumina MiSeq quels codes-barres ont été ajoutés à quels échantillons. Ces informations seront utilisées dans le processus de démultiplexage qui se déroule sur le système Miseq. Les feuilles d'échantillons peuvent être créées sur l'instrument lui-même à l'aide du logiciel Illumina Experiment Manager ou à l'aide du modèle de feuille d'échantillons Illumina MiSeq. Si vous utilisez le modèle de feuille d'échantillons pour créer votre feuille d'échantillons, modifiez-le dans un tableur tel qu'Excel et transférez la feuille d'échantillons remplie au MiSeq à l'aide d'une clé USB.

Les champs que vous devrez remplir dans votre modèle de feuille d'échantillons sont expliqués ci-dessous :

[Header]

- **Experiment Name:** Saisissez un nom d'expérience unique pour votre exécution (par ex., « 20220530_SC2_batch1 »).
- **Date :** Saisissez la date de l'exécution au format MM/JJ/AA.
- **Workflow :** Vous avez le choix entre plusieurs flux de travail différents. Si vous séquencez un pool de plusieurs échantillons indexés et que vous souhaitez effectuer un démultiplexage sur la machine, saisissez « GenerateFASTQ ».
- **Chemistry :** Pour tous les flux de travail qui utilisent l'indexation double, comme Nextera et TruSeq Custom Amplicon, le champ chemistry (chimie) est obligatoire et doit être configuré sur " amplicon ". Dans le cas contraire, laissez ce champ vide.

[Reads] :

- Saisissez les longueurs de read forward et reverse dans les lignes situées en dessous de « [Reads] ». Pour le séquençage à extrémités appariées, la longueur de read (lecture) dans chaque direction est le nombre de cycles indiqué sur le kit MiSeq que vous avez utilisé, divisé par deux, plus un. En d'autres termes, les longueurs de read forward et reverse sont de 151 pour un kit de 300 cycles.

[Data]

- **Sample_ID :** *Obligatoire.* Indiquez les numéros d'identification des échantillons pour toutes les séquences incluses dans ce cycle de séquençage. Ils peuvent être aussi simples que 1, 2, 3, etc. Chaque échantillon doit avoir un numéro d'identification unique.
- **Sample_Name :** *Obligatoire.* Indiquez les mêmes noms pour toutes les séquences incluses dans ce cycle de séquençage. Ces noms seront utilisés pour nommer les fichiers de sortie, ils doivent donc être uniques.
- **Index :** *Obligatoire.* Indiquez le nom de l'index i7 utilisé pour l'échantillon correspondant.
- **I7_index_ID :** *Facultatif.* Saisissez le nom de l'index i7 utilisé pour l'échantillon correspondant. Si vous ne connaissez pas le nom de l'index, vous pouvez saisir à nouveau la séquence d'index.
- **index2 :** *Obligatoire.* Indiquer le nom de l'index i5 utilisé pour l'échantillon correspondant.
- **I5_index_ID :** *Facultatif.* Saisissez le nom de l'index i5 utilisé pour l'échantillon correspondant. Si vous ne connaissez pas le nom de l'index, vous pouvez saisir à nouveau la séquence d'index.
- **Sample_Project :** *Facultatif.* Champ dans lequel vous pouvez indiquer le nom du projet modèle. Peut être laissé vide.
- **Description :** *Facultatif.* Champ dans lequel vous pouvez fournir des informations supplémentaires. Il peut être laissé vide.



Préparation des réactifs

Matériel :

- Bain-marie
- Seau à glace

Réactifs :

- Kit de réactifs MiSeq

Protocole :

1. Les réactifs MiSeq doivent être décongelés avant le séquençage. Sortez le kit de réactifs du congélateur à -20°C et décongelez-le dans un bain-marie avec de l'eau à température ambiante pendant environ 30 minutes. Si vous ne disposez pas d'un bain-marie, une glacière ou un autre récipient étanche contenant de l'eau à température ambiante fonctionne tout aussi bien. Veillez à ce que le niveau d'eau ne dépasse pas la « ligne de remplissage » indiquée sur la cartouche.

Note : Retirer le tampon d'hybridation (tampon HT1) de la boîte de réactifs avant de le jeter et le décongeler sur la table de travail. Placer le tampon sur de la glace après la décongélation.

2. Une fois la cartouche de réactifs décongelée, la placer sur de la glace ou au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation. Utiliser la cartouche dans les 24 heures suivant sa décongélation.
3. Conserver le tampon d'hybridation sur de la glace. Il sera utilisé pour diluer l'échantillon lors d'une étape ultérieure.



Préparation de l'hydroxyde de sodium

Veuillez noter que le NaOH est un réactif caustique qui peut provoquer des brûlures chimiques. Utilisez l'équipement de protection approprié lorsque vous le manipulez sous forme de pastille ou de solution.

Matériel et consommables :

- Pipette P20, pipette P200
- tube conique de 50 ml
- tube Eppendorf de 1,5 ml
- Embouts de pipette : P20, P200

Réactifs :

- NaOH (hydroxyde de sodium) en pastilles ou sous forme liquide
- Eau exempte de nucléase
- Eau de qualité laboratoire

OPTION A : Préparer du NaOH à partir de pastilles

1. Préparer une solution 4M (=4N) d'hydroxyde de sodium (NaOH). La solution 4M peut être utilisée jusqu'à 3 mois après la préparation initiale. Si une nouvelle dilution est nécessaire, la préparer au moins un jour avant le séquençage.
 - a. Peser 8 g de pastilles de NaOH et les transférer dans un tube conique de 50 ml.
 - b. Ajouter lentement 35 ml d'eau de qualité laboratoire dans le tube. Veuillez noter que cette réaction est exothermique et que le tube deviendra chaud.
 - c. Ajouter 15 ml d'eau supplémentaires et retourner le tube pour mélanger.
2. Laisser reposer la solution 4M pendant une nuit avant de l'utiliser. Notez la date de préparation sur le tube.
3. Préparer une nouvelle solution de NaOH 0,2M (=0,2N) qui sera utilisée pour dénaturer le pool de librairies d'ADN :

Composant	Volume
NaOH 4 M	5 µL
Eau exempte de nucléase	95 µL
Volume total	100 µL

OPTION B : Préparer du NaOH à partir d'une solution mère 2N

1. Préparer une solution fraîche de NaOH 0,2 M qui sera utilisée pour dénaturer le pool de librairies d'ADN :

Composant	Volume
NaOH 2 M	10 µL
Eau exempte de nucléase	90 µL
Volume total	100 µL



Préparation de l'échantillon

Suivez le protocole de préparation d'échantillons approprié en fonction de la concentration finale du pool de librairies final. Utilisez la MiSeq Loading Quicksheet (télécharger le fichier .xlsx) pour faciliter la préparation des dilutions d'échantillons.

Matériel et Consommables :

- Pipette P20, pipette P200
- Vortex
- Tube Eppendorf de 1,5 ml
- Embouts de pipette : P20, P200

Réactifs :

- Librairie finale d'ADN mis en commun
- Tampon d'hybridation Illumina MiSeq (du kit de réactifs MiSeq)
- Eau exempte de nucléase
- NaOH 0,2N
- Tampon d'élution (provenant par ex. d'un kit d'extraction Qiagen)

Si votre pool de librairies final est supérieur ou égal à 4nM :

1. Diluer le pool de librairies à 4 nM avec le tampon d'élution en utilisant la formule $(C1)*(V1)=(C2)*(V2)$.
2. Aliquoter 5 µl de la dilution à 4 nM dans un nouveau tube de 1,5 ml.
3. Ajouter 5 µl de NaOH 0,2 N aux 5 µl de pool de librairies dilué. Vortexer, essorer et laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes pour dénaturer l'ADN de l'échantillon.

Note : La concentration du pool de librairies dénaturées est maintenant de 2 nM.

4. Ajouter 990 µl de tampon d'hybridation au pool de librairies dénaturées de 2 nM. Mélanger par inversion et faire tourner.

Note : L'ADN de la librairie mise en commun est maintenant monocaténaire et à une concentration de 20 pM.

5. Diluer à la concentration de charge finale de 10 pM (ajuster si nécessaire) comme suit :

Composant	Volume
Tampon d'hybridation	300 µL
Librairie à 20 pM	300 µL
Volume total	600 µL

Note : Mélanger l'échantillon par inversion. Réduire la vitesse de rotation et placer sur de la glace jusqu'à l'utilisation.

Si le pool de librairies final est compris entre 1,2 et 3,9nM :



Chargement et fonctionnement d'Illumina MiSeq

1. Ajoutez 5 µL de votre librairie regroupée dans un tube de 1,5 mL.
2. Ajoutez 5 µL de NaOH 0,2 N aux 5 µL du pool de librairies. Vortexer, faire tourner et laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes pour dénaturer l'ADN de l'échantillon.
3. Déterminer la quantité de tampon d'hybridation à ajouter pour obtenir une concentration de charge finale de 10 ppm en utilisant la formule $(C1)*(V1)=(C2)*(V2)$.

Exemple pratique :

Après l'étape 2, une librairie de 1,2 nM sera à 0,6 nM ou 600 pM.

(pool de 600 pM) * (10 µL de librairie) = (concentration finale de 10 pM) * (X µL de tampon d'hybridation)

(6000) = (10 pM concentration finale) * (X µL de tampon d'hybridation)

(X µL de tampon d'hybridation) = (6000) / (10 pM concentration finale)

X µL de tampon d'hybridation = 600 µL

Dans cet exemple, 10 µL de 600 pM de la librairie d'ADN doivent être ajoutés à 590 µL de tampon d'hybridation.

On obtient ainsi une concentration finale de 10 pM (volume total : 600 µL).

4. Ajouter la quantité calculée de tampon d'hybridation au pool de librairies dénaturées pour obtenir la concentration de chargement de 10pM utilisée ci-dessus :

Composant	Volume
Tampon d'hybridation	Utiliser la formule
Librairie dénaturée	10 µL
Volume total	600 µL

Note : Mélanger l'échantillon par inversion. Réduire la vitesse de rotation et placer sur de la glace jusqu'à l'utilisation.

Si le pool de librairies final est inférieur à 1,2 nM :

1. La concentration de ce pool de librairies peut être trop faible pour produire de bons résultats de séquençage. Si vous souhaitez continuer, utilisez la MiSeq Loading Quicksheet (télécharger le fichier .xlsx) pour calculer la dilution appropriée.



Lavage en machine et préparation

Il est important de s'assurer que les lignes fluidiques du MiSeq sont soigneusement rincées entre les cycles de séquençage afin d'éviter toute accumulation de précipités. Il est également important que les systèmes fluidiques soient bien entretenus lorsque l'instrument est inactif. Le MiSeq doit être lavé avec 0,5 % de Tween 20 dans de l'eau de qualité laboratoire avant et après **chaque** utilisation. Le logiciel vous demandera d'effectuer le lavage après la fin de l'analyse et ne permettra pas à une autre analyse de démarrer si un lavage n'a pas été effectué. Vous devrez lancer manuellement un lavage avant chaque analyse.

Matériel :

- Séquenceur Illumina MiSeq
- Plateau de lavage MiSeq
- flacon de lavage MiSeq

Réactifs :

- Eau de qualité laboratoire
- Tween 20

Protocole :

1. Pour préparer une solution de lavage à 10 %, ajouter 5 ml de Tween 20 à 100 % à 45 ml d'eau de qualité laboratoire. On obtient 10 % de Tween 20. Conservez cette solution de base pour une utilisation ultérieure.
2. Pour préparer du Tween 20 à 0,5 %, ajouter 25 ml de Tween 20 à 10 % à 475 ml d'eau de laboratoire. Inverser plusieurs fois pour mélanger.
3. Ouvrez le logiciel MiSeq Control Software et sélectionnez l'icône *Wash Instrument*. Sélectionnez ensuite *Post-Run Wash*.
4. Vérifiez qu'une cuve à circulation est en place.

Note : NE PAS EFFECTUER DE LAVAGE SANS CUVE À CIRCULATION. La cuve à circulation garantit la présence d'un vide à l'intérieur des lignes de réactifs. Ce vide empêche les bulles d'air de pénétrer dans la fluidique de la machine.

5. La machine vous invitera à remplir le plateau de lavage MiSeq avec la solution de lavage MiSeq (solution de Tween à 0,5 %).
 - a. Ouvrir la porte du refroidisseur de réactifs et vérifier le volume du flacon de lavage. Remplir le flacon au moins à moitié s'il est trop bas. **Remarque** : soulever complètement le Sipper lors du retrait et de la remise en place du flacon.
 - b. Jeter le liquide dans le flacon à déchets.
 - c. Ouvrir la porte du refroidisseur pour retirer la cartouche de lavage.



- d. Remplir chaque puits du plateau de lavage avec la solution de lavage et le replacer dans l'instrument. Il n'est pas nécessaire de remplir complètement chaque puits, une marge de 1 à 5 mm est recommandée.
 - e. Fermez les deux portes du refroidisseur en vous assurant que le Sipper PR2 a été placé en position abaissée.
6. Sélectionnez *Start Wash* (Démarrer le lavage) pour commencer le lavage.
 7. Laisser tous les composants de lavage en place jusqu'au prochain lavage ou séquençage.
 8. Une fois par mois, effectuez un lavage de maintenance sur l'appareil. Il s'agit d'un lavage plus approfondi, qui effectue plusieurs rinçages de la fluidique et dure environ 90 minutes. La configuration de ce lavage est la même que celle d'un lavage post-exécution. Vous devrez revenir à la machine deux fois au cours de ce lavage pour remplir le bac et le flacon de lavage et commencer l'étape suivante. Si le lavage de maintenance est en retard, le MiSeq ne démarre pas une nouvelle analyse tant qu'il n'a pas été effectué.
 9. Si vous ne prévoyez pas d'utiliser le MiSeq pendant une longue période, effectuez un lavage d'attente. Cette opération met le MiSeq en état de veille. Répétez le lavage d'attente tous les 30 jours pendant que la machine est inactive. Vous devrez effectuer un lavage de maintenance avant de lancer la prochaine analyse de séquençage.

Note : Si vous remarquez des signes de contamination entre les cycles, vous pouvez envisager d'effectuer un lavage de la ligne de gabarit dans le cadre du lavage post-exécution. Pour plus de détails, voir la page 30 du MiSeq System Guide.



Nettoyage de la cuve à circulation et chargement de la cartouche de réactifs

Une fois la librairie finale diluée à la concentration de chargement, nettoyer la cuve à circulation et charger le pool dans la cartouche MiSeq.

Matériel :

- Évier ou autre récipient pour recueillir l'eau
- Pipette P1000

Consommables :

- Pointes de pipette P1000
- Gourde remplie d'eau distillée ou pipette de 1 ml et flacon d'eau de qualité laboratoire
- Lingettes Kim ou autre tissu non pelucheux

Réactifs :

- Cartouche de réactifs MiSeq

Protocole :

1. la cartouche de réactifs MiSeq et vérifier visuellement que tous les puits de réactifs sont complètement décongelés.
2. Tapoter la cartouche sur le comptoir pour déposer tous les réactifs au fond du kit.
3. À l'aide d'une pointe de pipette de 1 ml, percer la feuille d'aluminium à la position 17 (entourée d'un cercle orange). Jeter l'embout de la pipette après utilisation.
4. Ajouter 600 µl du pool de librairies de 10 pM dans le trou créé à l'étape précédente. Éviter de toucher la feuille percée avec la pointe de la pipette et éviter de répandre sur les parois du puits.
5. Retirer la cuve à circulation du réfrigérateur à 4 °C et la sortir avec précaution du récipient.

Note : Conserver le conteneur de la cuve à circulation et le tampon d'hybridation restant au cas où le démarrage de l'analyse serait retardé et que la cuve à circulation doit être stockée à nouveau.

6. Sur un évier ou des serviettes en papier, rincer soigneusement la cuve à circulation avec de l'eau de qualité laboratoire.
7. Sécher la cuve à l'aide de lingettes en tissu non pelucheux en vérifiant que la cuve est complètement sèche et exempte de taches ou d'imperfections. Éviter de toucher les deux orifices noirs situés au sommet de la cuve à circulation.
8. *En option.* Essuyer le verre de la cuve à circulation à l'aide d'une lingette imbibée d'alcool. Sécher ensuite avec des lingettes en tissu non pelucheux en vérifiant que la cuve est complètement sèche et exempte de taches ou d'imperfections.
9. Procéder immédiatement au chargement du MiSeq. Ne pas laisser le kit reposer pendant de longues périodes avec l'échantillon à l'intérieur.



Démarrage d'un cycle de séquençage

Matériel :

→ Séquenceur Illumina MiSeq

Réactifs :

- Cartouche de réactifs MiSeq avec librairie ajoutée
- Cuve à circulation nettoyée et sèche
- tampon PR2

Protocole :

1. Avant l'exécution, mettre le MiSeq hors tension. Sur l'écran d'accueil, sélectionner Manage Instrument (Gérer l'instrument), puis Shut Down (Arrêter). Basculer l'interrupteur d'alimentation en position OFF (arrêt) et attendre au moins 60 secondes. Remettre l'interrupteur d'alimentation en position ON et attendre que la machine démarre.
2. En outre, avant l'exécution, confirmer qu'une feuille d'échantillons a été créée pour le pool.
3. Transporter la cartouche MiSeq chargée, la cuve à circulation et le tampon PR2 vers le MiSeq.
4. Sur l'écran d'accueil, sélectionner *Sequence*.
5. Le MiSeq demande le chargement de la cuve à circulation.
 - a. Nettoyez la cuve à circulation comme décrit dans la section **Nettoyage de la cuve à circulation et chargement de la cartouche de réactifs** ci-dessus.
 - b. Ouvrir la porte de la cuve à circulation et appuyer sur le bouton blanc pour libérer la cuve à circulation usagée qui est maintenue en place.
 - c. Placer la nouvelle cuve à circulation nettoyée dans le support de la cuve à circulation. Les joints noirs doivent être orientés vers le haut et l'encoche de la cuve à circulation doit se trouver sur le côté droit.
 - d. Pousser doucement la cuve à circulation vers l'arrière de son logement tout en fermant le support de la cuve à circulation et la porte du support de la cuve à circulation.
 - e. Sélectionnez Next (Suivant) une fois que le RFID de la cuve à circulation est identifié.
6. Le MiSeq demande alors que les réactifs soient mis en place et qu'une feuille d'échantillons soit sélectionnée.
 - a. Ouvrir la grande porte du refroidisseur et la petite porte du refroidisseur de réactifs.
 - b. Soulever le Sipper PR2 et retirer le flacon de tampon de lavage.



- c. Vider le conteneur de déchets MiSeq. **Remarque** : Les déchets MiSeq contiennent des traces de formamide et doivent être éliminés correctement en suivant la procédure de gestion des déchets dangereux de votre établissement, bien qu'il soit généralement possible de les jeter dans l'évier.
 - d. Décapsuler le nouveau flacon de tampon PR2 et le placer dans le MiSeq. **Remarque** : Placer le bouchon du nouveau flacon de tampon sur le flacon de lavage pour qu'il reste propre entre les lavages.
 - e. Abaisser le Sipper PR2.
 - f. Retirer la cartouche de lavage du petit refroidisseur de réactifs et la remplacer par la cartouche de réactifs MiSeq chargée. **Remarque** : jeter le reste de la solution de lavage dans l'évier et laisser la cartouche de lavage sécher avant de la réutiliser.
 - g. Fermer la porte du petit refroidisseur de réactifs et celle du grand refroidisseur.
7. Sélectionner la feuille d'échantillons à partir de l'emplacement où elle a été sauvegardée.
 8. Sélectionner *Load Sample Sheet (Charger la feuille d'échantillons)* et confirmer que les paramètres d'exécution et de cycle correspondent à ce qui est souhaité.
 9. Sélectionner *Start Flow Check* pour effectuer le contrôle fluidique préalable à l'exécution. Cette opération prend environ cinq minutes.
 10. Sélectionnez *Start* (Démarrer) lorsque le contrôle de circulation est terminé.
 - a. Si le contrôle de la circulation échoue, retirer la cuve à circulation et la nettoyer à nouveau.
 - b. Si le contrôle de la circulation échoue une deuxième fois, effectuer un test de volume.
- Note** : Une analyse MiSeq 2 x 150 V2 dure environ 24 heures. Les statistiques importantes du cycle sont disponibles au bout d'une heure environ. Les clusters passant le filtre doivent être inférieurs à 1 000 k/mm² pour la chimie V2. Si elle est supérieure, il faut envisager d'interrompre le cycle et d'en recommencer un autre en diminuant la concentration de la librairie de chargement de 2 pM.
11. Une fois terminé, effectuez un cycle de post-lavage.