

illumina NextSeq500 测序仪操作说明及注意事项

一.仪器的开启与关闭

开启仪器：打开测序仪电源适配 UPS，将测序仪电源切换开关切换到 I（开）位置，按试剂仓上方的电源按钮，电源按钮将会开启仪器电源并启动集成仪器计算机和软件，请等待操作系统完成装载过程，NextSeq 控制软件(NCS) 会自动启动并初始化系统，初始化步骤结束后，“Home（主页）”屏幕将会打开。

关闭仪器：在“Home（主页）”界面选择 Manage Instrument（管理仪器），再选择 System Power Options（系统电源选项），最后选择 Shut Down（关闭）。

注意：“关闭”命令会安全地关闭软件和仪器电源。再次打开仪器前，请至少等待 60 秒。

二.测序前准备

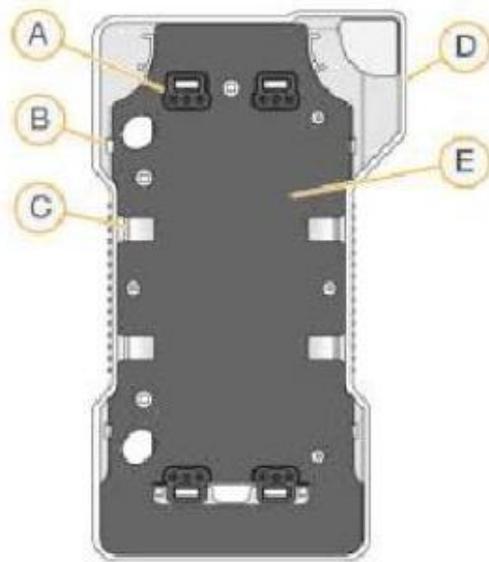
测序仪清洗：从“Home（主页）”屏幕中启动，清洗选项“Quick Wash（快速清洗）”和“Manual Post-Run Wash（运行后手动清洗）”。0.12% NaClO（次氯酸钠），0.05% Tween 20。Quick Wash（快速清洗），125 mL Tween 20 加入缓冲液清洗盒，选择 Quick Wash 进行清洗，持续时间为 20 min。Manual Post-Run Wash（运行后手动清洗），125mL Tween 20 加入缓冲液清洗盒，1mL 0.12% NaClO（次氯酸钠）加入试剂清洗盒 8 号孔，选择 Manual Post-Run Wash 进行清洗，持续时

间约为 90 min。

注意：仪器闲置或关机后每 14 天需要清洗一次。每次运行前需多清洗 2-3 次仪器，运行完毕后也需清洗 2-3 次仪器。使用后的流动槽用来清洗仪器不超过 20 次。

测序试剂盒准备：在 -25°C 到 -15°C 的环境中存储的试剂盒，在 2°C 到 8°C 的存储新的流动槽，缓冲液试剂盒在 25°C 左右的室温下存储。试剂盒使用前放入装有室温纯水（或清水）的水槽中（请勿浸泡整个夹盒），直至解冻成功（90 min）。在工作台上轻敲夹盒，去除其底部的水分，然后擦干夹盒底部。将试剂盒翻转 5 次以混匀试剂。检查位置 29、30、31 和 32 孔，确保试剂均已解冻。在工作台上轻敲试剂盒以减少气泡。流动槽使用前置于室温下 30 min，从箔纸包装中取出流动槽，打开透明的塑料翻盖盒，取出流动槽。使用无绒酒精棉清洁流动槽的玻璃表面。使用无尘实验室棉巾纸擦干玻璃。

注意：试剂盒在使用前一定要检查试剂是否完全解冻，并轻敲以减少气泡。使用流动槽前确保未破损，确保端口垫圈和白色塑料的帖子完好无损，确保四个白色固定夹卡在黑色承板的边缘，如果发现承板在夹子下不安全，轻轻一起按下黑色承板和白色框架直到板卡在夹子上，确保 4 个金属弹簧夹平对黑色的承板。



- A. 端口垫圈
- B. 固定夹
- C. 弹簧夹
- D. 白色框架
- E. 承板

测序文库准备：2N NaOH (pH=14)，HT1

上样要求，1.3 mL，文库浓度 1.7 pM，NaOH 浓度小于 1 mM。

注意：文库的浓度在稀释前要测量准确，并详细计算使用量，可加入 phix 测序以确定文库样品数据是否只准确（同样，加入 phix 需准确计算，phix 量需计算在文库终浓度内），文库使用 HT1 稀释。NaOH 使用纯水稀释。混合变性时，5 uL 0.2N NaOH 与 5 uL 4nM 文库（文库加入量需通过文库浓度计算）混合震荡均匀室温变性 5 min。变性后用使用 HT1 稀释，最后使用量为 1.3mL。

三.测序操作

测序操作：点击“Home（主页）”屏幕中“Sequence”，按要求放入流动槽（流动槽一定要确定表面干净及卡槽完好），在试剂盒 8 号孔内加入 1.3 mL 稀释好的文库并将试剂盒放置好，放入缓冲液，清空废

液。并在测序操作界面设置好文件名及保存位置等即可开始测序。

注意：放入流动槽、试剂盒、缓冲液、废液缸时要保证正确放入，试剂盒内含甲酰胺，甲酰胺是一种具生殖毒性的脂族酰胺。

测序检查：测序开始 2 hour 后，要注意检查 Q30、PF、Cluster Density

（簇密度。Q30 > 80%，PF > 75%， $170 < \text{Cluster Density} < 230$ 。

注意：机器运行结束后要进行清洗。机器放置的实验室要保持洁净，温度 22°C（ $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ）湿度 40%（ $40 \pm 20\%$ ）。