

NextSeq 550Dx in modalità di ricerca

Guida di consultazione dello strumento



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 IVI 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
Documento n. 1000000041922 v03	Ottobre 2021	Aggiunta una nota sul timer di 7 giorni in Verifiche per le corse di sequenziamento. Aggiornato il flusso di lavoro di sequenziamento con l'aggiunta di una sezione per la creazione di una corsa utilizzando il software Local Run Manager. Modificato il limite di stabilità. Aggiunto Infinium Methylation EPIC ai tipi di BeachChip. Aggiornate le immagini delle icone per riflettere le modifiche apportate all'interfaccia utente.
Documento n. 1000000041922 v02	Novembre 2020	Aggiornata la figura contenuta in Esecuzione di un lavaggio manuale per riflettere le nuove cartucce di reagenti di lavaggio e cartucce di tamponi di lavaggio. Aggiornate le informazioni sulla barra di stato con ulteriori colori.
Documento n. 1000000041922 v01	Marzo 2018	Aggiunte informazioni sul servizio di monitoraggio proattivo Illumina nella sezione Configurazione delle impostazioni di sistema.
Documento n. 1000000041922 v00	Novembre 2017	Versione iniziale.

Sommario

Capitolo 1 Descrizione generale	1
Informazioni sulla guida	1
Introduzione	1
Risorse aggiuntive	2
Componenti dello strumento	3
Panoramica sul kit di reagenti	6
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	6
Capitolo 2 Informazioni preliminari	11
Avvio dello strumento	11
Personalizzazione delle impostazioni di sistema	12
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	13
Capitolo 3 Sequenziamento	15
Introduzione	15
Flusso di lavoro di sequenziamento	16
Preparazione della cartuccia di reagenti	16
Preparazione della cella a flusso	17
Preparazione delle librerie per il sequenziamento	17
Impostazione di una corsa di sequenziamento	18
Monitoraggio del progresso della corsa	25
Lavaggio post-corsa automatico	26
Capitolo 4 Scansione	27
Introduzione	27
Flusso di lavoro della scansione	28
Come scaricare la cartella DMAP	28
Caricamento del BeadChip sull'adattatore	29
Impostazione di una scansione	30
Monitoraggio del progresso della scansione	32
Capitolo 5 Manutenzione	35
Introduzione	35
Esecuzione di un lavaggio manuale	35
Sostituzione del filtro dell'aria	38
Aggiornamenti del software	39
Opzioni di riavvio e di spegnimento	41
Appendice A Risoluzione dei problemi	43
Introduzione	43
File di risoluzione dei problemi	43
Risoluzione degli errori della verifica automatica	44
Contenitore dei reagenti usati pieno	46

Flusso di lavoro di reibridazione	47
Errori relativi al BeadChip e alla scansione	49
Ricette personalizzate e cartelle delle ricette	50
Messaggio di errore RAID	50
Configurazione delle impostazioni di sistema	51
Appendice B Real-Time Analysis	55
Descrizione generale di Real-Time Analysis	55
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	56
Appendice C File e cartelle di output	61
File di output del sequenziamento	61
Struttura della cartella di output	64
File di output della scansione	65
Struttura della cartella di output della scansione	65
Indice	67
Assistenza Tecnica	70

Capitolo 1 Descrizione generale

Informazioni sulla guida	1
Introduzione	1
Risorse aggiuntive	2
Componenti dello strumento	3
Panoramica sul kit di reagenti	6
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	6

Informazioni sulla guida

Questa guida di consultazione dello strumento fornisce istruzioni per l'utilizzo dello strumento NextSeq 550Dx in modalità di ricerca (RUO, Research Use Only).

Introduzione

Caratteristiche del sequenziamento

- ▶ **Sequenziamento a elevata processività:** lo strumento NextSeq™ 550Dx consente di sequenziare le librerie di DNA.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA):** esegue l'elaborazione delle immagini e l'identificazione delle basi. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis a pagina 55*.
- ▶ **Funzionalità di analisi dei dati integrata sullo strumento:** il modulo di analisi del software Analysis Software specificato per la corsa analizza i dati della corsa.
- ▶ **Dual Boot:** lo strumento NextSeq 550Dx contiene due dischi rigidi separati che supportano la modalità diagnostica (Dx, Diagnostics) e la modalità solo a uso di ricerca (RUO, Research Use Only).

Funzioni di scansione di array

- ▶ **Scansione di array integrata nel software di controllo:** NextSeq 550Dx permette la transizione tra la scansione di array e il sequenziamento a elevata processività sullo stesso strumento utilizzando lo stesso software di controllo.
- ▶ **Funzione di imaging estesa:** il sistema di imaging in NextSeq 550Dx comprende il software e le modifiche al piano per permettere l'imaging di un'area di superficie più grande per consentire la scansione dei BeadChip.
- ▶ **Tipi di BeadChip:** i tipi di BeadChip compatibili includono CytoSNP-12, CytoSNP-850K, Infinium MethylationEPIC e Karyomap-12.
- ▶ **Adattatore BeadChip:** un adattatore BeadChip riutilizzabile permette di caricare facilmente un BeadChip sullo strumento.
- ▶ **Analisi dei dati:** utilizzare il software BlueFuse® Multi per analizzare i dati dell'array.

Risorse aggiuntive

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

Risorsa	Descrizione
<i>Guida alla preparazione della sede di installazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009869_ita)</i>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
<i>Guida alla sicurezza e conformità dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009868_ita)</i>	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
<i>Guida alla conformità del lettore RFID (documento n. 100000030332_ita)</i>	Fornisce informazioni sul lettore RFID nello strumento, certificazioni di conformità e considerazioni relative alla sicurezza.
<i>Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx in modalità di ricerca (documento n. 100000041922_ita)</i>	Fornisce istruzioni sul funzionamento dello strumento e sulle procedure di risoluzione dei problemi. Da utilizzare quando lo strumento NextSeq 550Dx viene usato in modalità di ricerca con NextSeq Control Software (NCS) v3.0.
<i>Guida del sistema NextSeq 550 (documento n. 15069765_ita)</i>	Fornisce istruzioni sul funzionamento dello strumento e sulle procedure di risoluzione dei problemi. Da utilizzare quando lo strumento NextSeq 550Dx viene usato in modalità di ricerca con NextSeq Control Software (NCS) v4.0 o versione successiva.
<i>Guida del sistema NextSeq 550</i>	Fornisce una panoramica sui componenti dello strumento, sulle istruzioni per il funzionamento dello strumento e sulle procedure di manutenzione e di risoluzione dei problemi.
<i>BaseSpace help</i>	Fornisce informazioni sull'utilizzo di BaseSpace™ Sequence Hub e sulle opzioni di analisi disponibili.

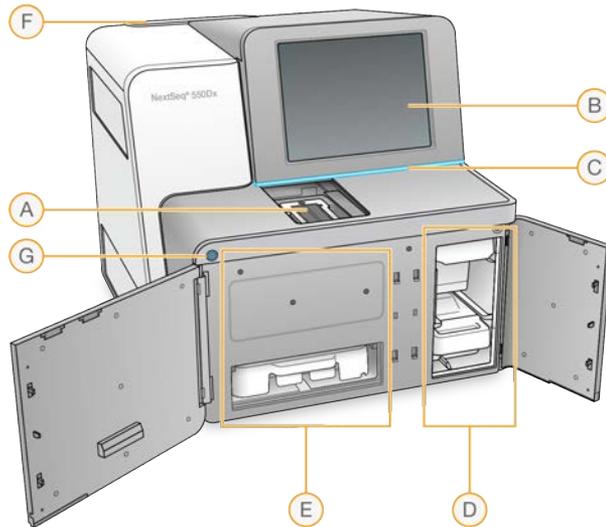
Consultare la [pagina di supporto per lo strumento NextSeq 550Dx](#) sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, alla formazione online e alle domande frequenti (FAQ).

Consultare le [pagine di supporto per NextSeq 550Dx](#) sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, alla formazione online e alle domande frequenti (FAQ).

Componenti dello strumento

Lo strumento NextSeq 550Dx comprende un monitor touch screen, una barra di stato e quattro scomparti.

Figura 1 Componenti dello strumento



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

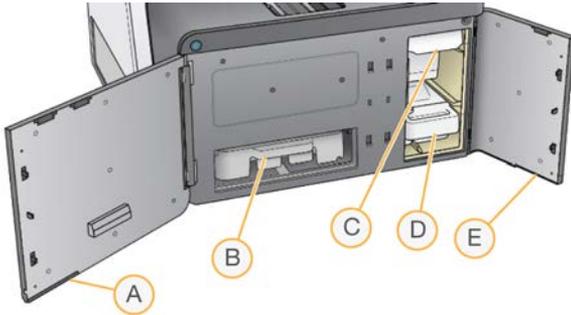
Scomparto di imaging

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 sullo strumento NextSeq 550Dx 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 nell'area inferiore destra dello sportello. Lo scomparto reagenti alloggia la cartuccia di reagenti.
- 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 e si trova nella parte posteriore dello strumento. Sostituire il filtro dell'aria ogni 90 giorni. Per informazioni sulla sostituzione del filtro, vedere [Sostituzione del filtro dell'aria a pagina 38](#).

Software NextSeq 550Dx

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

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS):** il software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura per l'impostazione di una corsa di sequenziamento.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA):** RTA esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante la corsa. Lo strumento NextSeq 550Dx 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 55](#).

Icone di stato

Un'icona di stato situata nell'angolo superiore destro di NCS indica qualsiasi cambiamento nelle condizioni durante l'impostazione o durante la corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Status OK (Stato OK)	Le condizioni del sistema sono normali.
	Processing (Elaborazione)	Il sistema è in fase di elaborazione.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Warning (Avvertenza)	Si è verificata un'avvertenza. Le avvertenze non arrestano una corsa o richiedono un intervento prima di poter procedere.
	Error (Errore)	Si è verificato un errore. Gli errori richiedono un intervento prima di poter procedere con la corsa.
	Service Needed (Necessita assistenza)	Si è verificata una notifica che richiede attenzione. Per ulteriori informazioni, fare riferimento al messaggio.

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.

NOTA

L'accettazione di un messaggio reimposta l'icona e il messaggio diventa inattivo. Il messaggio è ancora visibile all'utente se viene selezionata l'icona, ma sparisce al riavvio di NCS.

Pulsante di alimentazione

Il pulsante di alimentazione si trova nella parte anteriore di NextSeq 550Dx 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. Per impostazione predefinita, NextSeq 550Dx si avvia in modalità diagnostica.

Per informazioni sull'accensione iniziale dello strumento, vedere [Avvio dello strumento a pagina 11](#).

Per informazioni sullo spegnimento dello strumento, vedere [Spegnimento dello strumento a pagina 41](#).

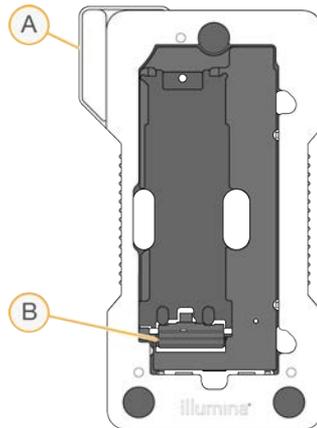
Stato di accensione	Intervento
Lo strumento è spento	Premere il pulsante per accendere l'alimentazione.
Lo strumento è acceso	Premere il pulsante per spegnere l'alimentazione. Sullo schermo viene visualizzata una finestra di dialogo per confermare lo spegnimento dello strumento.
Lo strumento è acceso	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.

Panoramica sull'adattatore BeadChip riutilizzabile

L'adattatore BeadChip riutilizzabile contiene il BeadChip durante la scansione. Il BeadChip è bloccato nel supporto incassato dell'adattatore mediante la clip di blocco. Quindi, l'adattatore BeadChip viene caricato sul piano nello scomparto di imaging.

Figura 3 Adattatore BeadChip riutilizzabile



- A Adattatore BeadChip
- B Clip di blocco

Panoramica sul kit di reagenti

Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento

I materiali di consumo per il sequenziamento richiesti per eseguire NextSeq 550Dx 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. Per maggiori informazioni, vedere l'insero della confezione per *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cicli)*, *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli)* o *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cicli)*.

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

ATTENZIONE

NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 Kit richiedono NOS 1.3, o versione successiva, affinché lo strumento accetti la cartuccia della a cella a flusso v2.5. Completare gli aggiornamenti del software prima di preparare i campioni e i materiali di consumo per evitare la perdita di reagenti o di campioni.

NOTA

Conservare i materiali di consumo per il sequenziamento nelle loro scatole fino al momento dell'utilizzo.

Etichettatura per la compatibilità dei kit

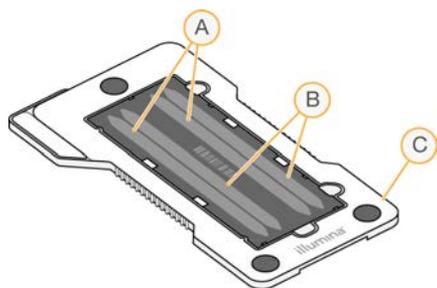
I componenti del kit sono etichettati con indicatori codificati per colore per indicare la compatibilità tra le celle a flusso e le cartucce di reagenti. Utilizzare sempre una cartuccia di reagenti e una cella a flusso compatibili. La cartuccia di tamponi è universale.

Ogni 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 4 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 di 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 61](#).

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 5 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.

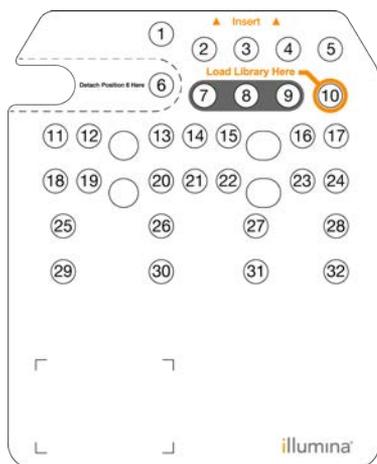


AVVERTENZA

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 6 Serbatoi numerati



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

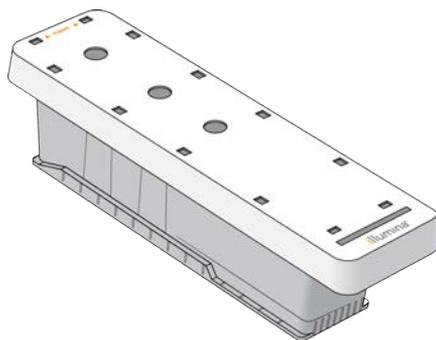
Serbatoio rimovibile in posizione n. 6

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 22](#).

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 7 Cartuccia di tamponi



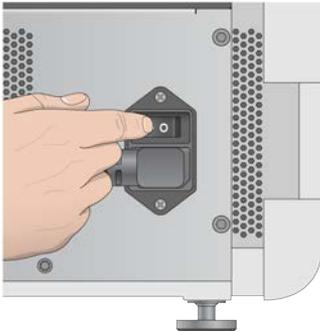
Capitolo 2 Informazioni preliminari

Avvio dello strumento	11
Personalizzazione delle impostazioni di sistema	12
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	13

Avvio dello strumento

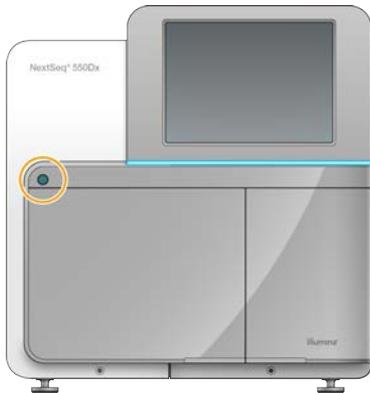
Portare l'interruttore di alimentazione in posizione I (accesso).

Figura 8 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 9 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 Immettere il nome utente e la password per Local Run Manager. Per informazioni sulle password, vedere *Password degli utenti a pagina 1*. Per informazioni su come impostare un account su Local Run Manager, vedere *Impostazioni e attività di amministrazione a pagina 1*.
- 4 Selezionare **Login** (Accedi). Si apre la schermata Home (Inizio), con le icone Sequence (Sequenziamento), Local Run Manager, Manage Instrument (Gestione strumento) e Perform Wash (Esecuzione lavaggio).

Indicatori di modalità dello strumento

La modalità predefinita su NextSeq 550Dx è la modalità diagnostica. Quanto segue è visualizzato nella schermata di NCS e indica la modalità dello strumento.

Modalità	Schermata Home (Inizio)	Barra dei colori	Orientamento delle icone di stato
Modalità diagnostica	Welcome to NextSeqDx (Benvenuti in NextSeqDx)	Blu	Orizzontale
Modalità di ricerca	Welcome to NextSeq (Benvenuti in NextSeq)	Arancione	Verticale

Personalizzazione delle impostazioni di sistema

Il software operativo include le impostazioni di sistema personalizzabili per l'identificazione dello strumento, le preferenze di input, le impostazioni audio e la posizione della cartella di output. Per modificare le impostazioni di configurazione della rete, vedere *Configurazione delle impostazioni di sistema a pagina 51*.

Opzioni di personalizzazione:

- ▶ Personalizzazione dell'identificazione dello strumento (Avatar e nome personalizzato)
- ▶ Impostazione dell'opzione di input e dell'indicatore audio
- ▶ Impostazione delle opzioni di configurazione della corsa
- ▶ Opzioni di spegnimento
- ▶ Configurazione dell'avvio dello strumento dopo la verifica pre-corsa
- ▶ Invio dei dati delle prestazioni dello strumento a Illumina
- ▶ Designazione di una cartella di output della corsa

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 preferita allo strumento, selezionare **Browse** (Sfoglia) per individuare l'immagine.
- 4 Nel campo Nick Name (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 delle opzioni di configurazione della corsa

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 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.
- 3 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.
- 4 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e uscire dalla schermata.

Impostazione dell'opzione di spurgo automatico

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

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

- 3 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 sullo strumento NextSeq 550Dx. Le apparecchiature e i materiali di consumo indicati di seguito sono utilizzati per la preparazione dei materiali di consumo, per il sequenziamento e per la manutenzione dello strumento. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida del sistema NextSeq 550*.

Materiali di consumo per il sequenziamento

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
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 e per uso generico

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)
Filtro dell'aria	Illumina, n. di catalogo 20022240	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
Congelatore, temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, antibrina	Fornitore di laboratorio generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico

Capitolo 3 Sequenziamento

Introduzione	15
Flusso di lavoro di sequenziamento	16
Preparazione della cartuccia di reagenti	16
Preparazione della cella a flusso	17
Preparazione delle librerie per il sequenziamento	17
Impostazione di una corsa di sequenziamento	18
Monitoraggio del progresso della corsa	25
Lavaggio post-corsa automatico	26

Introduzione

Per eseguire una corsa di sequenziamento sullo strumento NextSeq 550Dx, preparare una cartuccia di reagenti e una cella a flusso, quindi seguire le indicazioni 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 amplificate 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 nucleotide 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.

Analisi

Man mano che la corsa procede, il software operativo trasferisce automaticamente i file di identificazione delle basi (BCL) nella posizione di output specificata per l'analisi secondaria.

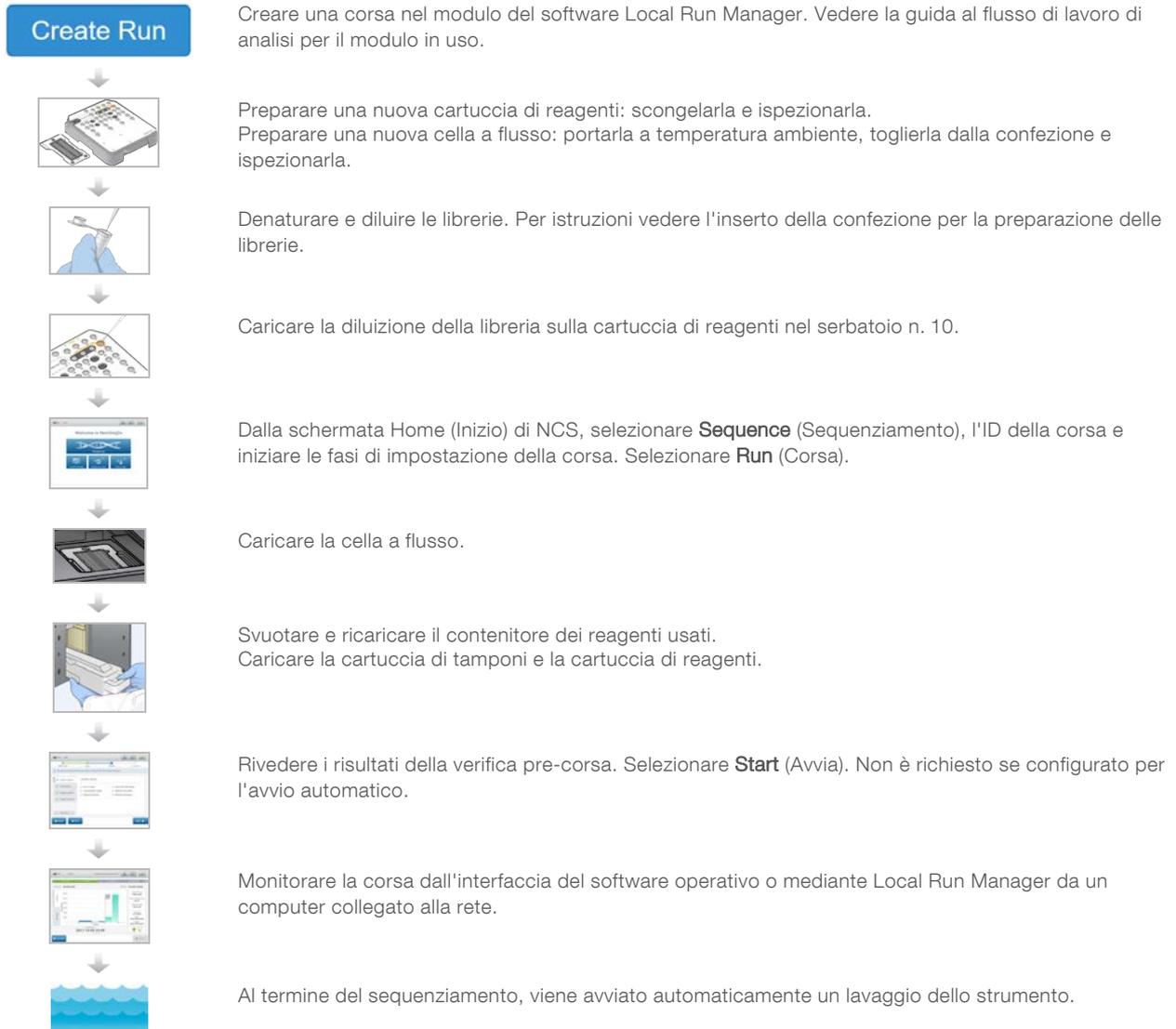
Durata della corsa di sequenziamento

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 otto cicli ciascuna per due letture indice.

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).

Flusso di lavoro di sequenziamento



Preparazione della cartuccia di reagenti

Attenersi scrupolosamente alle seguenti istruzioni per la cartuccia di reagenti per ottenere un sequenziamento corretto.

- 1 Rimuovere la cartuccia di reagenti dal luogo di conservazione con temperatura tra -25 °C e -15 °C.
- 2 Scegliere uno dei seguenti metodi per scongelare i reagenti. Non sommergere la cartuccia. Una volta scongelata la cartuccia, asciugarla prima di passare alla fase successiva.

Temperatura	Tempo di scongelamento	Limite di stabilità
Bagno d'acqua tra 15 °C e 30 °C	60 minuti	Non superare le sei ore
Tra 2 °C e 8 °C	7 ore	Non superare 7 giorni

NOTA Se si scongela più di una cartuccia nello stesso bagno d'acqua, consentire ulteriore tempo di scongelamento.

- 3 Capovolgere la cartuccia cinque volte per miscelare i reagenti.
- 4 Ispezionare la parte inferiore della cartuccia per assicurarsi che i reagenti siano scongelati e privi di precipitati. Confermare che le posizioni 29, 30, 31 e 32 siano scongelate, in quanto sono le più grandi e impiegano un tempo di scongelamento superiore.
- 5 Picchiettare delicatamente sul banco per ridurre le bolle d'aria.
Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.



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

Preparazione delle librerie per il sequenziamento

Denaturare e diluire le librerie a un volume di caricamento di 1,3 ml. In pratica, la concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e di quantificazione delle librerie. La diluizione delle librerie di campioni dipende dalla complessità dei raggruppamenti in pool di oligonucleotidi. Per le istruzioni sulla preparazione delle librerie dei campioni per il sequenziamento, inclusi la diluizione delle librerie e il raggruppamento in pool, vedere la sezione Istruzioni per l'uso applicabile al kit di preparazione delle librerie. È richiesta l'ottimizzazione della densità dei cluster su NextSeq 550Dx.

Denaturazione e diluizione delle librerie

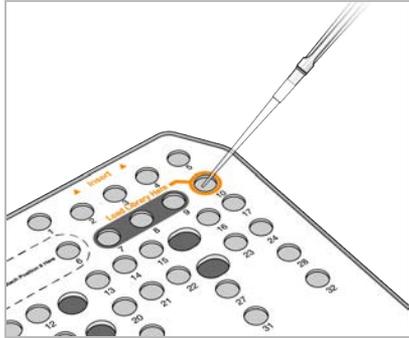
Denaturare e diluire le librerie a un volume di caricamento di 1,3 ml e a una concentrazione di caricamento di 1,8 pM. In pratica, la concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e di quantificazione delle librerie. Per istruzioni, vedere l'insero della confezione per la preparazione delle librerie.

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 nel serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Carica qui le librerie). Non toccare il sigillo in alluminio mentre si dispensano le librerie.

Figura 10 Caricamento delle librerie



Impostazione di una corsa di sequenziamento

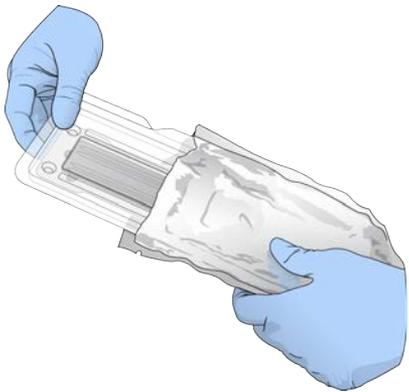
Accesso a BaseSpace

- 1 Immettere il nome utente e la password per BaseSpace.
- 2 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cella a flusso

- 1 Rimuovere la cella a flusso usata in una corsa precedente.
- 2 Rimuovere la cella a flusso dalla confezione in alluminio.

Figura 11 Rimozione dalla confezione in alluminio



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

Figura 12 Rimozione dalla confezione a forma di conchiglia

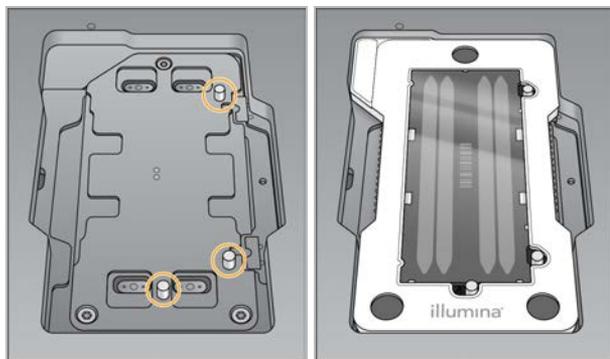


- 4 Pulire la superficie in vetro della cella a flusso con una salvietta imbevuta di alcool che non lascia residui. Asciugare il vetro con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.

NOTA Assicurarsi che la superficie in vetro della cella a flusso sia pulita. Se necessario, ripetere la fase di pulizia.

- 5 Utilizzare i perni di allineamento per posizionare la cella a flusso sul piano portacelle.

Figura 13 Caricamento della cella a flusso



- 6 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.

NOTA Tenere le mani lontano dallo sportello della cella a flusso mentre si chiude per evitare di schiacciarle.

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

Svuotamento del contenitore dei reagenti usati

- 1 Aprire lo sportello dello scomparto tamponi utilizzando il fermo sotto l'angolo inferiore sinistro dello sportello.
- 2 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.

Figura 14 Rimozione del contenitore dei reagenti usati



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

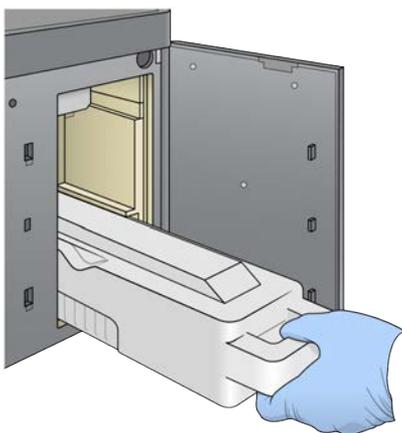


AVVERTENZA

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.

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

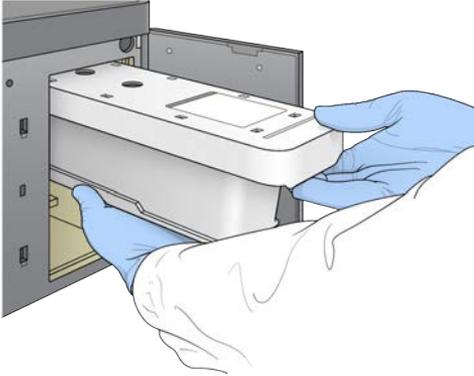
Figura 15 Caricamento del contenitore dei reagenti usati vuoto



Caricamento della cartuccia di tamponi

- 1 Rimuovere la cartuccia di tamponi usata dallo scomparto superiore.
È necessario utilizzare un po' di forza per sollevare e tirare fuori la cartuccia di tamponi.
- 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 verificato.

Figura 16 Caricamento della cartuccia di tamponi



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

Caricamento della cartuccia di reagenti

- 1 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti utilizzando il fermo sotto l'angolo inferiore destro dello sportello.
- 2 Rimuovere la cartuccia di reagenti usata dallo scomparto reagenti. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.



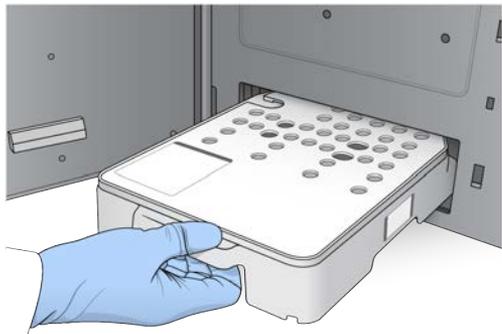
AVVERTENZA

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 22.

- 3 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 17 Caricamento della cartuccia di reagenti

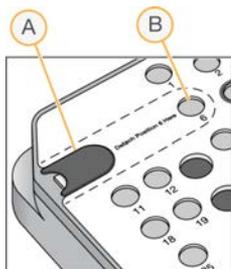


- 4 Selezionare **Load** (Carica).
Il software sposta automaticamente la cartuccia in posizione (circa 30 secondi), l'ID della cartuccia viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono sottoposti a verifica.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).

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 18 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.

Inserimento dei parametri della corsa

I passaggi visualizzati sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa) sono diversi in base alla configurazione del sistema:

- ▶ **BaseSpace o BaseSpace Onsite:** la schermata Run Setup (Impostazione corsa) elenca le corse che sono state impostate mediante la scheda Prep (Preparazione) di BaseSpace. Se la corsa prevista non viene visualizzata sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa), assicurarsi che la corsa sia selezionata per il sequenziamento in BaseSpace.
- ▶ **Computer indipendente:** la schermata Run Setup (Impostazione corsa) include i campi per la definizione dei parametri della corsa.

Selezione delle corse disponibili (configurazione BaseSpace)

- 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 Selezionare **Next** (Avanti).
- 3 Confermare i parametri della corsa.
 - ▶ **Run Name** (Nome corsa): il nome della corsa come assegnato in BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID libreria): il nome delle librerie raggruppate in pool come assegnato in BaseSpace.
 - ▶ **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): Single Read (Lettura unidirezionale) oppure Paired-End (Lettura paired-end).
 - ▶ **Read Length** (Lunghezza lettura): il numero di cicli per ogni lettura.
 - ▶ **[Facoltativo]** Custom Primers (Primer personalizzati), se applicabile.
 - ▶ **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 *NextSeq Custom Primers Guide (Guida ai primer personalizzati NextSeq) (documento n. 15057456)*.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Spurga i 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 (configurazione indipendente)

- 1 Immettere un nome della corsa scelto dall'utente.
- 2 **[Facoltativo]** Immettere un ID della libreria scelto dall'utente.
- 3 Selezionare un tipo di lettura, **Single Read** (Unidirezionale) oppure **Paired End** (Paired-end).
- 4 Inserire il numero di cicli per ciascuna lettura nella corsa di sequenziamento.
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli.
 - ▶ **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).
 - ▶ **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).

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 per Index Read (Lettura indici) non superano i cicli per Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2)
- 5 **[Facoltativo]** Se si stanno usando primer personalizzati, selezionare la casella di controllo per i primer usati. Per informazioni, vedere *NextSeq Custom Primers Guide (Guida ai primer personalizzati NextSeq) (documento n. 15057456)*.
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
 - ▶ **Index 1** (Indice 1): primer personalizzati per Index 1 (Indice 1).

- ▶ **Index 2** (Indice 2): primer personalizzati per Index 2 (Indice 2).
 - ▶ **Read 2** (Lettura 2): primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
- 6 **[Facoltativo]** Selezionare il pulsante **Advanced Settings**  (Impostazioni avanzate) per modificare i parametri della corsa.
- ▶ Dall'elenco a discesa **Recipe** (Ricetta), selezionare una ricetta. Sono elencate solo le ricette compatibili.
 - ▶ **Output folder location** (Posizione cartella di output): modificare la posizione della cartella di output per la corsa attuale. Selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare a una posizione di rete.
 - ▶ **Included file** (File inclusi): selezionare i file da includere in Output Folder (Cartella di output) da utilizzare in caso di ulteriore analisi. Ad esempio, i file manifest e gli elenchi dei campioni.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Spurga i materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa attuale.
 - ▶ **Use run monitoring for this run** (Usa monitoraggio corsa per questa corsa): modificare questa impostazione per utilizzare il monitoraggio della corsa in BaseSpace.
- 7 Selezionare **Next** (Avanti).

Revisione della verifica pre-corsa

Il software esegue una verifica pre-corsa 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 44](#).

Per arrestare una verifica automatica pre-corsa in corso, selezionare il pulsante **Cancel** (Annulla). Per riavviare la verifica, selezionare il pulsante **Retry** (Riprova). La verifica riprende dalla prima verifica non completata o non superata.

Per visualizzare i risultati di ciascuna singola verifica in una categoria, selezionare la scheda **Category** (Categoria).

Se lo strumento non è configurato per l'avvio automatico della corsa, avviare la corsa al completamento della verifica pre-corsa automatizzata.

Avvio della corsa

Al termine della verifica pre-corsa 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 13](#).



ATTENZIONE

Assicurarsi di mantenere l'accesso a Windows. Se si esce dal sistema Windows durante una corsa di sequenziamento, la corsa si arresta.

NOTA I reagenti non possono rimanere inattivi sullo strumento per più di 24 ore.

Monitoraggio del progresso della corsa

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

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 o visualizzabili da un computer indipendente usando Sequencing Analysis Viewer (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

Stato	Local Run Manager	Cartella di output
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 trasferiti manualmente dal computer dello strumento prima di avviare una corsa successiva.

Universal Copy Service

NextSeq 550Dx include Universal Copy Service. RTA2 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.

Sequencing Analysis Viewer

Il software Sequencing Analysis Viewer 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 *Sequencing Analysis Viewer User Guide (Guida per l'utente di Sequencing Analysis Viewer)* (n. codice 15020619).

Sequencing Analysis Viewer è incluso nel software installato sul computer dello strumento. Sequencing Analysis Viewer 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

Al completamento della corsa di sequenziamento, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico utilizzando 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 Scansione

Introduzione	27
Flusso di lavoro della scansione	28
Come scaricare la cartella DMAP	28
Caricamento del BeadChip sull'adattatore	29
Impostazione di una scansione	30
Monitoraggio del progresso della scansione	32

Introduzione

Per eseguire una scansione sullo strumento NextSeq 550Dx, sono necessari i seguenti componenti della corsa:

- ▶ Un BeadChip ibridato e colorato
- ▶ L'adattatore BeadChip riutilizzabile
- ▶ I file Decode Map (DMAP) per il BeadChip in uso
- ▶ Un file manifest per il tipo di BeadChip in uso
- ▶ Un file cluster per il tipo di BeadChip in uso

I file di output vengono generati durante la scansione e sono quindi messi in coda per essere trasferiti nella cartella di output specificata.

Eseguire l'analisi utilizzando il software BlueFuse Multi, che richiede i dati della scansione in un formato file di identificazione dei genotipi (GTC). Per impostazione predefinita, lo strumento NextSeq 550Dx genera dati normalizzati e identificazioni del genotipo associate in un formato file GTC. Facoltativamente, è possibile configurare lo strumento per generare file dei dati di intensità (IDAT) aggiuntivi. Per maggiori informazioni, vedere *Configurazione della scansione dei BeadChip a pagina 53*.

Utility Decode File Client

La cartella DMAP contiene le informazioni che identificano le posizioni delle microsferi sul BeadChip e quantifica il segnale associato con ogni microsfera. Una cartella DMAP è unica per ogni codice a barre del BeadChip.

L'utility Decode File Client permette di scaricare le cartelle DMAP direttamente dai server Illumina utilizzando un protocollo HTTP standard.

Per accedere a Decode File Client, andare alla [pagina di supporto di Decode File Client](http://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) sul sito Web Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Installare Decode File Client su un computer con accesso alla posizione di rete della cartella DMAP.

Per maggiori informazioni, vedere *Come scaricare la cartella DMAP a pagina 28*.

File manifest e file cluster

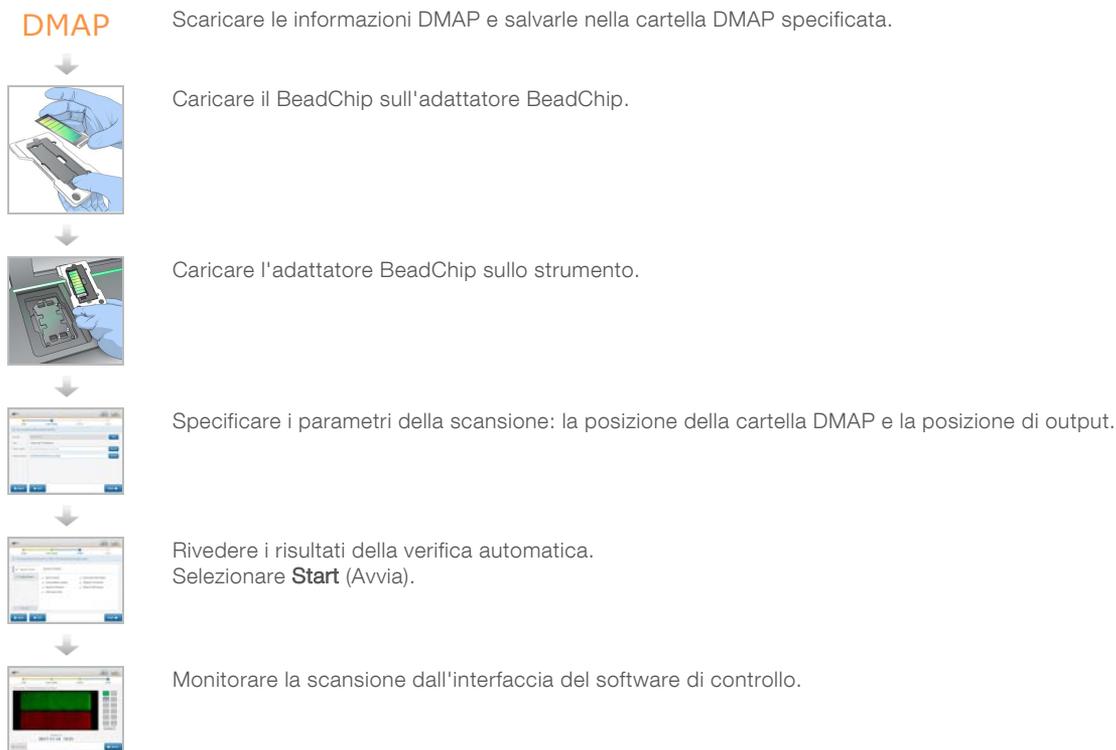
Per ogni BeadChip, il software richiede l'accesso a un file manifest e a un file cluster. Ogni file manifest e file cluster è unico per un tipo di BeadChip. Assicurarsi che siano utilizzati i file cluster che comprendono NS550 nel nome del file. I seguenti file sono compatibili con il sistema NextSeq 550Dx.

- ▶ **File manifest:** i file manifest descrivono il contenuto dell'SNP o della sonda su un BeadChip. I file manifest utilizzano il formato file *.bpm.
- ▶ **File cluster:** i file cluster descrivono le posizioni dei cluster per l'array di genotipizzazione Illumina e sono utilizzati nell'analisi dei dati per eseguire l'identificazione dei genotipi. I file cluster utilizzano il formato file *.egt.

La posizione dei file è specificata sulla schermata BeadChip Scan Configuration (Configurazione per la scansione del BeadChip). Dalla schermata Home (Inizio) di NCS, selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento), **System Configuration** (Configurazione sistema), quindi **BeadChip Scan Configuration** (Configurazione per la scansione del BeadChip).

Una volta installato lo strumento NextSeq 550Dx, il rappresentante Illumina scarica questi file e specifica il percorso nel software di controllo. Non è necessario modificare questi file, fatta eccezione in caso di perdita di dati o se è disponibile una nuova versione. Per maggiori informazioni, vedere *Sostituzione dei file manifest e dei file cluster a pagina 50*.

Flusso di lavoro della scansione



Come scaricare la cartella DMAP

Alla cartella DMAP si accede utilizzando l'utility Decode File Client mediante l'account o il BeadChip (visualizzazione predefinita).

Accesso alla cartella DMAP mediante account

- 1 Dalla scheda principale dell'utility Decode File Client, selezionare un'opzione di download:
 - ▶ AutoPilot
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Non tutti i BeadChip sono stati scaricati)
 - ▶ All BeadChips (Tutti i BeadChip)
 - ▶ BeadChips by Purchase Order (BeadChip per Ordine di acquisto)
 - ▶ BeadChips by barcode (BeadChip per codice a barre)
- 2 Immettere le informazioni richieste.

- 3 Individuare la cartella DMAP che si desidera scaricare.
- 4 Assicurarci di avere spazio libero sufficiente sulla destinazione di download.
- 5 Avviare il download. Visualizzare lo stato del download dalla scheda Download Status and Log (Stato download e registro).
- 6 Salvare la cartella DMAP nella posizione della cartella DMAP specificata.

Accesso alla cartella DMAP mediante BeadChip

- 1 Identificare i BeadChip utilizzando due delle opzioni seguenti:
 - ▶ Codice a barre del BeadChip
 - ▶ ID della confezione del BeadChip
 - ▶ Numero dell'Ordine di acquisto
 - ▶ Numero dell'Ordine di vendita
- 2 Individuare la cartella DMAP che si desidera scaricare.
- 3 Assicurarci di avere spazio libero sufficiente sulla destinazione di download.
- 4 Avviare il download. Visualizzare lo stato del download dalla scheda Download Status and Log (Stato download e registro).
- 5 Salvare la cartella DMAP nella posizione della cartella DMAP specificata.

Caricamento del BeadChip sull'adattatore

- 1 Premere sulla clip di blocco dell'adattatore. La clip si inclina leggermente per aprirsi.
- 2 Tenendo il BeadChip per le estremità, posizionare il BeadChip con il codice a barre accanto alla clip di blocco e collocare il BeadChip sul supporto incassato dell'adattatore.

Figura 19 Caricamento del BeadChip sull'adattatore



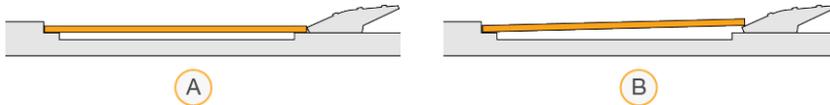
- 3 Utilizzando le aperture su entrambi i lati del BeadChip, assicurarsi che il BeadChip sia posizionato nel supporto incassato dell'adattatore.

Figura 20 Collocamento sicuro del BeadChip



- 4 Rilasciare delicatamente la clip di blocco per assicurare in posizione il BeadChip.
- 5 Ispezionare il BeadChip lateralmente per assicurarsi che il BeadChip sia adagiato sull'adattatore. Se necessario, riposizionare il BeadChip.

Figura 21 Ispezione della posizione del BeadChip



- A Posizione corretta: quando la clip viene rilasciata, il BeadChip è livellato sull'adattatore.
B Posizione errata: quando la clip viene rilasciata, il BeadChip non è livellato sull'adattatore.

Impostazione di una scansione

- 1 Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Experiment** (Esperimento), quindi selezionare **Scan** (Scansione).
Il comando Scan (Scansione) apre lo sportello dello scomparto di imaging, rilascia i materiali di consumo di una corsa precedente (se presenti) e apre la serie di schermate per l'impostazione della scansione. Un breve ritardo è normale.

Scaricamento dei materiali di consumo per il sequenziamento

Se quando si imposta una nuova scansione sono presenti materiali di consumo per il sequenziamento usati, il software indica di scaricare la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi prima di procedere con la fase successiva.

- 1 Se indicato, rimuovere i materiali di consumo usati da una corsa di sequenziamento precedente.
 - a Rimuovere la cartuccia di reagenti dallo scomparto reagenti. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.
 - b Rimuovere la cartuccia di tamponi usata dallo scomparto tamponi.



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.

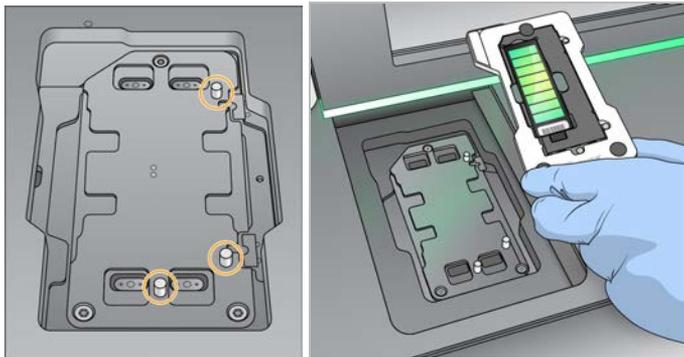
- 2 Rimuovere la cella a flusso dallo scomparto di imaging.

- 3 Chiudere gli sportelli dello scomparto reagenti e dello scomparto tamponi.

Caricamento dell'adattatore BeadChip

- 1 Utilizzare i perni di allineamento per posizionare l'adattatore BeadChip sul piano.

Figura 22 Caricamento dell'adattatore BeadChip



- 2 Selezionare **Load** (Carica).
Lo sportello si chiude automaticamente, l'ID del BeadChip viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono verificati. Un breve ritardo è normale. Se il codice a barre del BeadChip non può essere letto, viene visualizzata una finestra di dialogo che permette di immettere manualmente il codice a barre. Vedere *Il software non riesce a leggere il codice a barre del BeadChip a pagina 49*.
- 3 Selezionare **Next** (Avanti).

Impostazione della scansione

- 1 Nella schermata Scan Setup (Impostazione scansione), confermare le informazioni seguenti:
 - ▶ **Barcode** (Codice a barre): il software legge il codice a barre del BeadChip quando il BeadChip è caricato. Se il codice a barre è stato immesso manualmente, viene visualizzato il pulsante Edit (Modifica) per apportare ulteriori modifiche.
 - ▶ **Type** (Tipo): il campo del tipo di BeadChip viene popolato automaticamente in base al codice a barre del BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Posizione DMAP): la posizione della cartella DMAP specificata sulla schermata BeadChip Scan Configuration (Configurazione per la scansione del BeadChip). Per modificare la posizione solo per la scansione attuale, selezionare **Browse** (Sfoglia) e navigare alla posizione corretta.
 - ▶ **Output Location** (Posizione di output): la posizione di output specificata sulla schermata BeadChip Scan Configuration (Configurazione per la scansione del BeadChip). Per modificare la posizione solo per la scansione attuale, selezionare **Browse** (Sfoglia) e navigare alla posizione preferita.
- 2 Selezionare **Next** (Avanti).

Revisione della verifica pre-corsa

Il software esegue una verifica pre-corsa 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 44*.

Per arrestare una verifica automatica pre-corsa in corso, selezionare il pulsante **Cancel** (Annulla). Per riavviare la verifica, selezionare il pulsante **Retry** (Riprova). La verifica riprende dalla prima verifica non completata o non superata.

Per visualizzare i risultati di ciascuna singola verifica in una categoria, selezionare la scheda Category (Categoria).

Se lo strumento non è configurato per l'avvio automatico della corsa, avviare la corsa al completamento della verifica pre-corsa automatizzata.

Avvio della scansione

Al termine della verifica automatica, selezionare **Start** (Avvia). La scansione ha inizio.

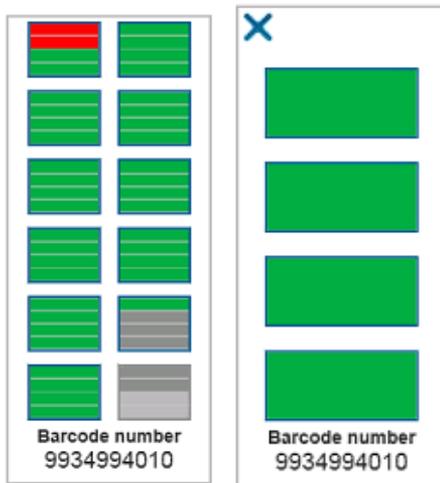
Per configurare il sistema per avviare una scansione automaticamente dopo una verifica completata correttamente, vedere *Impostazione delle opzioni di configurazione della corsa a pagina 13*.

Monitoraggio del progresso della scansione

- 1 Monitorare il progresso della scansione utilizzando l'immagine del BeadChip. Ciascun colore sull'immagine indica lo stato della scansione.
 - ▶ **Grigio chiaro**: scansione non eseguita.
 - ▶ **Grigio scuro**: scansione eseguita ma non registrata.
 - ▶ **Verde**: scansione eseguita e registrata correttamente.
 - ▶ **Rosso**: scansione e registrazione non riuscite.

Se la registrazione non riesce, è possibile ripetere la scansione dei campioni che contengono le sezioni non riuscite. Vedere *Mancata scansione del BeadChip a pagina 49*.
- 2 Selezionare l'immagine del BeadChip per passare tra la visualizzazione completa e la visualizzazione dettagliata di un campione selezionato.
 - ▶ La visualizzazione completa mostra i campioni sul BeadChip e le sezioni entro ciascun campione.
 - ▶ La visualizzazione dettagliata mostra ciascuna sezione entro il campione selezionato.

Figura 23 Immagine del BeadChip: visualizzazione completa e visualizzazione dettagliata



NOTA La terminazione di una scansione è definitiva. Se una scansione viene terminata prima del completamento della scansione, i dati della scansione **non** vengono salvati.

Trasferimento dei dati

Al termine della scansione, i dati sono messi in coda per essere trasferiti nella cartella di output della scansione. I dati sono scritti temporaneamente sul computer dello strumento. Quando viene avviata una scansione successiva, la cartella temporanea viene eliminata automaticamente dal computer dello strumento.

Il tempo richiesto per il trasferimento dei dati dipende dalla connessione di rete. Prima di avviare una scansione successiva, assicurarsi che i dati siano stati scritti nella cartella di output. Per verificare, assicurarsi che i file GTC siano presenti nella cartella del codice a barre. Per maggiori informazioni, vedere *Struttura della cartella di output della scansione a pagina 65*.

Se la connessione viene interrotta, il trasferimento dei dati riprende automaticamente al ripristino della connessione. Dopo essere stato messo in coda, ogni file dispone di un lasso di tempo di un'ora per far sì che i dati vengano trasferiti alla cartella di output. Quando è trascorsa l'ora o lo strumento viene riavviato prima del completamento del trasferimento, i dati non vengono scritti nella cartella di output.

Capitolo 5 Manutenzione

Introduzione	35
Esecuzione di un lavaggio manuale	35
Sostituzione del filtro dell'aria	38
Aggiornamenti del software	39
Opzioni di riavvio e di spegnimento	41

Introduzione

Le procedure di manutenzione includono i lavaggi manuali dello strumento e la sostituzione del filtro dell'aria. Sono inoltre descritte le opzioni di spegnimento e riavvio dello strumento.

- ▶ **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 35*.
- ▶ **Sostituzione del filtro dell'aria:** la sostituzione regolare del filtro dell'aria assicura il corretto flusso d'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). <ul style="list-style-type: none">• Richiesto ogni 14 giorni se lo strumento è rimasto inattivo con la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi in posizione.• Richiesto ogni 7 giorni se lo strumento si trova in uno stato asciutto (cartuccia di reagenti e cartuccia di tamponi rimosse).
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 dei reagenti di lavaggio). Richiesto se non è stato eseguito il lavaggio post-corsa automatico.

Un lavaggio manuale richiede la cartuccia dei 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 24 Cartuccia dei reagenti di lavaggio e cartuccia di tamponi di lavaggio, formato originale

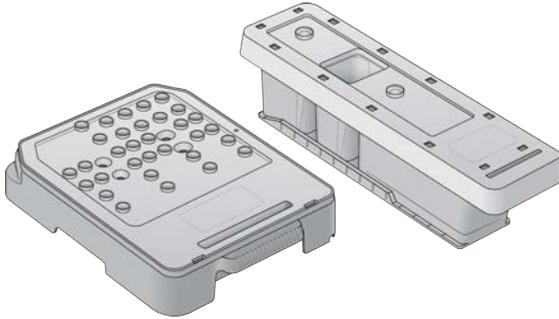
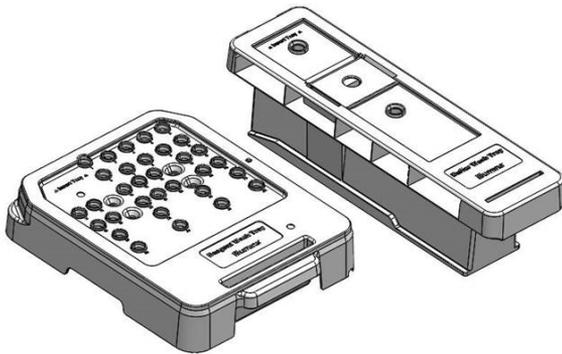


Figura 25 Cartuccia dei reagenti di lavaggio e cartuccia di tamponi di lavaggio, nuovo formato



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

Scegliere se preparare un lavaggio post-corsa manuale, come descritto di seguito, oppure preparare un lavaggio rapido (sezione successiva). Se si opta per un lavaggio post-corsa manuale, saltare la sezione relativa al lavaggio rapido e passare a *Caricamento di una cella a flusso usata e delle cartucce di lavaggio a pagina 37*.

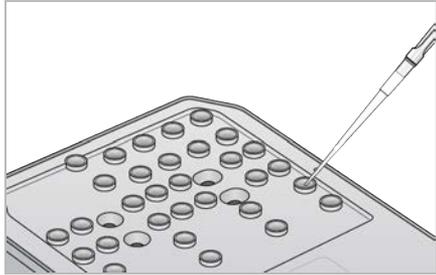
Materiali di consumo forniti dall'utente	Volume e descrizione
NaOCl	1 ml, diluito a 0,12% Caricato sulla cartuccia dei reagenti di lavaggio (posizione n. 28)
Tween 20 al 100% Acqua da laboratorio	Utilizzata per creare 125 ml di soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05% Caricata sulla cartuccia di tamponi 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.

- 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)
- Capovolgere la provetta per miscelare.

- 3 Aggiungere 1 ml di NaOCl allo 0,12% alla cartuccia dei reagenti di lavaggio. Il serbatoio corretto corrisponde alla posizione n. **28** sulla cartuccia precaricata.

Figura 26 Caricamento di NaOCl



- 4 Combinare i volumi seguenti per ottenere una soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05%:
 Cartuccia di tamponi di lavaggio, formato originale
 - ▶ Tween 20 al 100% (62 µl)
 - ▶ Acqua da laboratorio (125 ml)
 - ▶ Aggiungere 125 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia di tamponi di lavaggio.
 Cartuccia di tamponi di lavaggio, nuovo formato
 - ▶ Tween 20 al 100% (75 µl)
 - ▶ Acqua da laboratorio (150 ml)
 - ▶ Aggiungere 150 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia di 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)

È possibile preparare un lavaggio rapido, come descritto di seguito, come passaggio alternativo a [Preparazione per Manual Post-Run Wash \(Lavaggio post-corsa manuale\)](#) a pagina 36.

Materiali di consumo forniti dall'utente	Volume e descrizione
Tween 20 al 100%	Utilizzata per creare 40 ml di soluzione di lavaggio Tween 20 allo 0,05%
Acqua da laboratorio	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 µl)
 - ▶ Acqua da laboratorio (40 ml)
- 2 Aggiungere 40 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia di 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 dei reagenti usata nella corsa precedente, se presente.
- 7 Caricare la cartuccia dei 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 sono dotati di tre filtri dell'aria di ricambio che devono essere conservati e utilizzati quando lo strumento suggerisce di sostituire il filtro.

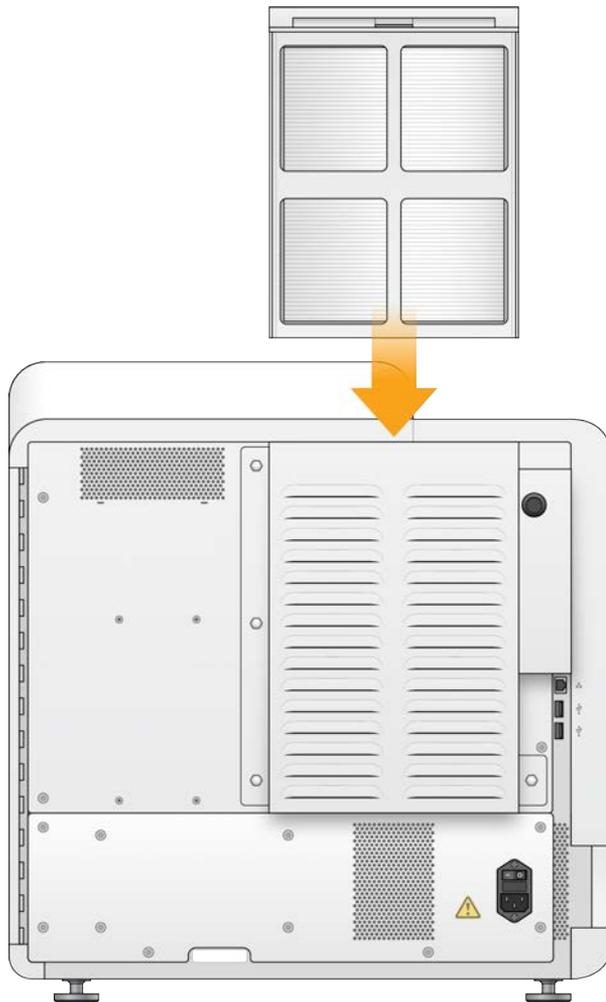
Il filtro dell'aria assicura flusso di aria nello strumento. Il software visualizza una notifica di sostituzione del filtro dell'aria ogni 90 giorni. Quando suggerito dal software, selezionare **Remind in 1 day** (Ricordami tra 1 giorno) o attenersi alla seguente procedura e selezionare **Filter Changed** (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 27 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
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)

- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

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 dello strumento NextSeq 550Dx](#) sul sito Web Illumina.

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** (Sfoglia) 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.

Opzioni di riavvio e di spegnimento

Accedere alle seguenti funzioni selezionando il pulsante Reboot / Shutdown (Riavvia/spegni):

- ▶ Reboot to RUO (Riavvio in RUO): lo strumento si apre in modalità di ricerca.
- ▶ Restart (Riavvia): lo strumento si apre in modalità diagnostica.
- ▶ Restart to Dx from RUO (Riavvia in modalità Dx dalla modalità RUO): lo strumento si apre in modalità diagnostica.
- ▶ Shutdown (Spegnimento): quando lo strumento viene nuovamente avviato si apre in modalità diagnostica.
- ▶ Exit to Windows (Esci su Windows): in base ai permessi, è possibile chiudere NCS e visualizzare Windows.

Riavvio in modalità diagnostica

Utilizzare il comando Restart (Riavvia) per spegnere in sicurezza lo strumento e riavviare in modalità diagnostica. La modalità diagnostica è la modalità di avvio predefinita.

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Reboot / Shutdown** (Riavvia/Spegni).
- 3 Selezionare **Restart** (Riavvia).

Spegnimento dello strumento

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Reboot / Shutdown** (Riavvia/Spegni).
- 3 Selezionare **Shutdown** (Spegni).

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

NOTA Per impostazione predefinita, all'accensione lo strumento si avvia in modalità diagnostica.



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.

Exit to Windows (Esci su Windows)

Il comando Exit to Windows (Esci su Windows) consente di accedere al sistema operativo dello strumento e a qualsiasi cartella sul computer dello strumento. Il comando chiude in sicurezza il software ed esce su Windows. Solo un utente con privilegi di amministratore può uscire su Windows.

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Reboot / Shutdown** (Riavvia/Spegni).
- 3 Selezionare **Exit to Windows** (Esci su Windows).

Appendice A Risoluzione dei problemi

Introduzione	43
File di risoluzione dei problemi	43
Risoluzione degli errori della verifica automatica	44
Contenitore dei reagenti usati pieno	46
Flusso di lavoro di reibridazione	47
Errori relativi al BeadChip e alla scansione	49
Ricette personalizzate e cartelle delle ricette	50
Messaggio di errore RAID	50
Configurazione delle impostazioni di sistema	51

Introduzione

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Vedere *Assistenza Tecnica* a pagina 70.

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.

File di risoluzione dei problemi per le corse di sequenziamento

File principale	Cartella	Descrizione
File informazioni corsa (RunInfo.xml)	Cartella della corsa (livello base)	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)	Cartella della corsa (livello base)	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)	Cartella della corsa (livello base)	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 di report binari. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.
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. Includere il registro degli errori quando si comunicano i problemi all'Assistenza Tecnica Illumina.

File di risoluzione dei problemi per le scansioni di array

File principale	Cartella	Descrizione
File dei parametri della scansione (ScanParameters.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le informazioni relative ai parametri della scansione. Le informazioni comprendono la data della scansione, il codice a barre del BeadChip, la posizione del file cluster e la posizione del file manifest.
File di registro	Logs	I file di registro descrivono ciascuna fase eseguita sullo strumento durante la scansione.
File delle metriche	[Barcode]	Le metriche sono fornite come metriche del campione e come metriche della sezione. [barcode]_sample_metrics.csv: per ogni campione e canale (rosso e verde), elenca Percent Off Image (Percentuale al di fuori dell'immagine), Percent Outliers (Percentuale valori anomali), P05, P50, P95, Avg FWHM Avg (Media FWHM media), FWHM Stddev (Deviazione standard FWHM) e Min Registration Score (Punteggio registrazione minimo). [barcode]_section_metrics.csv: per ogni sezione e tile, elenca Laser Z-position (Posizione Z del laser), Through Focus Z-position (Posizione Z sulla messa a fuoco), Red FWHM (FWHM rosso), Green FWHM (FWHM verde), Red Avg Pixel Intensity (Intensità pixel media rosso), Green Avg Pixel Intensity (Intensità pixel media verde), Red Registration Score (Punteggio registrazione rosso) e Green Registration Score (Punteggio registrazione verde).
File ripetizione scansione	[Barcode]	[barcode]_rescan.flowcell: elenca le posizioni delle tile regolate per una ripetizione della scansione, che include una sovrapposizione aumentata da tile a tile.

Risoluzione degli errori della verifica automatica

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

Verifiche per le corse di sequenziamento

Se la verifica pre-corsa non viene superata, l'etichetta RFID della cartuccia di reagenti non viene bloccata e può essere utilizzata per una corsa successiva. Tuttavia, le etichette RFID della cella a flusso, della cartuccia di reagenti e della cartuccia di tamponi saranno bloccate durante l'inizializzazione del software di controllo; questa azione potrebbe essere richiesta per risolvere un errore. La cella a flusso, la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi devono essere rimosse dallo strumento prima di un riavvio del sistema. Inoltre, dopo la foratura dei sigilli, le etichette RFID dei materiali di consumo sono bloccate. Una volta che l'etichetta RFID è stata letta dal software, parte un timer di 7 ore prima che la cella a flusso sia considerata bloccata o non utilizzabile.

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. Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
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)	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)	La cella a flusso potrebbe essere in posizione errata. <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.

Verifiche per le scansioni di array

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.
Verify Input Files (Verifica file di input)	Assicurarsi che il percorso al file cluster e al file manifest sia corretto e che i file siano presenti.
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.

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.
Auto-Center (Centramento automatico)	Scaricare l'adattatore BeadChip. Assicurarsi che il BeadChip sia alloggiato nell'adattatore, quindi ricaricare l'adattatore.

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 il 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 550Dx 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). 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 7 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C nella confezione in plastica 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 35*.

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 sulla scheda Prep (Preparazione) di BaseSpace

- 1 Se lo strumento è configurato per BaseSpace o BaseSpace Onsite impostare una nuova corsa sulla scheda Prep (Preparazione) utilizzando gli stessi parametri della corsa originale.

PUNTA Fare clic sulla scheda Pools (Raggruppamenti in pool), selezionare l'ID del raggruppamento in pool appropriato per mantenere le impostazioni della corsa precedente e quindi assegnare un nome unico 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 Caricare la cartuccia di tamponi e la cartuccia di reagenti nuove.
- 6 Dalla schermata Run Setup (Impostazione corsa), selezionare le seguenti opzioni:
 - ▶ **BaseSpace o BaseSpace Onsite:** selezionare la corsa e confermare i parametri della corsa.
 - ▶ **Computer indipendente:** immettere il nome della corsa e specificare gli stessi parametri della corsa originale.
- 7 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere alla verifica pre-corsa e avviare la corsa.

Errori relativi al BeadChip e alla scansione

Il software non riesce a leggere il codice a barre del BeadChip

Quando viene visualizzata la finestra di dialogo degli errori di lettura del codice a barre, selezionare le opzioni seguenti:

- ▶ Selezionare **Rescan** (Ripeti scansione). Il software cerca di leggere di nuovo il codice a barre.
- ▶ Selezionare il campo di testo e immettere il codice a barre numerico come mostrato nell'immagine. In base al BeadChip, i numeri del codice a barre contengono fino a 12 cifre. Selezionare **Save** (Salva). L'immagine del codice a barre è archiviata nella cartella di output.
- ▶ Selezionare **Cancel** (Annulla). Lo sportello dello scomparto di imaging si apre per scaricare l'adattatore BeadChip.

Mancata scansione del BeadChip

Dopo la scansione, le immagini vengono registrate. La registrazione identifica le microsfere mettendo in correlazione le loro posizioni sull'immagine scansionata con le informazioni contenute nella mappa delle microsfere o nella cartella DMAP.

Le sezioni che non vengono registrate sono indicate in rosso sull'immagine del BeadChip.

Figura 28 BeadChip con le sezioni non riuscite



Quando la scansione è completata e i dati della scansione sono scritti nella cartella di output, il pulsante **Rescan** (Ripeti scansione) diventa attivo.

Quando viene selezionato **Rescan** (Ripeti scansione), il software esegue le fasi seguenti:

- ▶ Ripete la scansione dei campioni che contengono le sezioni non riuscite utilizzando una sovrapposizione da tile a tile aumentata.
- ▶ Genera file di output nella cartella di output originale.
- ▶ Sovrascrive i precedenti file di output per le sezioni non riuscite.
- ▶ Incrementa il conteggio delle scansioni di uno per ogni ripetizione della scansione, ma lo fa in secondo piano. Il software non rinomina la cartella di output.

Ripetizione della scansione o avvio di una nuova scansione

- 1 Selezionare **Rescan** (Ripeti scansione) per sottoporre a scansione i campioni che contengono sezioni non riuscite.
- 2 Se la scansione continua a non riuscire, terminare la scansione.

- 3 Rimuovere il BeadChip e l'adattatore e ispezionare il BeadChip per eventuale presenza di polvere o residui. Utilizzare aria compressa o altro metodo di pulizia della polvere a compressione per eliminare i residui.
- 4 Ricaricare il BeadChip e avviare una nuova scansione.
Quando viene avviata una nuova scansione, il software esegue le fasi seguenti:
 - ▶ Esegue la scansione dell'intero BeadChip.
 - ▶ Genera file di output in una nuova cartella di output.
 - ▶ Incrementa il contatore delle scansioni di uno in base al conteggio delle scansioni dell'ultima ripetizione della scansione.

Sostituzione dei file manifest e dei file cluster

- 1 Andare alla pagina di supporto Illumina (support.illumina.com) per il BeadChip che si sta utilizzando e fare clic sulla scheda **Downloads** (Download).
- 2 Scaricare i file da sostituire o aggiornare e copiarli nella posizione di rete preferita.

NOTA Assicurarsi di selezionare i file manifest e i file cluster compatibili con il sistema dello strumento NextSeq 550Dx. I file compatibili contengono **NS550** nel nome del file.

- 3 Solo se la posizione è cambiata, aggiornare la posizione nella schermata BeadChip Scan Configuration (Configurazione per la scansione del BeadChip), nel modo seguente:
 - a Nella schermata Home (Inizio) di NCS, selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
 - b Selezionare **System Configuration** (Configurazione sistema).
 - c Selezionare **BeadChip Scan Configuration** (Configurazione per la scansione del BeadChip).
- 4 Selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare alla posizione dei file sostituiti o aggiornati.

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**
 - 📁 **High**: ricette personalizzate usate con un High Output Kit.
 - 📁 **Mid**: ricette personalizzate usate con un Mid Output Kit.
- 📁 **High**: ricette originali usate con un High Output Kit.
- 📁 **Mid**: ricette originali usate con un Mid Output Kit.
- 📁 **Wash**: contiene la ricetta per il lavaggio manuale.

Messaggio di errore RAID

Il computer NextSeq 550Dx è dotato di quattro dischi rigidi, due per la modalità diagnostica e due per la modalità di ricerca. 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. L'avvertenza RAID può essere accettata solo da un amministratore. L'utilizzo dello strumento con un solo disco rigido potrebbe portare a perdita di dati.

Configurazione delle impostazioni di 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. Solo un amministratore dell'account Windows dispone dei privilegi per accedere alle 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 (DNS, Domain Name Server), nome del computer e nome del dominio.

Impostazione della configurazione della rete

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

NOTA Il protocollo di configurazione host dinamico (DHCP, Dynamic Host Configuration Protocol) 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 numeri separati 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.
- 3 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.
 - 4 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.

- 5 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.

6 Selezionare **Save** (Salva).

Impostazione della configurazione dell'analisi

- 1 Nella schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System configuration** (Configurazione sistema).
- 2 Selezionare **Analysis Configuration** (Configurazione dell'analisi).
- 3 Selezionare dalle opzioni seguenti per indicare una posizione in cui trasferire i dati per l'analisi successiva.
 - ▶ Selezionare **BaseSpace** per inviare i dati di sequenziamento a BaseSpace Illumina. **[Facoltativo]** Selezionare la casella di controllo **Output Folder** (Cartella di output), selezionare **Browse** (Sfogliare) per andare a una posizione di rete secondaria dove salvare i file BCL oltre che in BaseSpace.
 - ▶ Selezionare **BaseSpace Onsite**. Nel campo Server Name (Nome server), immettere il percorso completo al server BaseSpace Onsite. **[Facoltativo]** Selezionare la casella di controllo **Output Folder** (Cartella di output), selezionare **Browse** (Sfogliare) per andare a una posizione di rete secondaria dove salvare i file BCL oltre che sul server BaseSpace Onsite.
 - ▶ Selezionare **Standalone instrument** (Strumento indipendente) per salvare i dati solo su una posizione di rete. Selezionare **Browse** (Sfogliare) e andare alla posizione di rete prescelta. Il software di controllo genera automaticamente il nome della cartella di output.
 - ▶ **[Facoltativo]** Selezionare **Use Run Monitoring** (Usa monitoraggio corsa) per monitorare la corsa utilizzando gli strumenti di visualizzazione disponibili su BaseSpace. È richiesto il login a BaseSpace e una connessione Internet.
- 4 Se è stato selezionato BaseSpace o BaseSpace Onsite, impostare i parametri di BaseSpace nel modo seguente.
 - ▶ Immettere **User Name** (Nome utente) e **Password** (Password) di BaseSpace per registrare lo strumento con BaseSpace.
 - ▶ Selezionare **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Usa login predefinito e bypassa la schermata di login di BaseSpace) per impostare il nome utente e la password registrati come login predefinito. Questa impostazione bypassa la schermata BaseSpace durante l'impostazione della corsa.
- 5 Selezionare **Send Instrument Performance Data to Illumina (Invia dati sulle 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, fare riferimento a *Illumina Proactive Technical Note (Nota tecnica sul servizio proattivo Illumina)* (documento n. 1000000052503).

Questo servizio:

- ▶ Non invia i dati del sequenziamento
- ▶ Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet
- ▶ È disattivato per impostazione predefinita. Per usufruire di questo servizio, attivare l'opzione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina).

6 Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione della scansione dei BeadChip

- 1 Nella schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System configuration** (Configurazione sistema).
- 2 Selezionare **BeadChip Scan Configuration** (Configurazione per la scansione del BeadChip).
- 3 Per specificare una posizione predefinita della cartella DMAP, selezionare **Browse** (Sfogliare) e andare alla posizione della cartella prescelta sulla rete della sede.

NOTA Prima di ciascuna scansione, scaricare e copiare il contenuto di DMAP in questa posizione. Il contenuto di DMAP è richiesto per ogni BeadChip ed è unico per ogni codice a barre del BeadChip.

- 4 Per specificare una posizione predefinita di output, selezionare **Browse** (Sfogliare) e andare alla posizione della cartella prescelta sulla rete della sede.
- 5 Selezionare un formato file per le immagini salvate. Il tipo di immagine predefinito è **JPG**.
- 6 Selezionare un formato file per gli output dei dati della scansione. Il tipo di file di output predefinito è **GTC only** (Solo GTC).
- 7 Selezionare **Save** (Salva).
- 8 Dalla schermata Scan Map (Mappa scansione), indicare il percorso al file manifest e al file cluster per ogni tipo di BeadChip. Selezionare **Browse** (Sfogliare) per ogni tipo di file e andare alla posizione della cartella che contiene questi file.
- 9 **[Facoltativo]** Selezionare **Hide Obsolete BeadChips** (Nascondi BeadChip obsoleti) per rimuovere i BeadChip obsoleti dalla visualizzazione.
- 10 Selezionare **Save** (Salva).

Appendice B Real-Time Analysis

Descrizione generale di Real-Time Analysis	55
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	56

Descrizione generale di Real-Time Analysis

Lo strumento NextSeq 550Dx 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 operativo 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.

Input di RTA2

RTA2 richiede i seguenti input per l'elaborazione:

- ▶ Le immagini delle tile contenute nella memoria locale del sistema.
- ▶ **RunInfo.xml**, che viene generato automaticamente all'inizio della corsa e fornisce il nome della corsa, il numero di cicli, se una lettura è indicizzata e il 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 operativo sulla posizione del file **RunInfo.xml** e se è stata specificata una cartella di output facoltativa.

File di output per RTA2

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

RTA2 fornisce metriche in tempo reale sulla qualità della corsa archiviate come file InterOp. I file InterOp sono un output binario che contiene tile, ciclo e metriche a livello di lettura.

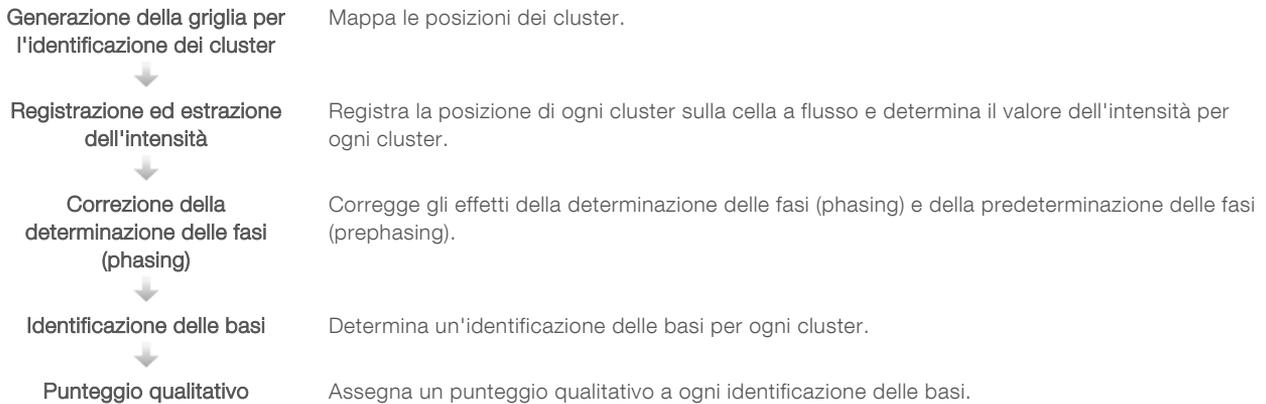
Gestione degli errori

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 una base che non sia G nei primi **cinque** cicli. Per qualsiasi sequenza indicizzata, RTA2 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.

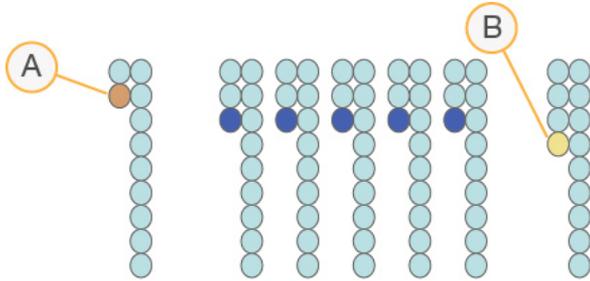
Se la registrazione non riesce per una qualsiasi immagine in un ciclo, non viene generata alcuna identificazione delle basi per quella tile in quel ciclo.

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 29 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. Lo strumento NextSeq 550Dx 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 30 Visualizzazione delle intensità dei cluster

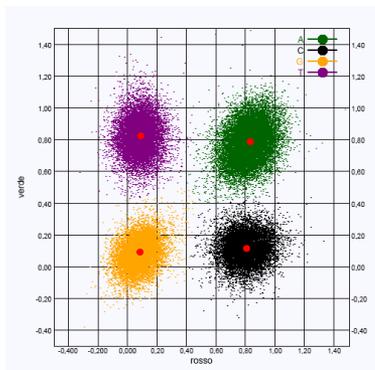


Tabella 1 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

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 di $< 0,63$. 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 entrambi i 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. I punteggi qualitativi sono rappresentati come Q(X), 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)

Punteggio qualitativo Q(X)	Probabilità di errore
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 sono registrati nei file per l'identificazione delle basi (*.bcl.bgzf).

Appendice C File e cartelle di output

File di output del sequenziamento	61
Struttura della cartella di output	64
File di output della scansione	65
Struttura della cartella di output della scansione	65

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 di 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 ciascuna 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 di report binari. 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. [Cartella della corsa - livello base], 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. [Cartella della corsa - livello base], RunInfo.xml

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 un totale di 864 tile.

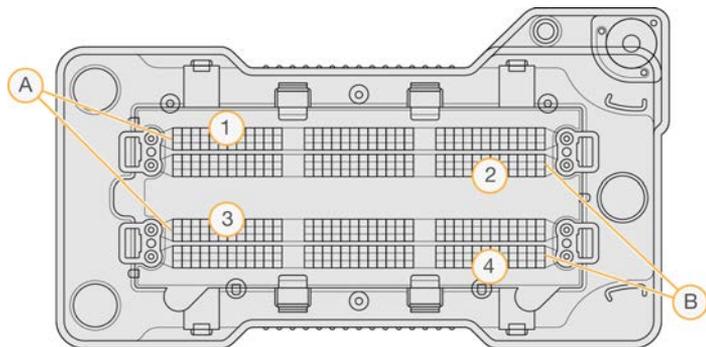
Tabella 2 Tile della cella a flusso

Componente della cella a flusso	Output elevato	Descrizione
Corsie	4	Una corsia è un canale fisico con porte di ingresso e di uscita dedicate.
Superfici	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	Una striscia è una colonna di tile in una corsia.
Segmenti della videocamera	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	Una tile è un'area sulla cella a flusso che la videocamera visualizza come un'immagine.
Tile totali sottoposte a imaging	864	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 31 Numerazione delle corsie

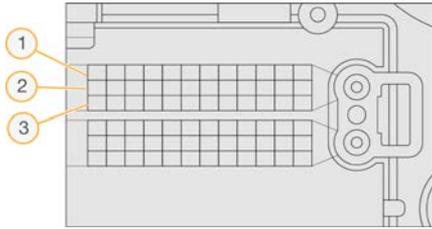


- A Coppia corsie A - corsie 1 e 3
- B Coppia corsie B - corsie 2 e 4

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 32 Numerazione delle strisce



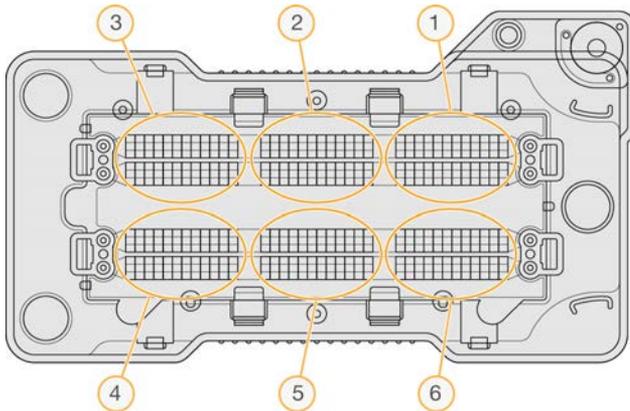
Numerazione delle videocamere

Lo strumento NextSeq 550Dx 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. Una volta sottoposte a imaging le corsie 1 e 3, il modulo di imaging si sposta sull'asse X per sottoporre a imaging le corsie 2 e 4.

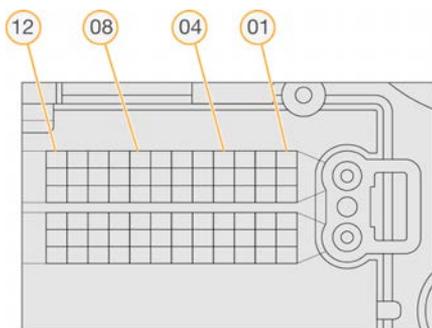
Figura 33 Numerazione delle videocamere e dei segmenti (è mostrata una cella a flusso High Output)



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 del segmento della videocamera.

Figura 34 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 61*.

Struttura della cartella di output

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

📁 Data

📁 Intensities

📁 BaseCalls

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

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

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

📁 L004: i file di identificazione delle basi per la corsia 4, aggregate 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:** file binari.

📁 **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.

📄 RTAComplete.txt

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

File di output della scansione

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File GTC	File di identificazione dei genotipi. Un file GTC viene generato per ogni campione scansionato sul BeadChip. Il nome del file comprende il codice a barre e il campione scansionato. [barcode]_[sample].gtc
File delle immagini	I file delle immagini sono denominati in base all'area scansionata sul BeadChip. Il nome comprende codice a barre, campione e sezione sul BeadChip, striscia e canale di imaging (rosso o verde). [barcode]_[sample]_[section]_[swath]_[camera]_[tile]_[channel].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Barcode (Codice a barre): il nome del file inizia con il codice a barre del BeadChip. • Sample (Campione): un'area del BeadChip, numerata come una riga (R0X), dall'alto al basso, e una colonna (C0X), da sinistra a destra. • Section (Sezione): una riga numerata in un campione. • Swath (Striscia): i BeadChip sono sottoposti a imaging sotto forma di una raccolta di tile sovrapposte. Quindi, solo la striscia 1 è utilizzata per sottoporre a imaging la sezione. • Camera (Videocamera): la videocamera utilizzata per raccogliere l'immagine. • Tile: un'area di imaging definita come il campo visivo della videocamera. • Channel (Canale): un canale, rosso o verde.

Struttura della cartella di output della scansione

 [Date]_[Instrument Name]_[Scan#]_[Barcode]

 [Barcode]

 Config

 Effective.cfg: registra le impostazioni di configurazione utilizzate durante la scansione.

 Focus: contiene i file delle immagini utilizzati per mettere a fuoco la scansione.

 Logs: contiene i file di registro che elencano ogni fase eseguita durante la scansione.

 PreScanDiagnosticFiles

 [Date_Time] Barcode Scan

 ProcessedBarcode.jpg: immagine del codice a barre del BeadChip.

 Scanning Diagnostics (file di registro)

 PreScanChecks.csv: registra i risultati della verifica automatica.

 GTC files: file dell'identificazione dei genotipi (un file per campione).

 IDAT files [facoltativo]: file dei dati di intensità (due file per campione; uno ciascuno per canale).

 Image files: le immagini scansionate per ogni campione, sezione, striscia, tile e canale.

 [Barcode]_sample_metrics.csv

 [Barcode]_section_metrics.csv

 ScanParameters.xml

Indice

A

- adattatore
 - caricamento BeadChip 31
 - orientamento BeadChip 29
 - panoramica 5
- aggiornamento software 39
- aiuto
 - documentazione 2
- algoritmo Phred 58
- analisi
 - file output 61
- analisi, primaria
 - purezza segnale 58
- assistenza clienti 70
- assistenza tecnica 70
- attraversano il filtro (PF) 58
- audio 12
- avvisi stato 4

B

- barra di stato 3
- BaseSpace 52
 - accesso 18
- BeadChip
 - adattatore 5, 29
 - analisi 1
 - caricamento 31
 - impossibile leggere codice a barre 49
 - mancata registrazione 49
 - orientamento codice a barre 29
 - tipi 1

C

- cartella DMAP
 - Decode File Client 27
 - scaricamento 28
- cartuccia reagenti
 - panoramica 8
 - serbatoio n. 28 36
 - serbatoio n. 6 22
- cartuccia tamponi 9, 21
- cella a flusso
 - confezione 17
 - coppia corsie 7
 - imaging 63
 - numerazione corsia 62

- numerazione tile 63
- numero striscia 62
- panoramica 7
- perni allineamento 18
- pulizia 17
- reibridazione 47
- tile 61
- cicli in una lettura 15
- cluster che attraversano il filtro 58
- compatibilità
 - cella a flusso, cartuccia reagenti 6
 - monitoraggio RFID 6, 8
- componenti
 - barra di stato 3
 - scomparto buffer 3
 - scomparto di imaging 3
 - scomparto reagenti 3
- Configurazione 52
- configurazione BaseSpace 23
- configurazione indipendente 23
- considerazioni sull'indicizzazione 58
- coppie corsie 62

D

- Decode File Client 27
 - accesso mediante account 28
 - accesso mediante BeadChip 29
- determinazione delle fasi (phasing) empirica 57
- determinazione delle fasi (phasing),
 - predeterminazione delle fasi (prephasing) 57
- documentazione 2, 70
- durata della corsa 15-16

E

- errori e avvertenze 4, 55
- errori verifica pre-corsa 44

F

- file filtro 61
- file GTC 65
- file identificazione delle basi 61
- file input, scansione
 - cartella DMAP 27
 - cartella DMAP, scaricamento 28
 - file cluster 27, 50

- file manifest 27, 50
- file InterOp 43, 61
- file locs 61
- file output 61
- file output scansione
 - GTC, IDAT 65
- file output, scansione
 - GTC, IDAT 65
- file output, sequenziamento 61
- filtro chastity 58
- filtro dell'aria 4, 38
- flusso di lavoro
 - accesso a BaseSpace 18
 - BeadChip 31
 - cartuccia reagenti 21
 - cartuccia tamponi 21
 - cella a flusso 18
 - considerazioni sull'indicizzazione 58
 - durata della corsa 15-16
 - ipoclorito di sodio 36
 - metriche corsa 25
 - modalità BaseSpace 23
 - modalità indipendente 23
 - opzione avanzata caricamento 13
 - panoramica 16, 28
 - preparazione cella a flusso 17
 - reagenti usati 19
 - sequenziamento 56
 - verifica pre-corsa 24, 31
- flusso di lavoro di sequenziamento 16, 56
- formammide, posizione n. 6 22
- formazione online 2

G

- generazione della griglia per l'identificazione dei cluster 56
- generazione di cluster 15, 25
- generazione griglia 56
- gestione strumento
 - spegnimento 41
- guida, tecnica 70

I

- icone
 - errori e avvertenze 4
 - stato 4
- identificazione delle basi 57
 - considerazioni sull'indicizzazione 58
- imaging, sequenziamento a due canali 57

- impostazione corsa, opzione avanzata 13
- impostazioni configurazione 51
- impostazioni di sistema 12
- intensità 57
- ipoclorito di sodio, lavaggio 36

L

- lavaggio
 - automatico 26
 - componenti lavaggio 35
 - lavaggio manuale 35
 - materiali di consumo forniti dall'utente 35
- lavaggio post-corsa 26
- lavaggio strumento 35
- linee guida acqua da laboratorio 14
- lunghezza lettura 15-16

M

- manutenzione preventiva 35
- manutenzione strumento
 - materiali di consumo 14
- manutenzione, preventiva 35
- materiali di consumo 6
 - acqua da laboratorio 14
 - cartuccia reagenti 8
 - cartuccia tamponi 9
 - cella a flusso 7
 - corse di sequenziamento 13
 - manutenzione strumento 14
 - materiali di consumo lavaggio 35-36
- materiali di consumo forniti dall'utente 13-14
- Messaggio di errore RAID 50
- metriche
 - cicli densità cluster 25
 - cicli intensità 25
 - identificazione delle basi 57
- metriche corsa 25
- modalità RUO 12
- monitoraggio RFID 6

N

- nome utente e password utente 11
- nome utente e password utente sistema 11
- numerazione corsia 62
- numerazione striscia 62
- numerazione tile 63
- numerazione videocamere 63

O

opzione avanzata caricamento 13

P

parametri corsa
 modalità BaseSpace 23
 modalità indipendente 23
 modifica parametri 23
posizione cartella 23
posizione cluster
 file 61
 generazione griglia 56
probabilità di errore 58
pulsante alimentazione 11
pulsante di alimentazione 5, 11
punteggi qualitativi 58

R

reagenti
 confezionati 6
 smaltimento corretto 21
reagenti usati
 contenitore pieno 46
 smaltimento 19, 37
reibridazione primer 47
reibridazione, Read 1 (Lettura 1) 47
riavvio 41
 strumento 41
riavvio in modalità di ricerca 12
risoluzione dei problemi
 contenitore reagenti pieno 46
 file specifici per la corsa 43
 file specifici scansione 44
 impossibile leggere codice a barre
 BeadChip 49
 mancata registrazione scansione 49
 metriche bassa qualità 47
 sostituzione file manifest e file cluster 50
 verifica pre-corsa 44
RunInfo.xml 43, 61

S

scomparto buffer 3
scomparto di imaging 3
scomparto reagenti 3

sequenziamento
 introduzione 15
 materiali di consumo forniti dall'utente 13
servizio di monitoraggio proattivo Illumina 52
software
 aggiornamento automatico 40
 aggiornamento manuale 40
 analisi immagini, identificazione delle basi 4
 durata della corsa 15-16
 impostazioni configurazione 51
 inizializzazione 11
 integrato sullo strumento 4
software BlueFuse Multi 1
software di controllo 4
software Real-Time Analysis 4
 determinazione delle fasi (phasing) 57
 flusso di lavoro 56
 risultati 61
spegnimento dello strumento 41
spurgo materiali di consumo 13
strumento
 avatar 12
 avvio 11
 impostazioni configurazione 51
 indicatori modalità 12
 pulsante di alimentazione 5
 riavvio 41
 spegnimento 41
Strumento
 nome personalizzato 12

T

tastiera 12
trasferimento dati
 scansione dati 33
 Universal Copy Service 25

U

Universal Copy Service 25

V

verifica pre-corsa 24, 31

W

Windows
 esci 41

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
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
Nord America	+1 8008094566	
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 (SDS, Safety Data Sheet): 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®