

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IN CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20006818 Documento n. 15046563 v07	Ottobre 2021	Inclusi tre filtri dell'aria di ricambio nella sezione Sostituzione del filtro dell'aria. Incluse nel manuale le cartucce nuove ed esistenti.
Materiale n. 20006818 Documento n. 15046563 v06	Giugno 2019	Aggiunte informazioni sul gruppo di lavoro per BaseSpace Sequence Hub durante l'impostazione della corsa. Aggiunte le informazioni sul percorso UNC per la cartella di output. Aggiunta la risoluzione dei problemi per gli errori di archiviazione sulla rete. Chiarito che le indicazioni per il filtro dell'aria sono per gli strumenti dotati di un filtro accessibile dal pannello posteriore. Aggiornata la posizione dei file che si trovavano nella cartella principale per indicare cartelle specifiche per la corsa della cartella di output.

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20006818 Documento n. 15046563 v05	Dicembre 2018	<p>Aggiornati descrizioni software, schermate e flusso di lavoro per NextSeq Control Software (NCS) 4.0.</p> <p>Aggiornate le seguenti informazioni aggiuntive per NCS 4.0.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiunte informazioni sul software Local Run Manager. • Aggiornate le informazioni di BaseSpace a BaseSpace Sequence Hub. La scheda Prep (Preparazione) di BaseSpace e BaseSpace Onsite non sono più disponibili. • Aggiunte istruzioni sulla selezione di Local Run Manager o della modalità della corsa manuale. La modalità manuale sostituisce la modalità indipendente, con qualche modifica. • Aggiunta l'opzione per il controllo degli aggiornamenti del software dello strumento in BaseSpace Sequence Hub. • Aggiunti Local Run Manager, Universal Copy Service e il driver di Direct Memory Access alla descrizione del System Suite bundle. Rimossi BaseSpace Broker e SAV. • Run Copy Service si chiama ora Universal Copy Service. • Aggiunta l'opzione per abilitare le ricette personalizzate al momento del caricamento della cartuccia di reagenti. • Rimossa la descrizione dell'immagine della cella a flusso durante il monitoraggio dell'avanzamento della corsa. • Rimossa la selezione dell'opzione di avvio per la modalità Kiosk e Windows. • Aggiunte le istruzioni di manutenzione per gli strumenti con un aggiornamento del filtro dell'aria. • Aggiunte nuove icone di attenzione, informazioni e riduzione a icona di NCS. • Aggiunte le istruzioni per personalizzare le impostazioni della corsa e del sistema. • Aggiornata l'opzione per l'invio dei dati delle prestazioni dello strumento. • Aggiornate le icone per il trasferimento dei dati. • Chiarito che per la scansione non vi sono limiti di tempo per i file messi in coda per il trasferimento. • Corretti i riferimenti di BSM a meccanismo di prelievo tamponi nelle informazioni sulle verifiche del movimento. <p>Aggiunto reagente o metanolo o alcol isopropilico (99%) per spettrofotometria per la manutenzione dello strumento.</p>
Materiale n. 20006818 Documento n. 15046563 v04	Maggio 2018	<p>Aggiunto il supporto per i reagenti NextSeq v2.5.</p> <p>Aggiornate le informazioni su conservazione/spedizione per i NextSeq v2.5 Reagent Kit che spediscono le celle a flusso a temperatura ambiente. Le celle a flusso NextSeq v2.5 continuano a richiedere le precedenti condizioni di conservazione.</p> <p>Aggiunte le informazioni relative ai NextSeq v2.5 Reagent Kit che richiedono aggiornamenti software alla versione 2.2.</p> <p>Aggiunta una nota relativa alla concentrazione di caricamento per i kit a output medio.</p> <p>Aggiunta una nota relativa alla procedura di salvataggio delle celle a flusso.</p> <p>Aggiunta una nota per raccomandare l'utilizzo di celle a flusso a output elevato per le verifiche del sistema.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20006818 Documento n. 15046563 v03	Marzo 2018	Rimossi nome utente e password predefiniti richiesti per l'accesso al sistema operativo. Illumina raccomanda di utilizzare le credenziali specifiche per il laboratorio. Aggiunte informazioni sul servizio di monitoraggio proattivo Illumina nella sezione Impostazione della configurazione di BaseSpace. Aggiornati i riferimenti al software RTA v2 in RTA2.
Materiale n. 20006818 Documento n. 15046563 v02	Marzo 2016	Aggiunta la sezione Considerazioni sull'indicizzazione. Rimosse le fasi per l'ispezione della cella a flusso. Specificati il volume e la concentrazione di caricamento nella fase Caricamento delle librerie sulla cartuccia di reagenti.
Materiale n. 20001879 Documento n. 15046563 v01	Ottobre 2015	Specificato che un equivalente del fornitore raccomandato di NaOCl è rappresentato da acqua da laboratorio equivalente. Aggiunta la raccomandazione per un servizio di manutenzione preventiva annuale. Riorganizzate le informazioni contenute nei capitoli Descrizione generale e Informazioni preliminari. Aggiunte le istruzioni per personalizzare le impostazioni del sistema. Rimosse le istruzioni per Live Help (Assistenza in diretta) dal capitolo Risoluzione dei problemi. Questa funzione è stata rimossa dal software di controllo.
N. codice 15046563 Rev. I	Maggio 2015	Corretta la descrizione dei serbatoi riservati sulla cartuccia di reagenti.
N. codice 15046563 Rev. H	Maggio 2015	Corretto il volume di Tween 20 nella soluzione di lavaggio utilizzata per i lavaggi manuali. Ristrutturate le informazioni relative alle opzioni di configurazione del sistema. Spostate le informazioni sul software Real-Time Analysis nell'Appendice A.

Documento	Data	Descrizione della modifica
N. codice 15046563 Rev. G	Febbraio 2015	<p>Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.4.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiunte le opzioni di lavaggio manuale: Quick Wash (Lavaggio rapido) e Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale). • Aggiunta la descrizione delle caratteristiche di personalizzazione della corsa per spurgare i materiali di consumo al termine della corsa e per saltare la conferma della verifica pre-corsa. • Aggiunta l'opzione per cancellare e riavviare una verifica pre-corsa. • Aggiunta l'opzione per permettere il monitoraggio della corsa in modalità indipendente. • Rimossa la descrizione dei file offset e dei file della determinazione delle fasi (phasing), che non sono più scritti nella cartella della corsa. • Aggiornata l'immagine del grafico a dispersione per mostrare le identificazioni delle basi distribuite in modo più uniforme quando si utilizza la versione 1.4 del software del sistema. • Aggiunta la descrizione di Run Copy Service (Esecuzione servizio copia). • Aggiunta l'opzione per utilizzare un primer Indice 2 personalizzato, possibile con NextSeq 500 Kit v2. Per informazioni, vedere la <i>Guida ai primer personalizzati NextSeq (documento n. 15057456)</i>. <p>Aggiornate le istruzioni per la preparazione dei reagenti per l'utilizzo di NextSeq 500 Kit v2: rimossi i passaggi manuali per caricare ipoclorito di sodio e i primer a doppia indicizzazione alla cartuccia di reagenti. Questi reagenti sono pre-caricati nella cartuccia di reagenti v2. Per maggiori informazioni, vedere la <i>Guida di riferimento per NextSeq 500/550 Kit v2 (documento n. 15058065)</i>.</p> <p>Aggiunta la sezione Materiali di consumo per il sequenziamento che elenca le versioni dei kit, versioni compatibili con NCS e il nome e il numero di codice della guida di riferimento del kit associata.</p> <p>Aggiornati i materiali di consumo forniti dall'utente per specificare l'utilizzo di NaOCl per le opzioni di lavaggio manuale introdotte in NCS v1.4.</p> <p>Corretti i requisiti per i cluster che attraversano il filtro a non più di una identificazione delle basi sotto il valore chastity nei primi 25 cicli.</p> <p>Aggiunto il volume di 120 ml di acqua da laboratorio alle istruzioni contenute in Verifica del sistema.</p>
N. codice 15046563 Rev. F	Settembre 2014	<p>Corrette le descrizioni delle caratteristiche di NextSeq Control Software v1.3.</p> <p>Aggiornato l'URL per le schede di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.</p> <p>Aggiornato il marchio del prodotto NextSeq da ™ a ®.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
N. codice 15046563 Rev. E	Agosto 2014	<p>Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiornate le descrizioni dei comandi System Customization (Personalizzazione sistema) e Software Updates (Aggiornamenti software) sulla schermata Manage Instrument (Gestione strumento). • Aggiornata la descrizione della schermata Pre-Run Check (Verifica pre-corsa), che raggruppa gli elementi da verificare in quattro categorie allargabili. • Aggiornate le istruzioni di Live Help (Assistenza in diretta) per accedervi utilizzando l'URL. L'icona sulla schermata Home (Inizio) non è disponibile in NCS v1.3. • Aggiunta la procedura di reibridazione integrata sullo strumento per reibridare il primer Read 1 (Lettura 1). L'opzione per reibridare una cella a flusso è compatibile con NCS v1.3, o versione successiva, e richiede una nuova cartuccia di reagenti e una nuova cartuccia di tamponi. <p>Aggiunta la <i>NextSeq Custom Primers Guide</i> (documento n. 15057456) (Guida ai primer personalizzati NextSeq) all'elenco delle risorse aggiuntive.</p>
N. codice 15046563 Rev. D	Giugno 2014	<p>Aggiunte le istruzioni per caricare BP13 in posizione n. 18 della cartuccia di reagenti quando si eseguono corse a doppia indicizzazione.</p> <p>Corretto il ciclo al quale appaiono le metriche della densità dei cluster, che è il ciclo 25.</p> <p>Corrette le posizioni della cartuccia di reagenti per i primer personalizzati alla posizione n. 7 (Lettura 1), n. 8 (Lettura 2) e n. 9 (Indice 1).</p> <p>Aggiunta una nota relativa ai danni potenziali legati al riposizionamento dello strumento in seguito all'installazione. Rivolgersi sempre al rappresentante Illumina prima di riposizionare lo strumento.</p> <p>Aggiornato l'URL per le schede di sicurezza (SDS) a support.illumina.com/sds.ilmn.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
N. codice 15046563 Rev. C	Aprile 2014	<p>Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.2 e RTA v2.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiunto il nome ricetta per NextSeq Mid da usare con NextSeq 500 Mid Output Kit. • Rimosse le istruzioni per l'aggiunta di NaOCl alla cartuccia di tamponi di lavaggio per un lavaggio manuale. • Corretto il volume di NaOCl a 3 ml per la posizione n 28 della cartuccia di reagenti, che è richiesta per un lavaggio post-corsa automatico. • Annotato che i nomi lunghi delle corse vengono visualizzati in un campo a scorrimento sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa). • Annotato che RTA v2 non applica le correzioni della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) alle letture indice. • Aggiunta la descrizione dei file di registro all'elenco dei file usati per la risoluzione dei problemi. • Aggiunte le istruzioni per svuotare un contenitore dei reagenti usati pieno durante una corsa. • Aggiunta la descrizione delle cartelle delle ricette, inclusa la posizione delle ricette personalizzate. • Aggiunta la descrizione delle verifiche termiche per ventole e sonde termiche.
N. codice 15046563 Rev. B	Febbraio 2014	<p>Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiunta la funzione di ricerca nella schermata Run Setup (Impostazione corsa) per filtrare l'elenco di corse disponibili. • Aggiunto che le ricette disponibili includono NextSeq High o NextSeq Mid, in base al tipo di cella a flusso. • Annotato che gli aggiornamenti software includono il contratto di licenza, note sulla versione e un elenco di software da aggiornare. • Aggiunta la descrizione del messaggio di errore RAID. • Annotato che un pulsante Exit (Esci) chiude NSS e riavvia automaticamente NCS al termine di una verifica del sistema. <p>Aggiunta la durata di conservazione dei reagenti fino a un massimo di una settimana alla temperatura di 4 °C.</p> <p>Aggiornata l'etichetta della cartuccia di reagenti per il serbatoio n. 10 a Load Library Here (Caricare qui la libreria).</p> <p>Aggiornato l'elenco dei materiali di consumo forniti dall'utente per indicare ipoclorito di sodio al 3%-6% ed elencato un numero di catalogo del fornitore.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per preparare una diluizione di NaOCl allo 0,06% per i lavaggi dello strumento, che include una riduzione in volume di 2 ml e una concentrazione di partenza di 3%-6%.</p> <p>Aggiunte le illustrazioni per mostrare la posizione corretta ed errata delle clip sulla cella a flusso.</p> <p>Aggiornato il capitolo Real-Time Analysis (RTA) per includere una panoramica di RTA v2, la struttura della cartella di output e il processo di identificazione delle basi.</p> <p>Aggiornato il capitolo sulla risoluzione dei problemi per includere gli errori di RTA v2 e includere RunParameters.xml nell'elenco dei file di risoluzione dei problemi.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
N. codice 15046563 Rev. A	Gennaio 2014	Versione iniziale.

Sommario

Capitolo 1 Descrizione generale	1
Introduzione	1
Risorse aggiuntive	1
Componenti dello strumento	2
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	5
Capitolo 2 Informazioni preliminari	9
Avvio dello strumento	9
Personalizzazione delle impostazioni del sistema	9
Personalizzazione delle impostazioni della corsa	11
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	12
Capitolo 3 Sequenziamento	14
Introduzione	14
Creazione di una corsa con il software Local Run Manager	15
Creazione di una corsa con NCS	15
Preparazione della cartuccia di reagenti	15
Preparazione della cella a flusso	16
Preparazione delle librerie per il sequenziamento	17
Impostazione di una corsa di sequenziamento	17
Monitoraggio del progresso della corsa	24
Lavaggio post-corsa automatico	26
Capitolo 4 Manutenzione	27
Introduzione	27
Esecuzione di un lavaggio manuale	27
Sostituzione del filtro dell'aria	30
Aggiornamenti del software	31
Spegnimento dello strumento	33
Appendice A Risoluzione dei problemi	34
Introduzione	34
File di risoluzione dei problemi	34
Risoluzione degli errori della verifica automatica	35
Contenitore dei reagenti usati pieno	36
Flusso di lavoro di reibridazione	37
Ricette personalizzate e cartelle delle ricette	39
Verifica del sistema	39
Messaggio di errore RAID	41
Errore di archiviazione sulla rete	41
Configurazione delle impostazioni del sistema	42
Appendice B Real-Time Analysis	45

Descrizione generale di Real-Time Analysis	45
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	46
File di output del sequenziamento	50
Tile della cella a flusso	50
Struttura della cartella di output	54
Indice	55
Assistenza Tecnica	58

Capitolo 1 Descrizione generale

Introduzione	1
Risorse aggiuntive	1
Componenti dello strumento	2
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	5

Introduzione

Il sistema NextSeq™ 500 Illumina® unisce la potenza del sequenziamento a elevata processività con la semplicità di uno strumento di sequenziamento da banco.

Caratteristiche

- ▶ **Sequenziamento ad elevata processività:** NextSeq 500 permette il sequenziamento degli esomi, degli interi genomi e dei trascrittomi e supporta le librerie TruSeq™, TruSight™ e Nextera™.
- ▶ **Tipi di celle a flusso:** le celle a flusso sono disponibili in configurazioni ad output elevato e ad output medio. Ciascun tipo di cella a flusso è confezionata con una cartuccia di reagenti pre-riempita compatibile.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA):** software di analisi integrato che esegue l'analisi dei dati integrata sullo strumento, che comprende l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi. NextSeq utilizza una nuova implementazione di RTA chiamata RTA2, che include importanti differenze dal punto di vista dell'architettura e delle caratteristiche. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis a pagina 45*.
- ▶ **Analisi basata sul cloud con BaseSpace™ Sequence Hub:** il flusso di lavoro di sequenziamento è integrato con BaseSpace Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico sul cloud Illumina per il monitoraggio della corsa, l'analisi dei dati, l'archiviazione e la collaborazione. Mentre la corsa è in fase di elaborazione, i file di output sono trasmessi in tempo reale a BaseSpace Sequence Hub per l'analisi.
- ▶ **Analisi dei dati integrata sullo strumento:** il software Local Run Manager analizza i dati della corsa in base al modulo di analisi indicato per la corsa.

Risorse aggiuntive

Dal sito Web di Illumina è possibile scaricare la seguente documentazione.

Risorsa	Descrizione
<i>Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema NextSeq (documento n. 15045113)</i>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
<i>Guida alla sicurezza e conformità del sistema NextSeq (documento n. 15046564)</i>	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
<i>Guida per l'utente del lettore RFID - modello n. TR-001-44 (documento n. 15041950)</i>	Fornisce informazioni sul lettore RFID nello strumento, certificazioni di conformità e considerazioni relative alla sicurezza.
<i>Denaturazione e diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (documento n. 15048776)</i>	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX facoltativo. Questa fase si applica alla maggior parte dei tipi di librerie.

Risorsa	Descrizione
<i>Guida ai primer personalizzati NextSeq (documento n. 15057456)</i>	Fornisce informazioni relative all'uso di primer di sequenziamento personalizzati al posto di primer di sequenziamento Illumina.
<i>Guida di BaseSpace</i>	Fornisce informazioni sull'utilizzo di BaseSpace™ Sequence Hub e sulle opzioni di analisi disponibili.
<i>Guida del software Local Run Manager (documento n. 100000002702)</i>	Fornisce una panoramica del software Local Run Manager e le istruzioni per l'utilizzo delle funzioni del software.

Consultare la [pagina di supporto per NextSeq 500](#) sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, alla formazione online e alle domande frequenti (FAQ).

Componenti dello strumento

Il sistema NextSeq 500 comprende un monitor touch screen, una barra di stato e quattro scomparti.

Figura 1 Componenti dello strumento



- A **Monitor touch screen:** consente la configurazione e l'impostazione della corsa integrate sullo strumento utilizzando l'interfaccia del software di controllo.
- B **Barra di stato:** indica lo stato dello strumento come in elaborazione (blu), richiede attenzione (arancione), pronto per il sequenziamento (verde) o quando è necessario eseguire un lavaggio entro 24 ore (giallo).
- C **Scomparto tamponi:** contiene la cartuccia di tamponi e il contenitore dei reagenti usati.
- D **Scomparto reagenti:** contiene la cartuccia di reagenti.
- E **Pulsante di alimentazione:** accende lo strumento e accende e spegne il computer dello strumento.
- F **Scomparto di imaging:** contiene la cella a flusso durante una corsa di sequenziamento.
- G **Scomparto del filtro dell'aria:** contiene il filtro dell'aria per gli strumenti dotati di un filtro ed è accessibile dal pannello posteriore.

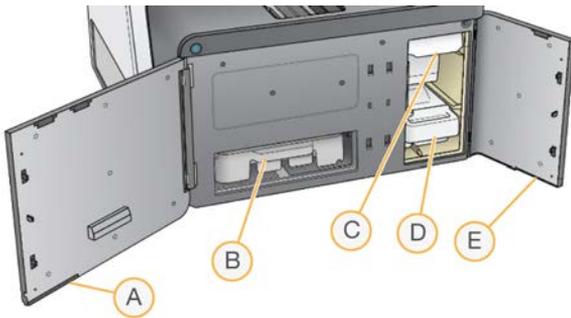
Scomparto di imaging

Lo scomparto di imaging alloggia il piano che comprende tre perni di allineamento per posizionare la cella a flusso. Dopo aver caricato la cella a flusso, lo sportello dello scomparto di imaging si chiude automaticamente e sposta i componenti in posizione.

Scomparto reagenti e scomparto tamponi

L'impostazione di una corsa di sequenziamento su NextSeq 500 richiede l'accesso allo scomparto reagenti e allo scomparto tamponi per caricare i materiali di consumo della corsa e per svuotare il contenitore dei reagenti usati.

Figura 2 Scomparto reagenti e scomparto tamponi



- A **Sportello dello scomparto reagenti:** chiude lo scomparto reagenti con un fermo che si trova sotto l'angolo inferiore destro dello sportello. Lo scomparto reagenti alloggia la cartuccia di reagenti. I reagenti vengono aspirati dai pescanti, scorrono nel sistema di fluidica e infine giungono alla cella a flusso.
- B **Cartuccia di reagenti:** la cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso pre-riempito.
- C **Cartuccia di tamponi:** la cartuccia di tamponi è un materiale di consumo monouso pre-riempito.
- D **Contenitore dei reagenti usati:** i reagenti usati sono raccolti per lo smaltimento dopo ciascuna corsa.
- E **Sportello dello scomparto tamponi:** chiude lo scomparto tamponi con un fermo che si trova sotto l'angolo inferiore sinistro dello sportello.

Scomparto del filtro dell'aria

Lo scomparto del filtro dell'aria contiene il filtro dell'aria per gli strumenti dotati di filtro ed è accessibile dal pannello posteriore. Sostituire il filtro dell'aria ogni 90 giorni. Per informazioni sulla sostituzione del filtro, vedere *Sostituzione del filtro dell'aria* a pagina 30.

Software NextSeq

Il software dello strumento include applicazioni integrate che eseguono le corse di sequenziamento.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS):** controlla il funzionamento dello strumento e guida l'utente lungo l'intera procedura per l'impostazione di una corsa di sequenziamento.
 - ▶ Il software è preinstallato e integrato su NextSeq. NCS esegue la corsa in base ai parametri specificati nel modulo del software Local Run Manager o in NCS.
 - ▶ Prima di avviare la corsa di sequenziamento, selezionare una corsa creata con il modulo Local Run Manager o in NCS. L'interfaccia software di NCS guida l'utente nella procedura di caricamento della cella a flusso e dei reagenti.
 - ▶ Durante la corsa, il software aziona il piano portacelle, eroga i reagenti, controlla la fluidica, imposta le temperature, cattura le immagini dei cluster sulla cella a flusso e fornisce un riepilogo visivo delle statistiche di qualità. La corsa può essere monitorata in NCS o in Local Run Manager.
 - ▶ Durante la corsa, che puoi monitorare in NCS o in Local Run Manager, NCS esegue le seguenti funzioni.
 - ▶ Gestisce il piano portacelle
 - ▶ Dispensa i reagenti

- ▶ Controlla la fluidica
- ▶ Imposta le temperature
- ▶ Cattura le immagini dei cluster sulla cella a flusso
- ▶ Riepilogo visivo delle statistiche di qualità
- ▶ **Software Local Run Manager:** una soluzione software integrata per la creazione di una corsa e l'analisi dei risultati (analisi secondaria). Il software fornisce inoltre il monitoraggio dei campioni e controlla i permessi degli utenti.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA):** RTA esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante la corsa. NextSeq 500 utilizza RTA v2, che include differenze importanti nell'architettura e nelle caratteristiche rispetto alle versioni precedenti. Per maggiori informazioni, vedere [Real-Time Analysis a pagina 45](#).
- ▶ **Universal Copy Service:** copia i file di output del sequenziamento dalla cartella della corsa alla cartella di output e a BaseSpace Sequence Hub (se applicabile), dove l'utente può fruire dei dati.

Real-Time Analysis (RTA) e Universal Copy Service eseguono solo processi in background.

Icone di stato

Un'icona di stato situata nell'angolo superiore destro della schermata dell'interfaccia del software di controllo indica qualsiasi cambiamento nelle condizioni durante l'impostazione o durante la corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Le condizioni del sistema sono normali.
	Elaborazione	Il sistema è in fase di elaborazione.
	Avvertenza	Si è verificata un'avvertenza. Le avvertenze non arrestano una corsa o richiedono un intervento prima di poter procedere.
	Errore	Si è verificato un errore. Gli errori richiedono un intervento prima di poter procedere con la corsa.
	Attenzione	Si è verificata una notifica che richiede attenzione. Per ulteriori informazioni, fare riferimento al messaggio.
	Informazione	Messaggio esclusivamente informativo. Non si richiede alcun ulteriore intervento.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona lampeggia per avvertire l'utente. Selezionare l'icona per visualizzare una descrizione della condizione. Selezionare **Acknowledge** (Conferma) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

Icone della barra di navigazione

L'icona per ridurre NCS a icona si trova nell'angolo in alto a destra dell'interfaccia del software di controllo.

Icona di accesso	Nome icona	Descrizione
	Riduzione a icona di NCS	Selezionare questa icona per ridurre a icona NCS e accedere alle applicazioni e alle cartelle di Windows.

Pulsante di alimentazione

Il pulsante di accensione si trova nella parte anteriore di NextSeq e permette di accendere lo strumento e il computer dello strumento. Il pulsante di alimentazione esegue le seguenti azioni in base allo stato di accensione dello strumento.

Stato di accensione	Intervento
Lo strumento è spento	Premere brevemente il pulsante per accendere l'alimentazione.
Lo strumento è acceso	Premere brevemente il pulsante per spegnere l'alimentazione. Sullo schermo viene visualizzata una finestra di dialogo per confermare uno spegnimento normale dello strumento.
Lo strumento è acceso	Premere e tenere premuto il pulsante di alimentazione per 10 secondi per forzare lo spegnimento dello strumento e del computer dello strumento. Utilizzare questo metodo per spegnere lo strumento solo se lo strumento non risponde.



NOTA

Spegnere lo strumento durante una corsa di sequenziamento termina la corsa immediatamente. La terminazione di una corsa è definitiva. I materiali di consumo della corsa non possono essere riutilizzati e i dati di sequenziamento ottenuti dalla corsa non sono salvati.

Requisiti della password di Windows

Il sistema operativo richiede una modifica della password di Windows ogni 180 giorni. Quando suggerito dal software, aggiornare la password di Windows. Se per l'analisi si utilizza Local Run Manager, aggiornare anche la password per l'account Windows in Local Run Manager. Vedere la sezione Configurazione delle impostazioni dell'account dei servizi nella *Guida del software Local Run Manager (documento n. 1000000002702)*.

Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento

Contenuto e conservazione

I materiali di consumo per il sequenziamento richiesti per eseguire NextSeq sono forniti separatamente in un kit monouso. Ciascun kit include una cella a flusso, una cartuccia di reagenti, una cartuccia di tamponi e un tampone di diluizione della libreria. Alla ricezione di NextSeq 500 Kit:

- ▶ Non aprire la confezione sigillata della cella a flusso fino al momento dell'uso.
- ▶ Mettere subito i componenti nel luogo di conservazione alle temperature indicate per assicurare prestazioni ottimali.
- ▶ Conservare le cartucce con l'etichetta della confezione rivolta verso l'alto.

Materiale di consumo	Quantità	Temperatura di conservazione	Descrizione
cartuccia di reagenti	1	Tra -25 °C e -15 °C	Contiene i reagenti per la generazione di cluster e per il sequenziamento
cartuccia di tamponi	1	Tra 15 °C e 30 °C	Contiene il tampone e la soluzione di lavaggio
HT1	1	Tra -25 °C e -15 °C	Tampone di ibridazione
cella a flusso	1	tra 2 °C e 8 °C*	Cella a flusso monouso

* Spedita a temperatura ambiente per i kit NextSeq v2.5 Reagents

I reagenti sono sensibili alla luce. Conservare la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi in un luogo buio lontano dalla luce.

La cella a flusso, la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi utilizzano l'identificazione a radiofrequenza (Radio Frequency Identification, RFID) per la compatibilità e il monitoraggio accurato dei materiali di consumo.

Tutti gli altri kit includono primer di sequenziamento con doppio indice e NaOCl nella cartuccia preriempita. Non sono richiesti ulteriori passaggi.



ATTENZIONE

I NextSeq v2.5 Reagent Kits richiedono NCS v2.2 o una versione successiva. Prima di preparare campioni e materiali di consumo, controllare di aver completato gli aggiornamenti del software.

Compatibilità dei kit ed etichettatura

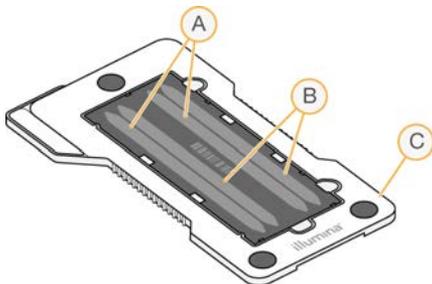
I componenti del kit sono etichettati con indicatori codificati per colore per indicare la compatibilità tra le celle a flusso e le cartucce di reagenti. Utilizzare sempre una cartuccia di reagenti e una cella a flusso compatibili. La cartuccia di tamponi è universale.

Ciascuna cella a flusso e cartuccia di reagenti è etichettata **High** (Elevato) o **Mid** (Medio). Verificare sempre l'etichetta quando si preparano i materiali di consumo per una corsa.

Tipo di kit	Marchio sull'etichetta
Componenti di High Output Kit	
Componenti di Mid Output Kit	

Panoramica sulla cella a flusso

Figura 3 Cartuccia della cella a flusso



- A Coppia corsie A: corsie 1 e 3
- B Coppia corsie B: corsie 2 e 4
- C Struttura della cartuccia della cella a flusso

La cella a flusso è un substrato su vetro su cui vengono generati i cluster e viene eseguita la reazione di sequenziamento. La cella a flusso è racchiusa in una cartuccia della cella a flusso.

La cella a flusso contiene quattro corsie che sono sottoposte a imaging in coppie.

- Le corsie 1 e 3 (coppia corsie A) sono sottoposte a imaging contemporaneamente.

- ▶ Le corsie 2 e 4 (coppia corsie B) sono sottoposte a imaging al completamento dell'imaging della coppia corsie A.

Sebbene la cella a flusso contenga quattro corsie, solo una singola libreria o un set di librerie raggruppate in pool viene sequenziato sulla cella a flusso. Le librerie vengono caricate sulla cartuccia di reagenti da un singolo flacone e trasferite automaticamente alla cella a flusso a tutte e quattro le corsie.

Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in aree denominate tile. Per maggiori informazioni, vedere *Tile della cella a flusso* a pagina 50.

Panoramica sulla cartuccia di reagenti

La cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso dotato di monitoraggio RFID e serbatoi sigillati e preriempiti con reagenti per la generazione di cluster e di sequenziamento.

Figura 4 Cartuccia di reagenti



La cartuccia di reagenti comprende un serbatoio designato al caricamento delle librerie preparate. Dopo l'avvio della corsa, le librerie vengono trasferite automaticamente dal serbatoio alla cella a flusso.

Diversi serbatoi sono riservati per il lavaggio post-corsa automatico. La soluzione di lavaggio viene pompata dalla cartuccia di tamponi nei serbatoi riservati, attraverso il sistema, quindi al contenitore dei reagenti usati.

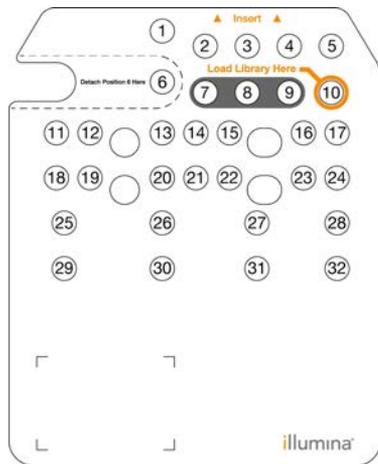


AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Serbatoi riservati

Figura 5 Serbatoi numerati



Posizione	Descrizione
7, 8 e 9	Riservate per i primer personalizzati facoltativi
10	Caricamento delle librerie

Per informazioni sui primer personalizzati, vedere la *Guida ai primer personalizzati NextSeq (documento n. 15057456)*.

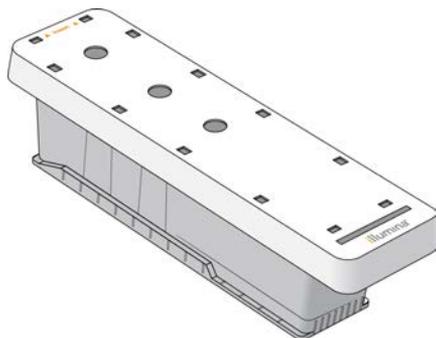
Serbatoio rimovibile in posizione n. 6

La cartuccia di reagenti pre-riempita include un reagente di denaturazione nella posizione n. 6 che contiene formammide. Per semplificare lo smaltimento sicuro di qualsiasi reagente non usato dopo una corsa di sequenziamento, il serbatoio in posizione 6 è rimovibile. Per maggiori informazioni, vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6 a pagina 23*.

Panoramica sulla cartuccia di tamponi

La cartuccia di tamponi è un materiale di consumo monouso che contiene tre serbatoi pre-riempiti con tamponi e soluzione di lavaggio. Il contenuto della cartuccia di tamponi è sufficiente per il sequenziamento di una cella a flusso.

Figura 6 Cartuccia di tamponi



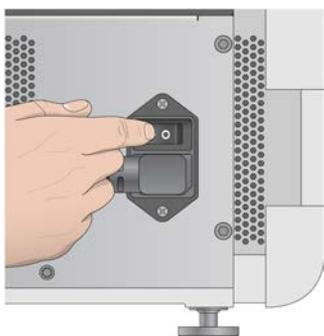
Capitolo 2 Informazioni preliminari

Avvio dello strumento	9
Personalizzazione delle impostazioni del sistema	9
Personalizzazione delle impostazioni della corsa	11
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	12

Avvio dello strumento

Portare l'interruttore di alimentazione in posizione I (acceso).

Figura 7 Interruttore di alimentazione sulla parte posteriore dello strumento



- 1 Premere il pulsante di alimentazione sopra lo scomparto reagenti. Il pulsante di alimentazione accende l'alimentazione dello strumento e avvia il computer e il software dello strumento integrati.

Figura 8 Pulsante di alimentazione sulla parte anteriore dello strumento



- 2 Attendere che il sistema operativo completi il caricamento. NextSeq Control Software (NCS) viene avviato e inizializza il sistema automaticamente. Al termine dell'inizializzazione si apre la schermata Home (Inizio).
- 3 Se il sistema è stato configurato per l'accesso mediante credenziali, attendere il caricamento del sistema, quindi accedere al sistema operativo. Se necessario, rivolgersi all'amministratore della struttura per ottenere il nome utente e la password.

Personalizzazione delle impostazioni del sistema

Il software di controllo include impostazioni di sistema personalizzabili per quanto segue. Per modificare le impostazioni di configurazione della rete, vedere *Configurazione delle impostazioni del sistema a pagina 42*.

- ▶ Personalizzazione dell'identificazione dello strumento (avatar e nome personalizzato)
- ▶ Impostazione dell'opzione della tastiera e dell'indicatore audio
- ▶ Impostazione dell'opzione per ricette personalizzate
- ▶ Impostazione del controllo degli aggiornamenti software dello strumento da BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Impostazione dell'opzione per l'invio dei dati delle prestazioni dello strumento

Avatar e nome personalizzato dello strumento

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 3 Per assegnare un'immagine avatar preferita allo strumento, selezionare **Browse** (Sfoglia) per individuare l'immagine.
- 4 Nel campo Nickname (Nome personalizzato), immettere un nome preferito per lo strumento.
- 5 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e passare alla schermata successiva. L'immagine e il nome vengono visualizzati nell'angolo superiore sinistro di ciascuna schermata.

Impostazione dell'opzione della tastiera e dell'indicatore audio

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 3 Selezionare la casella di controllo **Use on-screen keyboard** (Usa tastiera sullo schermo) per attivare la tastiera sullo schermo e immettere i dati per lo strumento.
- 4 Selezionare la casella di controllo **Play audio** (Attiva audio) per attivare gli indicatori audio per i seguenti eventi.
 - ▶ All'inizializzazione dello strumento
 - ▶ All'avvio di una corsa
 - ▶ Al verificarsi di determinati errori
 - ▶ Alla richiesta di intervento da parte dell'utente
 - ▶ Al termine di una corsa
- 5 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e passare alla schermata successiva.

Impostazione dell'opzione per ricette personalizzate

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 3 Selezionare la casella di controllo **Enable Custom Recipes** (Abilita ricette personalizzate) per abilitare la selezione di una ricetta personalizzata quando si carica una cartuccia di reagenti. Per maggiori informazioni, vedere *Ricette personalizzate e cartelle delle ricette a pagina 39*.
- 4 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e passare alla schermata successiva.

Impostazione del controllo degli aggiornamenti software dello strumento da BaseSpace

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).

- 3 Selezionare la casella di controllo **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Cerca automaticamente nuovi aggiornamenti software su BaseSpace) per attivare la ricerca automatica di aggiornamenti per BaseSpace Sequence Hub.
La verifica automatica della disponibilità degli aggiornamenti viene eseguita ogni 24 ore. Quando è disponibile un aggiornamento, viene visualizzata una notifica nei seguenti punti.
 - ▶ Nella schermata **Manage Instrument** (Gestione strumento), icona **Software Update** (Aggiornamento software).
 - ▶ Nella schermata **Home** (Inizio), pulsante **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 4 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e passare alla schermata successiva.

Impostazione dell'opzione per l'invio dei dati delle prestazioni dello strumento

- 1 Nella schermata **Home** (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 3 Selezionare **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina) per attivare il servizio di monitoraggio proattivo Illumina. In base alla versione di NCS in uso, il nome di questa impostazione nell'interfaccia del software potrebbe essere diverso dal nome presente in questa guida.
L'attivazione di questa impostazione consente di inviare a Illumina i dati delle prestazioni dello strumento. Questi dati consentono a Illumina di risolvere facilmente eventuali problemi, di rilevare possibili malfunzionamenti, di eseguire una manutenzione proattiva e di massimizzare il tempo di funzionamento dello strumento. Per maggiori informazioni sui vantaggi di questo servizio, vedere *Nota tecnica sul servizio Illumina Proactive (documento n. 1000000052503)*.
Questo servizio:
 - ▶ Non invia i dati del sequenziamento.
 - ▶ Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet.
 - ▶ Sia attivato per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, disattivare l'opzione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina).
- 4 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e passare alla schermata successiva.

Personalizzazione delle impostazioni della corsa

Il software di controllo comprende impostazioni personalizzabili per le preferenze d'impostazione della corsa e per spurgare i reagenti non usati.

Impostazione delle opzioni di configurazione della corsa

- 1 Nella schermata **Home** (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 3 Selezionare la casella di controllo **Use Advanced Load Consumables** (Usa caricamento avanzato dei materiali di consumo) per attivare l'opzione di caricamento di tutti i materiali di consumo da una singola schermata.

- 4 Selezionare la casella di controllo **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Salta conferma verifica pre-corsa) per avviare automaticamente il sequenziamento dopo il completamento corretto di una verifica automatica.
- 5 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e uscire dalla schermata.

Impostazione dell'opzione di spurgo automatico

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 3 Selezionare la casella di controllo **Purge Consumables at End of Run** (Spurgo dei materiali di consumo al termine della corsa) per spurgare automaticamente i reagenti non usati dalla cartuccia di reagenti al contenitore dei reagenti usati dopo ciascuna corsa.



NOTA

Lo spurgo automatico dei materiali di consumo allunga il flusso di lavoro.

- 4 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e uscire dalla schermata.

Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente

Le apparecchiature e i materiali di consumo seguenti sono utilizzati su NextSeq 500.

Materiali di consumo per il sequenziamento

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
1 N di NaOH (idrossido di sodio)	Fornitore di laboratorio generico	Denaturazione della libreria, diluita a 0,2 N
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 95041-714 (o equivalente) Fornitore di laboratorio generico	Pulizia della cella a flusso e per uso generico
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026, o equivalente	Pulizia della cella a flusso

Materiali di consumo per la manutenzione e la risoluzione dei problemi

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
NaOCl, 5% (ipoclorito di sodio)	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 239305 (o equivalente da laboratorio)	Lavaggio dello strumento utilizzando un lavaggio post-corsa manuale; diluito allo 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Lavaggio dello strumento utilizzando le opzioni di lavaggio manuale, diluito allo 0,05%
Acqua da laboratorio	Fornitore di laboratorio generico	Lavaggio dello strumento (lavaggio manuale)
Reagente o metanolo o alcol isopropilico (99%) per spettrofotometria, fialone da 100 ml	Fornitore di laboratorio generico	Pulizia periodica dei componenti ottici e supporto della cartuccia di pulizia dell'obiettivo

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Filtro dell'aria	Illumina, n. di catalogo 20022240	Per gli strumenti dotati di un filtro dell'aria accessibile dal pannello posteriore. Pulizia dell'aria aspirata dallo strumento per il raffreddamento.

Linee guida per l'acqua da laboratorio

Per eseguire le procedure dello strumento utilizzare sempre acqua da laboratorio o acqua deionizzata. Non usare mai acqua di rubinetto. Utilizzare solo acqua da laboratorio o gli equivalenti seguenti:

- ▶ Acqua deionizzata
- ▶ PW1 Illumina
- ▶ Acqua con resistività pari a 18 Megohm (MΩ)
- ▶ Acqua Milli-Q
- ▶ Acqua Super-Q
- ▶ Acqua sterile per biologia molecolare

Apparecchiatura

Apparecchio	Origine	Scopo
Congelatore, temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, antibrina	Fornitore di laboratorio generico	Per conservare la cartuccia.
Portaghiaccio	Fornitore di laboratorio generico	Per mettere da parte le librerie.
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico	Per conservare la cella a flusso.

Capitolo 3 Sequenziamento

Introduzione	14
Creazione di una corsa con il software Local Run Manager	15
Creazione di una corsa con NCS	15
Preparazione della cartuccia di reagenti	15
Preparazione della cella a flusso	16
Preparazione delle librerie per il sequenziamento	17
Impostazione di una corsa di sequenziamento	17
Monitoraggio del progresso della corsa	24
Lavaggio post-corsa automatico	26

Introduzione

Per eseguire una corsa di sequenziamento su NextSeq 500, preparare una cartuccia di reagenti e una cella a flusso. Attenersi ai suggerimenti del software per impostare e avviare la corsa. La generazione di cluster e il sequenziamento sono integrati sullo strumento. Dopo la corsa, viene avviato automaticamente un lavaggio dello strumento usando i componenti già caricati sullo strumento.

Generazione di cluster

Durante la generazione di cluster, singole molecole di DNA si legano alla superficie della cella a flusso e in seguito vengono sottoposte ad amplificazione per formare i cluster.

Sequenziamento

I cluster vengono sottoposti a imaging utilizzando la chimica di sequenziamento a due canali e una combinazione di filtri specifici per ciascun terminatore di catena marcato con coloranti fluorescenti. Al termine dell'imaging di una tile sulla cella a flusso, la tile successiva viene sottoposta a imaging. Il processo è ripetuto per ciascun ciclo di sequenziamento. Dopo l'analisi delle immagini, il software esegue l'identificazione delle basi, il filtraggio e il calcolo dei punteggi qualitativi.

Controlla l'andamento della corsa e le statistiche nelle seguenti posizioni.

- ▶ Interfaccia NCS
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Local Run Manager
- ▶ Un computer sulla rete che utilizza il software Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV).
Vedere *Visualizzatore analisi di sequenziamento a pagina 25*.

Analisi

Man mano che la corsa procede, il software di controllo trasferisce automaticamente i file di identificazione delle basi (BCL) a BaseSpace Sequence Hub, Local Run Manager oppure alla posizione di output specificata per l'analisi secondaria.

In base all'applicazione sono disponibili diversi metodi di analisi. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di BaseSpace* o la *Guida del software Local Run Manager Software Guide (documento n. 1000000002702)*.

Durata della corsa di sequenziamento

La durata della corsa di sequenziamento dipende dal numero di cicli eseguiti. La lunghezza massima di una corsa è una corsa paired-end di 150 cicli per ciascuna lettura (2 × 150), più un massimo di dieci cicli ciascuna per due letture indice.

Per le durate previste e altre specifiche di sistema, visitare la [pagina delle specifiche di NextSeq 500](#) sul sito Web Illumina.

Numero di cicli di sequenziamento in una lettura

In una corsa di sequenziamento, il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, una corsa paired-end da 150 cicli esegue letture da 151 cicli (2×151) con un totale di 302 cicli. Al termine della corsa, si analizzano 2×150 cicli. L'ultimo ciclo in più è necessario per i calcoli di correzioni della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing).

Creazione di una corsa con il software Local Run Manager

Il processo per l'impostazione dei parametri della corsa e dell'analisi in Local Run Manager varia in base allo specifico modulo del flusso di lavoro di analisi in uso. Per istruzioni specifiche sulla creazione di una corsa, fare riferimento alla guida del modulo Local Run Manager.

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Edit Runs** (Modifica corse).
- 2 Selezionare **Create Run** (Crea corsa) dal pannello di controllo di Local Run Manager e selezionare un modulo di analisi.
- 3 Immettere un nome per la corsa, i campioni per la corsa e, se applicabile, importare i file manifest.
- 4 Salvare la corsa e chiudere la finestra del pannello di controllo di Local Run Manager.

Per creare una corsa in NCS senza il software Local Run Manager, utilizzare la modalità manuale. Vedere *Creazione di una corsa con NCS a pagina 15* e *Modalità di esecuzione a pagina 18*.

Creazione di una corsa con NCS

Se si crea una corsa con NCS (modalità di esecuzione manuale), i parametri della corsa e di analisi vengono immessi immediatamente prima del caricamento della cella a flusso.

- 1 Riesaminare i parametri della corsa e di analisi necessari in *Inserimento dei parametri della corsa e di analisi in NCS (modalità corsa manuale) a pagina 19*.
- 2 Stabilire i parametri della corsa e dell'analisi per evitare ritardi quando si avvia la corsa di sequenziamento.

Preparazione della cartuccia di reagenti

- 1 Rimuovere la cartuccia di reagenti dal luogo di conservazione con temperatura tra -25 °C e -15 °C .
- 2 Scongela in un bagno d'acqua a temperatura ambiente fino a scongelamento (circa 60 minuti). Non sommergere la cartuccia.
- 3 Picchiettare delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua dalla base, quindi asciugare la base.
[Metodo alternativo] Scongela i reagenti per una notte a $2\text{--}8\text{ °C}$. Sono necessarie almeno 18 ore per lo scongelamento. A questa temperatura, i reagenti sono stabili fino a una settimana.
- 4 Capovolgere la cartuccia cinque volte per miscelare i reagenti.
- 5 Ispezionare le posizioni 29, 30, 31 e 32 per assicurarsi che i reagenti siano scongelati.
- 6 Picchiettare delicatamente sul banco per ridurre le bolle d'aria.



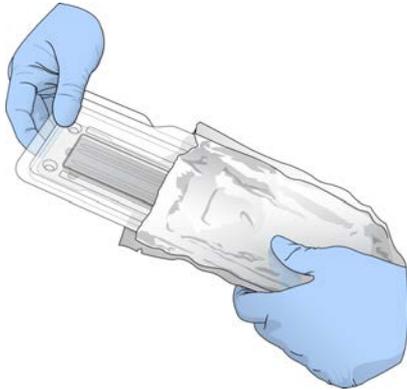
AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Preparazione della cella a flusso

- 1 Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
- 2 Rimuovere la cella a flusso dalla confezione in alluminio.

Figura 9 Rimozione dalla confezione in alluminio



- 3 Tenere la confezione della cella a flusso chiusa a temperatura ambiente per 30 minuti.



NOTA

Se la confezione in alluminio è intatta, la cella a flusso può rimanere a temperatura ambiente fino a 12 ore. Evitare il raffreddamento e il riscaldamento ripetuti della cella a flusso.

- 4 Aprire la confezione in plastica trasparente a forma di conchiglia e rimuovere la cella a flusso.

Figura 10 Rimozione dalla confezione a forma di conchiglia



- 5 Pulire la superficie in vetro della cella a flusso con una salvietta imbevuta di alcool che non lascia residui. Asciugare il vetro con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.

Preparazione delle librerie per il sequenziamento

Il volume della libreria e la concentrazione di caricamento sono diversi in base alla versione di NCS che si sta eseguendo.

Versione del software di controllo	Volume della libreria	Concentrazione della libreria
NCS v1.3, o versioni successive	1,3 ml	1,8 pM
NCS v1.2, o precedente	3 ml	3 pM

Denaturazione e diluizione delle librerie

Denaturare e diluire le librerie al volume e alla concentrazione di caricamento indicati di seguito.

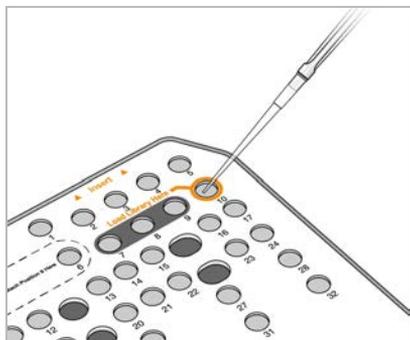
Tipo di kit	Volume di caricamento	Concentrazione di caricamento
Output elevato	1,3 ml	1,8 pM
Output medio	1,3 ml	1,5 pM

In pratica, la concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e di quantificazione delle librerie. Per istruzioni vedere la *Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (documento n. 15048776)*.

Caricamento delle librerie sulla cartuccia di reagenti

- 1 Pulire il sigillo in alluminio che copre il serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Carica qui le librerie) con un panno a bassissimo rilascio di particelle.
- 2 Forare il sigillo con la punta di una pipetta pulita da 1 ml.
- 3 Caricare 1,3 ml di librerie preparate alla concentrazione di 1,8 pM nel serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Carica qui le librerie). Non toccare il sigillo in alluminio mentre si dispensano le librerie.

Figura 11 Caricamento delle librerie



Impostazione di una corsa di sequenziamento

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Experiment** (Esperimento).
- 2 Nella schermata Select Assay (Selezione saggio), selezionare **Sequence** (Sequenziamento).
Il comando Sequence (Sequenziamento) apre lo sportello dello scomparto di imaging, rilascia i materiali di consumo di una corsa precedente e apre la serie di schermate per l'impostazione della corsa. Un breve ritardo è normale.

Modalità di esecuzione

Quando si imposta una corsa di sequenziamento, selezionare una delle seguenti modalità di corsa per stabilire dove inserire le informazioni sulla corsa e come analizzare i dati.

Modalità della corsa	Informazioni sulla corsa	Analisi dei dati*
Local Run Manager	Immettere in Local Run Manager.	Il software salva i dati nella cartella di output specificata per l'analisi automatica in Local Run Manager.
Manuale	Accedere a NCS.	Il software salva i dati in una cartella di output specificata da utilizzare per la successiva analisi non integrata sullo strumento.

* A scopo di analisi, BaseSpace Sequence Hub può essere associato con entrambe le modalità della corsa. Quando la modalità di esecuzione è Local Run Manager e BaseSpace Sequence Hub è configurato, entrambe le applicazioni analizzano i dati.

Local Run Manager è la modalità di esecuzione predefinita e assicura un flusso di lavoro più snello. In Local Run Manager, si creano e si salvano le corse. Le informazioni vengono poi inviate al software di controllo, dove si seleziona una corsa e si continua l'impostazione. Al termine del sequenziamento, Local Run Manager esegue automaticamente l'analisi dei dati. Non sono necessari foglio campioni e applicazioni di analisi separati.



NOTA

Local Run Manager non è una funzione del software di controllo. È un software integrato per registrare i campioni per il sequenziamento, specificare i parametri della corsa e analizzare i dati.

BaseSpace Sequence Hub (facoltativo)

Durante l'impostazione di una corsa di sequenziamento è possibile selezionare una delle seguenti opzioni di BaseSpace Sequence Hub.

Opzione	Descrizione e requisiti
Run Monitoring and Storage (Monitoraggio e archiviazione della corsa)	Invia i file InterOp, i file di registro e i dati della corsa a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio e l'analisi a distanza. Richiede un account BaseSpace Sequence Hub, una connessione Internet e un foglio campioni.
Run Monitoring Only (Solo monitoraggio della corsa)	Invia i file InterOp e di registro a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio a distanza della corsa. Questa è l'opzione predefinita. Richiede un account BaseSpace Sequence Hub e una connessione Internet.

Selezione della modalità della corsa e BaseSpace Sequence Hub

- Nella schermata per l'impostazione della corsa, selezionare una delle modalità seguenti.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Manuale
- [Facoltativo]** Selezionare **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usa impostazione di BaseSpace Sequence Hub) e poi una delle opzioni seguenti.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Monitoraggio e archiviazione della corsa)
 - ▶ Run Monitoring Only (Solo monitoraggio della corsa)
 Immettere il nome utente e la password per BaseSpace Sequence Hub.

Se suggerito, selezionare un gruppo di lavoro nel quale caricare i dati della corsa. Il software suggerisce questo passaggio solo se l'utente appartiene a diversi gruppi di lavoro.

- 3 Selezionare **Next** (Avanti).

Selezione della corsa (modalità corsa Local Run Manager)

- 1 Selezionare un nome della corsa dall'elenco delle corse disponibili.
Utilizzare le frecce verso l'alto e verso il basso per scorrere nell'elenco o inserire un nome della corsa nel campo Search (Cerca).
- 2 Confermare i parametri della corsa.
 - ▶ **Run Name** (Nome corsa): il nome della corsa come assegnato in Local Run Manager.
 - ▶ **Library ID** (ID libreria): il nome delle librerie sottoposte a raggruppamento in pool come assegnato in Local Run Manager.
 - ▶ **Recipe** (Ricetta): il nome della ricetta, **NextSeq High** o **NextSeq Mid**, in base alla cartuccia di reagenti usata per la corsa.
 - ▶ **Read Type** (Tipo lettura): unidirezionale o paired-end.
 - ▶ **Read Length** (Lunghezza lettura): il numero di cicli per ciascuna lettura.
 - ▶ **[Facoltativo]** Custom Primers (Primer personalizzati), se applicabile.
- 3 **[Facoltativo]** Selezionare l'icona **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).
 - ▶ **Run parameters** (Parametri della corsa): cambiare il numero di letture o il numero di cicli per lettura.
 - ▶ **Custom primers** (Primer personalizzati): modificare le impostazioni per i primer personalizzati. Per informazioni, vedere la *Guida ai primer personalizzati NextSeq (documento n. 15057456)*.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Spurgo dei materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa attuale.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento dei parametri della corsa e di analisi in NCS (modalità corsa manuale)

- 1 Immettere un nome della corsa scelto dall'utente.
- 2 **[Facoltativo]** Immettere un ID della libreria scelto dall'utente.
- 3 Dall'elenco a discesa Recipe (Ricetta), selezionare una ricetta. Sono elencate solo le ricette compatibili.
- 4 Selezionare un tipo di lettura: **Single-Read** (Unidirezionale) o **Paired-End** (Paired-end).
- 5 Inserire il numero di cicli per ciascuna lettura nella corsa di sequenziamento.
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli.
 - ▶ **Read 2** (Lettura 2): immettere un valore fino a 151 cicli. Di solito questo valore è lo stesso numero di cicli di Read 1 (Lettura 1).
 - ▶ **Index 1** (Indice 1): immettere il numero di cicli richiesti per il primer Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).
 - ▶ **Index 2** (Indice 2): immettere il numero di cicli richiesti per il primer Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).

Il software di controllo conferma le voci immesse in base ai criteri seguenti:

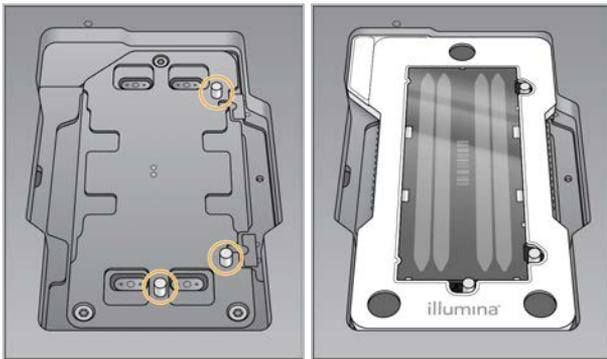
 - ▶ I cicli totali non devono superare il numero di cicli massimi permesso
 - ▶ I cicli per Read 1 (Lettura 1) sono superiori ai 5 cicli usati per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster
 - ▶ I cicli Index Read (Lettura indici) non superano i cicli Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2)

- 6 **[Facoltativo]** Se si stanno usando primer personalizzati, selezionare la casella di controllo per i primer usati. Per informazioni, vedere la *Guida ai primer personalizzati NextSeq (documento n. 15057456)*.
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
 - ▶ **Read 2** (Lettura 2): primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
 - ▶ **Index 1** (Indice 1): primer personalizzati per Index 1 (Indice 1).
 - ▶ **Index 2** (Indice 2): primer personalizzati per Index 2 (Indice 2).
- 7 Impostare la posizione della cartella di output per la corsa attuale. Selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare a una posizione di rete.
Per informazioni sui requisiti della cartella di output, vedere *Impostazione della posizione di Output Folder (Cartella di output) a pagina 44*.
- 8 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare a un foglio campioni.
I sistemi configurati per la modalità manuale con Run Monitoring and Storage (Monitoraggio e archiviazione della corsa) in BaseSpace Sequence Hub richiedono un foglio campioni.
- 9 Selezionare **Purge consumables for this run** (Spurga i materiali di consumo per questa corsa).
L'impostazione spurga automaticamente i materiali di consumo dopo l'attuale corsa.
- 10 Selezionare **Next** (Avanti).
- 11 **[Facoltativo]** Selezionare l'icona Edit (Modifica) per modificare i parametri della corsa.
- 12 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cella a flusso

- 1 Rimuovere la cella a flusso usata in una corsa precedente.
- 2 Utilizzare i perni di allineamento per posizionare la cella a flusso sul piano portacelle.

Figura 12 Caricamento della cella a flusso



- 3 Selezionare **Load** (Carica).
Lo sportello si chiude automaticamente, l'ID della cella a flusso viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono sottoposti a verifica.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).

Svuotamento del contenitore dei reagenti usati

- 1 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.

Figura 13 Rimozione del contenitore dei reagenti usati



NOTA

Mentre si rimuove il contenitore, posizionare l'altra mano sotto il contenitore per sostenerlo.

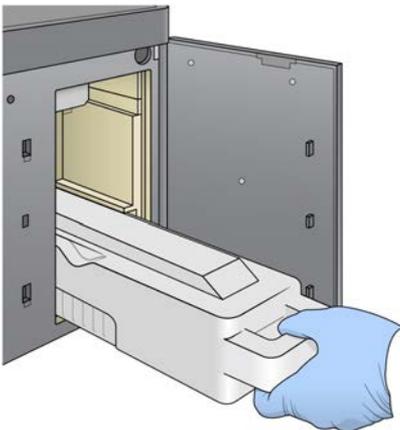


AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

- 2 Fare scorrere il contenitore dei reagenti usati vuoto nello scomparto tamponi fino all'arresto. Quando il contenitore è in posizione si avverte un "clic".

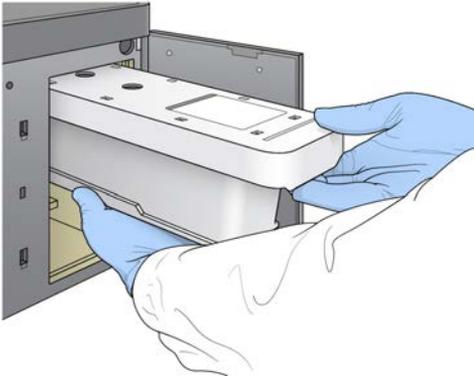
Figura 14 Caricamento del contenitore dei reagenti usati vuoto



Caricamento della cartuccia di tamponi

- 1 Rimuovere la cartuccia di tamponi usata dallo scomparto superiore.
- 2 Fare scorrere una nuova cartuccia di tamponi nello scomparto tamponi fino all'arresto.
Quando la cartuccia è in posizione si avverte un "clic", l'ID della cartuccia di tamponi viene visualizzato sullo schermo e il sensore viene sottoposto a verifica.

Figura 15 Caricamento della cartuccia di tamponi



- 3 Chiudere lo sportello dello scomparto tamponi e selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cartuccia di reagenti

- 1 Rimuovere la cartuccia di reagenti usata dallo scomparto reagenti. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

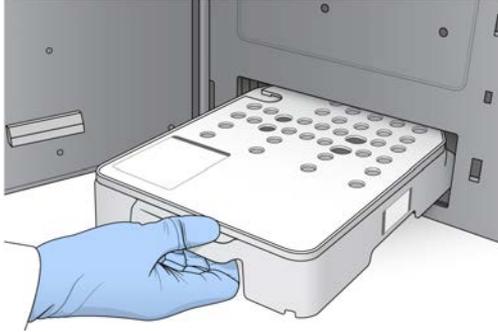


NOTA

Per semplificare lo smaltimento sicuro dei reagenti non usati, il serbatoio in posizione n. 6 è rimovibile. Per maggiori informazioni, vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6 a pagina 23*.

- 2 Fare scorrere la cartuccia di reagenti nello scomparto reagenti fino a quando la cartuccia si ferma in posizione, quindi chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

Figura 16 Caricamento della cartuccia di reagenti

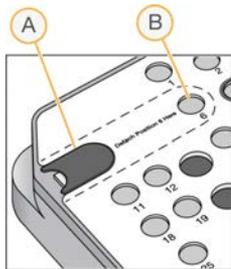


- 3 Selezionare **Load** (Carica).
Il software sposta automaticamente la cartuccia in posizione (circa 30 secondi), l'ID della cartuccia viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono sottoposti a verifica.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).

Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6

- 1 Dopo aver rimosso dallo strumento la cartuccia di reagenti **usata**, rimuovere la copertura protettiva in gomma sopra la slot accanto alla posizione n. 6.

Figura 17 Posizione rimovibile n. 6



- A Copertura protettiva in gomma
- B Posizione n. 6

- 2 Premere la linguetta in plastica trasparente e quindi spingere verso sinistra per far fuoriuscire il serbatoio.
- 3 Smaltire il serbatoio in base agli standard applicabili.

Revisione della verifica automatica

Il software esegue una verifica automatica del sistema. Durante la verifica, gli indicatori seguenti vengono visualizzati sulla schermata:

- ▶ **Segno di spunta grigio** ☒ : la verifica non è ancora stata eseguita.
- ▶ **Icona di progresso** ⦿ : la verifica è in corso.
- ▶ **Segno di spunta verde** ✓ : la verifica è stata superata.
- ▶ **Rosso** ✗ : la verifica non è stata superata. Per qualsiasi voce che non supera la verifica, è richiesta un'azione prima di poter procedere. Vedere *Risoluzione degli errori della verifica automatica* a pagina 35.

Per arrestare una verifica automatica in corso, selezionare l'icona  nell'angolo inferiore destro. Per riavviare la verifica, selezionare l'icona . La verifica riprende dalla prima verifica non completata o non superata.

Per visualizzare i risultati di ciascuna singola verifica entro una categoria, selezionare l'icona  per allargare la categoria.



NOTA

Quando si esegue la prima corsa di sequenziamento su NCS v4.0 o versione successiva, è normale che la registrazione della cella a flusso impieghi 15 minuti durante la verifica automatica del sistema.

Avvio della corsa

Al termine della verifica automatica, selezionare **Start** (Avvia). La corsa di sequenziamento viene avviata.

Per configurare il sistema per avviare una corsa automaticamente dopo una verifica completata correttamente, vedere *Impostazione delle opzioni di configurazione della corsa a pagina 11*.

Monitoraggio del progresso della corsa

- 1 Monitorare il progresso della corsa, le intensità e i punteggi qualitativi mentre le metriche vengono visualizzate sulla schermata.

Figura 18 Progresso e metriche della corsa di sequenziamento



- A **Progresso della corsa:** mostra la fase in corso di elaborazione e il numero di cicli completati per ogni lettura. La barra di progresso non è proporzionale alla velocità della corsa di ogni fase. Usare il tempo rimanente indicato nell'angolo superiore destro per determinare la durata attuale.
- B **Q-Score** (Punteggi qualitativi): mostra la distribuzione dei punteggi qualitativi. Vedere *Punteggio qualitativo a pagina 49*.
- C **Intensity** (Intensità): mostra il valore delle intensità dei cluster per il 90° percentile per ogni tile. I colori del grafico indicano ciascuna base: rosso è A, verde è C, blu è G e nero è T. I colori corrispondono agli indicatori delle basi utilizzati nel Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV).
- D **Cluster Density (K/mm²)** (Densità dei cluster - K/mm²): mostra il numero di cluster rilevati per la corsa.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (% cluster che attraversano il filtro): mostra la percentuale di cluster che attraversano il filtro. Vedere *Cluster che attraversano il filtro a pagina 48*.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Resa prevista - Gb): mostra il numero di basi previste per la corsa.

**NOTA**

Dopo aver selezionato Home (Inizio), non è possibile tornare a visualizzare le metriche della corsa. Tuttavia, le metriche della corsa sono accessibili su BaseSpace Sequence Hub o visualizzabili da un computer indipendente usando il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV).

Cicli per le metriche della corsa

Le metriche della corsa vengono visualizzate in diversi punti in una corsa.

- ▶ Durante le fasi di generazione di cluster non appare alcuna metrica.
- ▶ I primi cinque cicli sono riservati per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
- ▶ Le metriche della corsa appaiono dopo il ciclo 25, inclusi densità dei cluster, cluster che attraversano il filtro, resa e punteggi qualitativi.

Trasferimento dei dati

In base alla configurazione dell'analisi selezionata, durante la corsa viene visualizzata sullo schermo un'icona per indicare lo stato del trasferimento dei dati.

Stato	Local Run Manager	Cartella di output	Illumina BaseSpace
Collegato			
Collegato e in fase di trasferimento dati			
Scollegato			
Disattivato			

Se durante la corsa viene interrotto il trasferimento dei dati, i dati vengono archiviati temporaneamente sul computer dello strumento. Quando la connessione viene ripristinata, il trasferimento dei dati riprende automaticamente. Se la connessione non viene ripristinata prima del termine della corsa, i dati devono essere rimossi manualmente dal computer dello strumento prima di poter avviare una nuova corsa.

Universal Copy Service

NextSeq System Software Suite include un Universal Copy Service. RTA v2 richiede il servizio di copia dei file da una posizione di origine a una posizione di destinazione e il servizio esegue la copia desiderata nell'ordine ricevuto. Nel caso si verifichi un'eccezione, il file viene rimesso in coda per la copia in base al numero di file nella coda di copia.

Visualizzatore analisi di sequenziamento

Il software Visualizzatore analisi di sequenziamento mostra le metriche del sequenziamento generate durante la corsa. Le metriche vengono visualizzate sotto forma di grafici, diagrammi e tabelle in base ai dati generati da RTA e scritti nei file InterOp. Le metriche vengono aggiornate man mano che la corsa procede.

Selezionare **Refresh** (Aggiorna) in qualsiasi momento durante la corsa per visualizzare le metriche aggiornate. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento* (n. codice 15020619).

Visualizzatore analisi di sequenziamento è incluso nel software installato sul computer dello strumento. Visualizzatore analisi di sequenziamento può anche essere installato su un altro computer collegato alla stessa rete dello strumento per monitorare a distanza le metriche della corsa.

Lavaggio post-corsa automatico

Quando viene completata la corsa di sequenziamento, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico. Il lavaggio post-corsa automatico utilizza la soluzione di lavaggio fornita nella cartuccia di tamponi e NaOCl fornito nella cartuccia di reagenti.

Il lavaggio post-corsa automatico dura circa 90 minuti. Al termine del lavaggio, il **pulsante Home** (Inizio) diventa attivo. Durante il lavaggio, i risultati del sequenziamento rimangono visibili sulla schermata.

Dopo il lavaggio

Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nella posizione abbassata per impedire che aria entri nel sistema. Lasciare le cartucce in posizione fino alla corsa successiva.

Capitolo 4 Manutenzione

Introduzione	27
Esecuzione di un lavaggio manuale	27
Sostituzione del filtro dell'aria	30
Aggiornamenti del software	31
Spegnimento dello strumento	33

Introduzione

Le procedure di manutenzione comprendono i lavaggi manuali dello strumento, la sostituzione del filtro dell'aria e, quando disponibili, gli aggiornamenti del software del sistema.

- ▶ **Lavaggi dello strumento:** un lavaggio post-corsa automatico dopo ciascuna corsa di sequenziamento mantiene le prestazioni dello strumento. Tuttavia, un lavaggio manuale è richiesto periodicamente in determinate condizioni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale a pagina 27*.
- ▶ **Aggiornamenti del software:** quando è disponibile una versione aggiornata del software di sistema, è possibile installare automaticamente l'aggiornamento usando uno dei seguenti due metodi.
 - ▶ Mediante una connessione a BaseSpace Sequence Hub.
 - ▶ Manualmente dopo aver scaricato il programma di installazione dal sito Web Illumina. Vedere *Aggiornamenti del software a pagina 31*.
- ▶ **Sostituzione del filtro dell'aria:** per gli strumenti dotati di un filtro dell'aria accessibile dal pannello posteriore, la sostituzione regolare del filtro dell'aria assicura il corretto flusso di aria nello strumento.

Manutenzione preventiva

Illumina raccomanda di programmare un servizio di manutenzione preventiva ogni anno. Se non si dispone di un contratto di assistenza, contattare il responsabile di zona o l'Assistenza Tecnica Illumina per organizzare un servizio di manutenzione preventiva a pagamento.

Esecuzione di un lavaggio manuale

I lavaggi manuali sono avviati dalla schermata Home (Inizio). Le opzioni di lavaggio comprendono Quick Wash (Lavaggio rapido) e Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale).

Tipi di lavaggio	Descrizione
Quick Wash (Lavaggio rapido) Durata: 20 minuti	Lava il sistema con una soluzione di lavaggio fornita dall'utente composta da acqua da laboratorio e Tween 20 (cartuccia di tamponi di lavaggio). Richiesto ogni 14 giorni se lo strumento è rimasto inattivo o è stato spento.
Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale) Durata: 90 minuti	Lava il sistema con una soluzione di lavaggio fornita dall'utente composta da acqua da laboratorio e Tween 20 (cartuccia di tamponi di lavaggio) e ipoclorito di sodio allo 0,12% (cartuccia di reagenti di lavaggio). Richiesto se non è stato eseguito il lavaggio post-corsa automatico.

Un lavaggio manuale richiede la cartuccia di reagenti di lavaggio e la cartuccia di tamponi di lavaggio forniti con lo strumento e una cella a flusso usata. Una cella a flusso usata può essere utilizzata fino a 20 volte per i lavaggi dello strumento.

Figura 19 Cartuccia dei reagenti di lavaggio e cartuccia dei tamponi di lavaggio, formato originale.

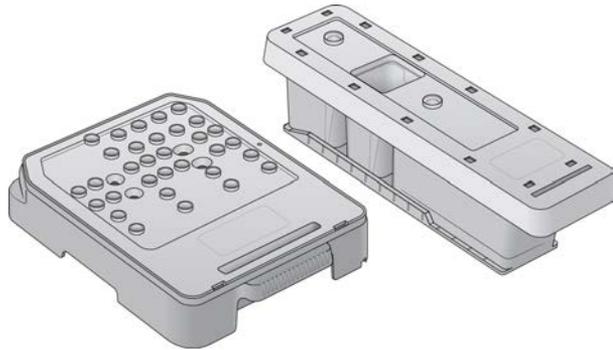
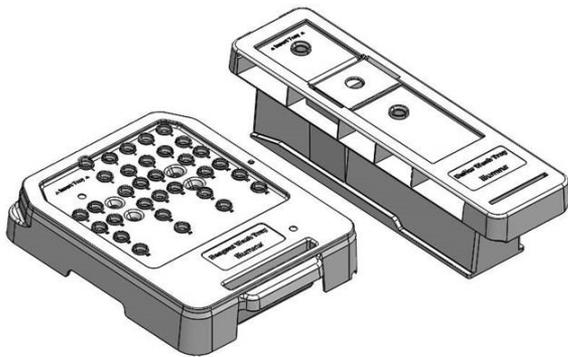


Figura 20 Cartuccia dei reagenti di lavaggio e cartuccia dei tamponi di lavaggio, nuovo formato.



Preparazione per Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale)

Materiali di consumo forniti dall'utente	Volume e descrizione
<ul style="list-style-type: none"> • NaOCl 	1 ml, diluito a 0,12% Caricato sulla cartuccia di reagenti di lavaggio (posizione n. 28)
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 al 100% • Acqua da laboratorio 	Utilizzata per creare 125 ml di soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05% Caricata sulla cartuccia di tamponi di lavaggio (serbatoio centrale)

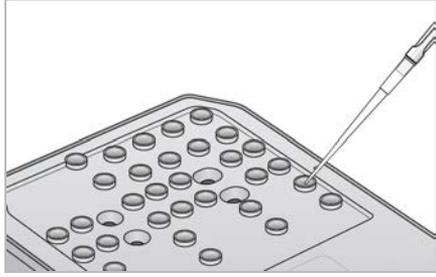


NOTA

Usare sempre una diluizione di NaOCl fresca preparata nelle ultime **24 ore**. Se si prepara un volume superiore a 1 ml, conservare la diluizione residua a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C da utilizzare nelle successive 24 ore. Altrimenti, smaltire la diluizione residua di NaOCl.

- 1 Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga per ottenere 1 ml di 0,12% NaOCl:
 - ▶ NaOCl al 5% (24 µl)
 - ▶ Acqua da laboratorio (976 µl)
- 2 Capovolgere la provetta per miscelare.
- 3 Aggiungere 1 ml di 0,12% NaOCl alla cartuccia di reagenti di lavaggio. Il serbatoio corretto corrisponde alla posizione n. 28 sulla cartuccia precaricata.

Figura 21 Caricamento di NaOCl



- 4 Combinare i volumi seguenti per ottenere una soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05%:
 Cartuccia di tamponi per il lavaggio, formato originale
 - ▶ Tween 20 al 100% (62 μ l)
 - ▶ Acqua da laboratorio (125 ml)
 - ▶ Aggiungere 125 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia di tamponi di lavaggio.
 Cartuccia di tamponi per il lavaggio, nuovo formato
 - ▶ Tween 20 al 100% (75 μ l)
 - ▶ Acqua da laboratorio (150 ml)
 - ▶ Aggiungere 150 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia dei tamponi di lavaggio.
- 5 Selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio), quindi selezionare **Manual Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa manuale).

Preparazione per Quick Wash (Lavaggio rapido)

Materiali di consumo forniti dall'utente	Volume e descrizione
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 al 100% • Acqua da laboratorio 	Utilizzata per creare 40 ml di soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05% Caricata sulla cartuccia di tamponi di lavaggio (serbatoio centrale)

- 1 Combinare i volumi seguenti per ottenere una soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05%:
 ▶ Tween 20 al 100% (20 μ l)
 ▶ Acqua da laboratorio (40 ml)
- 2 Aggiungere 40 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia dei tamponi di lavaggio.
- 3 Selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio), quindi selezionare **Quick Wash** (Lavaggio rapido).

Caricamento di una cella a flusso usata e delle cartucce di lavaggio

- 1 Se non è presente una cella a flusso usata, caricarne una nel modo seguente. Selezionare **Load** (Carica), quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 2 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

- 3 Fare scorrere il contenitore dei reagenti usati vuoto nello scomparto tamponi fino all'arresto.
- 4 Rimuovere la cartuccia di tamponi usata nella corsa precedente, se presente.
- 5 Caricare la cartuccia di tamponi di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio.
- 6 Rimuovere la cartuccia di reagenti usata nella corsa precedente, se presente.
- 7 Caricare la cartuccia di reagenti di lavaggio.
- 8 Selezionare **Next** (Avanti). La verifica pre-lavaggio si avvia automaticamente.

Avvio del lavaggio

- 1 Selezionare **Start** (Avvia).
- 2 Al termine del lavaggio, selezionare **Home** (Inizio).

Dopo il lavaggio

Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nella posizione abbassata per impedire che aria entri nel sistema. Lasciare le cartucce in posizione fino alla corsa successiva.

Sostituzione del filtro dell'aria

I nuovi sistemi vengono forniti con tre filtri dell'aria di ricambio. Questi filtri vanno conservati e devono essere utilizzati quando lo strumento chiede di cambiare il filtro.

Per gli strumenti dotati di un filtro dell'aria accessibile dal pannello posteriore, il filtro dell'aria assicura il flusso di aria nello strumento. Il software visualizza una notifica di sostituzione del filtro dell'aria ogni 90 giorni. Quando suggerito dal software, selezionare **Remind in 1 day** (Ricordami tra 1 giorno) o attenersi alla seguente procedura e selezionare **Filter Changed** (Filtro sostituito). Dopo aver selezionato **Filter Changed** (Filtro sostituito) viene reimpostato il conto alla rovescia di 90 giorni.

- 1 Rimuovere il nuovo filtro dell'aria dalla confezione e scrivere sul telaio del filtro la data in cui viene installato.
- 2 Nella parte posteriore dello strumento, premere sulla parte superiore del vassoio del filtro per rilasciare il vassoio.
- 3 Afferrare la parte superiore del vassoio del filtro dell'aria e tirare verso l'alto per sollevare completamente il vassoio dallo strumento.
- 4 Rimuovere e smaltire il vecchio filtro dell'aria.
- 5 Inserire il nuovo filtro dell'aria nel vassoio.

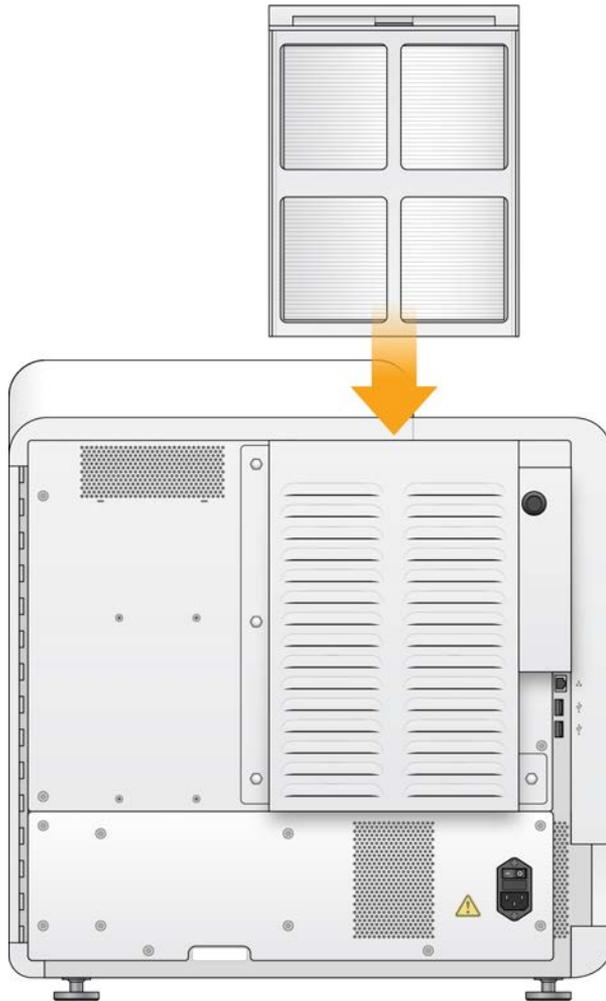


NOTA

Il filtro dell'aria non funziona correttamente se rivolto all'indietro. Assicurarsi di inserire il filtro dell'aria nel vassoio in modo che sia visibile la freccia verde Up (verso l'alto) e che non sia visibile l'etichetta di avvertenza. La freccia deve essere rivolta verso la maniglia del vassoio del filtro.

- 6 Fare scorrere il vassoio del filtro nello strumento. Spingere la parte superiore del vassoio del filtro fino a quando si blocca in posizione.

Figura 22 Inserimento del filtro dell'aria



Aggiornamenti del software

Gli aggiornamenti del software sono riuniti in un gruppo di software denominato System Suite, che include i seguenti software:

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Ricette NextSeq
- ▶ Software Local Run Manager
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Universal Copy Service
- ▶ Driver Direct Memory Access (DMA)

È possibile installare gli aggiornamenti del software automaticamente mediante una connessione a Internet o manualmente da una posizione di rete o USB.

- ▶ **Automatic updates** (Aggiornamenti automatici): per gli strumenti collegati a una rete con accesso a Internet, quando è disponibile un aggiornamento software viene visualizzata un'icona di allerta  sul pulsante Manage Instrument (Gestione strumento), nella schermata Home (Inizio).
- ▶ **Manual updates** (Aggiornamenti manuali): scaricare l'installer di System Suite dalla [pagina di supporto di NextSeq 500](#) sul sito Web Illumina. Se si desidera eseguire un aggiornamento manuale, assicurarsi di aver completato l'aggiornamento prima di preparare i campioni e i materiali di consumo per una corsa di sequenziamento.

Aggiornamento automatico del software

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
- 3 Selezionare **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Installare l'aggiornamento già scaricato da BaseSpace).
- 4 Selezionare **Update** (Aggiorna) per avviare l'aggiornamento. Si apre una finestra di dialogo di conferma del comando.
- 5 Attenersi alle istruzioni indicate nella procedura guidata all'installazione:
 - a Accettare il contratto di licenza.
 - b Rivedere le note sulla versione.
 - c Rivedere l'elenco di software inclusi nell'aggiornamento.

Al termine dell'aggiornamento, il software di controllo si riavvia automaticamente.



NOTA

Se è incluso un aggiornamento firmware, è richiesto un riavvio automatico dopo l'aggiornamento del firmware.

Aggiornamento manuale del software

- 1 Scaricare l'installer della System Suite dal sito Web Illumina e salvarlo in una posizione di rete. In alternativa, copiare il file di installazione del software su un dispositivo USB portatile.
- 2 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 3 Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
- 4 Selezionare **Manually install the update from the following location** (Installa manualmente l'aggiornamento dalla posizione seguente).
- 5 Selezionare **Browse** (Sfogliare) per andare alla posizione del file di installazione del software, quindi selezionare **Update** (Aggiorna).
- 6 Attenersi alle istruzioni indicate nella procedura guidata all'installazione:
 - a Accettare il contratto di licenza.
 - b Rivedere le note sulla versione.
 - c Rivedere l'elenco di software inclusi nell'aggiornamento.

Al termine dell'aggiornamento, il software di controllo si riavvia automaticamente.



NOTA

Se è incluso un aggiornamento firmware, è richiesto un riavvio automatico dopo l'aggiornamento del firmware.

Spegnimento dello strumento

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Shutdown Options** (Opzioni di spegnimento).
- 3 Selezionare **Shutdown** (Spegni).

Il comando Shut Down (Spegni) spegne in sicurezza il software e spegne lo strumento. Attendere almeno 60 secondi prima di accendere nuovamente lo strumento.



ATTENZIONE

Non riposizionare lo strumento. Uno spostamento dello strumento non eseguito nel modo appropriato può incidere sull'allineamento ottico e compromettere l'integrità dei dati. Nel caso sia necessario spostare lo strumento, rivolgersi al rappresentante Illumina.

Appendice A Risoluzione dei problemi

Introduzione	34
File di risoluzione dei problemi	34
Risoluzione degli errori della verifica automatica	35
Contenitore dei reagenti usati pieno	36
Flusso di lavoro di reibridazione	37
Ricette personalizzate e cartelle delle ricette	39
Verifica del sistema	39
Messaggio di errore RAID	41
Errore di archiviazione sulla rete	41
Configurazione delle impostazioni del sistema	42

Introduzione

Per eventuali domande tecniche, visitare le pagine di supporto di NextSeq 500 sul sito Web Illumina. Le pagine di supporto forniscono l'accesso a documentazione, download e domande frequenti.

Eseguire l'accesso all'account MyIllumina per accedere ai bollettini di supporto.

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Vedere *Assistenza Tecnica a pagina 58*.

Prendere in considerazione la possibilità di condividere un link al riepilogo corsa in BaseSpace Sequence Hub con l'Assistenza Tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi. È possibile collaborare alla risoluzione dei problemi quando il servizio di monitoraggio proattivo è attivo. Per ulteriori informazioni sul servizio, vedere *Impostazione dell'opzione per l'invio dei dati delle prestazioni dello strumento a pagina 11*.

File di risoluzione dei problemi

Un rappresentante dell'Assistenza Tecnica Illumina può richiedere copie dei file specifici della corsa o della scansione per risolvere il problema. Di solito, i file seguenti sono utilizzati per la risoluzione dei problemi. I file si trovano in cartelle specifiche per la corsa della cartella di output.

File principale	Sottocartella	Descrizione
File informazioni corsa (RunInfo.xml)	<Nome cartella corsa>	Contiene le informazioni seguenti: <ul style="list-style-type: none">• Nome della corsa• Numero di cicli per la corsa• Numero di cicli in ciascuna lettura• Se la lettura è una lettura indicizzata• Numero di strisce e tile sulla cella a flusso
File parametri della corsa (RunParameters.xml)	<Nome cartella corsa>	Contiene le informazioni relative ai parametri della corsa e ai componenti della corsa. Le informazioni comprendono l'etichetta RFID, il numero di serie, il numero di parte e la data di scadenza.
File configurazione RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Contiene le impostazioni della configurazione di RTA per la corsa. Il file RTAConfiguration.xml viene creato all'inizio della corsa.
File InterOp (*.bin)	InterOp	File report binari utilizzati per il Visualizzatore analisi di sequenziamento. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.

File principale	Sottocartella	Descrizione
File di registro	Logs	I file di registro descrivono ciascuna fase eseguita dallo strumento per ciascun ciclo ed elenca le versioni software e firmware usate per la corsa. Il file denominato [Nomestrumento]_Hardwareattuale.csv elenca i numeri di serie dei componenti dello strumento.
File registro errori (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs	Registro degli errori di RTA. I file registro errori sono aggiornati ogni volta che si verifica un errore.
File registro globale (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs	Registro di tutti gli eventi RTA. I file registro globale sono aggiornati durante tutta la corsa.
File registro corsia (*LaneLog*.txt)	RTA Logs	Registro degli eventi di elaborazione di RTA. I file registro corsia sono aggiornati durante tutta la corsa.

Errori di RTA

Per risolvere gli errori di RTA, controllare prima il registro degli errori di RTA, che è archiviato nella cartella RTALogs. Questo file non è presente per le corse prive di errori. I file si trovano in cartelle specifiche per la corsa della cartella di output. Includere il registro degli errori quando si comunicano i problemi all'Assistenza Tecnica Illumina.

Risoluzione degli errori della verifica automatica

Se si verificano errori durante la verifica automatica, utilizzare le azioni seguenti raccomandate per risolvere l'errore.

Le RFID della cella a flusso, della cartuccia di reagenti e della cartuccia di tamponi saranno bloccate durante l'inizializzazione del software di controllo che può essere necessaria per risolvere un errore. L'utente deve rimuovere la cella a flusso, la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi dallo strumento prima di riavviare il sistema. Inoltre, le RFID consumabili sono bloccate dopo la perforazione dei sigilli.

Verifiche del sistema	Intervento raccomandato
Doors closed (Sportelli chiusi)	Assicurarsi che gli sportelli dello scomparto siano chiusi.
Consumables loaded (Materiali di consumo caricati)	I sensori dei materiali di consumo non eseguono la registrazione. Assicurarsi che ogni materiale di consumo sia caricato correttamente. Sulle schermate per l'impostazione della corsa, selezionare Back (Indietro) per tornare alla fase di caricamento e ripetere l'impostazione della corsa.
Required software (Software richiesto)	Mancano componenti critici del software. Eseguire un aggiornamento manuale del software per ripristinare i componenti del software.
Instrument disk space (Spazio su disco dello strumento)	Il disco rigido dello strumento non ha spazio su disco sufficiente per eseguire una corsa. I dati di una corsa precedente potrebbero non essere stati trasferiti. Liberare i dati della corsa dal disco rigido dello strumento.
Network Connection (Connessione rete)	La connessione alla rete è stata interrotta. Verificare lo stato della rete e confermare la connessione fisica alla rete.
Network Disk Space (Spazio su disco della rete)	L'account BaseSpace è pieno o il server della rete è pieno.

Temperatura	Intervento raccomandato
Temperature (Temperatura)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Temperature sensors (Sensori della temperatura)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Fans (Ventole)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Sistema di imaging	Intervento raccomandato
Imaging Limits (Limiti di imaging)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Z Steps-and-Settle (Incremento e tempo transitorio del piano Z)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Bit error rate (Frequenza bit errore)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Flow Cell Registration (Registrazione cella a flusso)	<p>La cella a flusso potrebbe essere in posizione errata.</p> <ul style="list-style-type: none"> Sulle schermate per l'impostazione della corsa, selezionare Back (Indietro) per tornare alla fase della cella a flusso. Lo sportello dello scomparto di imaging si apre. Scaricare e ricaricare la cella a flusso per assicurarsi che sia posizionata correttamente.
Erogazione dei reagenti	Intervento raccomandato
Valve Response (Risposta valvola)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Pump (Pompa)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Buffer Mechanism (Meccanismo tampone)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Spent Reagents Empty (Vassoio reagenti usati vuoto)	Svuotare il contenitore dei reagenti usati e ricaricare il contenitore vuoto.

Contenitore dei reagenti usati pieno

Iniziare sempre una corsa con un contenitore dei reagenti usati vuoto.

Se si inizia una corsa senza svuotare il contenitore dei reagenti usati, i sensori del sistema indicano al software di mettere in pausa la corsa quando il contenitore è pieno. I sensori del sistema non possono mettere in pausa una corsa durante la generazione di cluster, la risintesi paired-end o un lavaggio post-corsa automatico.

Quando la corsa è in pausa, si apre una finestra di dialogo con le opzioni per sollevare i pescanti e svuotare il contenitore pieno.

Svuotamento del contenitore dei reagenti usati

- 1 Selezionare **Raise Sippers** (Solleva pescanti).
- 2 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in modo appropriato.
- 3 Rimettere il contenitore vuoto nello scomparto tamponi.
- 4 Selezionare **Continue** (Continua). La corsa riprende automaticamente.

Flusso di lavoro di reibridazione

Potrebbe essere necessario eseguire una corsa di reibridazione nel caso in cui le metriche generate durante i primi pochi cicli mostrano intensità inferiori a 2.500. Alcune librerie a bassa diversità possono mostrare intensità inferiori a 1.000, il che è previsto e non può essere risolto con la reibridazione.



NOTA

Il comando End Run (Termina corsa) è definitivo. La corsa non può essere ripresa, i materiali di consumo della corsa non possono essere riutilizzati e i dati di sequenziamento della corsa non sono salvati.

Quando viene terminata una corsa, il software esegue i passaggi seguenti prima di terminare la corsa:

- ▶ Pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- ▶ Sblocca l'etichetta RFID della cella a flusso per una corsa successiva.
- ▶ Assegna alla cella a flusso una data di scadenza per la reibridazione.
- ▶ Scrive i registri della corsa per i cicli completati. Un ritardo è normale.
- ▶ Bypassa il lavaggio post-corsa automatico.

Quando viene avviata una corsa di reibridazione, il software esegue i seguenti passaggi prima di eseguire la corsa:

- ▶ Crea una cartella per la corsa in base a un nome univoco per la corsa.
- ▶ Verifica che la data della cella a flusso per la reibridazione non sia scaduta.
- ▶ Esegue il priming dei reagenti. Un ritardo è normale.
- ▶ Salta il passaggio di generazione di cluster.
- ▶ Rimuove il primer Read 1 (Lettura 1) precedente.
- ▶ Ibridizza un primer Read 1 (Lettura 1) fresco.
- ▶ Prosegue con Read 1 (Lettura 1) e il resto della corsa in base ai parametri specificati della corsa.

Momenti in cui terminare una corsa per la reibridazione

La reibridazione successiva è possibile solo se si termina la corsa nei seguenti momenti:

- ▶ **Dopo il ciclo 5:** le intensità appaiono dopo la registrazione della griglia, che richiede i primi cinque cicli di sequenziamento. Sebbene sia sicuro terminare una corsa dopo il ciclo 1, si raccomanda di terminare una corsa dopo il ciclo 5. Non terminare una corsa durante la generazione di cluster.
- ▶ **Read 1 (Lettura 1) o Index 1 Read (Lettura indice 1):** terminare la corsa *prima* dell'avvio della risintesi paired-end. La cella a flusso non può essere salvata per la successiva reibridazione dopo l'avvio della risintesi paired-end.

Materiali di consumo richiesti

Una corsa di reibridazione richiede una nuova cartuccia di reagenti e una nuova cartuccia di tamponi NextSeq indipendentemente da quando è stata arrestata la corsa.

Terminazione della corsa attuale

- 1 Selezionare **End Run** (Termina corsa). Quando richiesto di confermare il comando, selezionare **Yes (Sì)**.
- 2 Quando richiesto di salvare la cella a flusso, selezionare **Yes (Sì)**. Il salvataggio della cella a flusso non assicura che l'attuale corsa possa essere salvata. Annotare la data di scadenza per la reibridazione.

- 3 Rimuovere la cella a flusso salvata e metterla da parte a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a quando si è pronti a impostare la corsa di reibridazione.



NOTA

È possibile conservare la cella a flusso fino a sette giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C nella confezione in plastica trasparente a forma di conchiglia **senza** la confezione essiccante. Per ottenere i risultati migliori, reibridare la cella a flusso salvata entro tre giorni.

Esecuzione di un lavaggio manuale

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio).
- 2 Dalla schermata Wash Selection (Selezione lavaggio), selezionare **Manual Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa manuale). Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale a pagina 27*.



NOTA

Se la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi non sono state rimosse dalla corsa arrestata, utilizzarle per il lavaggio manuale. Altrimenti, eseguire il lavaggio manuale con la cartuccia di reagenti di lavaggio e la cartuccia di tamponi di lavaggio.

Impostazione di una nuova corsa in BaseSpace Sequence Hub

- 1 Se si sta utilizzando BaseSpace Sequence Hub, impostare una nuova corsa utilizzando gli stessi parametri della corsa originale.



PUNTA

Fare clic sulla scheda Pools (Raggruppamento in pool), selezionare l'ID del raggruppamento in pool appropriato per mantenere le impostazioni della corsa precedente e quindi assegnare un nome univoco alla nuova corsa.

Impostazione di una corsa sullo strumento

- 1 Preparare una nuova cartuccia di reagenti.
- 2 Se la cella a flusso salvata è stata conservata, permettere alla cella a flusso di raggiungere la temperatura ambiente (15-30 minuti).
- 3 Pulire e caricare la cella a flusso salvata.
- 4 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in modo appropriato, quindi ricaricare il contenitore vuoto.
- 5 Nella schermata per l'impostazione della corsa, selezionare una delle modalità seguenti.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Manuale
- 6 **[Facoltativo]** Selezionare **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usa impostazione di BaseSpace Sequence Hub) e poi una delle opzioni seguenti.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Monitoraggio e archiviazione della corsa)
 - ▶ Run Monitoring Only (Solo monitoraggio della corsa)Immettere il nome utente e la password per BaseSpace Sequence Hub.
- 7 Caricare la cartuccia di tamponi e la cartuccia di reagenti nuove.
- 8 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere alla verifica pre-corsa e avviare la corsa.

Ricette personalizzate e cartelle delle ricette

Non modificare le ricette originali. Fare sempre una copia della ricetta originale assegnandole un nuovo nome. Se una ricetta originale è stata modificata, il programma di aggiornamento software non riconosce più la ricetta per gli ultimi aggiornamenti e le nuove versioni non vengono installate.

Archiviare le ricette personalizzate nella cartella delle ricette appropriata. Le cartelle delle ricette sono organizzate nel modo seguente.

- Custom** (Personalizzato)
 - High** (Elevato): ricette personalizzate usate con High Output Kit.
 - Mid** (Medio): ricette personalizzate usate con Mid Output Kit.
- High** (Elevato): ricette originali usate con High Output Kit.
- Mid** (Medio): ricette originali usate con Mid Output Kit.
- Wash** (Lavaggio): contiene la ricetta per il lavaggio manuale.

Verifica del sistema

Una verifica del sistema non è necessaria per il normale funzionamento o per la manutenzione dello strumento. Tuttavia, un rappresentante dell'Assistenza Tecnica Illumina potrebbe richiedere di eseguire una verifica del sistema per la risoluzione dei problemi.



NOTA

Se deve essere eseguito un lavaggio dello strumento, eseguire il lavaggio prima di avviare la verifica del sistema.

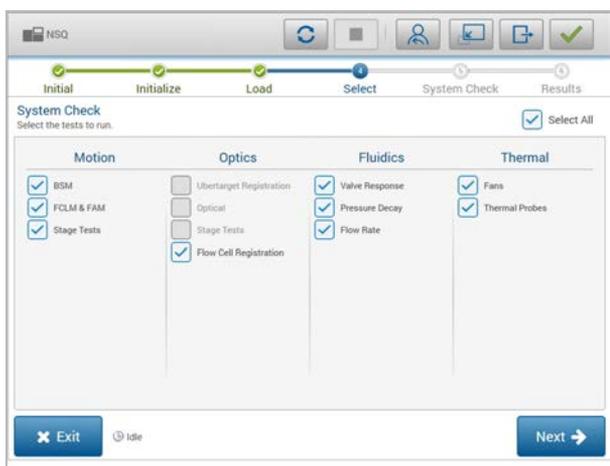
L'avvio di una verifica del sistema chiude automaticamente il software di controllo e lancia NextSeq Service Software (NSS). Il software di servizio si avvia e si apre una pagina di login. Utilizzare qualsiasi nome utente e password di Local Run Manager (livello amministratore o utente) per accedere a NSS. Dopo l'autenticazione, si apre la schermata Load (Carica) di NSS, configurata per usare l'opzione avanzata di caricamento.



NOTA

Per accedere al software di servizio prima che venga visualizzata la schermata di caricamento, utilizzare le credenziali dell'utente amministratore di Local Run Manager.

Figura 23 Verifiche del sistema disponibili



Le caselle di controllo inattive sulla schermata Select (Seleziona) indicano i test che richiedono l'assistenza da parte di un rappresentante dell'assistenza Illumina.

Esecuzione di una verifica del sistema

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Check** (Verifica sistema). Quando richiesto di chiudere il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì).
 - 2 Caricare i materiali di consumo nel modo seguente:
 - a Se una cella a flusso usata non è già sullo strumento, caricare una cella a flusso usata.
- 

NOTA

Illumina raccomanda l'utilizzo di una cella a flusso a output elevato per la verifica del sistema.
- b Svuotare il contenitore dei reagenti usati e rimetterlo sullo strumento.
 - c Caricare la cartuccia di tamponi di lavaggio contenente 120 ml di acqua da laboratorio nel serbatoio centrale.
 - d Caricare la cartuccia di reagenti di lavaggio. Assicurarsi che la cartuccia di reagenti di lavaggio sia vuota e pulita.
 - 3 Selezionare **Load** (Carica). Il software sposta in posizione la cella a flusso e la cartuccia di reagenti di lavaggio. Selezionare **Next** (Avanti).
 - 4 Selezionare **Next** (Avanti). Viene avviata la verifica del sistema.
 - 5 **[Facoltativo]** Al termine della verifica del sistema, selezionare **View** (Visualizza) accanto al nome della verifica per visualizzare i valori associati a ciascuna verifica.
 - 6 Selezionare **Next** (Avanti). Si apre il report della verifica del sistema.
 - 7 Selezionare **Save** (Salva) per salvare il report in formato zip. Andare alla posizione di rete in cui salvare il file.
 - 8 Una volta terminato, selezionare **Exit** (Esci).
 - 9 Quando richiesto di chiudere il software di controllo e di riavviare il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì). Il software di controllo si riavvia automaticamente.

Verifiche del movimento

Verifica del sistema	Descrizione
BSM	Verifica il guadagno e la distanza del meccanismo di prelievo dal tampone (Buffer Straw Mechanism - BSM) per confermare il corretto funzionamento del modulo.
FCLM & FAM	Verifica il guadagno e la resistenza del meccanismo di caricamento della cella a flusso (Flow Cell Load Mechanism - FCLM) e del modulo di automazione della fluidica (Fluid Automation Module - FAM) per confermare che i moduli funzionano correttamente.
Stage Tests (Test del piano)	Verifica i limiti e le prestazioni di spostamento del piano XY e dei sei piani Z, uno per ciascuna videocamera.

Verifica del modulo ottica

Verifica del sistema	Descrizione
Flow Cell Registration (Registrazione cella a flusso)	Misura il tilt della cella a flusso sul piano ottico, verifica la funzionalità della videocamera, verifica il modulo di imaging e verifica che la registrazione della cella flusso sia nella posizione di imaging corretta.

Verifiche della fluidica

Verifica del sistema	Descrizione
Valve Response (Risposta valvola)	Verifica l'accuratezza dei movimenti della pompa e della valvola e verifica l'intervallo di movimento della siringa della pompa.
Pressure Decay (Riduzione pressione)	Verifica la portata delle perdite di un sistema di fluidica sigillato, che conferma che la cella a flusso è montata correttamente nella posizione di sequenziamento.
Flow Rate (Portata)	Verifica la funzionalità dei sensori delle bolle d'aria, che sono utilizzati per rilevare la presenza di aria nelle linee dei reagenti. Misura le portate per verificare la presenza di occlusioni o perdite.

Verifiche termiche

Verifica del sistema	Descrizione
Fans (Ventole)	Verifica la velocità del sistema delle ventole in impulsi per minuto (Pulse Per Minute, PPM) per confermare il funzionamento delle ventole. Le ventole che non funzionano forniscono un valore negativo.
Thermal Probes (Sonde termiche)	Verifica la temperatura media di ciascun sensore termico. I sensori termici che non funzionano forniscono un valore negativo.

Messaggio di errore RAID

Il computer di NextSeq è dotato di due dischi rigidi. Se un disco rigido inizia a non funzionare, il sistema genera un messaggio di errore RAID e suggerisce di contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Di solito, è richiesta la sostituzione del disco rigido.

È possibile proseguire con le fasi d'impostazione della corsa e di funzionamento normale. Lo scopo del messaggio è quello di programmare in anticipo un intervento di assistenza per evitare interruzioni durante il funzionamento normale dello strumento. Per proseguire, selezionare **Acknowledge** (Accetta), quindi **Close** (Chiudi).

Errore di archiviazione sulla rete

Gli errori di archiviazione sulla rete sono causati da una delle seguenti ragioni:

- ▶ **Spazio di archiviazione insufficiente per la cartella di output:** aumentare la quantità di spazio sul dispositivo di archiviazione o spostare la cartella di output in una posizione dotata di spazio di archiviazione sufficiente.
- ▶ **Impossibile collegarsi all'archiviazione di rete:** controllare il percorso alla cartella di output. Vedere *Impostazione della posizione di Output Folder (Cartella di output)* a pagina 44.

- ▶ **Il sistema non è in grado di scrivere nell'archiviazione di rete:** rivolgersi all'amministratore informatico per controllare i privilegi. L'account di Windows sul sistema operativo dello strumento richiede il privilegio di lettura e scrittura per la cartella di output.

Anche l'account di Windows in Local Run Manager richiede il privilegio di lettura e scrittura per la cartella di output. Vedere la sezione *Specify Service Account Settings* in *Local Run Manager Software Guide* (documento n. 1000000002702) ("Configurazione delle impostazioni dell'account dei servizi" nella Guida del software Local Run Manager).

Configurazione delle impostazioni del sistema

Il sistema viene configurato durante l'installazione. Tuttavia, se è richiesta una modifica o se il sistema deve essere riconfigurato, utilizzare le opzioni di configurazione del sistema.

- ▶ **Network Configuration** (Configurazione della rete): fornisce le opzioni per le impostazioni relative a indirizzo IP, indirizzo del server di nomi di dominio (Domain Name Server, DNS), nome del computer e nome del dominio.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub:** se BaseSpace Sequence Hub è in uso, fornisce le opzioni di posizione in cui i dati vengono trasferiti per l'archiviazione e l'analisi.
- ▶ **Output Folder Location** (Posizione della cartella di output): fornisce le opzioni di percorso alla cartella di output.

Impostazione della configurazione della rete

- 1 Nella schermata **Manage Instrument** (Gestione strumento), selezionare **System configuration** (Configurazione sistema).
- 2 Selezionare **Network Configuration** (Configurazione della rete).
- 3 Selezionare **Obtain an IP address automatically** (Ottieni un indirizzo IP automaticamente) per ottenere l'indirizzo IP usando il server DHCP.



NOTA

Il protocollo DHCP è un protocollo di rete standard utilizzato sulle reti IP per distribuire dinamicamente i parametri di configurazione della rete.

Altrimenti, selezionare **Use the following IP address** (Usa l'indirizzo IP seguente) per collegare lo strumento a un altro server manualmente nel modo seguente. Contattare l'amministratore della rete per ottenere gli indirizzi specifici per la struttura.

- ▶ Immettere l'indirizzo IP. L'indirizzo IP è una serie di quattro cifre separata da un punto. Ad esempio, 168.62.20.37.
 - ▶ Immettere la maschera di sottorete, che è una sottodivisione della rete IP.
 - ▶ Immettere il gateway predefinito, che è un router sulla rete che collega a Internet.
- 4 Selezionare **Obtain a DNS server address automatically** (Ottieni un indirizzo DNS automaticamente) per collegare lo strumento al server di nomi di dominio associato con l'indirizzo IP.
In alternativa, selezionare **Use the following DNS server addresses** (Usa gli indirizzi del server DNS seguenti) per collegare manualmente lo strumento a un altro server del nome di dominio nel modo seguente.
 - ▶ Immettere l'indirizzo DNS prescelto. L'indirizzo DNS è il nome del server usato per tradurre i nomi di dominio in indirizzi IP.
 - ▶ Immettere l'indirizzo DNS alternativo. L'indirizzo alternativo è usato se il DNS prescelto non è in grado di tradurre un determinato nome di dominio in un indirizzo IP.

- 5 Selezionare **Save** (Salva) per passare alla schermata Computer (Computer).

**NOTA**

Il nome del computer dello strumento è il nome assegnato al computer dello strumento al momento della fabbricazione. Qualsiasi modifica al nome del computer può incidere sulla connettività e richiede un amministratore di rete.

- 6 Collegare il computer dello strumento a un dominio o a un gruppo di lavoro nel modo seguente.
 - ▶ **Per gli strumenti collegati a Internet:** selezionare **Member of domain** (Membro del dominio) e immettere il nome del dominio associato con la connessione Internet presso la sede. Le modifiche al dominio richiedono il nome utente e la password di amministratore.
 - ▶ **Per gli strumenti non collegati a Internet:** selezionare **Member of work group** (Membro del gruppo di lavoro) e immettere il nome di un gruppo di lavoro. Il nome del gruppo di lavoro è univoco per la struttura.
- 7 Selezionare **Save** (Salva).

Impostazione della configurazione di BaseSpace

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Configuration** (Configurazione sistema).
- 3 Selezionare **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Configurazione di BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Selezionare una delle opzioni seguenti per indicare una posizione in cui trasferire i dati per l'analisi.
 - ▶ Dall'elenco **Hosting Location** (Posizione host), selezionare la posizione del server in cui caricare i dati.
 - ▶ Se si dispone di un abbonamento Enterprise, selezionare la casella di controllo **Private Domain** (Dominio privato) e immettere il nome del dominio (URL) utilizzato per l'identificazione unica (Single sign-on, SSO) su BaseSpace Sequence Hub.
Ad esempio: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
- 5 Selezionare **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina) per attivare il servizio di monitoraggio proattivo Illumina. In base alla versione di NCS in uso, il nome di questa impostazione nell'interfaccia del software potrebbe essere diverso dal nome presente in questa guida.
L'attivazione di questa impostazione consente di inviare a Illumina i dati delle prestazioni dello strumento. Questi dati consentono a Illumina di risolvere facilmente eventuali problemi, di rilevare possibili malfunzionamenti, di eseguire una manutenzione proattiva e di massimizzare il tempo di funzionamento dello strumento. Per maggiori informazioni sui vantaggi di questo servizio, vedere *Nota tecnica sul servizio Illumina Proactive (documento n. 1000000052503)*.
Questo servizio:
 - ▶ Non invia i dati del sequenziamento.
 - ▶ Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet.
 - ▶ Sia attivato per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, disattivare l'opzione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina).
- 6 Selezionare **Save** (Salva).

Impostazione della posizione di Output Folder (Cartella di output)

NextSeq richiede una cartella di output per tutte le corse. Utilizzare il percorso Universal Naming Convention (UNC) per la cartella di output. Un percorso UNC include barre rovesciate (backslash), il nome del server e la directory, ma **non** una lettera per un disco di rete mappato.

- ▶ I percorsi alla cartella di output su un livello richiedono un backslash.
 - ▶ Esempio di percorso UNC: \\servername\directory1\
- ▶ I percorsi alla cartella di output su uno o più livelli non richiedono un backslash.
 - ▶ Esempio di percorso UNC: \\servername\directory1\directory2
- ▶ I percorsi a un'unità di rete mappata creano errori. **Non usarli.**
 - ▶ Esempio di percorso a un'unità di rete mappata: T:\sbsfiles

Per la modalità della corsa Local Run Manager, impostare la posizione della cartella di output nel software Local Run Manager. Per maggiori informazioni, vedere la *Local Run Manager Software Guide* (documento n. 100000002702) (Guida del software Local Run Manager).

Appendice B Real-Time Analysis

Descrizione generale di Real-Time Analysis	45
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	46
File di output del sequenziamento	50
Tile della cella a flusso	50
Struttura della cartella di output	54

Descrizione generale di Real-Time Analysis

NextSeq 500 utilizza un'implementazione del software Real-Time Analysis (RTA) denominata RTA2. RTA2 viene eseguito sul computer dello strumento ed estrae le intensità dalle immagini, esegue l'identificazione delle basi e assegna punteggi qualitativi all'identificazione delle basi. RTA2 e il software di controllo comunicano mediante un'interfaccia HTTP sul Web e condividono file di memoria. Se RTA2 viene terminato, l'elaborazione non riprende e i dati della corsa non vengono salvati.



NOTA

Le prestazioni di demultiplex non vengono calcolate. Quindi, la scheda Index (Indice) del Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) non viene popolata.

Input di RTA2

RTA2 richiede i seguenti input per l'elaborazione:

- ▶ Le immagini delle tile contenute nella memoria locale del sistema.
- ▶ **RunInfo.xml**, che il software di controllo genera automaticamente all'inizio della corsa. Il file contiene le seguenti informazioni.
 - ▶ Nome della corsa
 - ▶ Numero di cicli
 - ▶ Se la lettura è indicizzata
 - ▶ Numero di tile sulla cella a flusso
- ▶ **RTA.exe.config**, ossia un file di configurazione software in formato XML.

RTA2 riceve i comandi dal software di controllo sulla posizione del file **RunInfo.xml** e se è stata specificata una cartella di output facoltativa.

File di output di RTA v2

Le immagini per ciascun canale sono passate in memoria come tile. Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso definite come il campo visivo della videocamera. In base a queste immagini, il software produce output sotto forma di un set di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate e di file filtro. Tutti gli altri file sono file di output di supporto.

Tipo di file	Descrizione
File di identificazione delle basi (*.bcl)	Ciascuna tile analizzata viene inclusa in un file aggregato di identificazione delle basi per ciascuna corsia e per ciascun ciclo. Il file aggregato di identificazione delle basi contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato per ogni cluster in quella corsia.
File filtro (*.filter)	Ciascuna tile produce informazioni sul filtro che vengono aggregate in un file filtro per ciascuna corsia. I file filtro specificano se un cluster attraversa i filtri.

Tipo di file	Descrizione
File posizione cluster (*.locs)	I file posizione cluster contengono le coordinate X, Y per ciascun cluster in una tile. Un file posizione cluster viene generato per ciascuna corsia durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
File indice identificazione delle basi (*.bci)	Un file indice identificazione delle basi viene generato per ciascuna corsia per preservare le informazioni originali della tile. Il file indice contiene una coppia di valori per ciascuna tile, ossia il numero di tile e il numero di cluster per quella tile.

I file di output sono utilizzati per l'analisi a valle in BaseSpace. In alternativa, utilizzare il software di conversione bcl2fastq per la conversione FASTQ e soluzioni di analisi di terze parti. I file NextSeq richiedono bcl2fastq v2.0 o versione successiva. Per la versione più recente di bcl2fastq, visitare la pagina di [download di NextSeq](#) sul sito Web Illumina.

RTA v2 fornisce metriche in tempo reale sulla qualità della corsa archiviate come file InterOp. I file InterOp sono file di output binari che contengono tile, ciclo e metriche a livello di lettura e sono richiesti per visualizzare le metriche in tempo reale utilizzando il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV). Per la versione più recente di SAV, visitare la [pagina di download di SAV](#) sul sito Web Illumina.

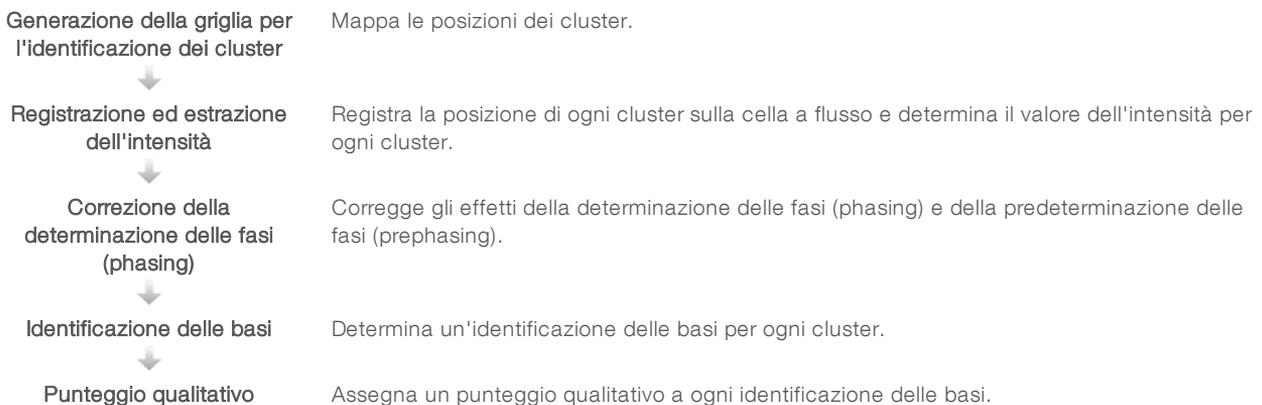
Gestione degli errori

RTA2 crea file di registro e li scrive nella cartella RTALogs. Gli errori vengono registrati in un file di errori nel formato file *.tsv.

I seguenti file di registro e di errori sono trasferiti alla destinazione di output finale al termine dell'elaborazione:

- ▶ *GlobalLog*.tsv riassume importanti eventi della corsa.
- ▶ *LaneNLog*.tsv elenca gli eventi di elaborazione per ciascuna corsia.
- ▶ *Error*.tsv elenca gli errori che si sono verificati durante una corsa.
- ▶ *WarningLog*.tsv elenca gli avvertimenti che si sono verificati durante una corsa.

Flusso di lavoro di Real-Time Analysis



Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

Il primo passaggio del flusso di lavoro RTA è la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, che definisce la posizione di ciascun cluster in una tile usando le coordinate X e Y.

La generazione della griglia per l'identificazione dei cluster richiede i dati dell'immagine ottenuti dai primi cinque cicli della corsa. Dopo che l'ultimo ciclo della griglia per una tile è stato sottoposto a imaging, viene generata la griglia.



NOTA

Per rilevare un cluster durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, deve essere presente almeno una base che non sia G nei primi **cinque** cicli. Per qualsiasi sequenza indicizzata, RTA v2 richiede almeno una base che non sia G nei primi **due** cicli.

La griglia è utilizzata come un riferimento per la fase successiva di registrazione ed estrazione dell'intensità. Le posizioni dei cluster per l'intera cella a flusso sono scritti nei file di posizione dei cluster (*.locs), uno per ciascuna corsia.

Registrazione ed estrazione dell'intensità

La registrazione e l'estrazione dell'intensità vengono avviate dopo la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.

- ▶ La registrazione allinea le immagini prodotte su ogni ciclo successivo di immagini rispetto alla griglia.
- ▶ L'estrazione dell'intensità determina un valore di intensità per ciascun cluster nella griglia per una data immagine.

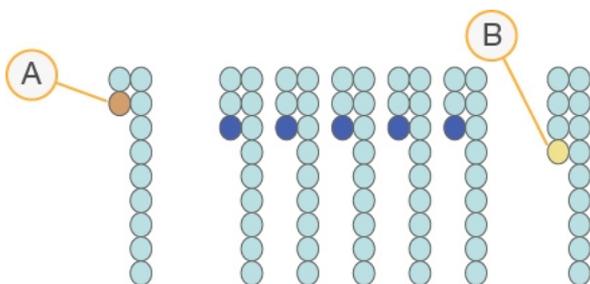
Se la registrazione non riesce per una qualsiasi immagine in un ciclo, non viene generata alcuna identificazione delle basi per quella tile in quel ciclo. Usare il software Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) per esaminare le immagini in miniatura e identificare le immagini la cui registrazione non è riuscita.

Correzione della determinazione delle fasi (phasing)

Durante la reazione di sequenziamento, ciascun filamento di DNA in un cluster si estende di una base per ciclo. La determinazione delle fasi (phasing) e la predeterminazione delle fasi (prephasing) si verificano quando un filamento fuoriesce dalla fase con il ciclo di incorporazione attuale.

- ▶ La determinazione delle fasi (phasing) si verifica quando una base rimane indietro.
- ▶ La predeterminazione delle fasi (prephasing) si verifica quando una base salta in avanti.

Figura 24 Determinazione delle fasi (phasing) e predeterminazione delle fasi (prephasing)



- A Lettura con una base nella determinazione delle fasi (phasing)
- B Lettura con una base nella predeterminazione delle fasi (prephasing)

RTA2 corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) che massimizza la qualità dei dati a ogni ciclo per tutta la corsa.

Identificazione delle basi

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ogni cluster di una data tile a un ciclo specifico. NextSeq 500Dx utilizza il sequenziamento a due canali, che richiede solo due immagini per codificare i dati per quattro basi di DNA, un'immagine dal canale rosso e un'immagine dal canale verde.

Le intensità estratte da un'immagine e confrontate con un'altra immagine forniscono quattro popolazioni distinte, ciascuna corrispondente a un nucleotide. Il processo di identificazione delle basi determina a quale popolazione appartiene ogni cluster.

Figura 25 Visualizzazione delle intensità dei cluster

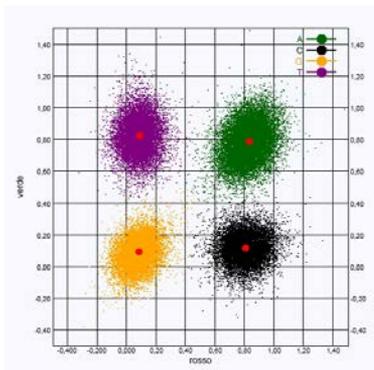


Tabella 1 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

Base	Canale rosso	Canale verde	Risultato
A	1 (on)	1 (on)	Cluster che mostrano intensità sia nel canale rosso che nel canale verde.
C	1 (on)	0 (off)	Cluster che mostrano intensità solo nel canale rosso.
G	0 (off)	0 (off)	I cluster che non mostrano intensità a una posizione cluster nota.
T	0 (off)	1 (on)	Cluster che mostrano intensità solo nel canale verde.

Cluster che attraversano il filtro

Durante la corsa, RTA2 filtra i dati non elaborati e rimuove le letture che non soddisfano la soglia per la qualità dei dati. I cluster sovrapposti o di bassa qualità vengono rimossi.

Per l'analisi a due canali, RTA2 utilizza un sistema basato sulla popolazione per determinare il valore chastity di un'identificazione delle basi. I cluster attraversano il filtro (PF) quando non più di un'identificazione delle basi nei primi 25 cicli presenta un valore chastity < 0,63. I cluster che non attraversano il filtro non sono identificati come basi.

Considerazioni sull'indicizzazione

La procedura di identificazione delle basi per le letture indici è diversa rispetto all'identificazione delle basi durante altre letture.

Le letture indici devono iniziare con almeno una base che non sia G in uno o nell'altro dei primi due cicli. Se Index Read (Lettura indici) inizia con due identificazioni delle basi di G, non viene generata alcuna intensità di segnale. Il segnale deve essere presente in entrambi i primi due cicli per assicurare prestazioni di demultiplex.

Per aumentare l'efficienza del demultiplex, selezionare le sequenze d'indice che forniscono segnale in almeno un canale, preferibilmente in entrambi i canali, per ogni ciclo. Attenendosi a queste linee guida si evitano combinazioni indici che risultano solo in basi G a qualsiasi ciclo.

- ▶ Canale rosso: A o C
- ▶ Canale verde: A o T

Questa procedura di identificazione delle basi assicura l'accuratezza quando si analizzano campioni con basso plex.

Punteggio qualitativo

Un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione della probabilità di un'identificazione delle basi errata. Un punteggio qualitativo superiore implica che un'identificazione delle basi presenta una qualità superiore ed è più probabile che sia corretta.

Il punteggio qualitativo permette di comunicare velocemente la probabilità di piccoli errori. Q(X) rappresenta i punteggi qualitativi, dove X è il punteggio. La tabella seguente illustra la relazione fra il punteggio qualitativo e la probabilità di errore.

Punteggio qualitativo Q(X)	Probabilità di errore
Q40	0,0001 (1 su 10.000)
Q30	0,001 (1 su 1.000)
Q20	0,01 (1 su 100)
Q10	0,1 (1 su 10)



NOTA

Il punteggio qualitativo si basa su una versione modificata dell'algoritmo Phred.

Il punteggio qualitativo calcola un set valori per ciascuna identificazione delle basi, quindi utilizza questi valori per individuare il punteggio qualitativo in una tabella qualitativa. Le tabelle qualitative sono create per fornire previsioni di qualità accurate e ottimali per le corse generate da una specifica configurazione di una piattaforma di sequenziamento e versione della chimica.

Dopo la determinazione del punteggio qualitativo, i risultati vengono registrati nei file di identificazione delle basi.

File di output del sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata è inclusa in un file di identificazione delle basi, aggregata in un file per ciascuna corsia, per ciascun ciclo. Il file aggregato contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato per ciascun cluster per quella corsia. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. [Ciclo].bcl.bgzf , dove [ciclo] rappresenta il numero del ciclo in formato a quattro cifre. I file di identificazione delle basi sono compressi usando gzip.
File indice identificazione delle basi	Per ciascuna corsia, un file indice binario elenca le informazioni originali della tile in una coppia di valori per ciascuna tile, che sono numero di tile e numero di cluster per la tile. I file indice individuazione delle basi sono creati la prima volta che un file di identificazione delle basi viene creato per quella corsia. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. s_[Corsia].bci
File posizione cluster	Per ciascuna tile, le coordinate XY per ciascun cluster sono aggregate in un file posizione cluster per ciascuna corsia. I file posizione cluster sono il risultato della generazione della griglia per l'identificazione dei cluster. Data\Intensities\L00[X] : i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. s_[corsia].locs
File filtro	I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. Le informazioni sui filtri sono aggregate in un file filtro per ogni corsia e lettura. I file filtro sono generati al ciclo 26 utilizzando 25 cicli di dati. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. s_[corsia].filter
File InterOp	File report binari utilizzati per il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV). I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa. Cartella InterOp
File configurazione RTA	Creati all'inizio di una corsa, i file configurazione RTA elencano le impostazioni per la corsa. <Nome cartella corsa>, RTAConfiguration.xml
File informazioni corsa	Elenca il nome della corsa, il numero di cicli in ciascuna lettura, se la lettura è una lettura indicizzata e il numero di strisce e tile sulla cella a flusso. Il file informazioni corsa viene creato all'inizio della corsa. <Nome cartella corsa>, RunInfo.xml
File immagini in miniatura	Un'immagine in miniatura per ciascun canale colore (rosso e verde) per le tile 1, 6 e 12 da tutte le videocamere, superficie superiore e inferiore a ogni ciclo durante l'imaging. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] : i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e una sottocartella per ciascun ciclo. s_[corsia]_[tile]_[canale].jpg : nel nome del file, la tile è rappresentata da un numero a cinque cifre che indica superficie, striscia, videocamera e tile. Per maggiori informazioni, vedere <i>Numerazione delle tile</i> a pagina 53 e <i>Assegnazione di un nome alle immagini in miniatura</i> a pagina 53.

Tile della cella a flusso

Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso definite come il campo visivo della videocamera. Il numero totale di tile dipende dal numero di corsie, strisce e superfici sottoposte a imaging sulla cella a flusso e da come le videocamere lavorano assieme per raccogliere le immagini.

- ▶ Le celle a flusso a output elevato dispongono di 864 tile.
- ▶ Le celle a flusso a output medio dispongono di 288 tile.

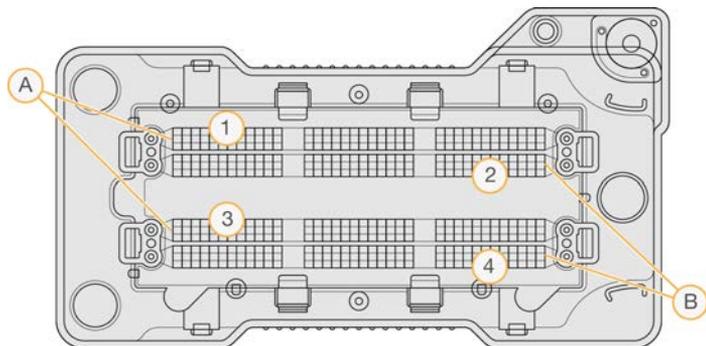
Tabella 2 Tile della cella a flusso

Componente della cella a flusso	Output elevato	Output medio	Descrizione
Corsie	4	4	Una corsia è un canale fisico con porte di ingresso e di uscita dedicate.
Superfici	2	2	La cella a flusso è sottoposta a imaging su due superfici: la superficie superiore e la superficie inferiore. La superficie superiore di una tile viene sottoposta a imaging, quindi la superficie inferiore della stessa tile viene sottoposta a imaging prima di passare alla tile successiva.
Strisce per corsia	3	1	Una striscia è una colonna di tile in una corsia.
Segmenti della videocamera	3	3	Lo strumento usa sei videocamere per sottoporre a imaging la cella a flusso in tre segmenti per ciascuna corsia.
Tile per striscia per segmento della videocamera	12	12	Una tile è un'area sulla cella a flusso che la videocamera visualizza come un'immagine.
Tile totali sottoposte a imaging	864	288	Il numero totale di tile corrisponde a corsie × superfici × strisce × segmenti della videocamera × tile per striscia per segmento.

Numerazione delle corsie

Le corsie 1 e 3, chiamate coppia corsie A, sono sottoposte a imaging contemporaneamente. Le corsie 2 e 4, chiamate coppia corsie B, sono sottoposte a imaging al completamento dell'imaging della coppia di corsie A.

Figura 26 Numerazione delle corsie

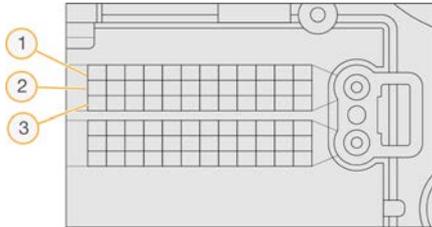


- A Coppia corsie A - corsie 1 e 3
- B Coppia corsie B - corsie 2 e 4

Numerazione delle strisce

Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in tre strisce. Le strisce sono numerate 1-3 per le celle a flusso a output elevato.

Figura 27 Numerazione delle strisce

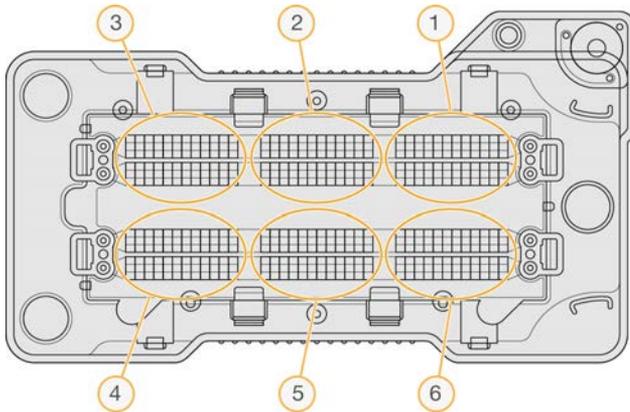


Numerazione delle videocamere

NextSeq 500 utilizza sei videocamere per sottoporre a imaging la cella a flusso.

Le videocamere sono numerate 1-6. Le videocamere 1-3 sottopongono a imaging la corsia 1. Le videocamere 4-6 sottopongono a imaging la corsia 3. Al termine dell'imaging delle corsie 1 e 3, il modulo di imaging si sposta sull'asse X e sottopone a imaging le corsie 2 e 4.

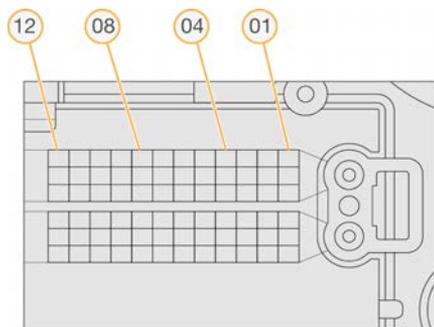
Figura 28 Numerazione delle videocamere e dei segmenti (è mostrata una cella a flusso High Output)



Numerazione delle tile

In ciascuna striscia sono presenti 12 tile per ciascun segmento della videocamera. Le tile sono numerate 01-12 (numero a due cifre) indipendentemente dal numero della striscia o dal segmento della videocamera.

Figura 29 Numerazione delle tile



Il numero completo della tile include cinque cifre che rappresentano la posizione, come indicato qui di seguito:

- ▶ **Superficie:** 1 rappresenta la superficie superiore; 2 rappresenta la superficie inferiore
- ▶ **Striscia:** 1, 2 o 3
- ▶ **Videocamera:** 1, 2, 3, 4, 5 o 6
- ▶ **Tile:** 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 o 12

Esempio: il numero di tile 12508 indica superficie superiore, striscia numero 2, videocamera numero 5 e tile numero 8.

Il numero di tile a cinque cifre completo è usato nel nome del file delle immagini in miniatura e nei file di determinazione delle fasi (phasing). Per maggiori informazioni, vedere *File di output del sequenziamento a pagina 50*.

Assegnazione di un nome alle immagini in miniatura

Un'immagine in miniatura per ciascun canale colore (rosso e verde) per le tile 1, 6 e 12 è generata da tutte le videocamere, superficie superiore e inferiore a ogni ciclo durante l'imaging. I file delle immagini in miniatura sono generati in formato file JPG.

A ciascuna immagine viene assegnato un nome con il numero di tile come indicato dalla convenzione seguente, che inizia sempre per **s_**:

- ▶ **Corsia:** 1, 2, 3 o 4
- ▶ **Tile:** numero della tile a cinque cifre, che indica superficie, striscia, videocamera e tile
- ▶ **Canale:** rosso o verde

Esempio: `s_3_12512_green.jpg` indica corsia numero 3, superficie superiore, striscia numero 2, videocamera numero 5, tile numero 12 e canale verde.

Struttura della cartella di output

Il software di controllo genera automaticamente il nome della cartella di output.

📁 Data

📁 Intensities

📁 BaseCalls

📁 L001: i file di identificazione delle basi per la corsia 1, aggregati in un file per ciclo.

📁 L002: i file di identificazione delle basi per la corsia 2, aggregati in un file per ciclo.

📁 L003: i file di identificazione delle basi per la corsia 3, aggregati in un file per ciclo.

📁 L004: i file di identificazione delle basi per la corsia 4, aggregati in un file per ciclo.

📁 L001: un file *.locs aggregato per la corsia 1.

📁 L002: un file *.locs aggregato per la corsia 2.

📁 L003: un file *.locs aggregato per la corsia 3.

📁 L004: un file *.locs aggregato per la corsia 4.

📁 Images

📁 Focus

📁 L001: le immagini di messa a fuoco per la corsia 1.

📁 L002: le immagini di messa a fuoco per la corsia 2.

📁 L003: le immagini di messa a fuoco per la corsia 3.

📁 L004: le immagini di messa a fuoco per la corsia 4.

📁 **InterOp**: i file binari usati dal Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV).

📁 **Logs**: i file di registro che descrivono le fasi operative.

📁 **Recipe**: il file della ricetta specifico per la corsa denominato con l'ID della cartuccia di reagenti.

📁 **RTALogs**: i file di registro che descrivono le fasi dell'analisi.

📁 **Thumbnail_Images**: le immagini in miniatura per le tile 1, 6 e 12 in ciascuna striscia a ciascun ciclo.

📄 RTAComplete.xml

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

Indice

A

- aggiornamento software 31
- aiuto
 - documentazione 1
- algoritmo Phred 49
- analisi
 - file output 50
 - opzioni 18
- analisi, primaria
 - purezza segnale 48
- assistenza clienti 58
- assistenza tecnica 58
- attraversano il filtro (PF) 48
- avvisi stato 4

B

- barra di stato 2
- BaseSpace Sequence Hub 1, 18
 - accesso 18, 38
 - configurazione 43
 - icone trasferimento 25

C

- cartella di output 18
- cartuccia reagenti
 - panoramica 7
 - preparazione 15
 - serbatoio n. 28 28
- cartuccia tamponi 8, 22
- cella a flusso
 - confezione 16
 - coppia corsie 6
 - imaging 52
 - nome file immagine 53
 - numerazione corsia 51
 - numerazione tile 53
 - numero striscia 52
 - panoramica 6
 - perni allineamento 20
 - pulizia 16
 - reibridazione 37
 - tile 50
 - tipi 1
- cicli in una lettura 15
- cluster che attraversano il filtro 48

- compatibilità
 - monitoraggio RFID 7
- componenti
 - barra di stato 2
 - scomparto buffer 2
 - scomparto di imaging 2
 - scomparto filtro dell'aria 2
 - scomparto reagenti 2
- considerazioni sull'indicizzazione 48
- coppie corsie 51
- corse
 - creazione 15
- creazione di una corsa 15

D

- determinazione fasi (phasing) 47
- documentazione 1, 58
- durata della corsa 14

E

- errore di archiviazione sulla rete 41
- errori
 - probabilità 49
- errori e avvertenze 4
- errori verifica pre-corsa 35

F

- file filtro 50
- file identificazione delle basi 50
- file InterOp 34, 50
- file locs 50
- file output 50
- file output, sequenziamento 50
- filtro chastity 48
- filtro dell'aria 30
- flusso di lavoro
 - accesso a BaseSpace Sequence Hub 18, 38
 - cartuccia reagenti 15, 22
 - cartuccia tamponi 22
 - cella a flusso 20
 - considerazioni sull'indicizzazione 48
 - durata della corsa 14
 - ipoclorito di sodio 28
 - Local Run Manager 18
 - metriche corsa 24
 - modalità Local Run Manager 19

- modalità manuale 19
- NCS 18
- opzione avanzata caricamento 11
- preparazione cella a flusso 16
- reagenti usati 21
- sequenziamento 46
- sportello scomparto cella a flusso 17
- verifica pre-corsa 23
- flusso di lavoro di sequenziamento 46
- formammide, posizione n. 6 23
- formazione online 1

G

- generazione griglia 47
- gestione strumento
 - spegnimento 33
- guida, tecnica 58

I

- icone
 - errori e avvertenze 4
 - riduzione a icona di NCS 4
 - stato 4
- identificazione delle basi 48
 - considerazioni sull'indicizzazione 48
- imaging, sequenziamento a due canali 48
- immagini in miniatura 50
- impostazione corsa, opzione avanzata 11
- impostazioni configurazione 42
- intensità 48
- ipoclorito di sodio, lavaggio 28

L

- lavaggio
 - automatico 26
 - componenti lavaggio 27
 - lavaggio manuale 27
 - materiali di consumo forniti dall'utente 27
- lavaggio post-corsa 26
- lavaggio strumento 27
- linee guida acqua da laboratorio 13
- Local Run Manager 19
 - creazione di una corsa 15
 - moduli 18
- lunghezza lettura 14-15

M

- manutenzione preventiva 27
- manutenzione strumento
 - materiali di consumo 12
- manutenzione, preventiva 27
- materiali di consumo
 - acqua da laboratorio 13
 - cartuccia reagenti 7
 - cartuccia tamponi 8
 - cella a flusso 6
 - corse di sequenziamento 12
 - manutenzione strumento 12
 - materiali di consumo lavaggio 27-28
- materiali di consumo forniti dall'utente 12
- Messaggio di errore RAID 41
- metriche
 - cicli densità cluster 25
 - cicli intensità 25
 - identificazione delle basi 48
- metriche corsa 24
- modalità corsa
 - Local Run Manager 18
 - manuale 18-19
- modalità manuale
 - creazione di una corsa 15
- moduli, Local Run Manager 18

N

- nome utente e password utente 9
- nome utente e password utente sistema 9
- numerazione corsia 51
- numerazione striscia 52
- numerazione tile 53
- numerazione videocamere 52

O

- opzione avanzata caricamento 11

P

- parametri corsa
 - modalità Local Run Manager 19
 - modalità manuale 19
 - modifica parametri 19
- posizione cartella 19
- posizione cluster
 - file 50

- generazione griglia 47
- predeterminazione fasi (prephasing) 47
- pulsante alimentazione 9
- pulsante di alimentazione 5, 9
- punteggi qualitativi 49

R

- reagenti
 - smaltimento corretto 22
- reagenti usati
 - contenitore pieno 36
 - smaltimento 21, 29
- reibridazione primer 37
- reibridazione, Read 1 (Lettura 1) 37
- risoluzione dei problemi
 - contenitore reagenti pieno 36
 - file specifici per la corsa 34
 - metriche bassa qualità 37
 - opzioni di contatto 34
 - verifica pre-corsa 35
 - verifica sistema 39
- RTA v2
 - terminazione 45
- RTAv2
 - descrizione generale 45
- RunInfo.xml 34, 50

S

- scomparto buffer 2
- scomparto del filtro dell'aria 3
- scomparto di imaging 2
- scomparto filtro dell'aria 2
- scomparto reagenti 2
- sequenziamento
 - materiali di consumo forniti dall'utente 12
- Servizio di monitoraggio proattivo Illumina 11, 43
- software
 - aggiornamento automatico 32
 - aggiornamento manuale 32
 - analisi immagini, identificazione delle basi 3
 - creazione di una corsa 15
 - durata della corsa 14
 - impostazioni configurazione 42
 - inizializzazione 9
 - integrato sullo strumento 3
- software di controllo 3
- software Real-Time Analysis 1, 3
 - risultati 50
- spegnimento strumento 33

- sportello scomparto cella a flusso 17
- spurgo materiali di consumo 12
- strumento
 - avvio 9
 - impostazioni configurazione 42
 - pulsante di alimentazione 5

T

- tabelle qualità 49
- trasferimento dati
 - icone attività 25
 - universal copy service 25
 - Universal Copy Service 25

U

- Universal Copy Service 25

V

- verifica pre-corsa 23
- verifica sistema 39
- Visualizzatore analisi di sequenziamento 14

W

- Windows
 - accesso 4
 - password 5

Assistenza Tecnica

Per ricevere assistenza tecnica, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Sito Web: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Gratuito	Regionale
Nord America	+1 8008094566	
Australia	+1 800775688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	4000665835	
Corea del Sud	+82 802345300	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940	+49 8938035677
Giappone	08001115011	
Hong Kong, Cina	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Norvegia	+47 800 16836	+47 21939693
Nuova Zelanda	0800451650	
Paesi Bassi	+31 8000222493	+31 207132960
Regno Unito	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapore	1.800.579.2745	
Spagna	+34 911899417	+34 800300143
Svezia	+46 850619671	+46 200883979
Svizzera	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, Cina	00806651752	
Altri paesi	+44.1799.534000	

Schede dei dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS): sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione sul prodotto: disponibile per il download all'indirizzo support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina[®]