

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente all'uso conforme a contratto da parte dei clienti Illumina in correlazione con 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 con alcun mezzo, senza previa approvazione scritta da parte della Illumina. Mediante questo documento, Illumina non cede alcuna licenza protetta dai suoi diritti di brevetto, di proprietà dei marchi, di proprietà intellettuale o riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di terzi.

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 PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEI PRODOTTI QUI DESCRITTI (COMPONENTI E SOFTWARE INCLUSI).

© 2015 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, il colore arancione zucca e la grafica del fluire delle basi sono marchi o marchi registrati di Illumina, Inc. negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

Cronologia revisioni

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15069765_ITA	B	Maggio 2015	Corretta la descrizione dei serbatoi riservati sulla cartuccia di reagenti.
15069765	A	Maggio 2015	Versione iniziale.

Sommario

Cronologia revisioni	iii
Sommario	v
Capitolo 1 Informazioni preliminari	1
Introduzione	2
Risorse aggiuntive	3
Componenti dello strumento	4
Panoramica sull'adattatore BeadChip riutilizzabile	6
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	7
Avvio dello strumento	10
Software NextSeq	12
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	21
Capitolo 2 Sequenziamento	23
Introduzione	24
Flusso di lavoro per il sequenziamento	25
Preparazione della cartuccia di reagenti	26
Preparazione della cella a flusso	27
Preparazione delle librerie per il sequenziamento	29
Impostazione di una corsa di sequenziamento	30
Monitoraggio del progresso della corsa	36
Lavaggio post-corsa automatico	38
Capitolo 3 Scansione	39
Introduzione	40
Flusso di lavoro della scansione	42
Come scaricare la cartella DMAP	43
Caricamento del BeadChip sull'adattatore	44
Impostazione di una scansione	45
Monitoraggio del progresso della scansione	47
Capitolo 4 Manutenzione	49
Introduzione	50
Esecuzione di un lavaggio manuale	51
Aggiornamenti software	54
Spegnimento dello strumento	56
Capitolo 5 Risoluzione dei problemi	57
Introduzione	58
File di risoluzione dei problemi	59
Live Help (Assistenza in diretta)	61
Risoluzione dei errori della verifica automatica	62
Contenitore dei reagenti usati pieno	65
Flusso di lavoro di reibridazione	66
Errori del BeadChip e della scansione	68
Ricette personalizzate e cartelle delle ricette	70
Verifica del sistema	71
Messaggio di errore RAID	74
Appendice A Real-Time Analysis (RTA)	75

Introduzione	76
Descrizione generale di RTA v2	77
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	79
Appendice B File e cartelle di output	83
File di output per il sequenziamento	84
Struttura della cartella di output del sequenziamento	88
File di output della scansione	89
Struttura della cartella di output della scansione	90
Indice	91
Assistenza tecnica	95

Informazioni preliminari

Introduzione	2
Risorse aggiuntive	3
Componenti dello strumento	4
Panoramica sull'adattatore BeadChip riutilizzabile	6
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	7
Avvio dello strumento	10
Software NextSeq	12
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	21



Introduzione

Il sistema NextSeq® 550 Illumina® è una soluzione singola che fornisce una transizione semplice tra il sequenziamento ad elevata processività e la scansione di array.

Caratteristiche del sequenziamento

- ▶ **Sequenziamento ad elevata processività:** NextSeq 550 permette il sequenziamento degli esomi, degli interi genomi e dei trascrittomi e supporta le librerie TruSeq® e Nextera®.
- ▶ **Tipi di celle a flusso:** le celle a flusso sono disponibili in configurazioni ad output elevato e ad output medio. Ciascun tipo di cella a flusso è confezionata con una cartuccia di reagenti pre-riempita compatibile.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA):** software di analisi integrato che esegue l'analisi dei dati sullo strumento, che comprende l'analisi delle immagini e l'identificazioni delle basi. NextSeq utilizza una nuova implementazione di RTA chiamata RTA v2, che comprende importanti differenze dal punto di vista dell'architettura e delle caratteristiche. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 75.
- ▶ **Integrazione BaseSpace®:** il flusso di lavoro di sequenziamento è integrato con BaseSpace, l'ambiente di calcolo genomico Illumina per l'analisi dei dati, l'archiviazione e la collaborazione. Per gli strumenti configurati per BaseSpace, le informazioni sulle librerie e i parametri della corsa sono specificati nella scheda Prep (Preparazione) di BaseSpace. Le corse che sono state impostate in BaseSpace vengono visualizzate sull'interfaccia dello strumento durante l'impostazione della corsa. Mentre la corsa è in fase di elaborazione, i file di output sono trasmessi in tempo reale a BaseSpace o a BaseSpace Onsite.

Funzione di scansione di array

- ▶ **Scansione di array integrata nel software di controllo:** NextSeq 550 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 550 comprende il software e le modifiche al piano per permettere l'imaging di un'area di superficie più grande per permettere la scansione dei BeadChip.
- ▶ **Tipi di BeadChip:** i tipi di BeadChip compatibili includono CytoSNP-12, CytoSNP-850K 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.

Considerazioni sulla sicurezza

Per informazioni importanti sugli aspetti relativi alla sicurezza, vedere la *Guida sulla sicurezza e conformità del sistema NextSeq* (n. codice 15046564_ITA).

Risorse aggiuntive

È possibile scaricare la documentazione seguente dal sito Web Illumina.

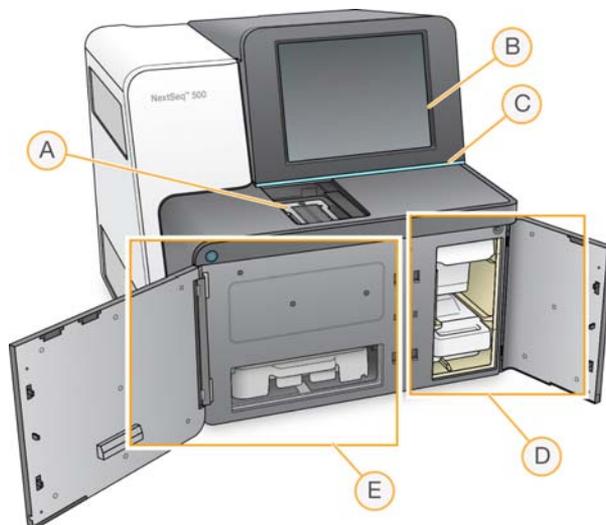
Risorsa	Descrizione
<i>Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema NextSeq (n. codice 15045113_ITA)</i>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
<i>Guida sulla sicurezza e conformità del sistema NextSeq (n. codice 15046564_ITA)</i>	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
<i>Guida per l'utente del lettore RFID - modello n. TR-001-44 (n. codice 15041950_ITA)</i>	Fornisce informazioni sul lettore RFID nello strumento, certificazioni di conformità e considerazioni relative alla sicurezza.
<i>Denaturazione e diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (n. codice 15048776)</i>	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX facoltativo. Questa procedura si applica alla maggior parte dei tipi di librerie.
<i>Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456)</i>	Fornisce informazioni relative all'uso di primer di sequenziamento personalizzati al posto di primer di sequenziamento Illumina.
<i>Guida di BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Fornisce informazioni sull'utilizzo di BaseSpace® e sulle opzioni di analisi disponibili.

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

Componenti dello strumento

Il sistema NextSeq 550 comprende un monitor touch screen, una barra di stato e tre scomparti.

Figura 1 Componenti dello strumento



- A **Scomparto di imaging:** contiene la cella a flusso per il sequenziamento o l'adattatore BeadChip per la scansione.
- B **Monitor touch screen:** permette la configurazione e l'impostazione integrate sullo strumento utilizzando l'interfaccia del software di controllo.
- C **Barra di stato:** indica lo stato dello strumento come in elaborazione (blu), richiede attenzione (arancione) e pronto per il sequenziamento (verde) 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.

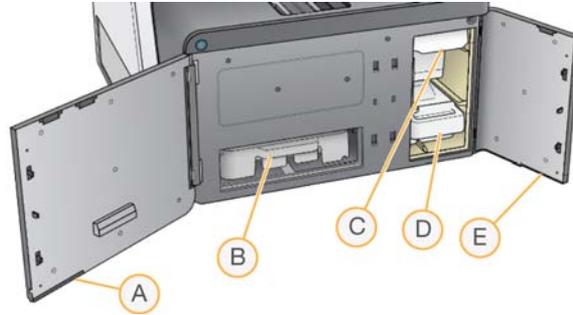
Scomparto di imaging

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

Scomparto reagenti e scomparto tamponi

L'impostazione di una corsa di sequenziamento su NextSeq 550 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

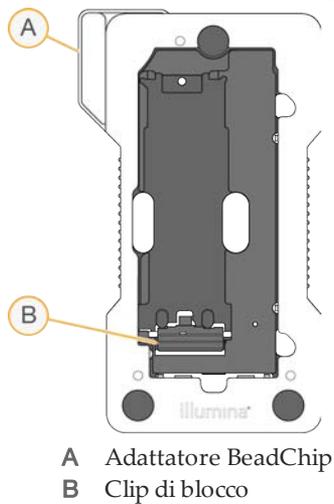


- A **Sportello dello scomparto reagenti:** chiude lo scomparto reagenti con un dispositivo di blocco che si trova sotto l'angolo inferiore destro dello sportello. Lo scomparto reagenti alloggia la cartuccia di reagenti. I reagenti vengono pompate nei pescanti, scorrono nel sistema di fluidica e infine giungono alla cella a flusso.
- B **Cartuccia di reagenti:** la cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso pre-riempito.
- C **Cartuccia di reagenti:** la cartuccia di reagenti 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 dispositivo di blocco che si trova sotto l'angolo inferiore sinistro dello sportello. Lo scomparto tamponi contiene la cartuccia di tamponi e il contenitore dei reagenti usati.

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



Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento

L'esecuzione di una corsa di sequenziamento su NextSeq 550 richiede un NextSeq 500/550 Kit monouso. Ciascun kit include una cella a flusso e i reagenti richiesti per eseguire una corsa di sequenziamento.

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.

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

Etichettatura per la compatibilità dei kit

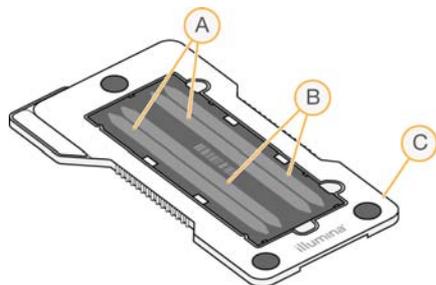
I componenti del kit sono etichettati con indicatori codificati per colore per indicare la compatibilità tra le celle a flusso e le cartucce di reagenti. Utilizzare sempre una cartuccia di reagenti e una cella a flusso compatibili. La cartuccia di tamponi è universale.

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

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

Panoramica sulla cella a flusso

Figura 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.

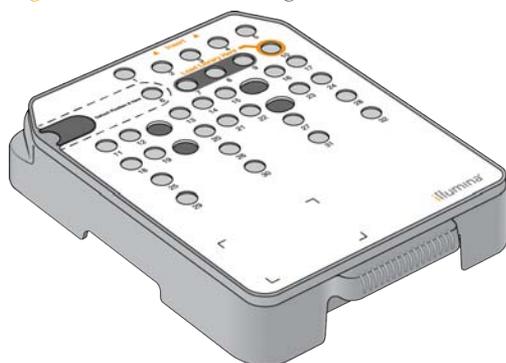
Sebbene la cella a flusso disponga di quattro corsie, solo una singola libreria o un set di librerie sottoposte a pooling viene sequenziato sulla cella a flusso. Le librerie vengono caricate sulla cartuccia di reagenti da un singolo flacone e trasferite automaticamente alla cella a flusso a tutte e quattro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

Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in aree denominate tile. Per maggiori informazioni, vedere *Tile della cella a flusso* a pagina 85.

Panoramica sulla cartuccia di reagenti

La cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso dotato di etichetta RFID e serbatoi con sigillo in alluminio che sono preriempiti con i reagenti di sequenziamento e i reagenti per la generazione di cluster.

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 automatico post-corsa. La soluzione di lavaggio viene pompata dalla cartuccia di tamponi ai serbatoi riservati attraverso il sistema e quindi al contenitore dei reagenti usati.

Ciascun serbatoio sulla cartuccia di reagenti è numerato. Non perforare i sigilli in alluminio a meno che non sia richiesto, ad esempio, per caricare le librerie prima di una corsa.

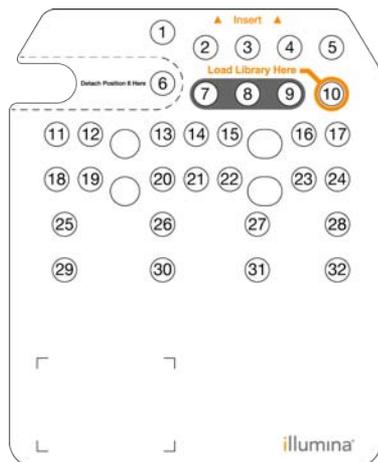


AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo 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

Per informazioni sui primer personalizzati, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq* (n. codice 15057456).

Serbatoio rimovibile in posizione n. 6

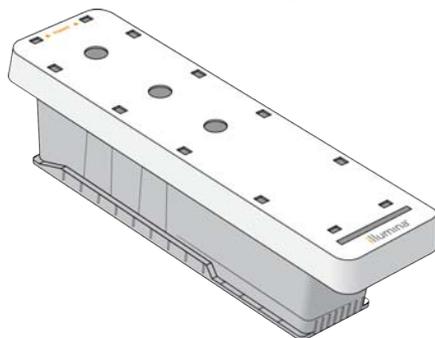
La cartuccia di reagenti pre-riempita include un reagente di denaturazione nella posizione n. 6 che contiene formammide. Per semplificare lo smaltimento sicuro di qualsiasi reagente non usato dopo una corsa di sequenziamento, il serbatoio in posizione 6 è rimovibile.

Per maggiori informazioni, vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6* a pagina 33.

Panoramica sulla cartuccia di tamponi

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

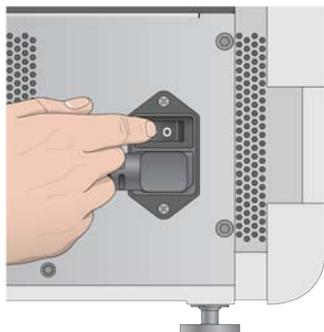
Figura 7 Cartuccia di tamponi



Avvio dello strumento

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

Figura 8 Interruttore di alimentazione sulla parte posteriore dello strumento



- 2 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



- 3 Attendere che il sistema operativo completi il caricamento. Quando il sistema è pronto, NextSeq Control Software (NCS) si avvia ed esegue automaticamente l'inizializzazione del sistema. Al termine dell'inizializzazione si apre la schermata di Home (Inizio).
Se il sistema è stato configurato per l'accesso mediante credenziali, eseguire il login con il nome utente e la password predefiniti:
 - Nome utente: **sbsuser**
 - Password: **sbs123**
 In caso contrario, eseguire il login utilizzando le credenziali specificate per la sede.

Pulsante di accensione

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

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

Software NextSeq

Il software dello strumento include applicazioni integrate che eseguono le corse di sequenziamento o la scansione di array.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)**: il software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura per l'impostazione di una corsa di sequenziamento o una scansione di array.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA)**: per le corse di sequenziamento, RTA esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante la corsa di sequenziamento. NextSeq 550 utilizza RTA v2, che include differenze importanti nell'architettura e nelle caratteristiche rispetto alle versioni precedenti. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 75.

Schermata Home (Inizio)

L'interfaccia di NextSeq Control Software (NCS) apre la schermata Home (Inizio).

Figura 10 Schermata Home (Inizio)



- ▶ **Experiment** (Esperimento): fornisce l'opzione per impostare una corsa di sequenziamento o una scansione BeadChip.
- ▶ **Manage Instrument** (Gestione strumento): fornisce le opzioni per configurare le impostazioni del sistema, eseguire una verifica del sistema, aggiornare il software e spegnere lo strumento. Vedere *Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)* a pagina 14.

Se lo strumento è connesso a una rete con accesso a Internet, quando è disponibile un'aggiornamento software viene visualizzata un'icona  di segnalazione.

- ▶ **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio): fornisce le opzioni per un lavaggio dello strumento manuale. Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale* a pagina 51.

Quando è richiesto un lavaggio, viene visualizzata un'icona  di segnalazione sul pulsante Perform Wash (Esecuzione lavaggio).

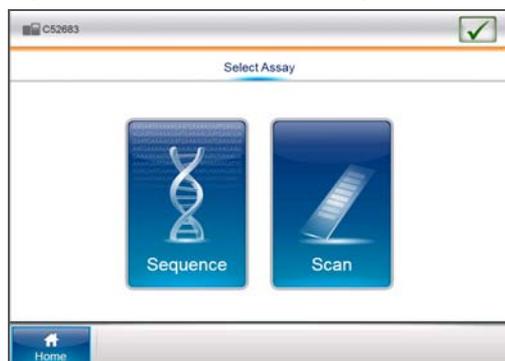
Schermate per l'impostazione della corsa

Selezionando **Experiment** (Esperimento) sulla schermata Home (Inizio) sono disponibili le opzioni **Sequence** (Sequenzia) o **Scan** (Esegui scansione).

- ▶ **Sequence** (Sequenzia): apre una serie di schermate che guidano l'utente nella procedura di login a BaseSpace, caricamento dei materiali di consumo per la corsa, revisione dei parametri della corsa, esecuzione di una verifica automatica del sistema e avvio della corsa. Per maggiori informazioni vedere *Sequenziamento* a pagina 23.

- ▶ **Scan** (Esegui scansione): apre una serie di schermate che guidano l'utente nella procedura di caricamento del BeadChip, revisione dei parametri della scansione, esecuzione di una verifica automatica del sistema e avvio della scansione. Per maggiori informazioni vedere *Scansione* a pagina 39.

Figura 11 Schermata Select Assay (Selezione saggio)



Opzione avanzata di caricamento

Il flusso di lavoro standard per l'impostazione della corsa di sequenziamento passa attraverso una serie di schermate per caricare i materiali di consumo della corsa. L'opzione avanzata di caricamento unisce su una sola schermata le fasi di caricamento di cella a flusso, cartuccia di buffer e cartuccia di reagenti e di svuotamento del contenitore dei reagenti usati.

Caricare i materiali di consumo per la corsa e il contenitore dei reagenti usati vuoto in qualsiasi ordine. Una volta terminato, selezionare **Load** (Carica) per spostare la cella a flusso e la cartuccia di reagenti in posizione. Il posizionamento automatico dei materiali di consumo può richiedere fino a 30 secondi. Quando i componenti della corsa sono in posizione, selezionare **Next** (Avanti).

Per attivare l'opzione avanzata di caricamento, selezionare **Use Advanced Load Consumables** (Usa caricamento avanzato dei materiali di consumo) sulla schermata Run Customization (Personalizzazione corsa). Per maggiori informazioni, vedere *Personalizzazione della corsa* a pagina 18.

Icone di stato

Nell'angolo superiore destro di ciascuna schermata è visualizzata un'icona di stato che segnala eventuali cambiamenti delle condizioni operative durante l'impostazione o l'esecuzione della corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Le condizioni del sistema sono normali.
	Elaborazione	Il sistema è in fase di elaborazione.
	Avvertenza	Si è verificata un'avvertenza. Le avvertenze non arrestano una corsa o richiedono un intervento prima di poter procedere.
	Errore	Si è verificato un errore. Gli errori richiedono un intervento prima di poter procedere con la corsa.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona cambia per mostrare l'immagine associata e lampeggia per avvertire l'utente. Selezionare l'icona per aprire la finestra di stato e visualizzare una descrizione della condizione.

- ▶ Selezionare le voci elencate nella finestra per visualizzare una descrizione dettagliata della condizione verificatasi ed eventualmente le istruzioni per risolvere il problema.
- ▶ Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)

La schermata Manage Instrument (Gestione strumento) contiene le impostazioni per la configurazione e i controlli dello strumento.

Figura 12 Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)



Opzione	Volume e descrizione
System Configuration (Configurazione del sistema)	Fornisce l'opzione per modificare le impostazioni del sistema, come il nome della macchina, il dominio e la connettività. Vedere <i>Impostazioni della schermata System Configuration (Configurazione sistema)</i> a pagina 15.
System Customization (Personalizzazione sistema)	Fornisce le impostazioni opzionali del software per preferenze di visualizzazione, suono e nome strumento. Vedere <i>Personalizzazione del sistema</i> a pagina 18.
Software Update (Aggiornamento software)	Fornisce le opzioni per aggiornare il software dello strumento. Vedere <i>Aggiornamenti software</i> a pagina 54.
System Check (Verifica sistema)	Fornisce opzioni di risoluzione dei problemi per la verifica dello stato di funzionamento dei componenti del sistema. Vedere <i>Verifica del sistema</i> a pagina 71.
Shutdown Options (Opzioni di spegnimento)	Fornisce le opzioni per riavviare il software del sistema, per spegnere lo strumento o uscire su Windows. Vedere <i>Opzioni di spegnimento</i> a pagina 19.

Opzione	Volume e descrizione
Unload Consumables (Scarica materiali di consumo)	Scarica la cella a flusso e la cartuccia di reagenti e solleva i pescanti dalla cartuccia di tamponi e dal contenitore di reagenti usati.
About (Informazioni su)	Elenca le versioni software, il nome del computer, l'ID dello strumento e il numero di corse da eseguire sullo strumento.

Impostazioni della schermata System Configuration (Configurazione sistema)

Il sistema viene configurato durante l'installazione. Tuttavia, se è necessario eseguire una modifica, usare le opzioni di configurazione del sistema.

Opzione	Descrizione
Network Configuration (Configurazione della rete)	Fornisce le opzioni per le impostazioni di indirizzo IP, indirizzo del server di nomi di dominio (DNS), nome del computer e nome del dominio.
BaseSpace Configuration (Configurazione di BaseSpace)	Fornisce le opzioni per i metodi di analisi, compresi BaseSpace, BaseSpace Onsite, modalità indipendente e monitoraggio della corsa in BaseSpace nonché le impostazioni per il login predefinito a BaseSpace e i report sulla salute dello strumento.
BeadChip Scan Configuration (Configurazione della scansione del BeadChip)	Fornisce le opzioni per indicare la posizione predefinita della cartella DMAP, la posizione della cartella di output, il formato file delle immagini salvate e il tipo di file di output.

Le schermate di configurazione del sistema includono i comandi seguenti:

- ▶ **Back** (Indietro): ritorna alla schermata precedente.
- ▶ **Exit** (Esci): non salva le modifiche e torna alla schermata Manage Instrument (Gestione strumento).
- ▶ **Save** (Salva): salva le modifiche e passa alla schermata successiva.

Configurazione della rete

Opzione	Descrizione
<p>IP address (Indirizzo IP)</p>	<p>Contattare l'amministratore di rete per gli indirizzi specifici per la struttura.</p> <p>Obtain an IP address automatically (Ottieni un indirizzo IP automaticamente): ottiene un indirizzo IP utilizzando il server DHCP.</p> <p>Use the following IP address (Usa l'indirizzo IP seguente): collega lo strumento a un'altra posizione server.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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
<p>DNS address (Indirizzo DNS)</p>	<p>Obtain a DNS address automatically (Ottieni un indirizzo DNS automaticamente): legge l'indirizzo DNS associato con l'indirizzo IP.</p> <p>Use the following DNS addresses (Usa gli indirizzi DNS seguenti): collega lo strumento a un server che traduce i nomi di dominio in indirizzi IP.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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.
<p>Computer name (Nome del computer)</p>	<p>Computer name (Nome computer): il nome assegnato al computer dello strumento al momento della fabbricazione. Qualsiasi modifica eseguita al nome del computer può incidere sulla connettività e richiede un amministratore di rete.</p> <p>Member of domain (Membro di dominio): collega lo strumento a un dominio. Il dominio è il nome associato con la connessione Internet della struttura. Le modifiche al dominio richiedono un nome utente e una password di amministratore.</p> <p>Member of work group (Membro del gruppo di lavoro): se lo strumento non è collegato a Internet, specificare un nome per il gruppo di lavoro. Il nome del gruppo di lavoro è univoco per la struttura.</p>

Configurazione di BaseSpace

Opzione	Descrizione
Analysis (Analisi)	<p>BaseSpace: invia i dati di sequenziamento a Base Space Illumina.</p> <p>BaseSpace Onsite (BaseSpace Onsite): invia i dati di sequenziamento a BaseSpace Onsite. Immettere Server Name (Nome del server) per il server di BaseSpace Onsite.</p> <ul style="list-style-type: none"> [Opzionale] Per le opzioni BaseSpace o BaseSpace Onsite, selezionare la casella di controllo Output Folder (Cartella di output) e quindi selezionare Browse (Sfogliare) per andare alla posizione preferita. Questa impostazione salva una copia dei dati di sequenziamento (solo file BCL) in una posizione di rete. <p>Standalone Instrument (Strumento indipendente): invia i dati di sequenziamento a una posizione sulla rete della struttura. Selezionare Browse (Sfogliare) e andare alla posizione preferita. Il software di controllo genera il nome della cartella di output.</p> <ul style="list-style-type: none"> [Opzionale] Selezionare Use Run Monitoring (Usa monitoraggio corsa) per monitorare la corsa utilizzando gli strumenti di visualizzazione disponibili su BaseSpace. È richiesto un login BaseSpace.
BaseSpace	<p>Immettere un User Name (Nome utente) e una Password (Password) per registrare lo strumento con BaseSpace. Il nome utente e la password immessi possono essere impostati come credenziali di login predefinite.</p> <p>Use default login and bypass the BaseSpace login screen (Usa login predefinito e bypassa la schermata di login di BaseSpace): imposta il nome utente e la password come login predefinito di BaseSpace e bypassa la schermata di BaseSpace durante l'impostazione della corsa.</p> <p>Send instrument health information to Illumina (Invia informazioni sulla salute dello strumento a Illumina): invia i file di registro a Illumina. Questa opzione non è disponibile con BaseSpace Onsite o con le configurazioni indipendenti.</p>

Configurazione per la scansione del BeadChip

Opzione	Descrizione
Scan (Scansione)	<p>DMAP Location (Posizione DMAP): specifica la posizione della cartella DMAP sulla rete della struttura. Copiare il contenuto di DMAP per il BeadChip da sottoporre a scansione prima di avviare la scansione.</p> <p>Output Location (Posizione di output): invia i dati della scansione a una posizione sulla rete della struttura. Selezionare Browse (Sfogliare) e andare alla posizione preferita. Il software di controllo genera automaticamente il nome della cartella di output.</p> <p>Saved Image Type (Tipi immagine salvati): specifica il formato file per i file delle immagini della scansione come JPEG (predefinito), PNG o TIFF.</p> <p>Output File Type (Tipo file di output): specifica il formato file dei file di output della scansione come GTC solamente (predefinito) o GTC e IDAT. Il software BlueFuse Multi richiede il formato file GTC come input.</p>

Opzione	Descrizione
Scan Map (Mappa scansione)	<p>Fornisce il percorso al file manifest e al file cluster per ciascun BeadChip supportato.</p> <p>Al momento dell'installazione iniziale dello strumento, il personale Illumina scarica questi file e imposta il percorso alla posizione di rete. Per ulteriori informazioni, vedere</p> <p>Se si desidera modificare il percorso, selezionare Browse (Sfoggia) e andare alla posizione preferita.</p>

Personalizzazione del sistema

Opzione	Descrizione
Start-Up Option (Opzione di avvio)	<p>Kiosk Mode (Modalità kiosk): mostra l'interfaccia del software di controllo a schermo intero. Il software è progettato per l'uso in modalità kiosk.</p> <p>Windows Mode (Modalità Windows): permette l'accesso a Windows sul computer dello strumento. In questa modalità l'interazione con l'interfaccia software, come la posizione dei pulsanti, può essere alterata.</p>
Keyboard and Audio (Tastiera e audio)	<p>Use on-screen keyboard (Utilizza tastiera dello schermo): attiva la tastiera dello schermo per inserire informazioni nello strumento. In alternativa, collegare una tastiera a una porta USB esterna.</p> <p>Play audio (Audio): attiva gli indicatori audio per gli eventi seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inizializzazione dello strumento • All'avvio di una corsa • Al verificarsi di determinati errori • Alla richiesta di interazione da parte dell'utente • Al termine di una corsa
Avatar Image (Immagine Avatar)	<p>Avatar Image (Immagine Avatar): selezionare Browse (Sfoggia) per individuare un'immagine preferita per lo strumento. Nel campo Name (Nome), immettere un nome preferito per lo strumento. L'immagine e il nome vengono visualizzati nella parte superiore di ciascuna schermata.</p>

Personalizzazione della corsa

Opzione	Descrizione
Advanced Load (Caricamento avanzato)	<p>Use Advanced Load Consumables (Usa caricamento avanzato dei materiali di consumo): selezionare questa opzione per caricare i materiali di consumo da una singola schermata piuttosto che da una serie di schermate per l'impostazione della corsa. Vedere <i>Opzione avanzata di caricamento</i> a pagina 13.</p>

Opzione	Descrizione
Purge Consumables (Spurgo dei materiali di consumo)	Purge Consumables at End of Run (Spurgo dei materiali di consumo al termine della corsa): attivata per impostazione predefinita, questa impostazione, dopo una corsa, spurga automaticamente i reagenti non usati dalla cartuccia di reagenti al contenitore dei reagenti usati. Quando questa impostazione non è attivata, smaltire manualmente i reagenti non usati. Lo spurgo dei materiali di consumo impiega tempo aggiuntivo. Disattivare questa impostazione per una corsa indipendentemente utilizzando la funzione Edit (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa).
Skip Check Confirmation (Salta conferma verifica)	Skip Pre-Run Check Confirmation (Salta conferma verifica pre-corsa): selezionare questa impostazione per avviare automaticamente il sequenziamento o la scansione dopo il completamento corretto di una verifica automatica. Se la verifica automatica non dovesse riuscire per qualsiasi ragione, risolvere l'errore prima di procedere.

Modifica delle impostazioni della corsa per spurgare i materiali di consumo

Modificare l'impostazione di spurgo dei materiali di consumo per una corsa indipendentemente dall'uso della funzione Edit (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa).

- ▶ **BaseSpace or BaseSpace Onsite configuration** (Configurazione di BaseSpace o BaseSpace Onsite): selezionare l'icona  **Edit** (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa). Una volta terminato, selezionare l'icona  **Save** (Salva).
- ▶ **Standalone configuration** (Configurazione su computer indipendente): selezionare l'icona  **Edit** (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa). Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).

Opzioni di spegnimento

Le opzioni di spegnimento non sono richieste per il funzionamento normale.

Opzione	Descrizione
Shut Down (Spegni)	Spegne il software e l'alimentazione dello strumento. Vedere <i>Spegnimento dello strumento</i> a pagina 56.
Restart (Riavvia)	Riavvia Windows e il software di controllo e quindi inizializza lo strumento. Questo comando è di solito usato durante una sessione di risoluzione dei problemi o da un rappresentante Illumina.
Exit to Windows (Esci su Windows)	Chiude il software di controllo e accede direttamente al sistema operativo. Uscire su Windows per eseguire compiti amministrativi. Il funzionamento normale è eseguito dall'interfaccia software in modalità kiosk.

Sequencing Analysis Viewer (SAV)

Il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) mostra le metriche di sequenziamento generate durante la corsa. Le metriche vengono visualizzate sotto forma di grafici di dispersione, 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 ulteriori informazioni, vedere *Guida per l'utente di Sequencing Analysis Viewer (SAV)*, (n. codice 15020619).

SAV è incluso in NextSeq System Suite installato sul computer dello strumento. SAV può anche essere installato su un altro computer collegato alla stessa rete dello strumento per monitorare a distanza le metriche della corsa.

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 ciascuna lettura (2×150), più otto cicli ciascuna per due letture indice.

Per le durate previste e altre specifiche di sistema, visitare la pagina delle specifiche di NextSeq 550 sul sito Web Illumina.

Numero di cicli 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. Il ciclo extra è necessario per i calcoli di determinazione delle fasi (phasing) e di predeterminazione delle fasi (prephasing).

Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente

I materiali di consumo e l'attrezzatura seguenti sono utilizzati su NextSeq 550.

Materiali di consumo forniti dall'utente per le corse di sequenziamento

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
1 N NaOH (idrossido di sodio)	Fornitore generico	Denaturazione della libreria, diluita a 0,2 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Fornitore generico	Denaturazione della libreria
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure di etanolo al 70%	VWR, n. catalogo 95041-714 (o equivalente) Fornitore generico	Pulizia della cella a flusso e per uso generico
Guanti monouso, privi di polvere lubrificante	Fornitore generico	Uso generale
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026 (o equivalente)	Pulizia della cella a flusso

Materiali di consumo forniti dall'utente per la manutenzione dello strumento

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
NaOCl, 5% (ipoclorito di sodio)	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 239305 (o equivalente)	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 generico	Lavaggio dello strumento (lavaggio manuale)

Linee guida per l'acqua da laboratorio

Per eseguire le procedure dello strumento usare sempre acqua da laboratorio. Non usare mai acqua di rubinetto o acqua deionizzata. Quanto segue sono esempi accettabili di acqua da laboratorio:

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

Apparecchiature fornite dall'utente

Apparecchio	Fornitore
Congelatore, temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, antibrina	Fornitore generico
Portaghiaccio	Fornitore generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore generico

Sequenziamento

Introduzione	24
Flusso di lavoro per il sequenziamento	25
Preparazione della cartuccia di reagenti	26
Preparazione della cella a flusso	27
Preparazione delle librerie per il sequenziamento	29
Impostazione di una corsa di sequenziamento	30
Monitoraggio del progresso della corsa	36
Lavaggio post-corsa automatico	38



Introduzione

Per eseguire una corsa di sequenziamento su NextSeq 550, 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 sottoposte ad amplificazione per formare i cluster.

Sequenziamento

I cluster vengono sottoposti a imaging usando la chimica di sequenziamento a due canali e una combinazione di filtri specifici per ciascun terminatore di catena etichettato 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.

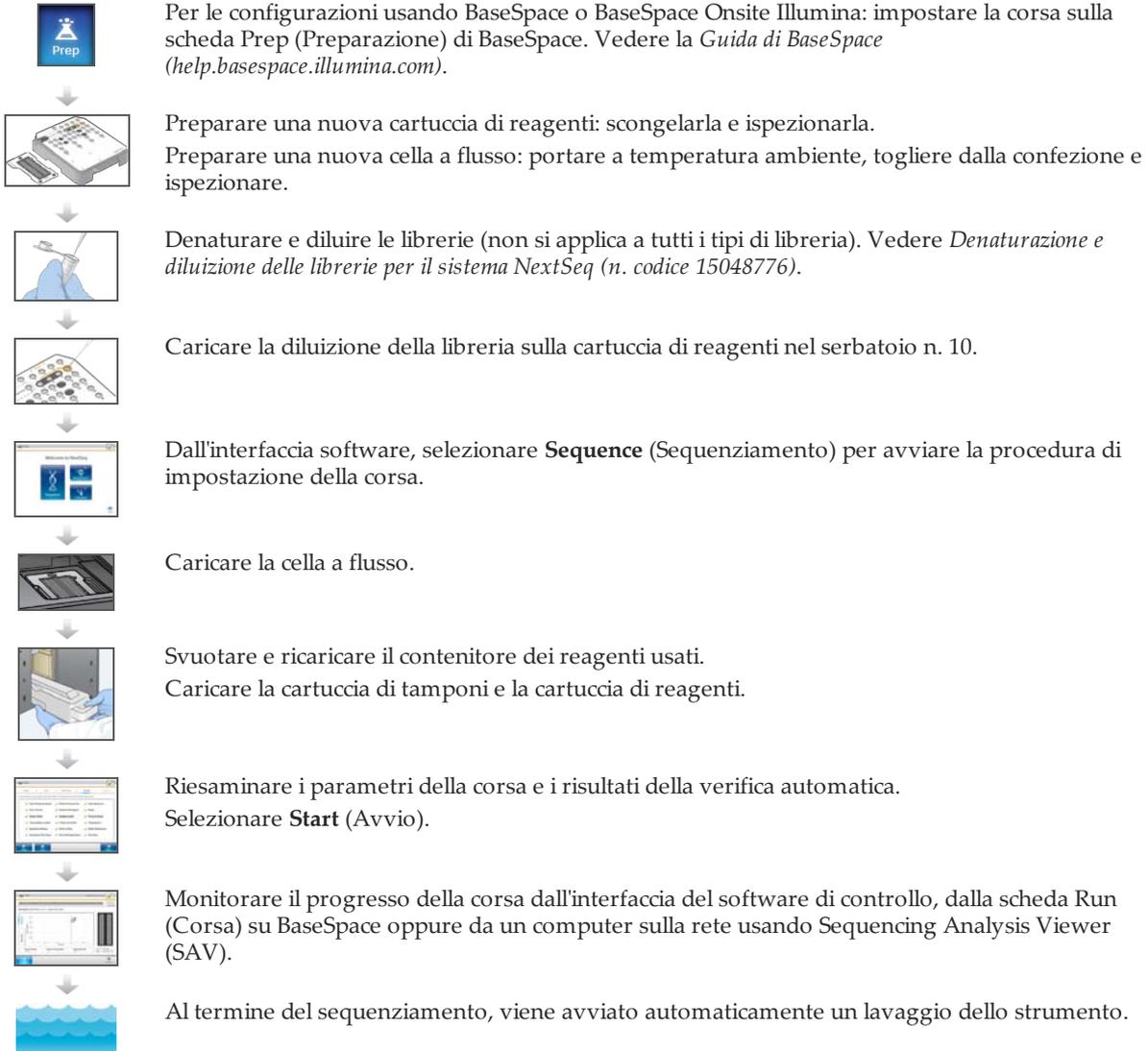
Monitorare il progresso e le statistiche della corsa dall'interfaccia del software di controllo, dalla scheda Run (Corsa) su BaseSpace oppure da un computer sulla rete usando il software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Vedere *Sequencing Analysis Viewer (SAV)* a pagina 20.

Analisi

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

In base all'applicazione sono disponibili diversi metodi di analisi. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di BaseSpace* (help.basespace.illumina.com).

Flusso di lavoro per il sequenziamento



Preparazione della cartuccia di reagenti

- 1 Rimuovere la cartuccia di reagenti dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
- 2 Scongela in un bagno d'acqua a temperatura ambiente fino a scongelamento (circa 60 minuti). Non sommergere la cartuccia.
- 3 Picchiettare delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua dalla base, quindi asciugare la base.



NOTA

Metodo alternativo: scongelare i reagenti durante la notte alla temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. I reagenti richiedono un minimo di 18 ore per lo scongelamento. A questa temperatura, i reagenti sono stabili fino a una settimana.

- 4 Capovolgere per miscelare i reagenti.
- 5 Ispezionare le posizioni 29, 30, 31 e 32 per assicurarsi che i reagenti siano scongelati.
- 6 Picchiettare delicatamente sul banco per ridurre le bolle d'aria.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Preparazione della cella a flusso

- 1 Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
- 2 Tenere la confezione aperta della cella a flusso a temperatura ambiente per 30 minuti.

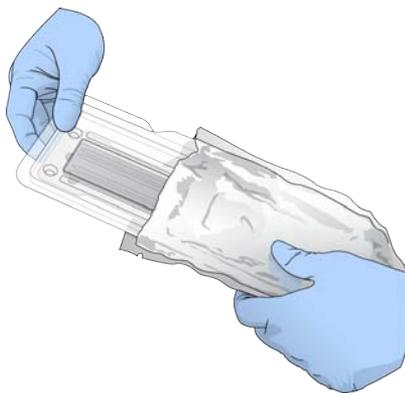


NOTA

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.

- 3 Rimuovere la cella a flusso dalla confezione in alluminio.

Figura 13 Rimozione dalla confezione in alluminio



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

Figura 14 Rimozione dalla confezione a forma di conchiglia

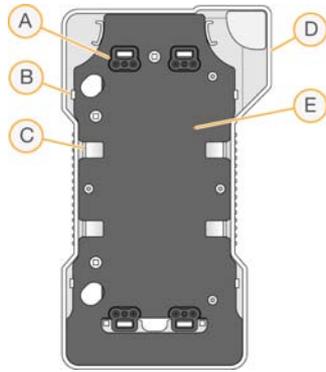


- 5 Pulire la superficie in vetro della cella a flusso con una salvietta imbevuta di alcool che non lascia residui. Asciugare il vetro con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.

Ispezione della cella a flusso

- 1 Assicurarsi che le porte della cella a flusso non siano ostruite.
- 2 Assicurarsi che le guarnizioni della porta siano posizionate e che siano visibili le parti bianche in plastica.

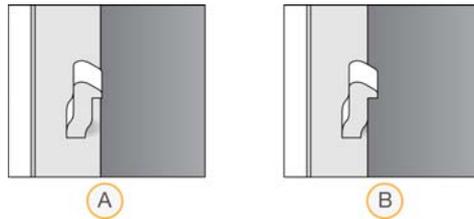
Figura 15 Componenti della cella a flusso



- A Guarnizioni porta (4)
- B Clip di blocco (4)
- C Clip a scatto (4)
- D Struttura della cartuccia della cella a flusso
- E Piastra di trasporto

- 3 Assicurarsi che le quattro clip di blocco bianche blocchino l'estremità della piastra di trasporto nera.
Se la piastra non è fissata sotto le clip, premere delicatamente assieme la piastra di trasporto nera e la struttura della cartuccia bianca fino a quando la piastra si blocca in posizione sotto le clip.

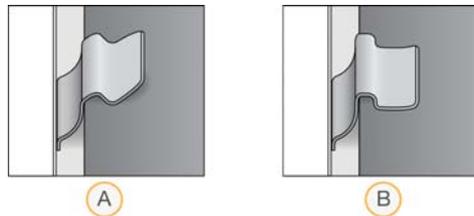
Figura 16 Ispezione delle clip di blocco



- A Posizione errata: la clip di blocco non blocca l'estremità della piastra di trasporto.
- B Posizione corretta: la clip di blocco blocca l'estremità della piastra di trasporto.

- 4 Assicurarsi che le quattro clip a scatto in metallo siano piatte sulla piastra di trasporto nera.

Figura 17 Ispezione delle clip a scatto



- A Posizione errata: la clip a scatto non è piatta sulla piastra di trasporto.
- B Posizione corretta: la clip a scatto è piatta sulla piastra di trasporto.

Preparazione delle librerie per il sequenziamento

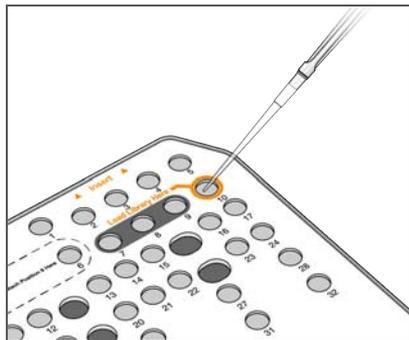
Denaturazione e diluizione delle librerie

Se richiesto dal tipo di libreria, denaturare e diluire le librerie e aggiungere un campione di controllo PhiX. Il volume della libreria e la concentrazione di caricamento è diversa in base alla versione di NCS che si sta eseguendo. Per maggiori informazioni, vedere la *Denaturazione e diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (n. codice 15048776)*.

Caricamento delle librerie sulla cartuccia di reagenti

- 1 Pulire il sigillo in alluminio che copre il serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Caricare qui la libreria) con un panno a bassissimo rilascio di particelle.
- 2 Perforare il sigillo con la punta di una pipetta pulita da 1 ml.
- 3 Caricare le librerie nel serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Caricare qui la libreria). Non toccare il sigillo in alluminio mentre si erogano le librerie.

Figura 18 Caricamento delle librerie



Impostazione di una corsa di sequenziamento

Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Experiment** (Esperimento) quindi selezionare **Sequence** (Sequenziamento).

Il comando Sequence (Sequenziamento) apre lo sportello dello scomparto di imaging, rilascia i materiali di consumo di una corsa precedente e apre la serie di schermate per l'impostazione della corsa. Un breve ritardo è normale.

Se lo strumento è configurato per BaseSpace o BaseSpace Onsite, si apre la schermata di login di BaseSpace.

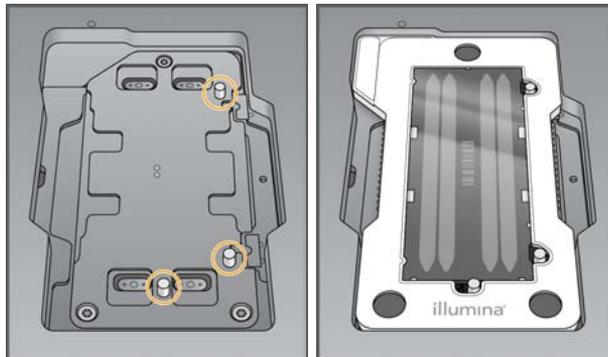
Schermata Log in to BaseSpace (Accedi a BaseSpace)

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

Caricamento della cella a flusso

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

Figura 19 Caricamento della cella a flusso



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

Svuotamento del contenitore dei reagenti usati

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

Figura 20 Rimozione del contenitore dei reagenti usati



NOTA

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

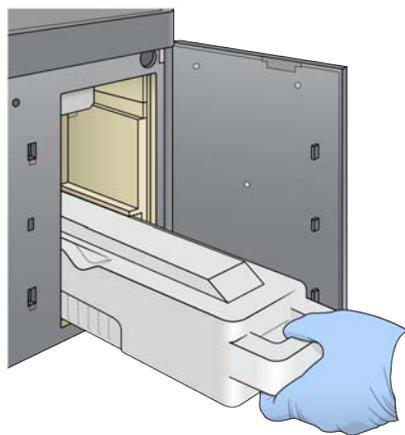


AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

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

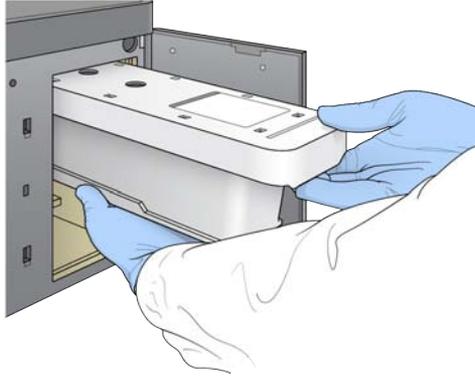
Figura 21 Caricamento del contenitore dei reagenti usati



Caricamento della cartuccia di tamponi

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

Figura 22 Caricamento della cartuccia di tamponi



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

Caricamento della cartuccia di reagenti

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



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

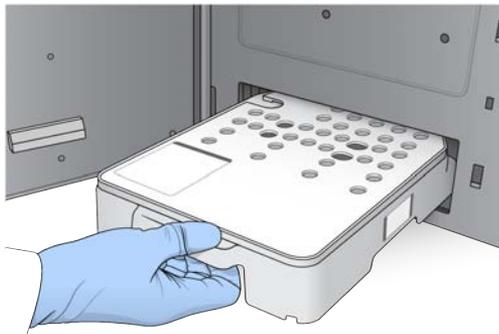


NOTA

Per semplificare lo smaltimento sicuro dei reagenti non usati, il serbatoio in posizione 6 è rimovibile. Per maggiori informazioni, vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6* a pagina 33.

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

Figura 23 Caricamento della cartuccia di reagenti

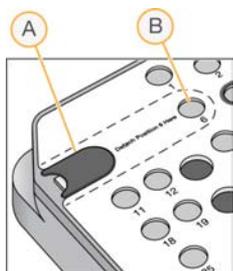


- 3 Selezionare **Load** (Carica). Il software sposta automaticamente la cartuccia in posizione (circa 30 secondi), l'ID della cartuccia viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono sottoposti a verifica.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).

Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6

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

Figura 24 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 in 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 autonomo:** 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.
Usare 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 sottoposte a pooling 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 ciascuna lettura.
 - [Opzionale] Custom Primers (Primer custom), se applicabile.

- 4 [Opzionale] Selezionare l'icona  **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).
 - **Run parameters** (Parametri della corsa): cambiare il numero di letture o il numero di cicli per lettura.
 - **Custom primers** (Primer personalizzati): cambiare le impostazioni per i primer personalizzati. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq* (n. codice 15057456).
 - **Purge consumables for this run** (Spurgo dei materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa corrente. Per maggiori informazioni, vedere *Personalizzazione della corsa* a pagina 18.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento dei parametri della corsa (configurazione su computer autonomo)

- 1 Immettere un nome della corsa scelto dall'utente.
- 2 [Opzionale] Immettere un ID della libreria scelto dall'utente.
- 3 Dall'elenco a discesa Recipe (Ricetta), selezionare una ricetta. Sono elencate solo le ricette compatibili.
- 4 Selezionare un tipo di lettura, **Single Read** (Unidirezionale) oppure **Paired End** (Paired-end).
- 5 Inserire il numero di cicli per ciascuna lettura nella corsa di sequenziamento.
 - **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli.
 - **Read 2** (Lettura 2): immettere un valore fino a 151 cicli. Questo valore è di solito lo stesso numero di cicli di Read 1 (Lettura 1).
 - **Index 1** (Indice 1): immettere il numero di cicli richiesti per il primer Index 1 (i7).
 - **Index 2** (Indice 2): immettere il numero di cicli richiesti per il primer Index 2 (i5).
 Il software di controllo conferma le voci immesse in base ai criteri seguenti:
 - I cicli totali non devono superare il numero di cicli massimi permesso
 - I cicli per Lettura 1 sono superiori ai 5 cicli usati per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster
 - I cicli Lettura Indici non superano i cicli Lettura 1 e Lettura 2
- 6 [Opzionale] Se si stanno usando primer personalizzati, selezionare la casella di controllo per i primer usati. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq* (n. codice 15057456).
 - **Read 1** (Lettura 1): primer personalizzato per Read 1 (Lettura 1).
 - **Read 2** (Lettura 2): primer personalizzato per Read 2 (Lettura 2).
 - **Index 1** (Indice 1): primer personalizzato per Index 1 (Indice 1).
 - **Index 2** (Indice 2): primer personalizzato per Index 2 (Indice 2).
- 7 [Opzionale] Selezionare l'icona  **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).
 - **Output folder location** (Posizione cartella di output): modificare la posizione della cartella di output per la corsa attuale. Selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare alla posizione di rete prescelta.

- **Purge consumables for this run** (Spurgo dei materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa corrente. Per maggiori informazioni, vedere *Personalizzazione della corsa* a pagina 18.
- **Use run monitoring for this run** (Usa monitoraggio corsa per questa corsa): modificare questa impostazione per utilizzare il monitoraggio della corsa in BaseSpace.

8 Selezionare **Next** (Avanti).

Revisione della verifica automatica

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

- ▶ **Segno di spunta grigio**: la verifica non è ancora stata eseguita.
- ▶ **Icona di progresso** : la verifica è in corso.
- ▶ **Segno di spunta verde**: la verifica è stata superata.
- ▶ **X rossa**: la verifica non è stata superata. Per qualsiasi voce che non supera la verifica, è richiesta un'azione prima di poter procedere. Vedere *Risoluzione dei errori della verifica automatica* a pagina 62.

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

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

Avvio della corsa

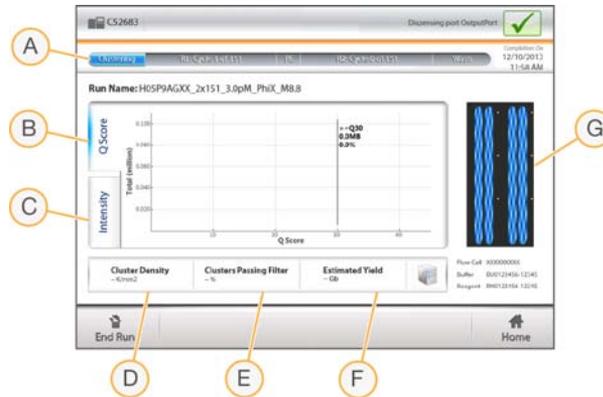
Al termine della verifica automatica, selezionare **Start** (Avvia). La corsa di sequenziamento viene avviata.

Per configurare il sistema per avviare una corsa automaticamente dopo una verifica, selezionare *Personalizzazione della corsa* a pagina 18.

Monitoraggio del progresso della corsa

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

Figura 25 Progresso e metriche della corsa di sequenziamento



- A Progresso della corsa:** mostra la fase in corso di elaborazione e il numero di cicli completati per ciascuna lettura. La barra di progresso non è proporzionale alla velocità della corsa di ciascuna fase. Usare il tempo rimanente indicato nell'angolo superiore destro per determinare la durata attuale.
- B Q-Score (Punteggi qualitativi):** mostra la distribuzione dei punteggi qualitativi. Vedere *Punteggio qualitativo* a pagina 81.
- C Intensity (Intensità):** mostra il valore delle intensità dei cluster per il 90° percentile per ciascuna tile. I colori del grafico indicano ciascuna base: rosso è A, verde è C, blu è G e nero è T. I colori corrispondono agli indicatori delle basi utilizzati in Sequencing Analysis Software (SAV).
- D Cluster Density (K/mm²) (Densità dei cluster - K/mm²):** mostra il numero di cluster rilevato per la corsa.
- E Clusters Passing Filter (%) (Cluster che attraversano il filtro - %):** mostra la percentuale di cluster che attraversano il filtro. Vedere *Cluster che attraversano il filtro* a pagina 78.
- F Estimated Yield (Gb) (Resa prevista - Gb):** mostra il numero di basi previste per la corsa.
- G Immagine della cella a flusso:** mostra quale coppia di corsie è sottoposte a imaging mentre l'altra coppia di corsie è in una fase della chimica.



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 autonomo 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, rendimento e punteggi qualitativi.

Trasferimento dei dati

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

Stato	BaseSpace Illumina	BaseSpace Onsite	Strumento autonomo
Collegato			
Collegato e in fase di trasferimento dati			
Scollegato			

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

Run Copy Service (Esecuzione servizio copia)

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

Lavaggio post-corsa automatico

Al completamento della corsa di sequenziamento, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico usando 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.



NOTA

Il lavaggio post-corsa automatico pompa la soluzione di lavaggio nel sistema dalla cartuccia di tamponi ai recipienti di lavaggio riservati nella cartuccia di reagenti, quindi al contenitore dei reagenti usati.

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.

Scansione

Introduzione	40
Flusso di lavoro della scansione	42
Come scaricare la cartella DMAP	43
Caricamento del BeadChip sull'adattatore	44
Impostazione di una scansione	45
Monitoraggio del progresso della scansione	47



Introduzione

Per eseguire una scansione su NextSeq 550, sono necessari un BeadChip ibridato e colorato, l'adattatore BeadChip, i file Decode Map (DMAP), un file manifest e un file cluster per il BeadChip che si sta utilizzando.

- ▶ Utilizzare un Decode Download Client per scaricare una cartella DMAP per il BeadChip che si sta utilizzando e copiarla nella posizione specificata sulla schermata BeadChip Configuration (Configurazione del BeadChip). I file Decode Map (DMAP) sono posizionati nella cartella DMAP che è univoca per ciascun codice a barre del BeadChip.
- ▶ Caricare il BeadChip sull'adattatore BeadChip riutilizzabile e quindi caricare l'adattatore sullo strumento. Il software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura per avviare la scansione.
- ▶ 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 di scansione in un formato file di identificazione dei genotipi (GTC). Per impostazione predefinita, NextSeq 550 genera dati normalizzati e identificazioni del genotipo associate nel formato file GTC. Facoltativamente, è possibile configurare lo strumento per generare file dei dati di intensità (IDAT) aggiuntivi. Per maggiori informazioni, vedere *Configurazione per la scansione del BeadChip* a pagina 17.

Decode File Client

La cartella DMAP contiene le informazioni che identificano le posizioni delle microsfere sul BeadChip e quantifica il segnale associato con ciascuna microsfera. Una cartella DMAP è univoca per ciascun codice a barre del BeadChip.

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

Per accedere a Decode File Client, andare alla pagina di supporto di Decode File Client 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 43.

File manifest e file cluster

Per ciascun BeadChip, il software richiede l'accesso a un file manifest e a un file cluster. Ciascun file manifest e file cluster è univoco per un tipo di BeadChip. Assicurarsi che siano utilizzati i file cluster che comprendono NS550 nel nome del file. Questi file sono compatibili con il sistema NextSeq.

- ▶ **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) e quindi **BeadChip Scan Configuration** (Configurazione per la scansione del BeadChip).

Una volta installato lo strumento NextSeq 550, 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 69.

Flusso di lavoro della scansione

DMP

Scaricare le informazioni DMAP e salvarle nella cartella DMAP specificata.



Caricare il BeadChip sull'adattatore BeadChip.



Caricare l'adattatore BeadChip sullo strumento.



Specificare i parametri della scansione: la posizione della cartella DMAP e la posizione di output.



Rivedere i risultati della verifica automatica.
Selezionare **Start** (Avvio).



Monitorare la scansione dall'interfaccia del software di controllo.

Come scaricare la cartella DMAP

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

Accesso alla cartella DMAP mediante account

- 1 Dalla scheda principale di Decode File Client, selezionare un'opzione di download:
 - AutoPilot
 - All BeadChips not yet downloaded (Tutti i BeadChip non ancora 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.
Assicurarsi di avere spazio libero sufficiente sulla destinazione del 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.

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.
Assicurarsi di avere spazio libero sufficiente sulla destinazione del download.
- 3 Avviare il download. Visualizzare lo stato del download dalla scheda Download Status and Log (Stato download e registro).
- 4 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 26 Caricamento del BeadChip sull'adattatore



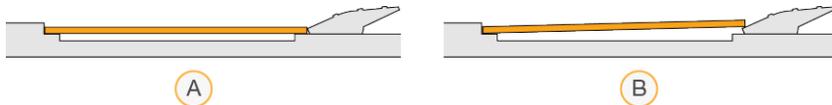
- 3 Utilizzando le aperture su entrambi i lati del BeadChip, assicurarsi che il BeadChip sia posizionato nel supporto incassato dell'adattatore.

Figura 27 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 28 Ispezione della posizione del BeadChip



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

Impostazione di una scansione

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.

Come scaricare i materiali di consumo del sequenziamento

Se i materiali di consumo del sequenziamento sono presenti e si sta impostando una scansione, il software suggerisce di scaricare la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi prima di passare alla fase successiva.

- 1 Se suggerito, rimuovere i materiali di consumo del sequenziamento 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.



AVVERTENZA

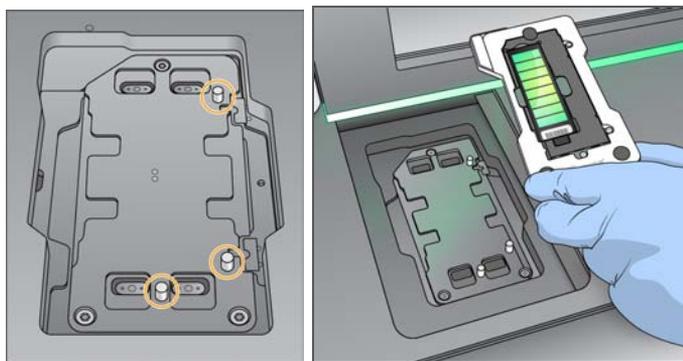
Questo set di reagenti contiene formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

- b Rimuovere la cartuccia di tamponi usata dallo scomparto tamponi.
- 2 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 29 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 sottoposti a verifica. 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 68.
 - 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 era 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** (Sfogliare) 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** (Sfogliare) e navigare alla posizione preferita.
- 2 Selezionare **Next** (Avanti).

Revisione della verifica automatica

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

- ▶ **Segno di spunta grigio**: la verifica non è ancora stata eseguita.
- ▶ **Icona di progresso** : la verifica è in corso.
- ▶ **Segno di spunta verde**: la verifica è stata superata.
- ▶ **X rossa**: la verifica non è stata superata. Per qualsiasi voce che non supera la verifica, è richiesta un'azione prima di poter procedere. Vedere *Risoluzione dei errori della verifica automatica* a pagina 62.

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

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

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, selezionare *Personalizzazione della corsa* a pagina 18.

Monitoraggio del progresso della scansione

Monitorare il progresso della scansione utilizzando l'immagine del BeadChip. Ciascun colore sull'immagine indica lo stato della scansione.

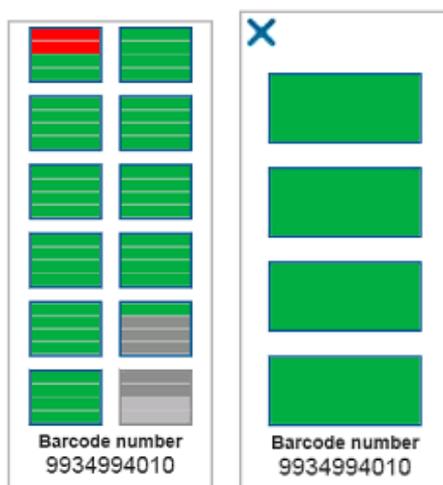
- ▶ **Grigio chiaro:** scansione non eseguita.
- ▶ **Grigio scuro:** scansione eseguita ma non registrata.
- ▶ **Verde:** scansione eseguita e registrata correttamente.
- ▶ **Rosso:** scansione e registrazione non riuscite.

Se la registrazione non riesce, è possibile eseguire una nuova scansione dei campioni che contengono le sezioni non riuscite. Vedere *Mancata scansione del BeadChip* a pagina 68.

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 30 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 sottoposti a 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 90.

Se la connessione viene interrotta, il trasferimento dei dati riprende automaticamente al ripristino della connessione. Ciascun file dispone di un timer di un'ora dopo che è stato messo in coda per il trasferimento 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.

Manutenzione

Introduzione	50
Esecuzione di un lavaggio manuale	51
Aggiornamenti software	54
Spegnimento dello strumento	56



Introduzione

Le procedure di manutenzione comprendono i lavaggi manuali dello strumento e, quando disponibili, gli aggiornamenti del software del sistema.

- ▶ **Lavaggi dello strumento:** un lavaggio post-corsa automatico dopo ciascuna corsa di sequenziamento mantiene le prestazioni dello strumento. Tuttavia, un lavaggio manuale è richiesto periodicamente in determinate condizioni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale* a pagina 51.
- ▶ **Aggiornamenti software:** quando è disponibile una versione aggiornata del software del sistema, è possibile installare l'aggiornamento automaticamente mediante una connessione a BaseSpace oppure manualmente dopo aver scaricato l'installer dalla pagina Web Illumina. Vedere *Aggiornamenti software* a pagina 54.

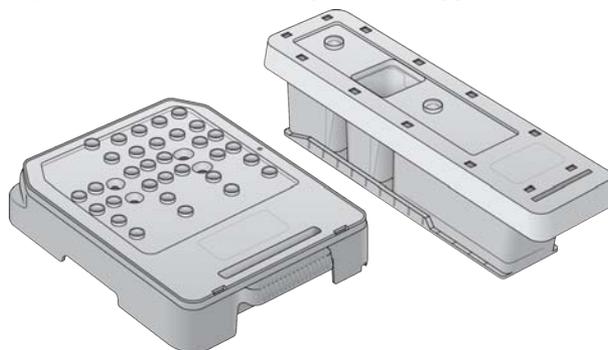
Esecuzione di un lavaggio manuale

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 dei 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). • Richiesto dopo uno spegnimento.
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 dei 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 dei 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 31 Cartuccia dei reagenti di lavaggio e cartuccia dei tamponi di lavaggio



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

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

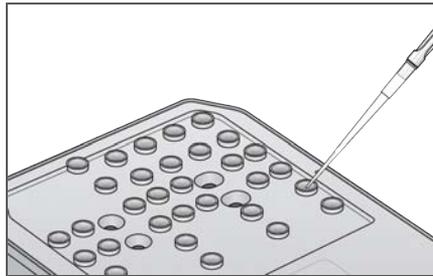


NOTA

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

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

Figura 32 Caricamento di NaOCl



- 4 Combinare i seguenti volumi per ottenere una soluzione di lavaggio di 0,05% Tween 20:
 - 100% Tween 20 (62 µl)
 - Acqua da laboratorio (125 ml)
- 5 Aggiungere 125 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia dei tamponi di lavaggio.
- 6 Selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio) quindi **Manual Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa manuale).

Preparazione per Quick Wash (Lavaggio rapido)

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

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

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

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



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

- 3 Fare scorrere il contenitore dei reagenti usati nello scomparto tamponi fino all'arresto.
- 4 Rimuovere la cartuccia dei tamponi usata nella corsa precedente, se presente.
- 5 Caricare la cartuccia dei 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** (Avvio).
- 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.

Aggiornamenti software

Gli aggiornamenti software sono confezionati in un gruppo di software denominato System Suite, che include:

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Ricette NextSeq
- ▶ RTA v2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

Gli aggiornamenti software possono essere installati automaticamente utilizzando una connessione Internet o manualmente da una rete o una posizione USB.

- ▶ **Automatic updates** (Aggiornamenti automatici): per gli strumenti collegati a una rete con accesso a Internet, quando è disponibile un aggiornamento software viene visualizzata l'icona  sul pulsante Manage Instrument (Gestione strumento) sulla schermata Home (Inizio).
- ▶ **Manual updates** (Aggiornamenti manuali): scaricare l'installer di System Suite dalla pagina di supporto di NextSeq 550 sul sito Web Illumina.

Aggiornamento software automatico

- 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 Attendersi alle istruzioni della 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 compreso un aggiornamento del firmware, è richiesto un riavvio automatico del sistema dopo l'aggiornamento del firmware.

Aggiornamento software manuale

- 1 Scaricare l'installer di System Suite dalla pagina 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** (Installare manualmente l'aggiornamento dalla posizione seguente).

- 5 Selezionare **Browse** (Sfogliare) per andare alla posizione della cartella in cui si trova il file di installazione del software, quindi selezionare **Update** (Aggiorna).
 - 6 Attenersi alle istruzioni della 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 compreso un aggiornamento del firmware, è richiesto un riavvio automatico del sistema dopo l'aggiornamento del firmware.

Spegnimento dello strumento

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **System Power Options** (Opzioni di alimentazione del sistema).
- 3 Selezionare **Shut Down** (Spegnimento).
Il comando Shut Down (Spegni) spegne in sicurezza il software e spegne lo strumento.
Attendere almeno 60 secondi prima di accendere nuovamente lo strumento.



ATTENZIONE

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

Risoluzione dei problemi

Introduzione	58
File di risoluzione dei problemi	59
Live Help (Assistenza in diretta)	61
Risoluzione dei errori della verifica automatica	62
Contenitore dei reagenti usati pieno	65
Flusso di lavoro di reibridazione	66
Errori del BeadChip e della scansione	68
Ricette personalizzate e cartelle delle ricette	70
Verifica del sistema	71
Messaggio di errore RAID	74



Introduzione

Per eventuali domande tecniche, visitare le pagine di supporto di NextSeq 550 sul sito Web Illumina. Le pagine di supporto forniscono l'accesso a documentazione, download e domande frequenti.

Accedere all'account MyIllumina per accedere ai bollettini di supporto.

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, rivolgersi all'Assistenza tecnica Illumina. Vedere *Assistenza tecnica* a pagina 95.

Prendere in considerazione la possibilità di condividere un link al riepilogo della corsa in BaseSpace con l'Assistenza tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi.

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 risolvere il problema.

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)	Data \Intensities	Contiene le impostazioni della configurazione di RTA per la corsa. Il file RTAConfiguration.xml viene creato all'inizio della corsa.
File InterOp (*.bin)	InterOp	File report binari usati per Sequencing Analysis Viewer. 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 [Nome strumento]_Hardwareattuale.csv elenca i numeri di serie dei componenti dello strumento.
File registro errori (*ErrorLog*.txt)	Registri RTA	Registro degli errori di RTA. I file registro errori sono aggiornati ogni volta che si verifica un errore.
File registro globale (*GlobalLog*.tsv)	Registri RTA	Registro di tutti gli eventi RTA. I file registro globale sono aggiornati durante tutta la corsa.
File registro corsia (*LaneLog*.txt)	Registri RTA	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	[Codice a barre]	Le metriche sono fornite come metriche del campione e come metriche della sezione. [codice a barre]_campione_metriche.csv: per ciascun 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). [codice a barre]_sezione_metriche.csv: per ciascuna sezione e tile, elenca Laser Z-position (Laser posizione Z), Through Focus Z-position (Sul fuoco posizione Z), 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 nuova scansione	[Codice a barre]	[codice a barre]_nuova_scansione.cella_a_flusso: elenca le posizioni delle tile regolate per una nuova scansione, che include una sovrapposizione aumentata da tile a tile.

Live Help (Assistenza in diretta)

La funzione Live Help (Assistenza in diretta) collega lo strumento direttamente al personale dell'Assistenza tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi. Con il permesso dell'utente, un rappresentante dell'Assistenza tecnica Illumina può visualizzare lo schermo e condividere il controllo dello strumento. L'utente mantiene il controllo prioritario sullo strumento e può mettere fine alla sessione di condivisione della schermata in qualsiasi momento.

Per abilitare Live Help (Assistenza in diretta), lo strumento deve essere collegato a una rete con accesso a Internet.

Risoluzione dei errori della verifica automatica

Se si verificano errori durante la verifica automatica, utilizzare le azioni seguenti raccomandate per risolvere l'errore. Le verifiche automatiche sono diverse per il sequenziamento e per le scansioni di array.

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 usata per una corsa successiva. Tuttavia, l'etichetta RFID viene bloccata dopo che i sigilli in alluminio sono stati perforati.

Verifiche del sistema	Azione raccomandata
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 ciascun 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)	I componenti critici del software sono mancanti. Eseguire un aggiornamento manuale del software per ripristinare i componenti del software.
Instrument Disk Space (Spazio su disco dello strumento)	Il disco rigido dello strumento non ha spazio su disco sufficiente per eseguire una corsa. I dati di una corsa precedente potrebbero non essere stati trasferiti. Liberare i dati della corsa dal disco rigido dello strumento.
Network Connection (Connessione rete)	La connessione alla rete è stata interrotta. Verificare lo stato della rete e confermare la connessione fisica alla rete.
Network Disk Space (Spazio su disco della rete)	L'account BaseSpace è pieno o il server della rete è pieno.

Temperature (Temperatura)	Azione raccomandata
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	Azione raccomandata
Imaging Limits (Limiti di imaging)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Sistema di imaging	Azione raccomandata
Z Steps-and-Settle (Fasi e arresto 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	Azione raccomandata
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 (Contenitore dei reagenti usati vuoto)	Svuotare il contenitore dei reagenti usati e ricaricare il contenitore vuoto.

Verifiche per le scansioni di array

Verifiche del sistema	Azione raccomandata
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 ciascun 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)	I componenti critici del software sono mancanti. 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 di 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.

Verifiche del sistema	Azione raccomandata
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	Azione raccomandata
Imaging Limits (Limiti di imaging)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Z Steps-and-Settle (Fasi e arresto 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 smaltire 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

Una corsa di reibridazione potrebbe essere necessaria se le metriche generate durante i primi pochi cicli mostrano intensità inferiori a 2500. Alcune librerie a bassa diversità possono mostrare intensità inferiori a 1000, 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 passaggi seguenti 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 Lettura 1 precedente.
- ▶ Ibridizza un primer Lettura 1 fresco.
- ▶ Prosegue con la 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 momenti seguenti:

- ▶ **Dopo il ciclo 5:** le intensità appaiono dopo la registrazione della griglia, che richiede i primi 5 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.
- ▶ **Lettura 1 o Lettura Indice 1:** terminare la corsa *prima* dell'avvio della risintesi paired-end. La cella a flusso non può essere salvata per le successiva reibridazione dopo l'avvio della risintesi paired-end.

Materiali di consumo necessari

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

Terminazione della corsa attuale

- 1 Selezionare **End Run** (Termina corsa). Quando richiesto di confermare il comando, selezionare **Yes** (Sì).

- 2 Quando richiesto di salvare la cella a flusso, selezionare **Yes (Sì)**. 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 trasparente a forma di conchiglia *senza* la confezione essiccante. Per ottenere i risultati migliori, reibridare la cella a flusso salvata entro 3 giorni.

Esecuzione di un lavaggio manuale

- 1 Dalla 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 51.

**NOTA**

Se la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi non sono ancora state rimosse dalla corsa arretrata, è possibile utilizzare queste cartucce per il lavaggio manuale. In caso contrario eseguire un lavaggio manuale con la cartuccia dei reagenti di lavaggio e la cartuccia dei tamponi di lavaggio.

Impostazione di una nuova corsa sulla scheda BaseSpace Prep (Preparazione BaseSpace)

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

**SUGGERIMENTO**

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

Impostazione di una corsa sullo strumento

- 1 Preparare una nuova cartuccia di reagenti.
- 2 Se la cella a flusso salvata è stata conservata, permettere alla cella a flusso di raggiungere la temperatura ambiente (15-30 minuti).
- 3 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 opzioni seguenti:
 - **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** (Successivo) per procedere alla verifica pre-corsa e avviare la corsa.

Errori del BeadChip e della 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** (Nuova 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 dei codici a barre contengono fino a 12 cifre. Selezionare **Save** (Salva). L'immagine del codice a barre è archiviato nella cartella di output.
- ▶ Selezionare **Cancel** (Annulla). Lo sportello dello scomparto di imaging si apre per scaricare l'adattatore BeadChip.

Mancata scansione del BeadChip

Le immagini sono registrate dopo essere state sottoposte a scansione. La registrazione identifica le microsfere mettendo in correlazione le loro posizioni sull'immagine scansionata e le informazioni nella mappa delle microsfere o nella cartella DMAP.

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

Figura 33 BeadChip che mostra le sezioni non riuscite



Quando la scansione è completata e i dati sottoposti a scansione sono scritti nella cartella di output, il pulsante Rescan (Nuova scansione) diventa attivo.

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

- ▶ Esegue una nuova 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 ciascuna nuova scansione, ma lo fa in secondo piano. Il software non rinomina la cartella di output.

Nuova scansione o avvio di una nuova scansione

- 1 Selezionare **Rescan** (Nuova 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 altri metodi 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 nuova scansione.

Sostituzione dei file manifest e dei file cluster

- 1 Andare alla pagina di supporto di 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 NextSeq 550. 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 Dalla 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** (Sfogliare) 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** (Personalizzato)
 - 📁 **High** (Elevato): ricette personalizzate usate con un High Output Kit.
 - 📁 **Mid** (Medio): ricette personalizzate usate con un Mid Output Kit.
- 📁 **High** (Elevato): ricette originali usate con un High Output Kit.
- 📁 **Mid** (Medio): ricette originali usate con un Mid Output Kit.
- 📁 **Wash** (Lavaggio): contiene la ricetta per il lavaggio manuale.

Verifica del sistema

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

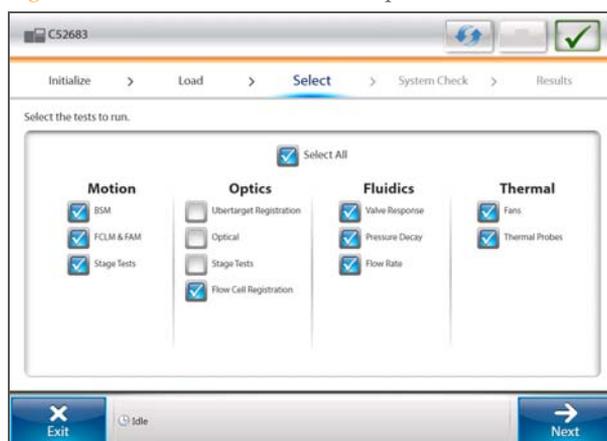


NOTA

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

L'avvio di una verifica del sistema chiude il software di controllo e lancia NextSeq Service Software (NSS). Il software di servizio viene lanciato e si apre alla schermata Load (Carica), che viene configurata per usare l'opzione avanzata di caricamento.

Figura 34 Verifiche del sistema disponibili



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

Esecuzione di una verifica del sistema

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Check** (Verifica sistema). Quando richiesto di chiudere il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì).
- 2 Caricare i materiali di consumo nel modo seguente:
 - a Se una cella a flusso usata non è già sullo strumento, caricare una cella a flusso usata.
 - b Svuotare il contenitore dei reagenti usati e rimetterlo sullo strumento.
 - c Caricare la cartuccia dei tamponi di lavaggio contenente 120 ml di acqua da laboratorio nel serbatoio centrale.
 - d Caricare la cartuccia dei reagenti di lavaggio. Assicurarsi che la cartuccia dei reagenti di lavaggio sia vuota e pulita.
- 3 Selezionare **Load** (Carica). Il software sposta in posizione la cella a flusso e la cartuccia dei reagenti di lavaggio. Selezionare **Next** (Avanti).
- 4 Selezionare **Next** (Avanti). Viene avviata la verifica del sistema.
- 5 [Opzionale] Al termine della verifica del sistema, selezionare **View** (Visualizza) accanto al nome della verifica per visualizzare i valori associati a ciascuna verifica.

- 6 Selezionare **Next** (Avanti). Si apre il report della verifica del sistema.
- 7 Selezionare **Save** (Salva) per salvare il report in formato compresso. Andare alla posizione di rete in cui salvare il file.
- 8 Una volta terminato, selezionare **Exit** (Esci).
- 9 Quando richiesto di chiudere il software di controllo e di riavviare il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì). Il software di controllo si riavvia automaticamente.

Verifiche del movimento

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

Verifica del modulo ottica

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

Verifiche della fluidica

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

Verifiche termiche

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

Messaggio di errore RAID

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

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

Real-Time Analysis (RTA)

Introduzione	76
Descrizione generale di RTA v2	77
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	79



Introduzione

Il software integrato Real-Time Analysis (RTA) esegue l'analisi dei dati in tempo reale integrata sullo strumento durante la corsa di sequenziamento, comprese l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi, accelerando di conseguenza i tempi di analisi a valle. NextSeq usa una nuova implementazione del software Real-Time Analysis (RTA) chiamata RTA v2, che include differenze importanti nell'architettura e nelle caratteristiche.

RTA v2 introduce le differenze seguenti:

- ▶ Tutti i processi sono eseguiti in memoria per massimizzare la velocità di elaborazione.
- ▶ I file di configurazione, i formati file di output e il flusso di lavoro di elaborazione differiscono dalle implementazioni precedenti di RTA.
- ▶ Le impostazioni del file di configurazione usate con le implementazioni precedenti di RTA non sono compatibili con RTA v2.
- ▶ Se l'elaborazione viene arrestata, RTA v2 non continua o non riprende l'elaborazione. Non è possibile riavviare il software durante una corsa di sequenziamento.

Descrizione generale di RTA v2

RTA v2 viene eseguito sul computer dello strumento ed esegue l'analisi durante la corsa. RTA v2 estrae le intensità dalle immagini, esegue l'identificazione delle basi e assegna punteggi qualitativi all'identificazione delle basi.

A differenza delle versioni precedenti di RTA, RTA v2 e NextSeq Control Software (NCS) comunicano tramite un'interfaccia HTTP sul Web e condividono file di memoria. RTA v2 archivia in memoria tutte le informazioni dell'elaborazione per renderla più veloce possibile. Poiché l'elaborazione avviene in memoria, *RTA v2 non può essere riavviato dopo l'interruzione di una corsa.*

Input per RTA v2

RTA v2 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, che è un file di configurazione software in formato XML.

RTA v2 riceve i comandi dal software di controllo sulla posizione del file RunInfo.xml e se è stata specificata una cartella di output opzionale.

File di output di RTA v2

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

Tipo di file	Descrizione
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata viene inclusa in un file aggregato di identificazione delle basi (*.bcl) per ciascuna corsia e per ciascuno ciclo. Il file aggregato dell'identificazione delle basi contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato per ciascun 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, che sono il numero di tile e il numero di cluster per quella tile.

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

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

Cluster che attraversano il filtro

Durante la corsa, RTA v2 filtra i dati non elaborati e rimuove le letture che non corrispondono alla soglia per la qualità dei dati. I cluster sovrapposti o di qualità bassa vengono rimossi.

Per l'analisi a due canali, RTA v2 utilizza un sistema basato sulla popolazione per determinare il valore chastity di una identificazione delle basi. I cluster attraversano il filtro (PF) quando non più di una identificazione delle basi nei primi 25 cicli hanno un valore chastity di $< 0,63$. I cluster che non attraversano il filtro non rappresentano un'identificazione delle basi.

Gestione degli errori di RTA v2

RTA v2 crea file di registro e li scrive nella cartella RTALogs. Gli errori vengono registrati in un file di errori in formato file *.tsv.

I file di registro e i file di errori seguenti 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

Il flusso di lavoro di Real-Time Analysis include le fasi seguenti:

- ▶ **Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster:** definisce le posizioni dei cluster.
- ▶ **Registrazione ed estrazione dell'intensità:** allinea le posizioni dei cluster e determina i valori di intensità.
- ▶ **Correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing):** corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing).
- ▶ **Identificazione delle basi:** determina una identificazione delle basi per ciascun cluster.
- ▶ **Punteggio qualitativo:** assegna un punteggio qualitativo per ciascuna identificazione delle basi.

Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

La prima fase nel 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, RTA v2 richiede almeno una base che non sia G nei primi **due** cicli.

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

Registrazione ed estrazione dell'intensità

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

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

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

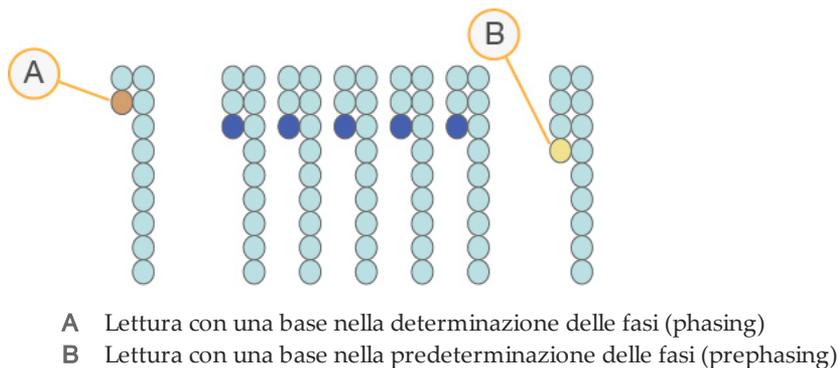
Correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing)

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 35 Determinazione delle fasi (phasing) e predeterminazione delle fasi (prephasing)



RTA v2 corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) usando un algoritmo empirico per la correzione della determinazione delle fasi (phasing), che massimizza il valore chastity cumulativo dei dati a ogni ciclo per tutta la corsa. RTA v2 non applica correzioni alle letture indici.

Identificazione delle basi

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ciascun cluster di una data tile a un ciclo specifico. NextSeq 550 usa 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 confrontata con un'altra immagine fornisce quattro popolazioni distinte, ciascuna corrispondente a un nucleotide. Il processo di identificazione delle basi determina a quale popolazione appartiene ciascun cluster.

Figura 36 Intensità dei cluster in un grafico a dispersione

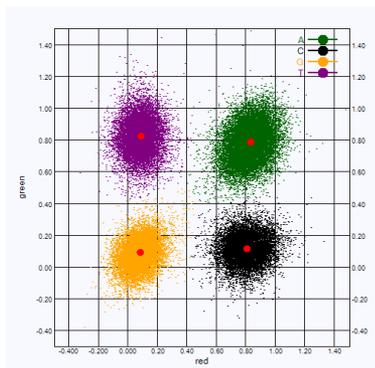


Tabella 1 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

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.

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

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 è più affidabile e più probabile che sia corretta.

Il punteggio qualitativo permette di comunicare velocemente la probabilità di piccoli errori. I punteggi qualitativi sono rappresentati come QXX, dove XX è il punteggio. La tabella seguente illustra la relazione fra il punteggio qualitativo e la probabilità di errore.

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

Il punteggio qualitativo calcola un set valori per ciascuna identificazione delle basi e quindi usa questi valori per individuare il punteggio qualitativo in una tabella qualitativa. Le tabelle qualitative sono create per fornire previsioni di qualità accurate ed 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). Per maggiori informazioni, vedere *File di output per il sequenziamento* a pagina 84.

File e cartelle di output

File di output per il sequenziamento	84
Struttura della cartella di output del sequenziamento	88
File di output della scansione	89
Struttura della cartella di output della scansione	90



File di output per il sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	<p>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.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia.</p> <p>[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.</p>
File indice identificazione delle basi	<p>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.</p> <p>I file indice individuazione delle basi sono creati la prima volta che un file di identificazione delle basi viene creato per quella corsia.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia.</p> <p>s_[Corsia].bci</p>
File posizione cluster	<p>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.</p> <p>Data\Intensities\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia.</p> <p>s_[corsia].locs</p>
File filtro	<p>I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. Le informazioni sui filtri sono aggregate in un file filtro per ciascun corsia e lettura.</p> <p>I file filtro sono generati al ciclo 26 usando 25 cicli di dati.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia.</p> <p>s_[corsia].filter</p>
File InterOp	<p>File report binari usati dal software Sequencing Analysis Viewer (SAV). I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.</p> <p>Cartella InterOp</p>
File configurazione RTA	<p>Creati all'inizio di una corsa, i file configurazione RTA elencano le impostazioni per la corsa.</p> <p>[Cartella della corsa - livello base], RTAConfiguration.xml</p>
File informazioni corsa	<p>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.</p> <p>[Cartella della corsa - livello base], RunInfo.xml</p>

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File immagini in miniatura (thumbnail)	<p>Un'immagine in miniatura per ciascun canale colore (rosso e verde) per le tile 1, 6 e 12 da tutte le videocamere, superficie superiore e inferiore a ogni ciclo durante l'imaging.</p> <p>Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e una sotto cartella per ciascun ciclo.</p> <p>s_[corsia]_[tile]_[canale].jpg: nel nome del file, la tile è rappresentata da un numero a cinque cifre che indica superficie, striscia, videocamera e tile. Per maggiori informazioni, vedere <i>Numerazione delle tile</i> a pagina 87 e <i>Assegnazione di un nome alle immagine in miniatura (thumbnail)</i> a pagina 87.</p>

Tile della cella a flusso

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

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

Tabella 2 Tile della cella a flusso

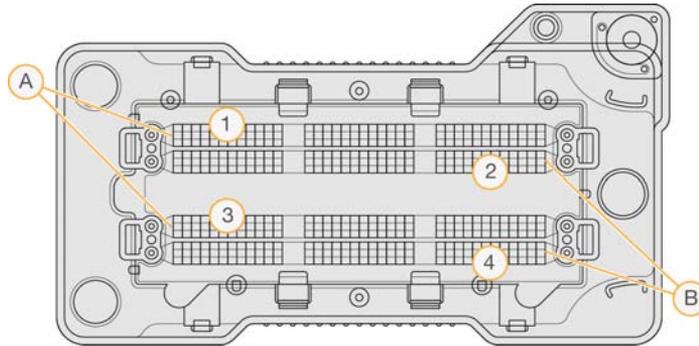
Componente della cella a flusso	Output elevato	Output medio	Descrizione
Corsie	4	4	Una corsia è un canale fisico con porte di ingresso e di uscita dedicate.
Superfici	2	2	La cella a flusso è sottoposta a imaging su due superfici, la superficie superiore e la superficie inferiore. La superficie superiore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

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 corsie A.

Figura 37 Numerazione delle corsie

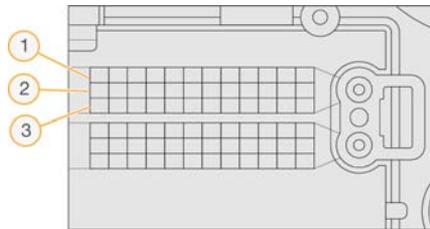


- A Coppia corsie A - corsie 1 e 3
- B Coppia corsie B - corsie 2 e 4

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 38 Numerazione delle strisce

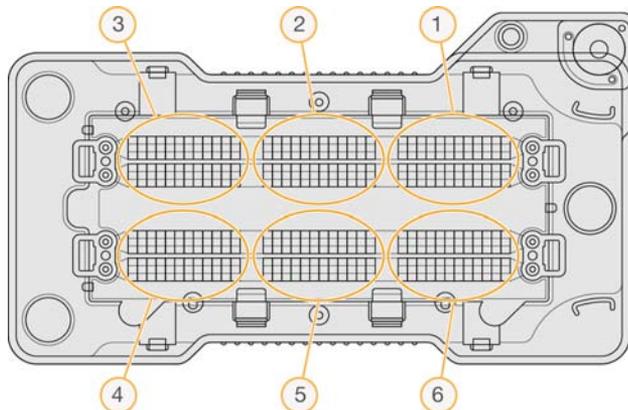


Numerazione delle videocamere

NextSeq 550 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 39 Numerazione delle videocamere e dei segmenti

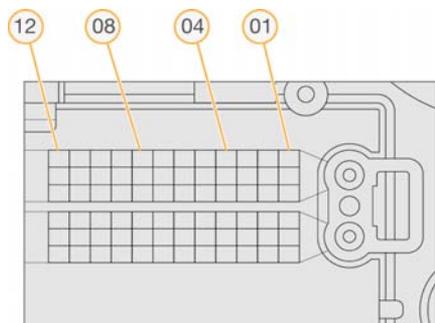


Mostrata una cella a flusso High output (Output elevato)

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 40 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 ulteriori informazioni, vedere *File di output per il sequenziamento* a pagina 84.

Assegnazione di un nome alle immagine in miniatura (thumbnail)

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

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

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

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

Struttura della cartella di output del sequenziamento

- 📁 **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**: i file binari usati da Sequencing Analysis Viewer (SAV).
- 📁 **Logs**: i file di registro che descrivono le fasi operative.
- 📁 **Recipe**: il file della ricetta specifico per la corsa denominato con l'ID della cartuccia di reagenti.
- 📁 **RTALogs**: i file di registro che descrivono le fasi dell'analisi.
- 📁 **Thumbnail_Images**: le immagini in miniatura per le tile 1, 6 e 12 in ciascuna striscia a ciascun ciclo.
- 📄 RTAComplete.xml
- 📄 RTAConfiguration.xml
- 📄 RunInfo.xml
- 📄 RunNotes.xml
- 📄 RunParameters.xml

File di output della scansione

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File GTC	<p>File di identificazione dei genotipi. Un file GTC è generato per ciascun campione sottoposto a scansione sul BeadChip. Il nome del file comprende il codice a barre e il campione sottoposto a scansione.</p> <p>[codice a barre]_[campione].gtc</p>
File delle immagini	<p>I file delle immagini sono denominati in base all'area sottoposta a scansione sul BeadChip. Il nome comprende il codice a barre, il campione e la sezione su BeadChip, striscia e canale di imaging (rosso o verde).</p> <p>[codice a barre]_[campione]_[sezione]_[striscia]_[videocamera]_[tile]_[canale].jpg</p> <ul style="list-style-type: none"> • Codice a barre: il nome del file inizia con il codice a barre del BeadChip. • Campione: un'area del BeadChip, numerata come una riga (R0X), dall'alto al basso, e una colonna (C0X) da sinistra a destra. • Sezione: un riga numerata entro un campione. • Striscia: i BeadChip sono sottoposti a imaging come una raccolta di tile sovrapposte. Quindi, solo una striscia è utilizzata per sottoporre a imaging la sezione. • Videocamera: la videocamera utilizzata per raccogliere l'immagine. • Tile: un'area di imaging definita come il campo visivo della videocamera. • Canale: un canale è rosso o verde.

A

- accesso a Windows 14
- adattatore
 - caricamento BeadChip 45
 - orientamento BeadChip 44
 - panoramica 6
- aggiornamento software 54
- analisi
 - file di output 84
- analisi secondaria
 - modalità BaseSpace 17
 - modalità indipendente 17
- analisi, primaria
 - determinazione delle fasi (phasing) 79
 - punteggio qualitativo 81
 - purezza segnale 78
- assistenza clienti 95
- assistenza tecnica 95
- attraversamento filtro (PF) 78
- avviso di stato 13

B

- barra di stato 4
- BaseSpace 2
 - icone trasferimento 37
 - impostazione 17
 - login 30
- BeadChip
 - adattatore 6, 44
 - analisi 2
 - caricamento 45
 - impossibile leggere il codice a barre 68
 - mancata registrazione 68
 - orientamento codice a barre 44
 - tipi 2

C

- cartella DMAP
 - Decode File Client 40
 - download 43
- cartuccia di reagenti
 - panoramica 8
 - preparazione, flusso di lavoro
 - cartuccia di reagenti 26
- cartuccia di tamponi 9, 31
- cartuccia reagenti
 - serbatoio n. 28 52
- cella a flusso
 - confezione 27
 - coppie di corsie 7
 - denominazione file immagini 87
 - guarnizioni porta 27
 - imaging 86
 - ispezione 27
 - numerazione corsie 86

- numerazione tile 87
- numero striscia 86
- panoramica 7
- perni di allineamento 30
- pulizia 27
- reibridazione 66
- tile 85
- tipi 2
- cicli in una lettura 20
- cluster che attraversano il filtro 78
- compatibilità
 - cella a flusso, cartuccia di reagenti 7
 - etichettatura RFID 8
 - monitoraggio RFID 7
- componenti
 - barra di stato 4
 - scomparto di imaging 4
 - scomparto reagenti 4
 - scomparto tamponi 4
- configurazione autonoma 34
- configurazione BaseSpace 33
- coppie corsie 86

D

- Decode File Client 40
 - accesso mediante account 43
 - accesso mediante BeadChip 43
- determinazione delle fasi (phasing) 79
- documentazione 3, 95
- durata della corsa 20

E

- errori e avvertenze 13
 - in file di output 78
- errori verifica pre-corsa 62
- esecuzione servizio copia 37

F

- file di input, scansione
 - cartella DMAP 40
 - cartella DMAP, download 43
 - file cluster 40, 69
 - file manifest 40, 69
- file di output 84
- file di output della scansione
 - GTC, IDAT 89
- file di output scansione
 - GTC, IDAT 17
- file di output, scansione
 - GTC, IDAT 17, 89
- file di output, sequenziamento 84
- file di registro
 - GlobalLog 78
 - LaneNLog 78
- file filtro 84
- file GTC 17, 89
- file identificazione delle basi 84

- file InterOp 59, 84
- file locs 84
- filtro chastity 78
- flusso di lavoro
 - BeadChip 45
 - cartuccia di reagenti 32
 - cartuccia di tamponi 31
 - cella a flusso 30
 - durata della corsa 20
 - ipoclorito di sodio 52
 - login a BaseSpace 30
 - metriche della corsa 36
 - modalità autonoma 34
 - modalità BaseSpace 33
 - opzione avanzata di caricamento 13
 - panoramica 25, 42
 - preparazione della cella a flusso 27
 - reagenti usati 30
 - verifica pre-corsa 35, 46
- formammide, posizione n. 6 33
- formazione online 3
- G**
- generazione della griglia per
 - l'identificazione dei cluster 79
- gestione strumento 12
 - impostazione analisi secondaria 17
 - impostazione di BaseSpace 17
 - impostazioni IP e DNS 16
 - invio salute strumento 17
 - nome computer 16
 - personalizzazione 18
 - spegnimento 56
- guida
 - documentazione 3
 - salute dello strumento 17
- guida, Live Help (Assistenza in diretta) 61
- I**
- icone
 - errori e avvertenze 13
 - stato 13
- identificazione delle basi 80
- imaging, sequenziamento a due canali 80
- immagini in miniatura 85
- impostazione corsa, opzione avanzata 13
- impostazioni configurazione 15
- impostazioni IP e DNS 16
- intensità 80
- interruttore di alimentazione 10
- ipoclorito di sodio, lavaggio 52
- L**
- lavaggio
 - automatico 38
 - componenti lavaggio 51
 - lavaggio manuale 12, 51
 - materiali di consumo forniti dall'utente 51
- lavaggio post-corsa 38
- lavaggio strumento 51
- linee guida acqua da laboratorio 21
- Live Help (Assistenza in diretta) 12, 61
- lunghezza lettura 20
- M**
- manutenzione strumento
 - materiali di consumo forniti dall'utente 21
- materiali di consumo
 - acqua da laboratorio 21
 - cartuccia di reagenti 8
 - cartuccia di tamponi 9
 - cella a flusso 7
 - corse di sequenziamento 21
 - forniti da Illumina 7
 - manutenzione strumento 21
 - materiali di consumo lavaggio 51-52
- materiali di consumo forniti dall'utente 21
- messaggio di errore RAID 74
- metriche
 - cicli densità cluster 36
 - cicli intensità 36
 - identificazione delle basi 80
- metriche della corsa 36
- monitoraggio RFID 7
- N**
- nome avatar 18
- nome strumento, personalizzazione 18
- nome utente e password 10
- nome utente e password del sistema 10
- numerazione corsie 86
- numerazione strisce 86
- numerazione tile 87
- numerazione videocamere 86
- O**
- opzione avanzata di caricamento 13, 18
- P**
- parametri della corsa
 - modalità autonoma 34
 - modalità BaseSpace 33
 - modifica parametri 33
- personalizzazione 18
- posizione cartella 34
- posizione cartella di output 17
- posizione cluster
 - file 84
 - generazione della griglia per l'identificazione dei cluster 79
- predeterminazione delle fasi (prephasing) 79
- probabilità errore 81
- pulsante di accensione 10
- punteggi qualitativi 81
- punteggi qualitativi (Q-scores) 81
- R**
- reagenti
 - confezione 7
 - smaltimento corretto 32

- reagenti usati
 - contenitore pieno 65
 - smaltimento 30, 53
- reibridazione primer 66
- reibridazione, Lettura 1 66
- risoluzione dei problemi
 - contenitore dei reagenti usati 65
 - file specifici per la corsa 59
 - file specifici per la scansione 60
 - impossibile leggere il codice a barre del BeadChip 68
 - Live Help (Assistenza in diretta) 61
 - mancata registrazione della scansione 68
 - metriche qualità bassa 66
 - opzioni contatto 58
 - sostituzione file manifest e file cluster 69
 - verifica pre-corsa 62
 - verifica sistema 14, 71
- RTA v2
 - gestione errori 78
- RunInfo.xml 59, 84

S

- scala Phred 81
- schermata Home (Inizio) 12
- scomparto di imaging 4
- scomparto reagenti 4
- scomparto tamponi 4
- Sequencing Analysis Viewer 24
- sequenziamento
 - materiali di consumo forniti dall'utente 21
- sequenziamento a due canali 80
- software
 - aggiornamento automatico 54
 - aggiornamento manuale 14, 54
 - analisi immagini, identificazione delle basi 12
 - durata della corsa 20
 - impostazione strumento 18
 - impostazioni configurazione 15
 - inizializzazione 10
 - integrato sullo strumento 12
 - schermata Home (Inizio) 12
- software BlueFuse Multi 2, 17
- software di controllo 12
- software Real-Time Analysis 2, 12
 - differenze di RTA v2 76
 - risultati 84
- spegnimento dello strumento 14, 56
- spurgo dei materiali di consumo 19
- strumento
 - avvio 10
 - impostazioni configurazione 15
 - pulsante di accensione 10
 - spegnimento 14

T

- trasferimento dati
 - esecuzione servizio copia 37
 - icone attività 37
- trasferimento dei dati
 - dati di scansione 47

V

- verifica pre-corsa 35, 46
- verifica sistema 14, 71

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 3 Dati di contatto generali Illumina

Sito Web	www.illumina.com
Email	techsupport@illumina.com

Tabella 4 Numeri di telefono Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Australia	1.800.775.688	Norvegia	800.16836
Austria	0800.296575	Nuova Zelanda	0800.451.650
Belgio	0800.81102	Paesi Bassi	0800.0223859
Danimarca	80882346	Regno Unito	0800.917.0041
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

Schede di sicurezza (SDS)

Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione dei prodotti

La documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito web di Illumina. Andare al sito support.illumina.com e selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).

