

NGL-SEQUENÇAGE (NGL-SQ) :

Déclaration des processus de Séquençage Illumina

Important :

- Les déclarations continuent dans le LIMS Solexa jusqu'aux librairies finales *normalisées ou non* ; cela correspond normalement aux **lib-10nM et lib-XnM \geq 1nM**.
- Dès que ces librairies sont créées dans le LIMS solexa, **elles s'importent automatiquement dans NGL-SQ en tant que « librairies normalisées », à l'état « Processus en attente »** (*import toutes les 10 min*).
- Le passif (depuis le 1^{er} janvier 2015) est importé dans NGL-SQ (tubes NON vides) :
 - lib-10nM et lib-XnM \geq 1nM \Rightarrow importées en tant que librairies normalisées
 - lib-XnM $<$ 1nM et $>$ 60pM \Rightarrow NON importées
 - lib-XnM \leq 60 pM \Rightarrow importées en tant que dénat.
- La suite des déclarations devra s'effectuer obligatoirement dans NGL-SQ :
 - **dénat-dilution, prep FC, dépôt** dans le cadre d'un séquençage 2000/2500, Miseq, NextSeq ;
 - **prep FC ordonnée, dépôt** dans le cadre d'un séquençage 4000 / X5

Table des matières

1. CREATION PROCESSUS Séquençage [2000/2500, Miseq, Nextseq] : Dénat, prep FC, dépôt.....	3
1.1) Mettre à jour les propriétés d'un (ou de plusieurs) processus	3
1.2) Supprimer des processus que vous n'auriez pas dû créer	4
2. Création expérience : Dénaturation-dilution	4
3. Création expérience : Préparation Flowcell.....	6
2. Création expérience : Dépôt sur séquenceur	9
2.1) Générer la sample sheet	9
2.2) Démarrer la progression	10
2.3) Terminer l'expérience	10
2.3.1) Recommencer l'expérience	10
<i>La FC doit être redéposée (même séquenceur à une autre date ou autre séquenceur).....</i>	<i>10</i>
3. Gérer une erreur de container dans une expérience de prep-FC	10
4. Redéposer une lib normalisée (une dénat doit être refaite).....	11
4.2. Changement d'état containers.....	11
5. Redéposer une dénat (suffisamment récente pour être réutilisée)	11
5.2. CREATION PROCESSUS Séquençage : Prep FC, Dépôt	11
6. Cas particulier d'une librairie normalisée ou dénat à déposer sur N flowcell en parallèle	12
6.2. Processus créé à partir de la librairie normalisée	12
6.3. Processus créé à partir de la dénat	13
7. CREATION PROCESSUS Séquençage : Hiseq 4000 / X5 [prep FC ordonnée, dépôt]	13
8. Création expérience : prep FC ordonnée	14
La création du dépôt sur séquenceur se fait exactement comme dans le chapitre 2. Création expérience : Dépôt sur séquenceur.	
9. Mettre des tubes à la poubelle : le notifier dans NGL par un changement d'état à « Indisponible »	14
10. Menus de Recherche et Création	14
11. Traçabilité des réactifs dans les expériences.....	15
Annexe 1 Workflows : interactions	16
Annexe 2.1 : Processus de Séquençage [Hiseq 2000/2500, Miseq, Nextseq]	17
Annexe 2.2 : créer N processus de Séquençage en parallèle, à partir d'une même dénat qui doit être déposée sur N flowcells en même temps.....	18
Annexe 2.3 : Processus de Séquençage : 4000 / X5	19
Annexe 3 : Modèles Feuille de route séquenceurs générées par NGL-SQ dans l'expérience de dépôt sur séquenceur.	20

1. CREATION PROCESSUS Séquençage [2000/2500, Miseq, Nextseq] : Dénat, prep FC, dépôt

Vous pouvez choisir de :

- Créer/Associer les processus en masse sur un grand nombre de librairies normalisées (par anticipation) OU
- Créer/Associer uniquement les processus aux librairies normalisées destinées à une même FC.

- Aller dans le menu **Processus > Création**.
- Choisir le processus à créer : *Catégorie : Séquençage Type : Dénat, prep FC, dépôt*.
Les containers issus de « librairies normalisées » à « Processus en attente » sont préfiltrés par défaut.
- Utiliser les filtres de recherche (si besoin) pour rechercher efficacement vos containers parmi la liste importante de lib normalisées :

Filtres de recherche disponibles :

- **Projet(s)** : exemple : HUHAPMAP_224 ✓ VEGETAL_18 ✓
- **Echantillon(s)** : exemple : B00G25L ✓ B00G25R ✓ (stock barcode)
- **Regex pour code support** : taper le library barcode (en entier ou partiellement), ou plusieurs library barcodes, en les séparant avec des | .

Filtres de recherche supplémentaires :

- **Regex code aliquot** : taper le sample barcode (en entier ou partiellement) ; possibilité d'en écrire plusieurs en les séparant par des | (Alt Gr + 6)
Exemples : **B00GW6** pour retrouver **B00GW66**, **B00GW67**, **B00GW68**, **B00GW6A...**
B00FZ06|B00GT08|B00GW6J pour retrouver les 3
- Sélectionner les tubes destinés au processus de séquençage et les mettre dans le panier.
- Cliquer sur l'onglet **Dénat, prep FC, dépôt** dans le volet de gauche pour visualiser le panier de containers.
- Renseigner les propriétés de processus :
 - **Instrument**
 - **Position**
- **Enregistrer**.
- ⇒ **Un processus est créé par content** (un content correspond ici à un échantillon_TAG), à l'état « Nouveau ».
- ⇒ cf. [Annexe 1](#) et [2.1](#) : Les containers (lib normalisées) passent alors à « **Disponible transformation** » pour l'expérience de dénat-dilution.

1.1) Mettre à jour les propriétés d'un (ou de plusieurs) processus


Si vous souhaitez modifier l'instrument ou la position prévisionnelle (propriétés de processus) :

- Aller dans le menu **Processus > Recherche**.
- **Filtrer sur Cat : Séquençage Type : Dénat, prep FC, dépôt** pour faire apparaître les colonnes des propriétés.
- Rechercher et sélectionner les processus à modifier.
- Editer.
- Faire les modifications et enregistrer.


1.2) Supprimer des processus que vous n'auriez pas dû créer

- Aller dans le menu **Processus > Suppression**.
- **Règles :**
 - **Un processus ne peut être supprimé que s'il est à « Nouveau ».**
 - **Un processus ne peut être supprimé que s'il n'a pas d'expérience associée** (elle serait à Nouveau dans ce cas et le container à Expérience en attente).
 - **Un processus NE PEUT PAS être supprimé si le container associé est à « Disponible Transformation / Transfert / ... ».**

2. Création expérience : Dénaturation-dilution

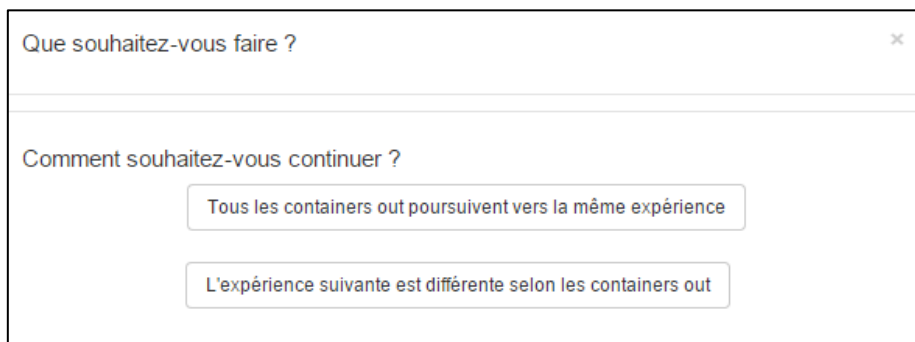
- cf. *Annexe 1 et 2.1* : les containers (lib normalisées) « En attente de processus » auxquels on a associé un processus sont passés à « Disponible transformation » pour la 1^{ère} expérience du processus (ici : dénat-dilution).
- Aller dans le menu **Expérience > Création**.
- **Sélect. une transformation : Dénaturation-dilution.** Lancer la recherche  sur les tubes pouvant entrer dans cette expérience (correspond aux lib normalisées à disponible transformation).
- Utiliser les filtres de recherche (si besoin) pour rechercher efficacement vos containers parmi la liste importante de supports containers :

Filtres de recherche disponibles :

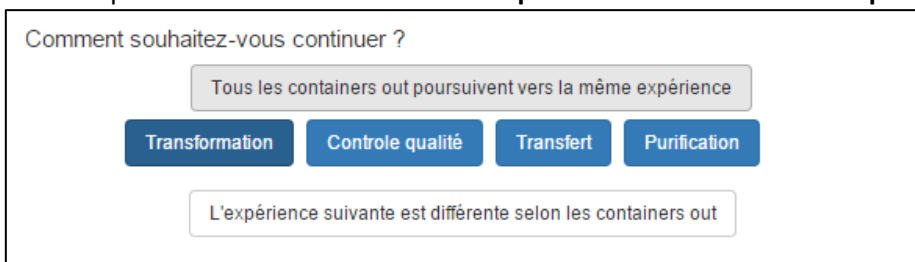
- **Sélect type processus :** Dénat, prep FC, dépôt ⇨ Des **filtres supplémentaires** apparaissent, correspondant aux propriétés du processus :
 - **Instrument**
 - **Position**
 - **Projet(s)**
 - **Echantillon(s)**
 - **Regex pour code support / Regex code aliquot**
- Sélectionner les containers pour l'expérience et les mettre dans le panier.
- Cliquer sur l'onglet **Dénaturation-dilution** dans le volet de gauche puis sur le bouton **Configurer Dénaturation-dilution** et enfin sur l'onglet **Configurer Dénaturation-dilution** à gauche [en cours de refonte pour diminuer le nb d'étapes].
- Renseigner les propriétés de l'expérience et de l'instrument.
- Renseigner les propriétés des containers (tableau central) : sélectionner les lignes et éditer pour renseigner les valeurs.
- **Sauvegarder** 
- Démarrer la progression (l'expérience passe à « en cours » ; les processus passent à « en cours » et les containers passent à « En cours d'utilisation »).
- Editer une résolution de fin d'expérience puis Terminer l'expérience. [en cours de refonte pour diminuer le nb d'étapes].

★ **Cas 1) Résolution* = déroulement correct (uniquement)**

⇨ Une pop-up s'ouvre :



⇒ Cliquer sur « **Tous les containers out poursuivent vers la même expérience** »

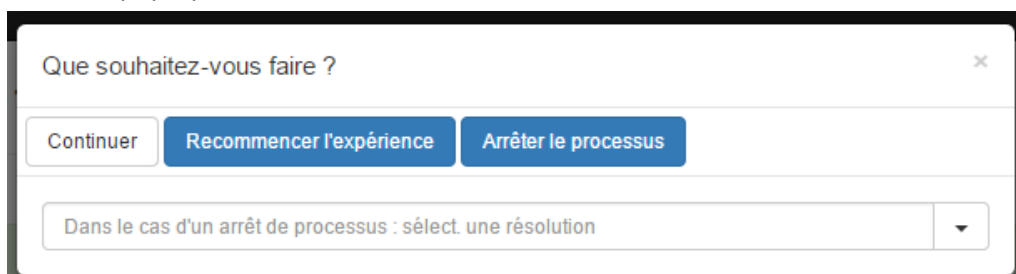


⇒ Cliquer sur **Transformation** cf. [Annexe 2.1](#)

⇒ cf. [Annexe 1](#) : L'expérience passe à « Terminé ». Les containers IN (lib normalisées) passent à « En stock », les containers OUT (dénat) passent à « Disponible transformation » pour la prochaine expérience (prep FC). Les processus restent à « En cours ».

★ **Cas 2) Résolution* inclut autre chose que « déroulement correct »**

⇒ Une pop-up s'ouvre :



2.3.1) Continuer

Les dénat poursuivent vers prep FC, même si problème signalé.

⇒ **Même comportement que dans le cas 1) : choisir « Tous les containers out poursuivent vers la même expérience » puis « Transformation ».**

2.3.2) Recommencer l'expérience

Aucune des dénat n'est utilisable, elles doivent être recommencées (nouveaux codes-barres) à partir des mêmes lib normalisées.

⇒ Les containers OUT (dénat) passent à « Indisponible » ; **les containers IN sont remis à « Disponible transformation »**, ils peuvent rentrer à nouveau dans une expérience de dénat-dil sans avoir à leur recréer un processus ; les processus restent à « En cours ».






2.3.3) Arrêter le processus

Aucune des dénat n'est utilisable et on ne souhaite pas les recommencer.

⇒ Les containers OUT passent à « Indisponible » ; les containers IN passent « En stock » ; **les processus passent à « Terminé »** et on doit **obligatoirement renseigner une résolution de fin de processus** (en l'occurrence : processus partiel ✓)

- ★ **Cas où tous les containers OUT poursuivent mais pas vers la même catégorie d'expérience** (certains doivent aller vers une transformation, d'autres vers un QC, d'autres vers un transfert) : **POSSIBLE [me demander]**
- ★ **Cas où certains containers s'arrêtent dans le processus ou doivent être recommencés ET d'autres continuent vers une expérience** : **NON GÉRÉ pour le moment**

3. Création expérience : Préparation Flowcell

- Aller dans le menu **Expérience > Création**.
- **Sélect. une transformation : Préparation flowcell**. Lancer la recherche  sur les tubes pouvant entrer dans cette expérience (correspond aux dénat à « Disponible transformation »).
- Utiliser les filtres de recherche (si besoin) pour rechercher efficacement vos containers parmi la liste importante de supports containers :
Filtres de recherche disponibles :
 - **Sélect type processus** : Dénat, prep FC, dépôt (ou prep FC, dépôt selon le type processus créé) ⇒ Des **filtres supplémentaires** apparaissent, correspondant aux propriétés du processus :
 - **Instrument**
 - **Position**
 - **Projet(s)**
 - **Echantillon(s)**
 - **Regex pour code support / code aliquot**
- Sélectionner les containers pour l'expérience et les mettre dans le panier.
- Visualiser le panier de containers et cliquer sur **Configurer Préparation Flowcell** puis sur **Configurer Préparation Flowcell** à gauche.
- Renseigner les propriétés de l'expérience et de l'instrument :
 - Protocole
 - Type instrument
 - Instrument
 - **Container sortie** ⇒ fait apparaître le bon nombre de lignes dans composition flowcell
 - Type lectures
 - Code flowcell : à biper avec le lecteur de code-barres
- Glisser les solutions stocks du panier d'input vers les lanes de la FC.
- Le bouton  permet de replier / déployer les lanes de la FC.
- Le bouton  permet de dupliquer une solution stock si elle doit être déposée sur plusieurs lanes (action possible uniquement dans le panier d'inputs).
- Rester sur l'onglet **[Composition Flowcell]**.
- Renseigner les propriétés des containers IN (solutions stock) : **% à déposer** ; et des containers OUT (lanes) : **% PhiX** et **Volume final**  = *volume introduit dans la barrette (cBot ext) OU cassette de réactifs (Miseq/NextSeq) OU tube de chargement prévu sur le séquenceur (clustering sur séquenceur Hiseq 2500 rapide).*
- Passer sur l'onglet **[Feuille de calcul]**.
- Sélectionner les lignes à éditer.
- Editer les propriétés (conc. chargement lib-B).
- **Sauvegarder** 

Composition flowcell

Feuille de calcul

2 Résultats(s)

bibliothèque dénaturée						lib-B		prep FC					
#	Support container	Code aliquot	Tag	Concentration (nM)	Volume (µL)	Etat container	Conc. chargement (pM)	% à déposer	% phiX	Volume final (µL)	Code Container	Etat Support Container	
1	0A6E27JCN	PHIX174		0,002	2	Expérience en attente	29	100	20	3	FDHGF_1		
2	0A6E3965U	PHIX174		0,002	2	Expérience en attente	25	100	10	3	FDHGF_2		

○ **Messages d'erreur si :**

- Même index présent 2 fois sur la lane
- % différent de 100% sur une lane
- Catégorie d'index non homogène sur la lane (single index, dual index, mid)
- Taille d'index non homogène sur la lane (6 bases, 8 bases, 2*8 bases)
- Oubli de renseigner des propriétés obligatoires

⇒ Quand tout est OK, expérience créée et compo FC en vue « repliée ».

cf. [Annexe 1](#) : L'expérience est à « Nouveau ».

Les containers sont à « En attente d'expérience ».

Les processus associés aux containers sont toujours à « En cours »

3.1) [Démarrer la progression](#)

⇒ cf. [Annexe 1](#) : L'expérience passe à « En cours » ; les containers passent à « En cours d'utilisation » ; les processus restent à « En cours ».

- **Messages d'erreur si au moins une des propriétés obligatoires n'a pas été renseignée.** Sinon « sauvegarde réussie ».

3.2) [Terminer l'expérience](#)

- **Lorsque la cBot est terminée, revenir sur l'expérience.** Renseigner une **résolution*** (**obligatoire**) de fin d'expérience puis cliquer sur **Terminer**.

★ **Cas 1) Résolution* = déroulement correct (uniquement)**

⇒ Une pop-up s'ouvre :

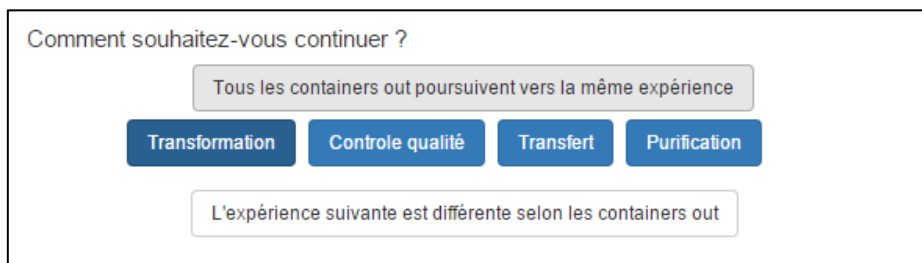
Que souhaitez-vous faire ?

Comment souhaitez-vous continuer ?

Tous les containers out poursuivent vers la même expérience

L'expérience suivante est différente selon les containers out

⇒ Cliquer sur « **Tous les containers out poursuivent vers la même expérience** »

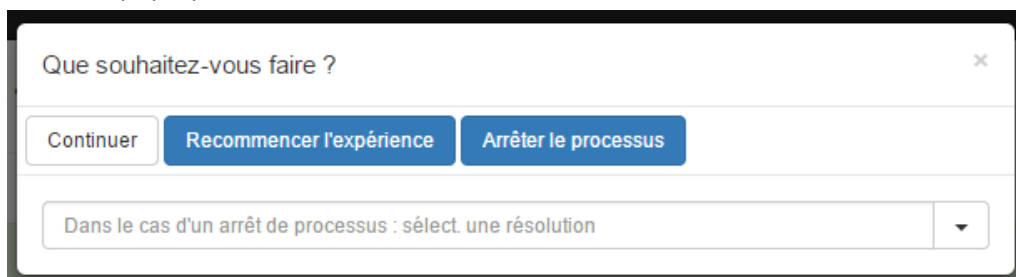


⇒ Cliquer sur **Transformation**.

⇒ cf. [Annexe 1](#) : L'expérience passe à « Terminé ». Les containers IN (*dénat*) passent à « En stock », le support container OUT (*flowcell*) passe à « Disponible transformation » pour la prochaine expérience. Les processus restent à « En cours ».

★ **Cas 2) Résolution* inclut autre chose que « déroulement correct »**

⇒ Une pop-up s'ouvre :



2.3.4) Continuer

La FC va être déposée, même si problème signalé.

⇒ **Même comportement que dans le cas 1)** : choisir « Tous les containers out poursuivent vers la même expérience » puis « Transformation ».

2.3.5) Recommencer l'expérience

La FC est inutilisable, elle doit être recommencée (nouvelle réf FC) avec les mêmes dénat.



⇒ Le support container OUT (*Flowcell*) passe à « Indisponible » ; **les containers IN sont remis à « Disponible transformation »**, ils peuvent rentrer à nouveau dans une expérience de prepa FC sans avoir à leur recréer un processus ; les processus restent à « En cours ».

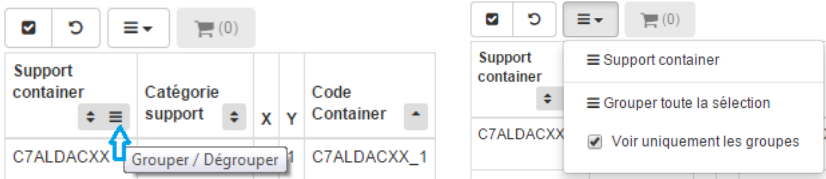
2.3.6) Arrêter le processus

La FC est inutilisable et on ne souhaite pas la recommencer.

⇒ Le support container OUT (*Flowcell*) passe à « Indisponible » ; les containers IN « En stock » ; **les processus passent à « Terminé »** et on doit **obligatoirement renseigner une résolution de fin de processus** (en l'occurrence : processus partiel ✓)


2. Création expérience : Dépôt sur séquenceur

- Aller dans le menu **Expérience > Création**
- **Sélect. une transformation : Dépôt sur séquenceur**
- Lancer la recherche 
- Le bouton GROUPEUR  de la colonne Support container est coché par défaut, ce qui permet de visualiser une seule ligne pour le support de container (la FC).



Support container	Catégorie support	X	Y	Code Container
C7ALDACXX				C7ALDACXX_1

Support container	Catégorie support	X	Y	Code Container
C7ALDACXX	Flowcell 8			C7ALDACXX_1,C7ALDACXX_2,C7ALDACXX_3,C7ALDACXX_4,C7ALDACXX_5,C7ALDACXX_6,C7ALDACXX_7,C7ALDACXX_8

- Sélectionner la flowcell et la mettre dans le panier.
- Cliquer sur l'onglet **Dépôt sur séquenceur** dans le volet de gauche,
- Cliquer sur le bouton **Configurer Dépôt sur séquenceur** puis sur Configuration à gauche.
- **Renseigner les propriétés de l'expérience et de l'instrument :**
 - Protocole
 - **Date réelle de dépôt : se met par défaut à la date de création de l'expérience ; à modifier si celle-ci est différente du jour où vous créez l'expérience**
 - Type instrument
 - Instrument
 - Mode run (si HiSeq 2500) : fast run ou high-throughput
 - Piste contrôle (par défaut à auto-calibrage)
 - Position (si dépôt HiSeq)
 - Nom cassette Miseq (si dépôt Miseq)
 - Type lectures
 - Nb cycles Read1
 - Nb cycles Read Index1
 - Nb cycles Read Index2 : **0 si pas de read index 2**
 - Nb cycles Read2
- **Sauvegarder** 
- **Message d'erreur si :**
 - Plusieurs flowcell mises dans un dépôt.
 - Une flowcell incomplète est mise dans le dépôt.
 - Oubli de renseigner des propriétés obligatoires.

2.1) Générer la sample sheet

- **Générer la Sample Sheet** pour le séquenceur en cliquant sur le bouton **Action** (en haut à droite) puis **Feuille de route** :
 ⇒ La FDR est directement envoyée dans le répertoire SampleSheet du séquenceur (un message de confirmation apparaît). Elle est aussi téléchargée sur votre ordinateur (dossier Téléchargements).

Modèles FDR séquenceurs en Annexe 3.

2.2) [Démarrer la progression](#)

- **Quand vous déposer la FC sur séquenceur : revenir sur l'expérience et **Démarrer la progression**.** Messages d'erreur si oubli de renseigner des propriétés obligatoires. Sinon l'expérience passe « En cours » (cf. [Annexe 1](#)).

2.3) [Terminer l'expérience](#)

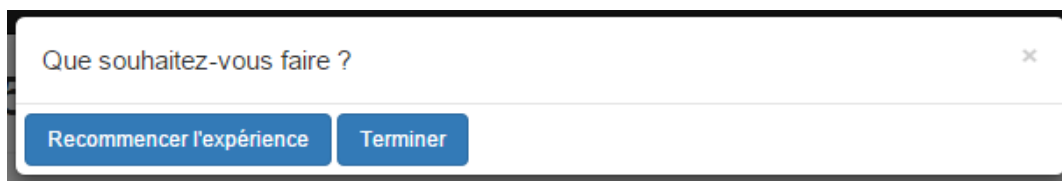
- **Lorsque le dépôt a été effectué**, et que la first base est passée (par exemple), revenir sur l'expérience : renseigner une **résolution*** (**obligatoire**) de fin d'expérience puis cliquer sur **Terminer**.

★ **Cas 1) Résolution* = déroulement correct (uniquement)**

- ⇒ cf. [Annexe 1](#) : L'expérience passe à « Terminé ». Le support container IN (*flowcell*) passe « En stock ». Il n'y a pas de container OUT. Les processus passent à « Terminé » (car c'est la dernière expérience du processus).

★ **Cas 2) Résolution* inclut autre chose que « déroulement correct »**

- ⇒ Une pop-up s'ouvre :



2.3.1) [Recommencer l'expérience](#)

La FC doit être redéposée (même séquenceur à une autre date ou autre séquenceur).

- ⇒ **Le support container IN (*flowcell*) est remis à « Disponible transformation »** ; le processus reste « En cours ».

2.3.2) [Terminer](#)

Terminer l'expérience normalement, même si problème signalé.

- ⇒ **Même comportement que dans le cas 1)**

3. [Gérer une erreur de container dans une expérience de prep-FC](#)

NB : possible uniquement si l'expérience est à « Nouveau »

- Retourner sur l'expérience de prep FC concernée.
- Cliquer sur **Editer**.
- Cliquer sur l'onglet Création expérience apparu dans le volet de gauche.
- Faire une recherche sur les dénat que vous voulez rajouter à la prep. FC.
Rappel : les dénat doivent être à « Disponible transformation » et avoir un processus pour pouvoir rentrer dans une expérience de prep FC.
- Les sélectionner et les mettre dans le panier.
- Retourner sur l'onglet avec le code de l'expérience dans le volet de gauche.
- Les nouveaux containers apparaissent dans le panier d'inputs.
- Glisser les nouvelles solutions stocks du panier d'input vers les lanes de la FC.
- Enlever de la compo FC les dénat que vous voulez supprimer, en les remettant dans le panier d'input. Les supprimer en cliquant sur la poubelle (pas obligatoire).
- **Ne pas oublier d'éditer les nouvelles lignes dans le tableau FDR.**
- **Sauvegarder.**

Remarque : vous devez d'abord récupérer un autre container, puis l'échanger dans la FC.

Rappel : A partir du moment où l'expérience est en cours, cette manipulation n'est plus possible.

Vérifications : le nouveau container entré dans l'expérience doit être à « Expérience en attente » et son (ses) processus Nouveau doit (doivent) être associé(s) à l'expérience. Le container qui a été enlevé de la FC doit être revenu à « Disponible transformation » et l'exp doit avoir été effacée de son (ses) processus Nouveau.

4. Redéposer une lib normalisée (une dénat doit être refaite)

Lorsque vous souhaitez redéposer une librairie normalisée (après un certain délai depuis le dernier dépôt) :

- Vérifiez qu'elle n'est plus associée à un processus en cours (recherche container : colonne processus doit être vide) ;
- Changer son état à « Processus en attente » (cf. chapitre 5. [Changement d'état container](#)) ;
- Créer un nouveau processus de séquençage : **dénat, prep FC, dépôt (processus « long »)**

4.2. Changement d'état containers

- Aller dans le menu **Containers > Changement d'état**
- Utiliser les filtres de recherche si besoin :
 - Issu du type d'expérience : librairie normalisée ✓ OU dénaturation-dilution ✓
 - Container depuis le : <date création>
 - Container créé par : <login utilisateur>
 - Projet, Echantillon, CB tube, code aliquot...
- Sélectionner la ligne concernée (en cliquant dessus).
- Cliquer sur le bouton Editer.
- **Modifier l'état à « Processus en attente ».**
- *Le container est alors prêt pour rentrer dans un nouveau processus.*

Règles existantes :

- On ne peut pas passer un container à « En attente Processus » (IW-P) s'il a encore un processus associé ⇒ car on ne doit jamais avoir 2 processus (N ou IP) en même temps.
- On ne peut pas passer le container à « Disponible *** » (A-TM, A-TF...) s'il n'a pas de processus associé ⇒ pour éviter les cas où un container mis à disponible SANS processus puisse rentrer dans une expérience.

5. Redéposer une dénat (suffisamment récente pour être réutilisée)

Lorsque vous souhaitez redéposer une dénat :

- 1) Vérifiez qu'elle n'est plus associée à un processus en cours (recherche container : colonne processus doit être vide) ;
- 2) Changer son état à « Processus en attente » (cf. chapitre 5. [Changement d'état container](#)) ;
- 3) Créer un nouveau processus de séquençage : **prep FC, dépôt (processus « court »)**

5.2. CRÉATION PROCESSUS Séquençage : Prep FC, Dépôt

- Aller dans le menu **Processus > Création.**

- Choisir le processus à créer : **Catégorie : Séquençage Type : Prep FC, Dépôt.**
Les containers issus de « dénaturation-dilution » sont préfiltrés par défaut.
 - Utiliser les filtres de recherche si besoin.
 - Sélectionner les containers destinés au processus de séquençage et les mettre dans le panier.
 - Cliquer sur l'onglet **Prep FC, Dépôt** dans le volet de gauche pour visualiser le panier de containers. Renseigner les propriétés de processus. **Enregistrer.**
- ⇒ **Un processus est créé par content.**
cf. [Annexe 1](#) et [2.1](#) : Les containers passent alors à « **Disponible transformation** » pour l'expérience de prep FC.

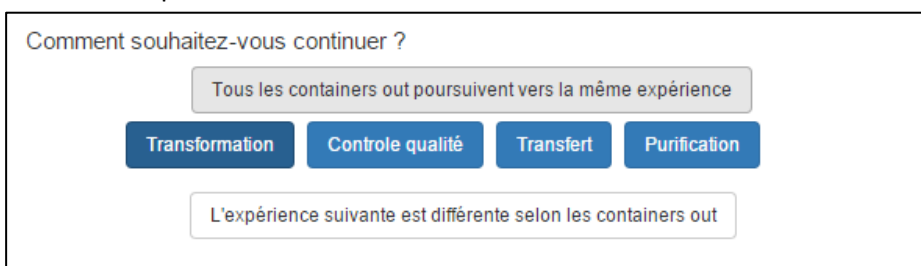
6. Cas particulier d'une librairie normalisée ou dénat à déposer sur N flowcell en parallèle

6.2. Processus créé à partir de la librairie normalisée

Cf. [Annexe 2.2](#)

La librairie normalisée associée à un processus de « denat, prep FC, dépôt » est alors à l'état « Disponible transformation » pour l'expérience de dénaturation-dilution.

- Créer l'expérience de **dénaturation-dilution**.
- Terminer l'expérience :



- Choisir « **Tous les containers poursuivent vers la même expérience** » : **Transfert**
OU « l'expérience suivante est différente selon les containers » et choisir l'état « Disponible Transfert » pour celle concernée et « Disponible transformation » pour les autres (*m'appeler pour que je vous explique au moment de le faire*)
- Créer l'expérience de **Transfert > Aliquot**.
- Créer le nombre d'aliqots souhaité (N pour un dépôt sur N flowcells en parallèle). Ne pas renseigner de CB de tubes de sortie (CB créé par NGL) (ces aliqots sont « fictifs » et non stockés).
- Renseigner une **résolution* (obligatoire)** de fin d'expérience puis cliquer sur Terminer.

★ **Cas 1) Résolution* = déroulement correct (uniquement)**

⇒ Une pop-up s'ouvre :



- ⇒ Cliquer sur « **Terminer les processus** » (pas d'autres choix possibles ; en effet un processus est linéaire et ne peut avoir de « branches », si plusieurs aliquots doivent poursuivre vers une prep FC, un processus par aliquot doit être créé ; ainsi les processus pourront être menés en parallèle et chacun avancer à son rythme).

cf. [Annexe 1](#) : L'expérience passe à « Terminé ». **Les processus passent à Terminé**. Les containers IN passent à « En stock » ; **les containers OUT passent à « Processus en attente »**.

- Créer les processus de « Prep FC, Dépôt » sur les dénat (aliquotées)
- Créer les prep FC pour chaque dénat.

6.3. [Processus créé à partir de la dénat](#)

La dénaturation-dilution associée à un processus de « prep FC, dépôt » est alors à l'état « Disponible transformation » pour l'expérience de prep FC.

- Faire un changement d'état sur le container pour le passer à « Disponible Transfert »
- Créer l'expérience de **Transfert > Aliquot**.
- Créer le nombre d'aliquots souhaité (N pour un dépôt sur N flowcells en parallèle). Ne pas renseigner de CB de tubes de sortie (CB créé par NGL) (ces aliquots sont « fictifs » et non stockés).
- Terminer l'expérience.



- Cliquer sur « **Terminer les processus** »
- Créer les processus de « Prep FC, Dépôt » sur les dénat (aliquotées)
- Créer les prep FC pour chaque dénat.

7. [CREATION PROCESSUS Séquençage : Hiseq 4000 / X5 \[prep FC ordonnée, dépôt\]](#)

Important : Les lib-XnM correspondant aux dilutions 1, 2 ou 3nM auront été déclarées dans le LIMS solexa et importées dans NGL-SQ en tant que « librairies normalisées »

- Aller dans le menu **Processus > Création**.
 - Choisir le processus à créer : **Catégorie : Séquençage Type : 4000 / X5 (prep FC ordonnée)**
Les containers issus de « librairies normalisées » à « Processus en attente » sont préfiltrés par défaut.
 - Sélectionner les tubes destinés au processus de séquençage et les mettre dans le panier.
 - Visualiser le panier et renseigner les propriétés de processus :
 - Instrument
 - Position
 - **Enregistrer**.
- ⇒ cf. [Annexe 1](#) et [2.3](#) : Les containers (lib normalisées) passent alors à « **Disponible transformation** » pour l'expérience de **prep FC ordonnée**.

8. Création expérience : prep FC ordonnée

Même principe que chapitre 3. Création prep FC (classique) ; si ce n'est que ce sont des **lib normalisées, associées à un processus de Séquençage 4000 / X5**, qui sont pré-filtrées par défaut.

Lors de la configuration de l'expérience : l'onglet Composition flowcell est le même que sur la prep FC classique ; l'onglet **Feuille de calculs** est par contre différent :

X	Support container	Tag	Lib normalisée		Dénaturation - neutralisation								% à déposer	% phiX	Support container
			Conc. (nM)	Vol. (µl)	Vol. dil. ds dénat. (µL)	Vol NaOH (µl)	Conc. NaOH	Vol. TrisHCL (µl)	Conc. TrisHCL (mM)	Vol. master EPX (µl)	Conc. finale (pM)	Vol. final (µL)			
1	OAKC2EH91	IND2	1	10	5	5	0,1 N	5	200	35	100	50	100	1	C7Y2FACXX
2	OAKC2EH92	IND4	2	10	5	5	0,1 N	5	200	35	200	50	100	1	C7Y2FACXX
3	OAKC2EH93	IND7	3	10	5	5	0,1 N	5	200	35	300	50	100	1	C7Y2FACXX
			ramené du IN		saisie utilisateur (ou valeurs par défaut)						calcul / NGL	saisie utilisateur (ou valeurs par défaut)	issu de la compo FC		

La création du **dépôt sur séquenceur** se fait exactement comme dans le chapitre 2. Création expérience : Dépôt sur séquenceur.

9. Mettre des tubes à la poubelle : le notifier dans NGL par un changement d'état à « Indisponible »

- Aller dans le menu **Container > Changement d'état**
- Rechercher les containers via les différents filtres (NB : le filtre sur le storage n'est pas encore disponible)
- Les sélectionner.
- Editer.
- Choisir « Indisponible »
- Enregistrer
- NB : le champ storage n'est pas encore modifiable (à venir).

10. Menus de Recherche et Création

Cf. [présentation power point NGL-SQ-DEV-CNG](#)

Différents menus de recherche et de création sont disponibles :

- ★ Recherche de containers (et de supports)
- ★ Création de processus à partir de containers
- ★ Recherche de processus
- ★ Création d'expérience à partir de containers
- ★ Recherche d'expériences

Ils comportent tous :

- des **colonnes additionnelles** pour ajouter des colonnes à la volée dans le tableau de résultat (exemples : type échantillon, type processus banque...) [à faire évoluer selon vos besoins / si réalisable techniquement].

- et des **filtres supplémentaires** (*exemples : type échantillon, type processus banque, tag, catégorie de tag, regex code aliquot...* et correspondant aux propriétés de processus quand un type de processus est sélectionné) [*à faire évoluer selon vos besoins / si réalisable techniquement*].

11. Traçabilité des réactifs dans les expériences

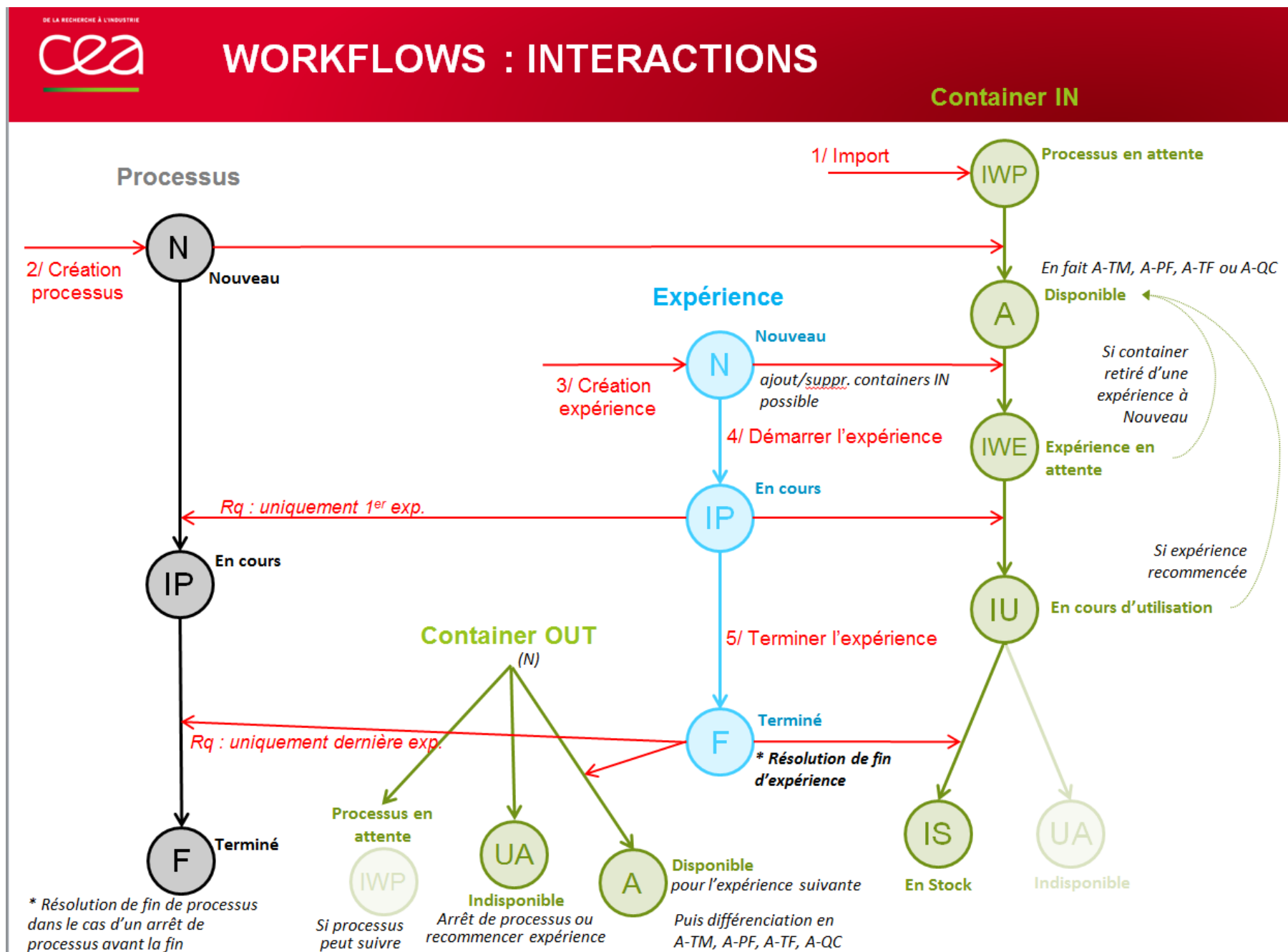
Cf. présentation power point NGL-SQ-DEV-CNG

Pré-requis : S'assurer que les kits existent dans le catalogue de réactifs ; si non les créer sur <http://nql-reagents.cng.fr> via le menu **Catalogue Réactifs > Création**.

Dans NGL-SQ, sur la page de l'expérience concernée, Cliquer sur **Ajouter un réactif**, choisir un nom de kit dans la liste déroulante (kits créés dans le catalogue) et biper à l'aide du lecteur de codes-barres les CB d'une boîte et/ou d'un réactif, dans cet ordre : REF, LOT, CB unique.

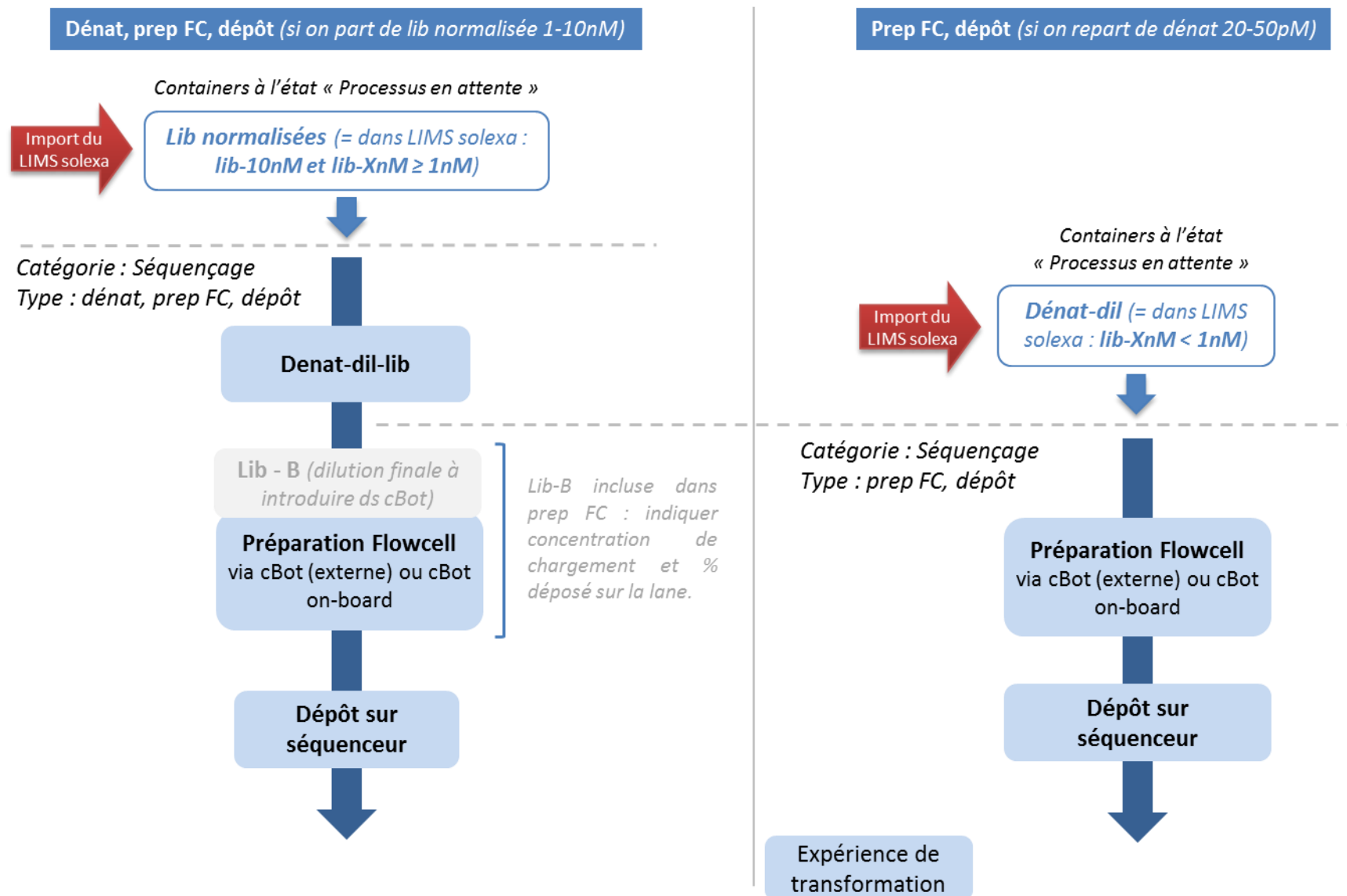
Bien vérifier que les CB sont séparés par des « _ » ; sinon réinitialiser la douchette avec le code-barres prévu pour les tabulations.

Annexe 1 Workflows : interactions



Annexe 2.1 : Processus de Séquençage [Hiseq 2000/2500, Miseq, Nextseq]

Pour pouvoir créer des expériences sur des tubes, puits, plaques, etc. il faut au préalable leur attribuer un processus (= chemin d'expériences à réaliser).

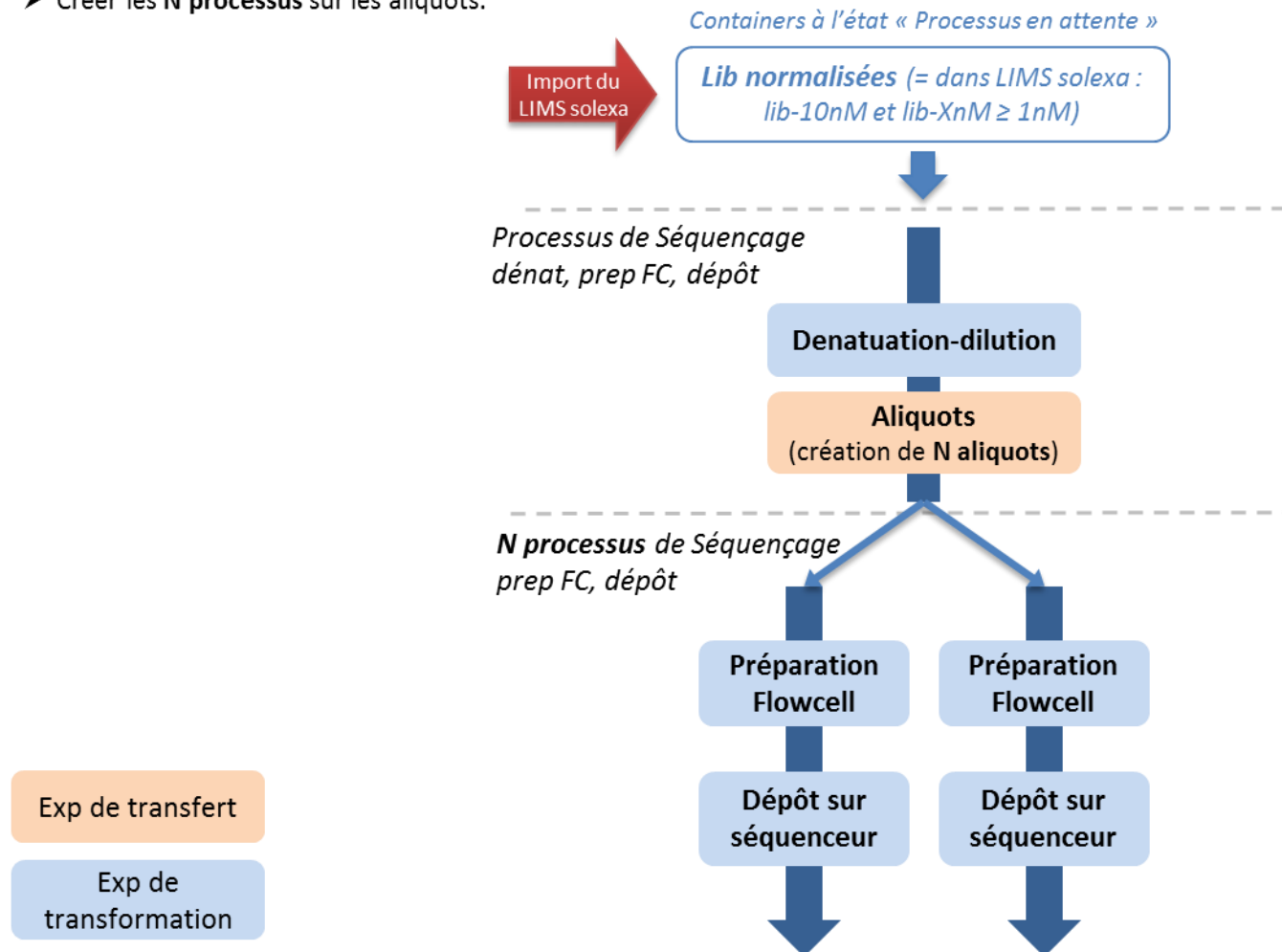


Annexe 2.2 : créer N processus de Séquençage en parallèle, à partir d'une même dénat qui doit être déposée sur N flowcells en même temps

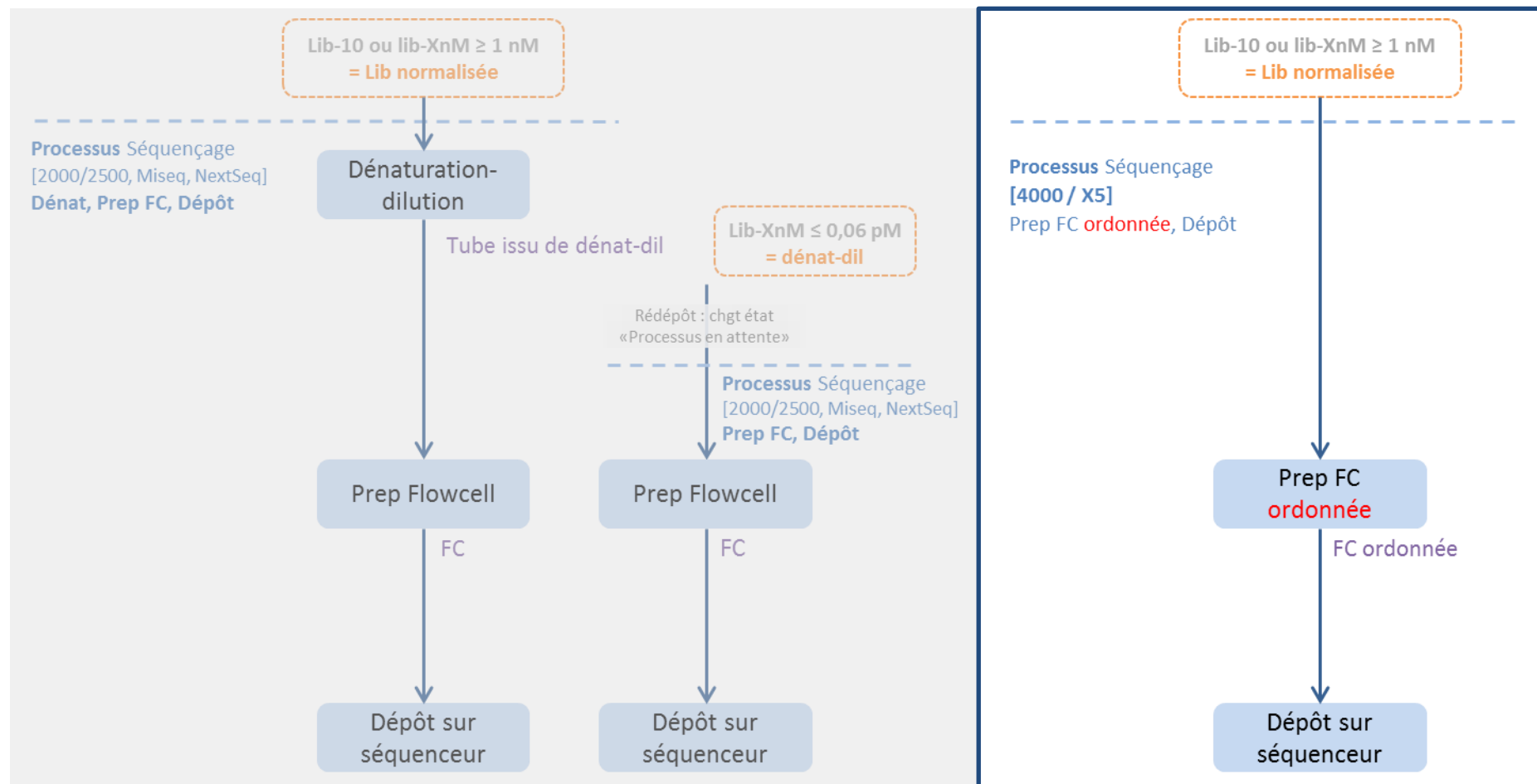
Un tube entrant dans un processus y est associé jusqu'à la fin de celui-ci et ne peut être mis dans un 2^{ème} processus en parallèle [améliorations en cours].

Si, à partir d'une même dénaturation-dilution, on souhaite réaliser N flowcells en parallèle, en même temps, il faut :

- Créer une expérience d'aliquot (*cat d'exp : transfert*) après la dénaturation-dilution pour créer N aliquots (fictifs – codes barres NGL).
- Créer les N processus sur les aliquots.



Annexe 2.3 : Processus de Séquençage : 4000 / X5



Légende :



Annexe 3 : Modèles Feuille de route séquenceurs générées par NGL-SQ dans l'expérience de dépôt sur séquenceur.

FDR NextSeq 500 : **NON gérée**

FDR Miseq single ou non indexé (**NON géré pour du dual indexing**)

[Header]

IEMFileVersion,4

Investigator Name,

Project Name,

Experiment Name,ILLUMINA-DEPOT-20151020_123710

Date,10/20/2015

Workflow,GenerateFASTQ

Application,FASTQ Only

Assay,

Description,

Chemistry,Default

[Reads]

101

23

[Settings]

[Data]

Sample_ID,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,index,Sample_Project,Description

1_B00H6WC_DA_ill-22,AGB2IJ,,,,CGTACG,,ill-22_50.0

1_B00H6WC_DA_ill-23, AGB2IJ,,,,CGTACG,,ill-23_50.0

...

FDR Hiseq (dual indexing géré dans le cas d'un séquençage 2000 / 2500) (dual indexing non géré pour du 4000 ou X5)

FCID,Lane,SampleID,SampleRef,Index,Description,Control,Recipe,Operator,SampleProject

C7CNLACXX,1,1_B00GZ3S_RD_ill-18,,GTCCGC,,N,,,ill-18_50.0

C7CNLACXX,1,1_B00GZ3R_RD_ill-25,,ACTGAT,,N,,,ill-25_50.0

C7CNLACXX,2,2_B00GZ3U_RD_ill-05,,ACAGTG,,N,,,ill-05_50.0

C7CNLACXX,2,2_B00GZ3T_RD_ill-19,,GTGAAA,,N,,,ill-19_50.0

C7CNLACXX,3,3_B00GZ3V_RD_ill-06,,GCCAAT,,N,,,ill-06_50.0

C7CNLACXX,3,3_B00GZ3W_RD_ill-12,,CTTGTA,,N,,,ill-12_50.0

C7CNLACXX,4,4_B00GZ3X_RD_ill-01,,ATCACG,,N,,,ill-01_50.0

C7CNLACXX,4,4_B00GZ3Y_RD_ill-23,,GAGTGG,,N,,,ill-23_50.0

C7CNLACXX,5,5_B00GXBL_DA_nul-04,,GCACTA,,N,,,nul-04_100.0

C7CNLACXX,6,6_B00GXBL_DA_nul-06,,GTGCTT,,N,,,nul-06_100.0

C7CNLACXX,7,7_B00GXBM_DA_nul-07,,AAGCCT,,N,,,nul-07_100.0

C7CNLACXX,8,8_B00GXBM_DA_nul-08,,GTCGTA,,N,,,nul-08_100.0

NB : pour un séquençage 4000 ou X, l'onglet indexing visible dans SAV n'apparaîtra pas en milieu de run mais une fois le run terminé et en cours de transfert voire déjà transféré.