

Illumina Sequencing --cBot/HiSeq 2000

马涛

Mail: mat@genomics.org.cn



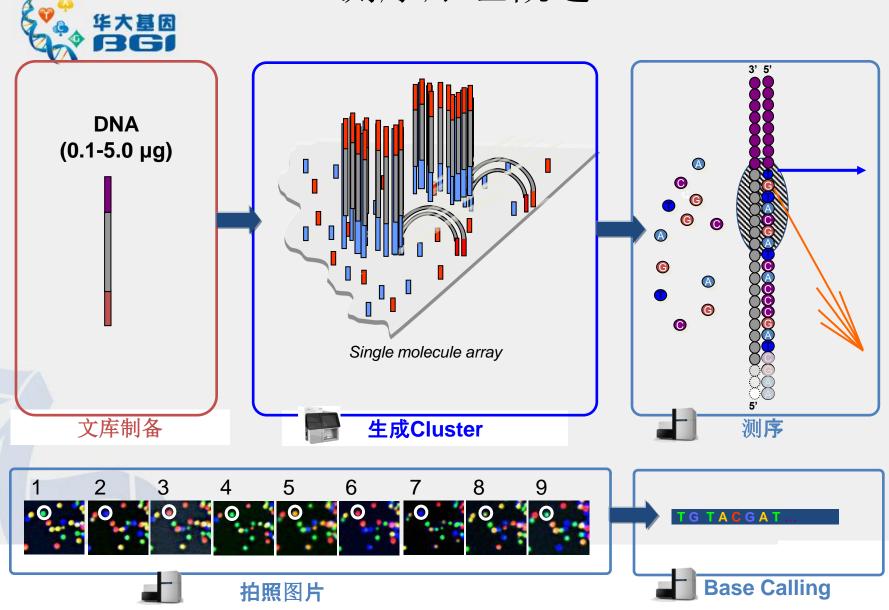
测序流程





拍照图片 Intensities Reads Alignments

测序原理概述





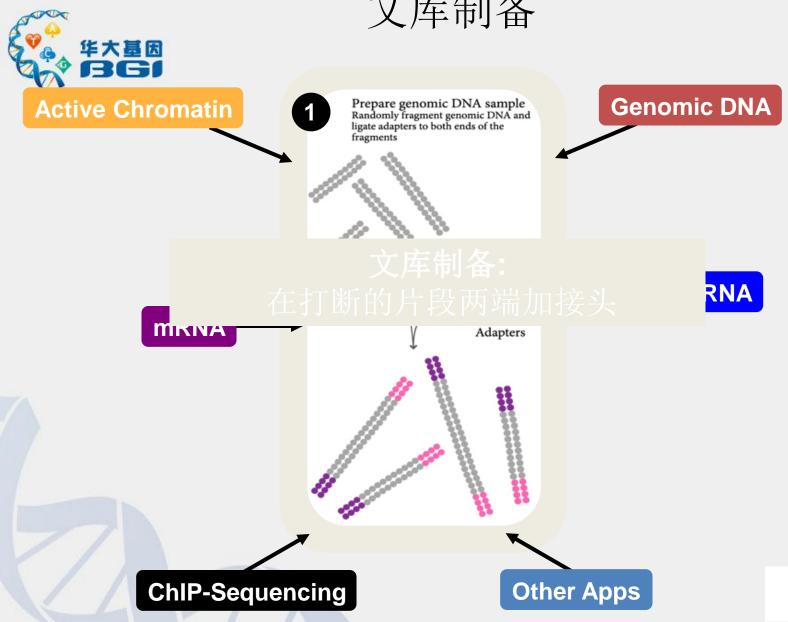
文库制备

测序流程-文库制备





文库制备





生成Cluster

测序流程-芯片制备



数据分析



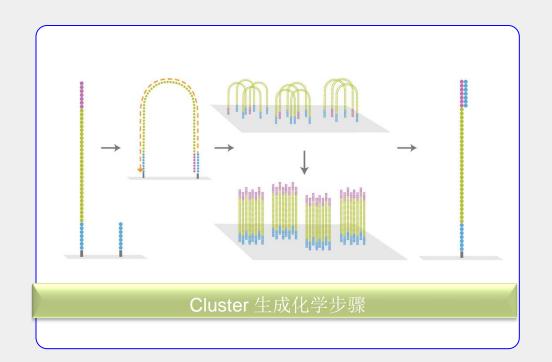
Reads **Alignments**

生成Cluster



· Cluster 生成步骤:

- 扩增
- 线性化
- 阻断
- 引物杂交





cBot

- 把 DNA 样本泵入flow cell
- 把DNA模板扩增成族
- 自动抽取试剂并控制温度



cBot 概况



flow cell 夹具

manifold

96孔板 试剂

废液桶



wash

水槽

触摸屏

条形码 扫描器

Integrated system sensors for flow, waste and plate position

内部结构—左侧视图



• 温控模块

• Kloehn 泵

• 试剂平台

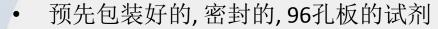
• 冷却系统



cBot – 试剂







- 简单的试剂装载
- 完全消除了试剂准备中的错误
- 更小的试剂盒包装 节约了空间





试剂概况

Positions When Loaded in cBot:

试剂盒有缺角的一面朝向 使用者

> 生成cluster试剂 (1.4mL tubes)

12 (empty) 11 (HP1) 10 (HP5) 9 (BMX) 8 (LS1/LMX1) 7 (HT2) 6 (AMX1) 5 (AT1) 4 (AMX1) 3 (APM1) 2 (HFE) ሽ(HT1) 13 14

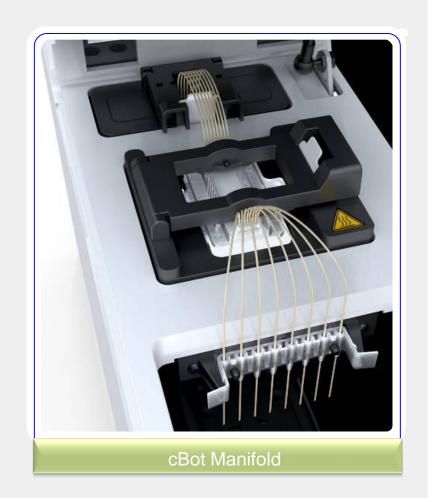


文库 模板 引物 (200uL tubes)

cBot - Manifold

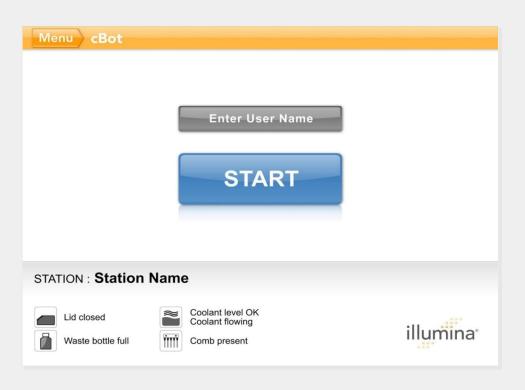


- 每个RUN只使用一个 manifold
- 简单的安装
- 试剂盒只需把盒盖取下,安装
- 灵敏的感应器 确保manifold 安装正确
- 接口严密无泄漏





cBot -触摸屏操作



- 简单的操作,实时监控
 - Current status, run completion
- 触摸屏上一步接一步的操作指示
 - Embedded help menu

cBot -条形码扫描器



- 集成条形码扫描器对FC和试剂条码扫描
 - 唯一的ID 进行跟踪
- 废液提醒传感器





测序

测序流程—测序







DNA打断 末端修复 加A



桥式PCR扩增 测序引物准备测序





测序 生成 base calls



数据分析



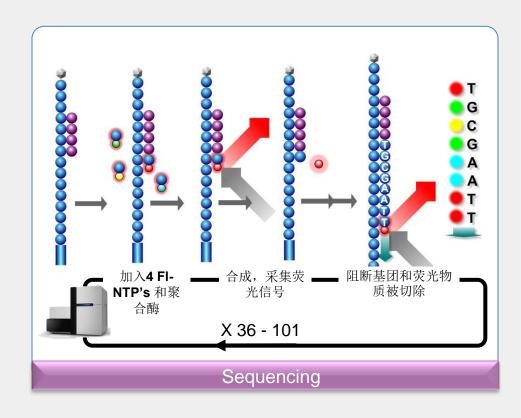
Reads **Alignments**

华大基因

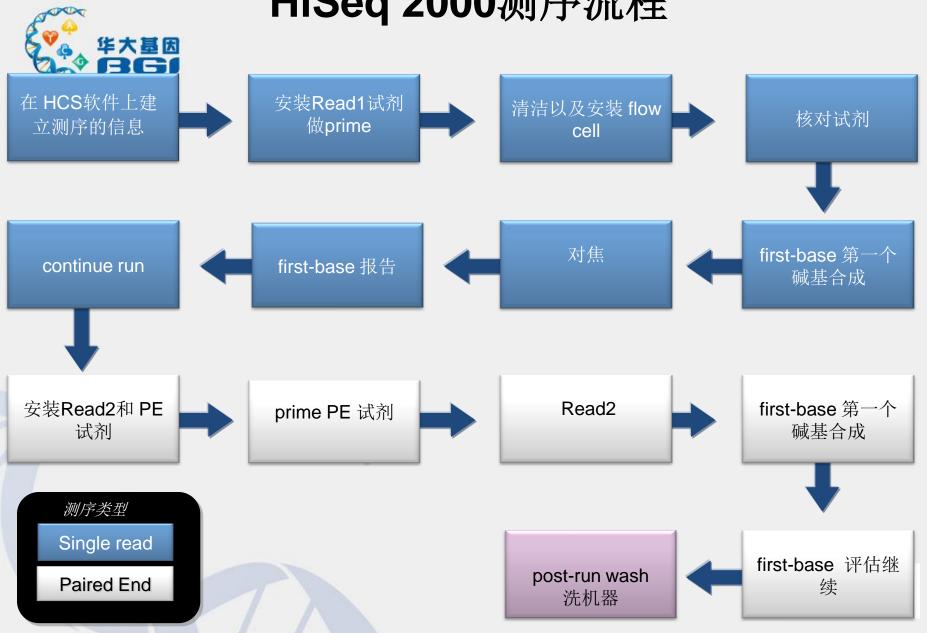
Sequencing

3-step cycles:

- 带有荧光游离核苷酸合成
- 成像
- 切除阻断基团和荧光物质
- 如果是Paired-end runs 就会用到 paired-end module



HiSeq 2000测序流程





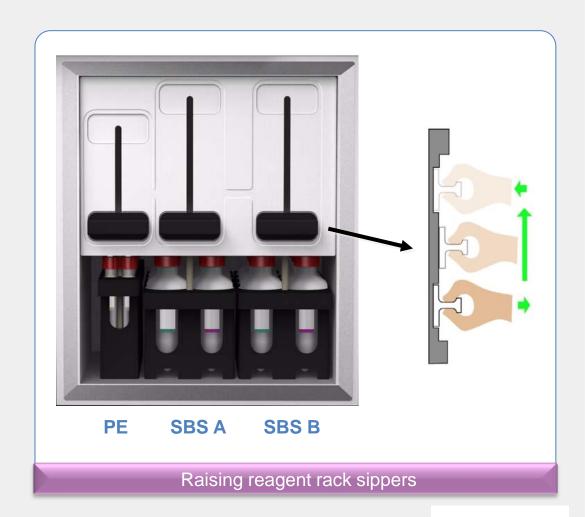
HiSeq 2000 概况





- 试剂吸管把手
- 3个试剂架
 - 2个 SBS 架
 - 1 PE 架

试剂舱



HiSeq 2000 试剂



• 测序试剂

- 安装约15 minutes
- 每个RUN可以测 209 cycles
- 条形码跟踪
- 试剂舱恒温

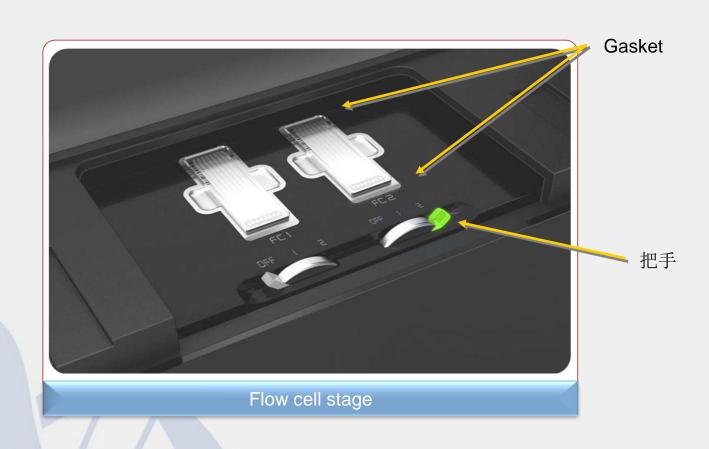




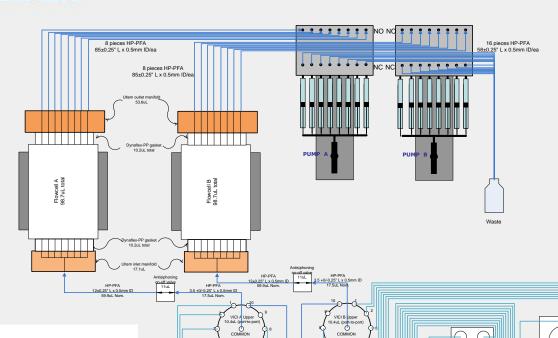
Flow Cell 平台



- Flow cells 用真空吸附
- 不用再向GA那样加油
- LED 显示真空吸附FC的情况







4 +0/-0.25" L x 0.5mm ID

COMMON

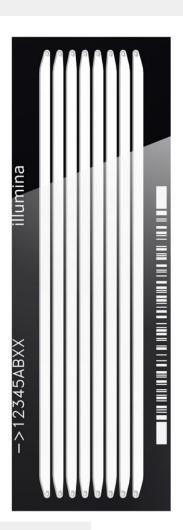
两套独立的 管道系统

Flow Cell 的设计



- 面积更大,双边面设计
 - 增加了5倍面积
 - 保留 8 lane 设计
 - 25mm 宽 X 75mm 长
 - Lanes 1.7 mm 宽
 - 只适用于 cBot

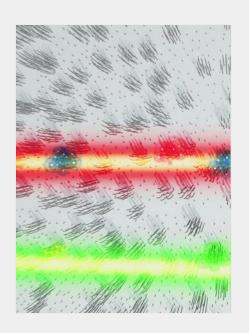


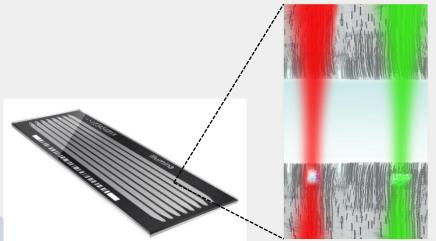


双面使用



- 更快的成像
- 线扫描
- Time Delay Integration (TDI) 成像系统
- 对flow cell的两个表面clusters进行扫描
- 更大的测序通量输出



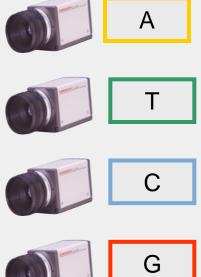


成像



- 4 CCD cameras
- 4个碱基图像同时捕获
 - 先扫描上表面 (all 4 colors)
 - 再扫描下表面 (all 4 colors)



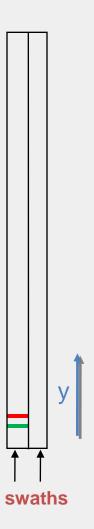


Flow Cell 线扫描



Swath

- 把一个line的一半定义为一个 swath
- Cameras operate in TDI 不间断 的输出图像



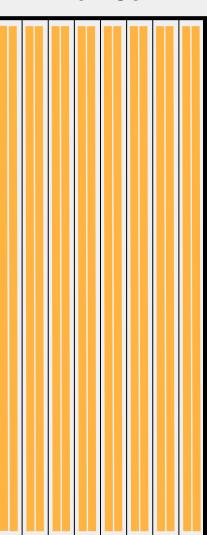


Flow Cell Swath/Tile

Tile Swath

Flow Cell

- HiSeq Control Software (HCS) 把1个 swath 划分为 8 个部分 (tiles)
- HiSeq tile 不同于GA tile

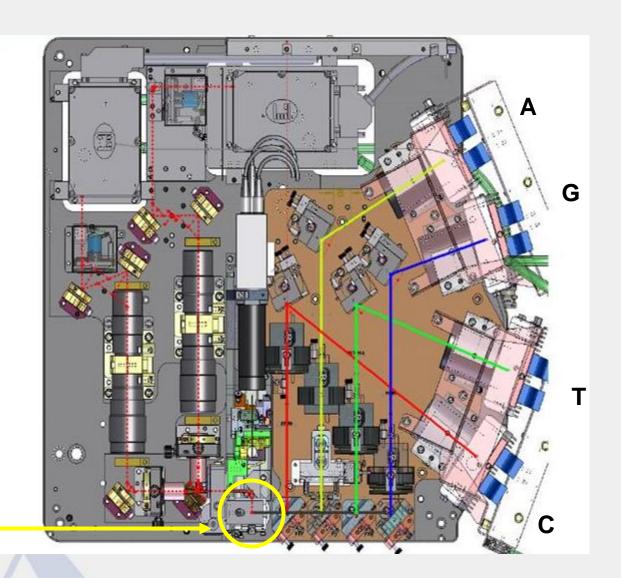




图像采集示意图

最大限度提高通量:

Cameras满负荷运转 化学反应和图像采集 交替进行 连续成像



Objective

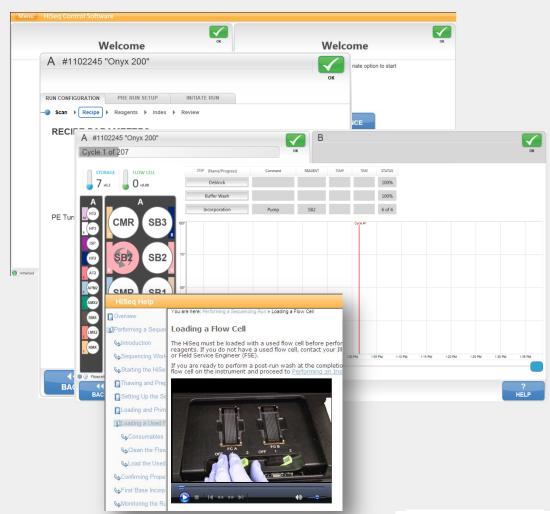
HiSeq Control Software (HCS)



更加简单的操作

- Step-by-step run set up
- ▶ 人性化的 recipe
- **▶** 实时监**控**
- **试剂跟踪**
- 帮助菜单

操作界面



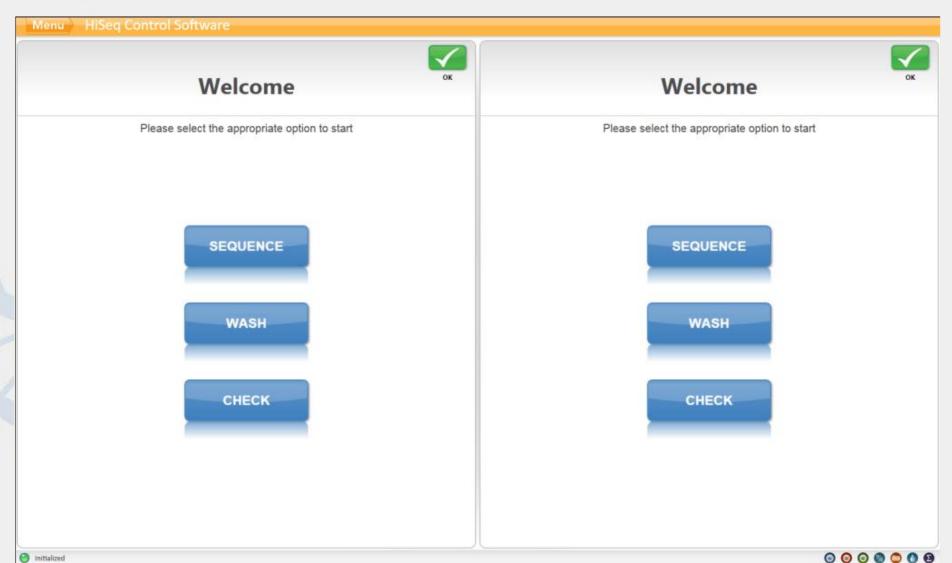
HiSeq Control Software (HCS)

- 华大量因
- · HCS应用于整个RUN的流程:
 - 建立RUN的信息及参数
 - 进行测序
 - 对整个RUN进行监控
 - 对一些操作步骤进行提醒 (e.g.,安装试剂,FC, priming, wash)





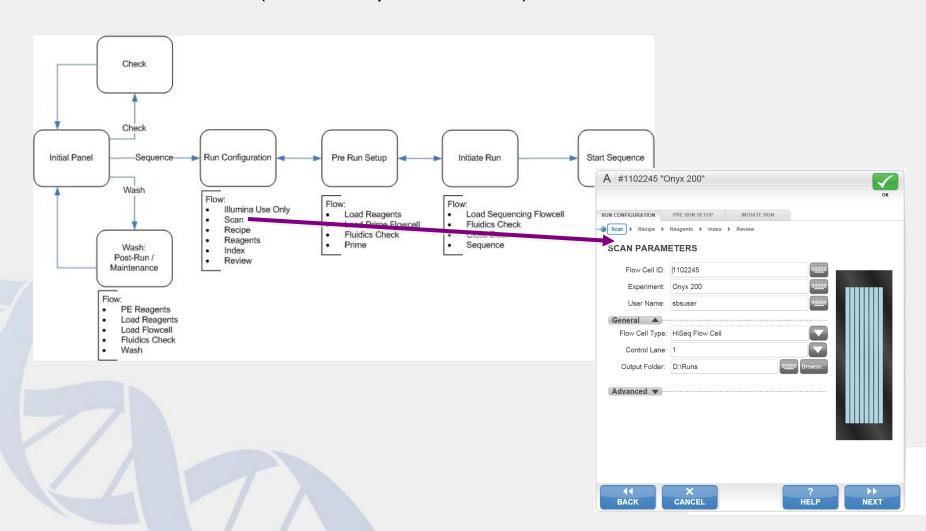
HCS操作界面





HiSeq 工作流程

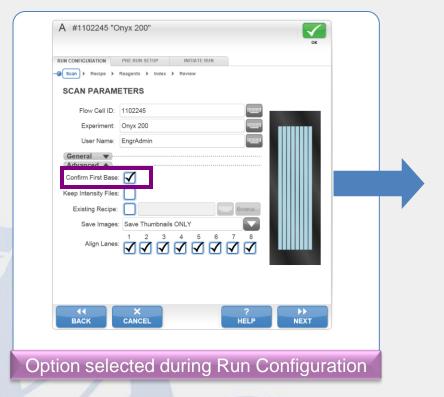
▶ 三个不同程序的选择(Wash, Sequence Check), 根据提示进行下一步操作

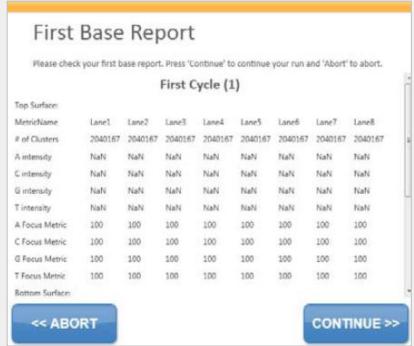


First Base 报告



 若在操作界面上选取了Confirm First Base,就会弹出First Base报告进行 这个RUN 的初步评判

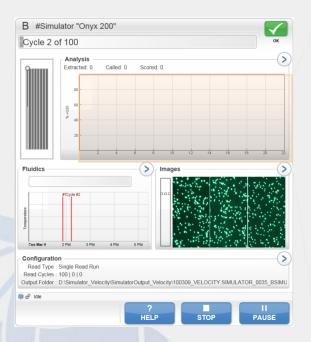


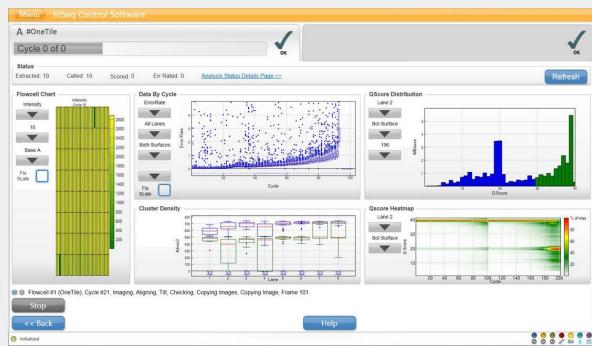


HiSeq 2000 HCS软件



• HCS软件初步数据分析结果

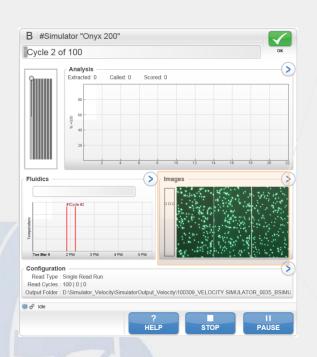


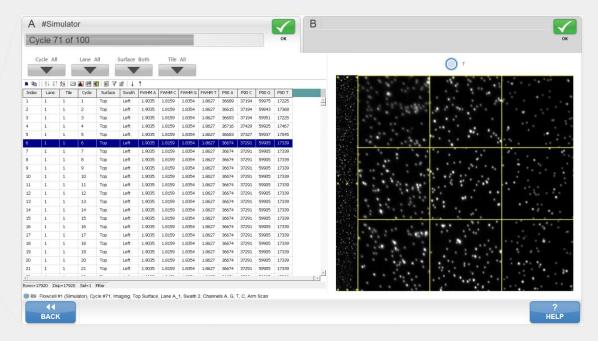


HiSeq 2000HCS软件



• 一个RUN的Images Thumbnail 概况







数据分析

测序流程—数据分析





HiSeq 2000 数据分析



A Simple, Familiar Workflow



images







base calling

HiSeq CONTROL SOFTWARE

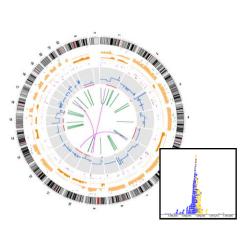
Read Generation







Alignments, variations, builds



biologically meaningful results

VISUALIZATION

GenomeStudio, or favorite browser



谢谢