

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

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente addestrato. 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 DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2017 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, BaseSpace, HiSeq, HiSeq X, TruSeq, la tonalità di arancione e la grafica del fluire delle basi sono marchi di fabbrica di Illumina, Inc. e/o delle sue affiliate 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

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20015569 Documento n. 15066493 v04	Gennaio 2017	Aggiornata la procedura del lavaggio di manutenzione. Rimosso Sigma-Aldrich n. di catalogo SRE0076 per la soluzione di lavaggio SeqClin. Aggiornato il nome del software con HiSeq Control Software HD v3.4.
Materiale n. 20013046 Documento n. 15066493 v03	Settembre 2016	Aggiunto Custom Protocol Selector alle Risorse addizionali. Aggiunto Sigma-Aldrich n. di catalogo SRE0076 per la soluzione di lavaggio SeqClin. Annotata la frequenza indicativa per sostituire i flaconi e le provette di lavaggio. Aggiornate le istruzioni per avviare lo strumento: <ul style="list-style-type: none">• Attendere che il sistema si carichi prima di accedere al sistema operativo, non dopo.• La durata per la configurazione dei dispositivi dello strumento e per l'inizializzazione di DoNotEject è stata modificata da un minuto a tre minuti.• Annotato che i dischi rigidi devono essere vuoti per il corretto funzionamento del software. Aggiornate le istruzioni per la formattazione veloce per includere l'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea (S:\). Corrette le istruzioni per accedere al file di registro. Corrette le descrizioni per le opzioni di BaseSpace Server.

Documento	Data	Descrizione della modifica
<p>Materiale n. 20007158 Documento n. 15066493 v02</p>	<p>Maggio 2016</p>	<p>Aggiornate le descrizioni del software per HiSeq Control Software v3.3.76 con l'aggiunta di istruzioni per gli utenti che dispongono dell'abbonamento a BaseSpace Enterprise per la configurazione di un dominio.</p> <p>Rinominate BaseSpace in BaseSpace Sequence Hub e BaseSpace Onsite in BaseSpace Onsite Sequence Hub.</p> <p>Aggiunte le informazioni seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Numeri di catalogo dei kit Cluster. • <i>Guida del sistema cBot 2 (documento n. 15065681)</i> come riferimento per la generazione di cluster. • Struttura della cartella dei file di output per il sequenziamento e nome e percorso della cartella della corsa. • Risoluzione dei problemi di perdita di registrazione nella Lettura 1. • Raccomandazione di un servizio di manutenzione preventiva annuale. <p>Rimossi i seguenti elementi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Provette coniche con base d'appoggio e punte per pipette dai materiali di consumo forniti dall'utente. • Nome utente e password predefiniti richiesti per l'accesso al sistema operativo. Illumina raccomanda di utilizzare le credenziali specifiche per il laboratorio. • Numero di catalogo per questa guida. <p>Corretti i seguenti elementi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Istruzioni per la preparazione e il caricamento dei reagenti di indicizzazione e paired-end per un ciclo unidirezionale. HRM non è richiesto per un ciclo a singolo indice unidirezionale. • Nome del software Real-Time Analysis usato sullo strumento da RTA v2 a RTA2.

Documento	Data	Descrizione della modifica
<p>Materiale n. 20000055</p> <p>Documento n. 15066493 v01</p>	<p>Agosto 2015</p>	<p>Aggiornate le descrizioni del software alla versione HiSeq Control Software v3.3.52, che aggiunge le seguenti funzioni:</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'opzione di sequenziare una cella a flusso unidirezionale. • L'opzione di collegarsi a BaseSpace Onsite. • Gli indicatori di rilevamento mostrano lo stato del trasferimento dei dati di Run Copy Service e BaseSpace. <p>Rinominato il campo PE Reagent Kit ID (ID kit di reagenti paired-end) nella schermata Reagents (Reagenti) in Cluster Kit ID (ID kit Cluster).</p> <p>Aggiunta l'opzione per specificare un numero di cicli SBS personalizzati dalla schermata Reagents (Reagenti) e aggiornati i cicli rimanenti predefiniti.</p> <p>Aggiunte le informazioni seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Istruzioni per preparare i reagenti SBS, paired-end e di indicizzazione. • Istruzioni per pulire il vano portacella con acqua prima di pulirlo con alcol. • Nota per smaltire la soluzione di lavaggio di manutenzione in base alle normative governative locali. <p>Corretti la durata e i volumi previsti per il lavaggio di manutenzione.</p>
<p>N. codice 15066493 Rev. A</p>	<p>Febbraio 2015</p>	<p>Versione iniziale.</p>

Sommario

Cronologia revisioni	iii
Sommario	vii
Capitolo 1 Descrizione generale	1
Introduzione	2
Risorse aggiuntive	3
Componenti dello strumento	4
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	9
Capitolo 2 Informazioni preliminari	11
Avvio di HiSeq 3000	12
Personalizzazione delle impostazioni del sistema	13
Visualizzazione e invio dei dati dello strumento	15
Materiali di consumo forniti dall'utente	16
Capitolo 3 Preparazione dei reagenti	17
Introduzione	18
Preparazione dei reagenti SBS	19
Preparazione dei reagenti paired-end e di indicizzazione	20
Capitolo 4 Sequenziamento	21
Introduzione	22
Flusso di lavoro per il sequenziamento	23
Inserimento dei parametri della corsa	24
Caricamento e priming dei reagenti	27
Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento	32
Monitoraggio della corsa	35
Rimozione dei reagenti	36
Esecuzione di un lavaggio con acqua	37
Formattazione veloce dell'unità di output e dell'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea	38
Capitolo 5 Manutenzione	39
Introduzione	40
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	41
Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)	46
Spegnimento dello strumento	47
Appendice A Risoluzione dei problemi	49
File di registro	50
Possibili problemi d'impostazione della corsa	51
Esecuzione di una verifica della fluidica	52
Messa in pausa o arresto di una corsa su HiSeq 3000	53
Possibile reibridazione primer Lettura 1	55
Appendice B Real-Time Analysis (RTA)	57
Descrizione generale di Real-Time Analysis (RTA)	58
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis (RTA)	60

Appendice C File di output	65
File di output per il sequenziamento	66
Struttura della cartella di output	67
Numerazione delle tile	68
Indice	69
Assistenza tecnica	73

Descrizione generale

Introduzione	2
Risorse aggiuntive	3
Componenti dello strumento	4
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	9



Introduzione

Il sistema HiSeq® 3000 unisce una progettazione innovativa a prestazioni comprovate per offrire la massima produttività e i minori costi per la genomica in scala produttiva.

Caratteristiche

- ▶ **Imaging a doppia superficie:** HiSeq 3000 utilizza un sistema a epifluorescenza a due videocamere e quattro sensori con tecnologia di scansione all'avanguardia per consentire l'imaging a doppia superficie.
- ▶ **Cella a flusso preconfigurata (patterned):** una cella a flusso preconfigurata (patterned) permette la generazione di cluster di sequenziamento in un modo ordinato, per aumentare le letture di output e i dati generati.
- ▶ **Ampio vano refrigerato per i reagenti:** lo scomparto reagenti è un ampio vano refrigerato che contiene reagenti sufficienti per l'intera corsa di sequenziamento.
- ▶ **Fluidica integrata per corse paired-end:** la fluidica integrata paired-end fornisce i reagenti dallo scomparto reagenti alla cella a flusso per la risintesi Lettura 2 e per il sequenziamento indicizzato.
- ▶ **Opzioni dei controlli dell'interfaccia:** l'interfaccia software dello strumento fornisce varie opzioni per l'impostazione della corsa e per il funzionamento dello strumento utilizzando il monitor touch screen o la tastiera integrata.
- ▶ **Identificazione delle basi in tempo reale:** il software dello strumento estrae le intensità dalle immagini ed esegue l'identificazione delle basi qualitativamente valutate sul computer dello strumento, il che permette di monitorare le metriche di qualità durante la corsa e di risparmiare tempo prezioso durante la successiva analisi dei dati. L'analisi a valle dei dati di sequenziamento può essere eseguita con il software di analisi Illumina o software di terze parti su una infrastruttura personalizzata.
- ▶ **Integrazione di BaseSpace® Sequence Hub:** il flusso di lavoro per il sequenziamento è integrato con BaseSpace Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico Illumina per l'analisi dei dati, l'archiviazione e la collaborazione. Mentre la corsa è in fase di elaborazione, i file di output sono trasmessi in tempo reale a BaseSpace Sequence Hub o a BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Risorse aggiuntive

È possibile scaricare la documentazione seguente dal sito Web Illumina.

Risorsa	Descrizione
<i>Custom Protocol Selector</i>	Una procedura guidata per creare documentazione end-to-end personalizzata per il metodo di preparazione delle librerie, i parametri della corsa e il metodo di analisi utilizzati per la corsa di sequenziamento.
<i>Guida alla preparazione della sede di installazione per i sistemi HiSeq 4000 e HiSeq 3000 (documento n. 15066492)</i>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
<i>Guida sulla sicurezza e conformità dei sistemi HiSeq 4000 e HiSeq 3000 (documento n. 15066491)</i>	Fornisce informazioni sulla etichettatura dello strumento, le certificazioni di conformità e gli aspetti relativi alla sicurezza.

Consultare la pagina di supporto per HiSeq 3000 sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, alla formazione online e alle domande frequenti.

Componenti dello strumento

Il sistema HiSeq 3000 include lo strumento, un monitor, un computer di controllo dello strumento e accessori quali una tastiera, un mouse e uno scanner per codici a barre. Lo strumento include quattro scomparti principali: modulo ottica, scomparto della cella a flusso, scomparto della fluidica e scomparto reagenti. Lo stato operativo dello strumento è indicato da una barra di stato illuminata.

Figura 1 Componenti esterni

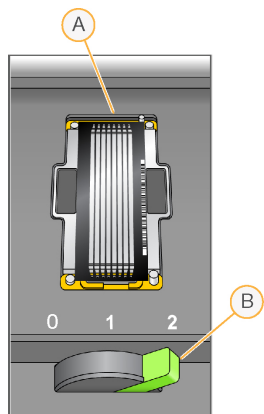


- A Modulo ottica:** contiene componenti ottici che consentono l'imaging a doppia superficie della cella a flusso, per l'acquisizione contemporanea di A, C, G e T mediante epifluorescenza. Il fascio laser di eccitazione passa attraverso l'obiettivo e la fluorescenza viene raccolta simultaneamente attraverso lo stesso obiettivo.
- B Scomparto della cella a flusso:** contiene il piano portacelle a depressione, che tiene in posizione la cella a flusso durante le corse di sequenziamento.
- C Scomparto della fluidica:** contiene le pompe della fluidica che erogano i reagenti alla cella a flusso e poi al contenitore per gli scarti.
- D Barra di stato:** utilizza tre colori per indicare lo stato dello strumento. Il blu indica che lo strumento è in esecuzione, l'arancione indica che lo strumento necessita attenzione e il verde indica che lo strumento è pronto a iniziare la corsa successiva.
- E Scomparto reagenti:** contiene i rack che contengono i reagenti per le corse di sequenziamento e la soluzione di lavaggio per i lavaggi dello strumento.

Scomparto della cella a flusso

Lo scomparto della cella a flusso contiene il piano portacelle, la stazione termica, il sistema del depressore e le connessioni della fluidica alla cella a flusso.

Figura 2 Piano portacelle



- A Cella a flusso
B Leva della cella a flusso

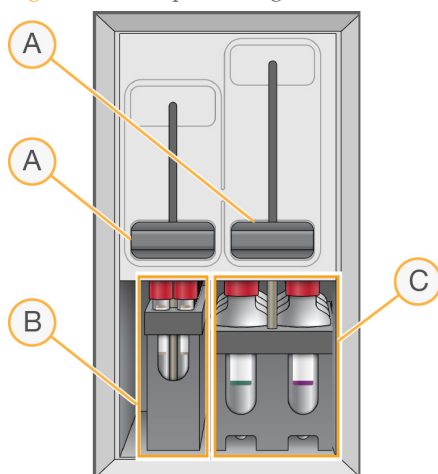
La cella a flusso è posizionata sul piano portacelle, che si sposta dentro e fuori il modulo ottica. La cella a flusso è posizionata sul vano portacella con le porte di ingresso e di uscita rivolte verso il basso ed è tenuta in posizione da una pompa a vuoto. La leva della cella a flusso illuminata di fronte al vano portacella controlla la pompa a vuoto. La leva della cella a flusso diventa verde quando la tenuta del vuoto è corretta.

Scomparto reagenti

Lo scomparto reagenti è un ampio vano refrigerato per i reagenti che contiene due rack reagenti: uno per i reagenti SBS e uno per i reagenti di indicizzazione e i reagenti paired-end. Le maniglie dei pettini di aspirazione abbassano i pescanti nei flaconi di reagente.

- ▶ **Rack reagenti SBS:** si trova nella posizione centrale, alla destra del rack dei reagenti paired-end. Contiene flaconi conici da 250 ml. Le posizioni numerate corrispondono alle connessioni su una valvola interna di selezione dei reagenti.
- ▶ **Rack reagenti di indicizzazione e reagenti paired-end:** posizionato a sinistra. Presenta una riga di posizioni numerate che contiene provette coniche da 15 ml contenente reagenti paired-end e reagenti di indicizzazione.
- ▶ **Vano refrigerato per i reagenti:** il vano refrigerato per i reagenti alloggia i rack reagenti e mantiene una temperatura interna compresa tra 2 °C e 8 °C.

Figura 3 Scomparto reagenti



- A Maniglie dei pettini di aspirazione
- B Rack reagenti per i reagenti di indicizzazione e i reagenti paired-end
- C Rack reagenti per i reagenti SBS






Software HiSeq 3000

Sul computer dello strumento sono installate tre applicazioni software:

- ▶ **HiSeq 3000 Control Software:** l'interfaccia HiSeq Control Software HD v3.4 guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione di una corsa di sequenziamento. Durante la corsa, il software di controllo controlla l'hardware dello strumento, controlla la fluidica, imposta le temperature e fornisce un riepilogo visivo delle statistiche di qualità.
- ▶ **Software Real-Time Analysis:** integrato con il software di controllo, Real-Time Analysis (RTA) esegue l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 57.
- ▶ **Software Sequencing Analysis Viewer:** Sequencing Analysis Viewer (SAV) fornisce statistiche dettagliate sulla qualità.

Icone di stato

Un'icona di stato posizionata nell'angolo superiore destro di ciascuna schermata segnala cambiamenti nelle condizioni operative, errori o avvertenze durante le fasi di impostazione della corsa e durante l'esecuzione della corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Nessun cambiamento. Le condizioni del sistema sono normali.
	Informazione	Solo a fini informativi. Non si richiede alcun intervento.
	Attenzione	Informazione che richiama l'attenzione dell'utente.
	Avvertenza	Le avvertenze non provocano l'arresto della corsa, ma possono subordinarne il proseguimento a un intervento dell'utente.
	Errore	In genere gli errori provocano l'arresto della corsa, che potrà continuare solo dopo un intervento dell'utente.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona associata lampeggia per avvertire l'utente.

- ▶ Selezionare l'icona per aprire la finestra di stato e visualizzare una descrizione della condizione.
- ▶ Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

Indicatori di attività e di rilevamento

La schermata Welcome (Benvenuto) contiene nell'angolo inferiore destro una serie di icone che indicano l'attività dello strumento e lo stato di componenti specifici in base agli indicatori di rilevamento dello strumento.

Figura 4 Indicatori di attività



Da sinistra a destra, gli indicatori di attività rappresentano i motori X, Y e Z, la funzionalità dell'elettronica, la videocamera, il sistema di fluidica e le funzioni di elaborazione.

Figura 5 Indicatori di rilevamento



Da sinistra a destra, gli indicatori di rilevamento rappresentano la temperatura della cella a flusso, la temperatura del vano refrigerato per i reagenti, lo stato del trasferimento dei dati e lo stato del cloud di BaseSpace Sequence Hub.





Stato del trasferimento dei dati

Il software HiSeq include Run Copy Service, che gestisce il trasferimento dei dati alla cartella di output. Una opzione di BaseSpace invia le informazioni sull'integrità dello strumento e i dati del sequenziamento a BaseSpace Sequence Hub o BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Due degli indicatori di rilevamento sull'interfaccia software mostrano lo stato del trasferimento di Run Copy Service e BaseSpace Sequence Hub.






Run Copy Service

Lo stato del trasferimento di Run Copy Service incide sulla possibilità di avviare una nuova corsa o di formattare in sicurezza l'unità di output.

Icona di stato	Descrizione
	I dati sono in fase di trasferimento. Non formattare l'unità di output fino al termine del trasferimento.
	I dati sono in fase di trasferimento ma la connessione di rete è lenta. Al termine del trasferimento è possibile impostare una corsa di sequenziamento o formattare l'unità di output.
	Run Copy Service è spento.
	Run Copy Service è acceso ma non trasferisce dati.

BaseSpace Sequence Hub

Un indicatore di rilevamento di BaseSpace rileva lo stato di BaseSpace Sequence Hub. Una nuvola blu indica una connessione attiva. Una nuvola grigia indica che il software non può connettersi. La tabella seguente fornisce ulteriori dettagli su ciascuna icona di stato.

Icona di stato	Descrizione
	Non connesso a BaseSpace Sequence Hub.
	Connesso a BaseSpace Sequence Hub ma senza trasferimento dei dati.
	Connesso a BaseSpace Sequence Hub e in fase di trasferimento dei dati per quattro o meno corse.
	Connesso a BaseSpace Sequence Hub e in fase di trasferimento dei dati per cinque o più corse. Quando questa icona è visualizzata, il software di controllo non permette ad alcuna corsa di connettersi a BaseSpace Sequence Hub.
	Disconnesso da BaseSpace Sequence Hub con i dati in coda per il trasferimento.

Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento

Per eseguire una corsa su HiSeq 3000 sono necessari un HiSeq 3000/4000 SBS Kit e un Cluster Kit. I kit Cluster sono disponibili nelle versioni paired-end e SR.

Nome del kit	N. di catalogo
HiSeq 3000/4000 SBS Kit (300 cicli)	FC-410-1003
HiSeq 3000/4000 SBS Kit (150 cicli)	FC-410-1002
HiSeq 3000/4000 SBS Kit (50 cicli)	FC-410-1001
HiSeq 3000/4000 PE Cluster Kit	PE-410-1001
HiSeq 3000/4000 SR Cluster Kit	GD-410-1001

Ciascun SBS Kit include i reagenti di sequenziamento utilizzati su HiSeq, con reagenti sufficienti per il sequenziamento di una cella a flusso. I reagenti di sequenziamento sono forniti in flaconi da 250 ml che si caricano direttamente sugli appositi rack. Le etichette dei reagenti sono codificate a colori per ridurre gli errori di caricamento.

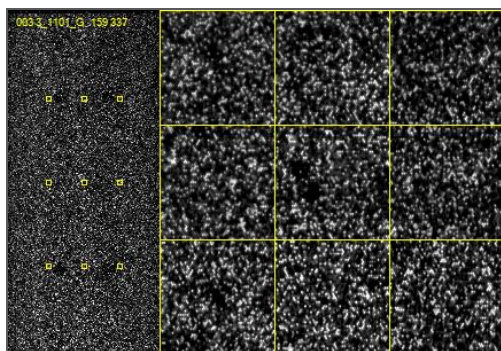
I kit Cluster contengono i reagenti di generazione cluster usati su cBot e i reagenti di indicizzazione e paired-end usati su HiSeq 3000. Ciascun kit Cluster include un kit di accessori con guarnizioni della cella a flusso, tappi a imbuto per i flaconi di reagente SBS e una provetta di conservazione della cella a flusso.

Cella a flusso preconfigurata (patterned)

HiSeq 3000 utilizza una cella a flusso preconfigurata (patterned) con miliardi di nano pozzetti ordinati all'interno del vetro della cella a flusso. L'organizzazione ordinata aumenta il numero di letture di output e la quantità di dati di sequenziamento generati.

La cella a flusso preconfigurata (patterned) è fornita in HiSeq 3000/4000 Cluster Kit.

Figura 6 Esempi di cluster su una cella a flusso preconfigurata (patterned)



Informazioni preliminari

Avvio di HiSeq 3000	12
Personalizzazione delle impostazioni del sistema	13
Visualizzazione e invio dei dati dello strumento	15
Materiali di consumo forniti dall'utente	16



Avvio di HiSeq 3000

- 1 Avviare il computer di controllo dello strumento.
- 2 Attendere il caricamento del sistema, quindi accedere al sistema operativo. Se necessario, rivolgersi all'amministratore della struttura per ottenere il nome utente e la password.
- 3 Individuare l'interruttore di alimentazione sul lato sinistro dello strumento e spostarlo in posizione ON.
- 4 Attendere almeno tre minuti per la configurazione corretta dei dispositivi dello strumento e per l'inizializzazione dell'unità dello strumento denominata DoNotEject (Non espellere).
- 5 Chiudere la finestra che si apre quando DoNotEject è inizializzato. Se la finestra non si apre, usare MyComputer per verificare l'unità DoNotEject.



NOTA

Non espellere mai l'unità di tipo flash denominata DoNotEject posta all'interno del telaio dello strumento ed evitare di modificare i file su tale unità. Questa unità contiene i file della configurazione hardware e si inizializza ogni volta che lo strumento viene acceso.

- 6 Per garantire uno spazio su disco adeguato, archiviare in rete i dati che si trovano sul computer dello strumento e che provengono da analisi precedenti. Eseguire una veloce riformattazione delle unità O:\ e S:\ per eliminare qualsiasi dato rimasto. I dischi rigidi devono essere vuoti affinché il software funzioni correttamente.
- 7 Aprire HCS mediante l'icona di collegamento sul desktop del computer. Una volta inizializzato il software, si apre la schermata Welcome (Benvenuto) e nell'angolo inferiore destro della schermata appare l'icona di inizializzazione.

Pratiche migliori per gestire lo strumento e il computer di controllo

- ▶ Non accendere il computer quando lo strumento è in funzione. Accendere sempre il computer prima di accendere lo strumento.
- ▶ Non spegnere lo strumento quando il software di controllo dello strumento è in esecuzione.
- ▶ Dopo aver spento lo strumento, attendere un minuto prima di accenderlo di nuovo.
- ▶ Prima di accendere il computer, collegare i cavi USB per lo strumento, il monitor e la tastiera alla parte posteriore del computer.
- ▶ Collegare lo scanner per codici a barre e il mouse alle porte USB nella parte anteriore del computer.

Personalizzazione delle impostazioni del sistema

Il software di controllo include impostazioni del sistema personalizzabili per le cartelle della corsa, le preferenze LIMS e i domini. La finestra Menu Options (Opzioni di menu) fornisce le impostazioni per definire il modello dell'ID della corsa, le posizioni delle cartelle predefinite, se lo strumento invierà informazioni sullo stato di integrità del sistema a Illumina, l'autenticazione LIMS e i domini per BaseSpace Enterprise.

Per personalizzare la visualizzazione dell'interfaccia, selezionare **Menu | View** (Menu | Visualizzazione). È possibile visualizzare l'interfaccia a schermo intero o in una finestra, o minimizzare l'interfaccia.

Definizione delle impostazioni delle cartelle della corsa

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Menu | Tools | Options** (Menu | Strumenti | Opzioni) per aprire la finestra Menu Options (Opzioni di menu).
- 2 Per personalizzare la convenzione usata per generare i nomi per le cartelle della corsa, modificare le impostazioni nel campo **Run ID Template** (Modello ID corsa). Selezionare **Reset** (Reimposta) per annullare il campo.
- 3 Per impostare una posizione per la cartella di output, immettere la posizione nel campo **Default Output Folder** (Cartella di output predefinita).



NOTA

Illumina raccomanda una posizione di rete per le cartelle di output. Tuttavia, è possibile specificare una posizione sull'unità O:\ se la posizione è diversa dalla cartella HiSeq Temp (HiSeq temporanea). Non utilizzare l'unità S:\ o l'unità C:\. L'unità S:\ è riservata per le operazioni dello strumento e l'unità C:\ è troppo piccola.

- 4 Per impostare una posizione per i moduli campione LIMS, immettere la posizione nel campo **Run Setup Folder** (Cartella impostazione corsa).
- 5 Selezionare **OK** (OK) per salvare il lavoro e chiudere la finestra Menu Options (Opzioni di menu). Selezionare **Cancel** (Annulla) per chiudere senza salvare.

Impostazione delle preferenze per LIMS

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Menu | Tools | Options** (Menu | Strumenti | Opzioni) per aprire la finestra Menu Options (Opzioni di menu).
- 2 Immettere le impostazioni seguenti per LIMS:
 - ▶ **LIMS Server** (Server LIMS): il nome del server per l'interazione con il sistema LIMS supportato da Illumina.
 - ▶ **LIMS User Name** (Nome utente LIMS): il nome utente LIMS usato per l'autenticazione del sistema LIMS Illumina.
 - ▶ **LIMS Password** (Password LIMS): la password LIMS usata per l'autenticazione del sistema LIMS Illumina.
- 3 Selezionare **OK** (OK) per salvare il lavoro e chiudere la finestra Menu Options (Opzioni di menu). Selezionare **Cancel** (Annulla) per chiudere senza salvare.

Configurazione di un dominio

Se si dispone di un abbonamento a BaseSpace Enterprise, attenersi alle istruzioni seguenti per configurare il dominio.

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Menu | Tools | Options** (Menu | Strumenti | Opzioni) per aprire la finestra Options (Opzioni).
- 2 Selezionare un'opzione server per BaseSpace:
 - ▶ **Cloud**: si collega al dominio BaseSpace Sequence Hub dell'utente.
 - ▶ **Onsite**: si collega al dominio BaseSpace Onsite Sequence Hub dell'utente.
- 3 Immettere il dominio per il server selezionato.
- 4 Selezionare **OK** (OK) per salvare il lavoro e chiudere la finestra Options (Opzioni di menu). Selezionare **Cancel** (Annulla) per chiudere senza salvare.

Visualizzazione e invio dei dati dello strumento

Il pulsante Menu (Menu) sulla schermata Welcome (Benvenuto) e la finestra Menu Options (Opzioni di menu) forniscono opzioni per visualizzare e inviare i dati dello strumento.

- ▶ Per visualizzare le informazioni su hardware dello strumento, versioni del software e su come mettersi in contatto con l'Assistenza tecnica, selezionare **Menu | About** (Menu | Informazioni su).
- ▶ Per permettere allo strumento di inviare informazioni a BaseSpace Sequence Hub per ciascuna corsa (raccomandato), selezionare **Menu | Tools | Options** (Menu | Strumenti | Opzioni), quindi selezionare la casella di controllo **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Invia dati sull'integrità dello strumento a Illumina per aiutare Illumina a migliorare i prodotti). Tutte le informazioni rimangono confidenziali.

Materiali di consumo forniti dall'utente

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure Etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 95041-714 Fornitore di laboratorio generico	Pulizia della cella a flusso e del piano portacelle.
Damigiana, da almeno 6 litri	Fornitore di laboratorio generico	Per la preparazione della soluzione di lavaggio di manutenzione.
Provette per centrifuga, 250 ml	Corning, n. di catalogo 430776	Rack reagenti SBS, posizioni contenenti PW1. Lavaggio dello strumento.
Provette coniche, 15 ml	Corning, n. di catalogo 430052	Rack reagenti paired-end, posizioni contenenti PW1. Lavaggio dello strumento. Raccolta e misura del volume degli scarti.
Guanti monouso, privi di polvere	Fornitore di laboratorio generico	Uso generale.
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026	Pulizia del vano portacella.
Carta pulente per lenti, 10x15 cm ca.	VWR, n. di catalogo 52846-001	Pulizia della cella a flusso.
ProClin 300, 50 ml	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 48912-U	Lavaggio di manutenzione.
Tween 20, liquido viscoso, 100 ml	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Lavaggio di manutenzione.
Pinzette di plastica con punta quadrata	McMaster-Carr, n. di catalogo 7003A22	Rimozione delle guarnizioni della cella a flusso.
Acqua da laboratorio, 18 M Ω	Millipore	Rack reagenti SBS e paired-end, posizioni contenenti PW1. Lavaggio dello strumento.

Preparazione dei reagenti

Introduzione	18
Preparazione dei reagenti SBS	19
Preparazione dei reagenti paired-end e di indicizzazione	20



Introduzione

Prima di impostare la corsa, preparare tutti i reagenti per il sequenziamento: reagenti SBS, reagenti di indicizzazione e reagenti paired-end. Durante l'impostazione della corsa, quando indicato dal software, vengono caricati tutti i reagenti. Durante la corsa, non è necessario tornare allo strumento per ricaricare i reagenti.

I reagenti di sequenziamento possono essere preparati durante la generazione di cluster.

Preparazione dei reagenti SBS

I reagenti SBS sono caricati sullo strumento all'inizio della corsa. Procedere come indicato nelle seguenti istruzioni per scongelare e ispezionare HCM, HIM e HSM.

Scongellamento dei reagenti SBS

- 1 Rimuovere HCM, HIM e HSM dal contenitore per la conservazione a temperatura compresa tra $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Scongellarli a una temperatura compresa tra $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ per circa 16 ore.
In alternativa, scongelare HIM e HSM in un bagno di acqua deionizzata a temperatura ambiente per circa 90 minuti. Scongellare HCM in un bagno d'acqua *separato*.



NOTA

Sostituire sempre i guanti dopo aver maneggiato HCM.

- 3 Capovolgere ciascun flacone per miscelare.
- 4 Ispezionare HSM per assicurarsi che non siano visibili formazioni a vortice.
- 5 Mettere da parte HIM e HSM su ghiaccio.
- 6 Mettere HCM da parte su ghiaccio *separatamente* per impedire la contaminazione incrociata.

Preparazione dei reagenti paired-end e di indicizzazione

I reagenti di indicizzazione e paired-end sono caricati sullo strumento all'inizio della corsa e sono utilizzati durante la fase di indicizzazione delle letture e di sintesi della Lettura 2 di una corsa di sequenziamento.

Attenersi alle istruzioni per preparare i reagenti di indicizzazione e paired-end solo se si sta sequenziando una cella a flusso paired-end o sequenziando le librerie indicizzate su una cella a flusso unidirezionale.



AVVERTENZA

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

Scongellamento e preparazione dei reagenti di indicizzazione e paired-end

- 1 Rimuovere i reagenti seguenti dal luogo di conservazione a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C:
 - ▶ Per una corsa su una cella a flusso paired-end: HAM, HDR, HLM2, HP11, HP14, HPM e HRM. HP14 non è richiesto per le librerie non indicizzate.
 - ▶ Per una corsa su una cella a flusso unidirezionale:
 - ▶ Librerie a doppia indicizzazione: HDR, HP12 e HRM.
 - ▶ Librerie a indicizzazione singola: HDR e HP12.
- 2 Scongellare in un becher riempito con acqua deionizzata a temperatura ambiente per circa 20 minuti.
- 3 Capovolgere ciascuna provetta per miscelare.
- 4 Centrifugare a 1.000 rpm per un minuto.
- 5 Mettere da parte su ghiaccio HAM, HLM2 e HRM.
- 6 Mettere da parte a temperatura ambiente HDR, HP11, HP12, HP14 e HPM.

Sequenziamento


Introduzione	22
Flusso di lavoro per il sequenziamento	23
Inserimento dei parametri della corsa	24
Caricamento e priming dei reagenti	27
Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento	32
Monitoraggio della corsa	35
Rimozione dei reagenti	36
Esecuzione di un lavaggio con acqua	37
Formattazione veloce dell'unità di output e dell'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea	38



Introduzione

Per eseguire una corsa su HiSeq 3000, preparare tutti i reagenti e attenersi ai suggerimenti del software per impostare la corsa. I passaggi per l'impostazione della corsa includono l'inserimento dei parametri della corsa, il caricamento e il priming dei reagenti, il caricamento della cella a flusso e una verifica della fluidica.

Le fasi per l'impostazione della corsa sono organizzate in tre schede: Run Configuration, Pre-Run Setup e Initiate Run (Configurazione corsa, Impostazioni pre-corsa e Avvio corsa).

- ▶ Le schermate di configurazione della corsa contengono elenchi a tendina o campi di testo per i parametri della corsa. Usare lo scanner portatile per codici a barre per scansionare l'ID della cella a flusso o del kit di reagenti, oppure inserire l'ID utilizzando la tastiera del touch screen. L'icona della tastiera si trova a destra dei campi di testo. 
- ▶ Selezionare **Next** (Avanti) per passare alla schermata successiva o selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla schermata precedente.
- ▶ In qualunque momento durante le fasi di impostazione della corsa, selezionare **Cancel** (Annulla) per uscire dall'impostazione della corsa e ritornare alla schermata Welcome (Benvenuto).

Per informazioni relative alla durata della corsa e altre specifiche delle prestazioni, visitare la pagina delle specifiche di HiSeq 3000 sul sito Web Illumina.

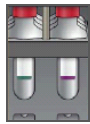
Flusso di lavoro per il sequenziamento



Preparare la cella a flusso e i reagenti per la corsa.



Utilizzando le informazioni indicate sull'interfaccia del software di controllo, immettere i parametri della corsa.



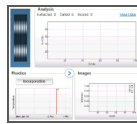
Caricare i reagenti SBS per Lettura 1 e Lettura 2. Se applicabile, caricare i reagenti di indicizzazione e i reagenti paired-end.



Con una cella a flusso usata, confermare il flusso corretto. Eseguire il priming dei reagenti SBS e misurare gli scarti del priming.



Caricare una cella a flusso con cluster HiSeq 3000/4000 e confermare il flusso corretto.



Avviare la corsa di sequenziamento.
[Opzionale] Dopo il ciclo 2, ispezionare First Base Report (Report sulla prima base), quindi proseguire la Lettura 1.



Al termine della corsa, rimuovere i reagenti. Eseguire un lavaggio dello strumento.

Inserimento dei parametri della corsa

Iniziare l'impostazione della corsa immettendo i parametri della corsa mediante una serie di schermate sulla scheda Run Configuration (Configurazione corsa). Il software guida l'utente in ciascuna schermata mentre viene specificata la connettività BaseSpace Sequence Hub, vengono immessi gli ID dei materiali di consumo, vengono selezionate le opzioni di indicizzazione e vengono registrati altri parametri per la corsa.

Schermata Storage (Archiviazione)

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Sequence** (Sequenziamento) per aprire la schermata Storage (Archiviazione).
- 2 [Opzionale] Collegarsi a BaseSpace Sequence Hub o a BaseSpace Onsite Sequence Hub nel modo seguente.
 - a Selezionare **Connect to BaseSpace** (Collegarsi a BaseSpace).
 - b Selezionare **BaseSpace** o **BaseSpace Onsite**.
 - c Se è stato selezionato BaseSpace, selezionare una delle opzioni seguenti:
 - ▶ **Storage and Analysis** (Archiviazione e analisi): invia i dati della corsa a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio e l'analisi dei dati a distanza. Con questa opzione è richiesto un foglio campioni.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): invia solo i file InterOp a BaseSpace Sequence Hub, che permettono di monitorare la corsa a distanza.
 - d Accedere a BaseSpace Sequence Hub o a BaseSpace Onsite Sequence Hub usando e-mail e password dell'account MyIllumina.
- 3 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione della cartella di output prescelta.
- 4 Confermare che l'impostazione per le immagini in miniatura sia **Save All Thumbnails** (Salva tutte le immagini in miniatura).
Il software salva automaticamente tutte le immagini in miniatura. Un'immagine in miniatura è una campionatura di immagini da diverse tile in ciascuna colonna di tile o striscia, combinata in un'immagine in miniatura.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso)

La schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a flusso) registra le informazioni sulla cella a flusso usata per la corsa. Sono richiesti tutti i campi.

- 1 Sottoporre a scansione o inserire l'ID della cella a flusso (numero di codice a barre) per la quale si desidera eseguire il sequenziamento.
- 2 Selezionare il tipo di cella a flusso appropriato, **HiSeq 3000/4000 PE** o **HiSeq 3000/4000 SR**.
- 3 Immettere il nome dell'esperimento da visualizzare in ciascuna schermata per permettere di identificare la corsa in fase di elaborazione.
- 4 Immettere un nome utente.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).


Schermata Advanced (Avanzato)


- 1 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Confirm First Base** (Conferma prima base).
Un report sulla prima base viene generato automaticamente per ciascuna corsa dopo il ciclo 2 e posizionato nel livello base della cartella della corsa. La selezione di questa opzione permette di confermare il report sulla prima base prima di procedere con la corsa. In caso contrario, la corsa continua senza mostrare la casella di dialogo di conferma.
- 2 [Opzionale] Dall'immagine della cella a flusso, selezionare le corsie che si desiderano rimuovere dalla corsa.
Tutte le corsie sono incluse come valore predefinito. L'allineamento del campione di controllo PhiX viene eseguito automaticamente per tutte le corsie.
- 3 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Recipe (Ricetta)

Una ricetta viene generata automaticamente in base alle informazioni inserite sulla schermata Recipe (Ricetta).

- 1 Selezionare un'opzione per Index Type (Tipo indice):
 - ▶ **No Index** (Nessun indice): esegue una corsa non indicizzata unidirezionale o paired-end.
 - ▶ **Single Index** (Indice singolo): esegue una corsa unidirezionale o paired-end con una lettura di indicizzazione.
 - ▶ **Dual Index** (Indice doppio): esegue una corsa unidirezionale o paired-end con due letture di indicizzazione.
 - ▶ **Custom** (Personalizzata): esegue una corsa unidirezionale o paired-end con un numero di cicli personalizzato per le letture indici.
- 2 Immettere il numero di cicli per Lettura 1 e Lettura 2, se applicabile.

 **NOTA**
Il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, per eseguire 125 cicli per la Lettura 1, inserire 126.
- 3 Se l'utente ha selezionato l'opzione di indicizzazione **Custom** (Personalizzata), inserire il numero di cicli per ciascuna lettura indici.

 **NOTA**
Le lunghezze delle letture non devono necessariamente corrispondere.
- 4 Confermare le seguenti impostazioni popolate automaticamente per la chimica.
 - ▶ **SBS: HiSeq 3000/4000 SBS Kit**: mostra la chimica SBS usata per Lettura 1 e Lettura 2.
 - ▶ **Indice: HiSeq 3000/4000 Sequencing Primer** o **HiSeq 3000/4000 Dual Index Sequencing Primer**: mostra la chimica usata per le letture indici.
 - ▶ **Inversione paired-end: HiSeq 3000/4000 PE** o **HiSeq 3000/4000 PE Dual Index**: mostra la chimica usata per la sintesi paired-end.
- 5 [Opzionale] Selezionare la casella di controllo **Use Existing Recipe** (Usa ricetta esistente) per usare una ricetta personalizzata.

Schermata Sample Sheet (Foglio campioni)

I fogli campioni sono opzionali fatta eccezione quando si usa BaseSpace Sequence Hub per eseguire l'analisi dei dati.

- 1 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per individuare il foglio campioni.
- 2 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Reagents (Reagenti)

La schermata Reagents (Reagenti) registra informazioni su kit di reagenti utilizzato per la corsa.

- 1 Eseguire la scansione o immettere l'ID del codice a barre del kit di reagenti SBS.
- 2 Per le corse paired-end, eseguire la scansione o immettere l'ID del kit Cluster.
- 3 Selezionare il kit di reagenti SBS per la corsa:
 - ▶ Selezionare **300 Cycles** (300 cicli) per i kit di reagenti da 300 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 325.
 - ▶ Selezionare **150 Cycles** (150 cicli) per i kit di reagenti da 150 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 174.
 - ▶ Selezionare **50 Cycles** (50 cicli) per i kit di reagenti da 50 cicli. I cicli rimanenti si fermano al valore preimpostato di 74.
 - ▶ Selezionare **Custom** (Personalizza) per un kit parziale o kit multipli da 50 cicli. Nel campo Cycles Remaining (Cicli rimanenti), inserire il numero di cicli SBS per i quali si prevede che i reagenti dureranno.



NOTA

Il campo Cycles Remaining (Cicli rimanenti) viene popolato automaticamente in base all'ID del kit SBS. Il software esegue il conto alla rovescia in base al numero di cicli immesso. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi.

- 4 Selezionare **Prime SBS Reagents** (Priming reagenti SBS) per eseguire il priming dei reagenti.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Review (Revisione)

- 1 Rivedere i parametri per la corsa sulla schermata Review (Revisione).
- 2 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere o selezionare **Back** (Indietro) per modificare i parametri.

Caricamento e priming dei reagenti

Dopo aver inserito i parametri per la corsa, caricare i reagenti SBS, i reagenti di indicizzazione e i reagenti paired-end per la corsa, quindi eseguire il priming dei reagenti nel sistema di fluidica. Il software guida l'utente in questo processo tramite una serie di schermate sulla scheda Pre-Run Setup (Impostazioni pre-corsa).

Caricamento dei reagenti SBS


- 1 Capovolgere ciascun flacone per miscelare.
 -  **ATTENZIONE**
Miscelare e caricare HCM per ultimo, dopo aver caricato tutti gli altri reagenti, per impedire la contaminazione incrociata. Dopo aver manipolato il flacone di HCM, smaltire i guanti e sostituirli con un nuovo paio.
- 2 Sostituire il tappo su ciascun flacone con un tappo a imbuto.
- 3 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.
- 4 Sollevare i pescanti per il rack reagenti SBS nel modo seguente.
 - a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé, quindi sollevarla.
 - b Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
- 5 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.
- 6 Posizionare ciascun flacone nel rack nelle posizioni numerate associate. Assicurarsi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.

Tabella 1 Posizioni dei reagenti SBS

Posizione	Reagente	Descrizione
1	HIM	HT Incorporation Mix
2	PW1	25 ml di PW1 o acqua da laboratorio
3	HSM	HT Scan Mix
4	HB1	HT SBS Buffer 1
5	HB2	HT SBS Buffer 2
6	HB2	HT SBS Buffer 2
7	HCM	HT Cleavage Mix
8	HB2	HT SBS Buffer 2

- 7 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.
- 8 Far scorrere il rack nello scomparto reagenti, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.
- 9 Abbassare i pettini di aspirazione nei flaconi di reagente SBS nel modo seguente.
 - a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso di sé, quindi abbassarla.
 - b Ispezionare i pettini di aspirazione per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
 - c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

Caricamento dei reagenti di indicizzazione e paired-end

- 1 Capovolgere ciascun flacone per miscelare.

- 2 Sollevare i pescanti per il rack reagenti PE nel modo seguente.
 - a Tirare la maniglia verso di sé e sollevare la maniglia.
 - b Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
- 3 Far scorrere il rack fuori dallo scomparto reagenti usando la maniglia del rack.
- 4 Se si esegue un ciclo non indicizzato unidirezionale, saltare il punto 5 e caricare ciascuna posizione con una provetta conica da 15 ml riempita con 10 ml di PW1 o acqua da laboratorio.
- 5 Rimuovere i tappi delle provette di reagente e posizionare ciascuna provetta sul rack nella posizione numerata associata o facendo corrispondere il colore dell'etichetta.

Tabella 2 Cella a flusso paired-end

Posizione	Reagente	Descrizione
10	HRM	HT Resynthesis Mix
11	HLM2	HT Linearization Mix 2
12	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
13	HAM	HT Amplification Mix
14	HPM	HT Amp Premix
15	HDR	HT Denaturation Mix (contiene formammide)
16	HP11	Primer Mix - Lettura 2
17	HP14*	Indexing Primer Mix
18	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
19	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio

* HP14 è richiesto solo per le corse indicizzate. Se HP14 non viene usato, caricare una provetta conica da 15 ml riempita con 10 ml di PW1 o acqua da laboratorio.

Tabella 3 Cella a flusso unidirezionale

Posizione	Reagente	Descrizione
10	HRM*	HT Resynthesis Mix
11	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
12	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
13	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
14	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
15	HDR	HT Denaturation Mix (contiene formammide)
16	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
17	HP12	Index 1 Primer Mix
18	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio
19	PW1	10 ml di PW1 o acqua da laboratorio

* HRM è richiesto solo per le corse a doppia indicizzazione. Se HRM non viene usato, caricare una provetta conica da 15 ml riempita con 10 ml di PW1 o acqua da laboratorio.

- 6 Far scorrere il rack nello scomparto, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.
- 7 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente PE nel modo seguente.
 - a Tirare la maniglia verso di sé e abbassare la maniglia.
 - b Ispezionare i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.
 - c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura.

- 8 Selezionare la casella di controllo **PW1 (25 ml) loaded in Position 2** (PW1 - 25 ml - caricato in posizione 2), quindi selezionare **Next** (Avanti).

Priming dei reagenti

La procedura per il priming dei reagenti include il caricamento di una cella a flusso per il priming, la conferma del flusso corretto e l'avvio del priming.



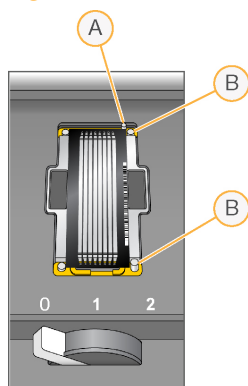
ATTENZIONE

Per il priming dei reagenti utilizzare sempre una cella a flusso *usata*. Usare la cella a flusso proveniente da una corsa precedente per il priming dei reagenti su una corsa successiva o per un lavaggio post-corsa.

Caricamento di una cella a flusso per il priming

- 1 Sottoporre a scansione o inserire l'ID (numero di codice a barre) della cella a flusso per il priming.
- 2 Sciacquare con acqua da laboratorio la cella a flusso per il priming. Asciugarla con un panno pulente per lenti o con un panno che non lascia residui.
- 3 Pulire con salviette imbevute di alcol e un panno pulente per lenti.
- 4 Collocare il vano portacella con le porte di ingresso e uscita rivolte verso il *basso* e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso, che indica la direzione del flusso, punti verso lo strumento.
- 5 Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 7 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro



- A Perno guida superiore
- B Perni guida destri

- 6 Rimuovere la mano dalla cella a flusso per impedire spostamenti dell'allineamento.
- 7 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione.
Quando la leva della cella a flusso lampeggia verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente. Se la leva non è verde, vedere *Possibili problemi d'impostazione della corsa* a pagina 51.
- 8 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 2.

Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta.

- Assicurarsi che la casella di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

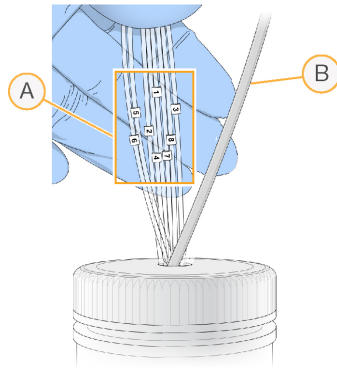
La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

- Selezionare la posizione **2** dall'elenco a tendina.
- Confermare i valori predefiniti seguenti:
 - ▶ Volume (Volume): **125**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
- Selezionare **Pump** (Pompa).
- Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
- Se sono presenti troppe bolle, attenersi a quanto segue:
 - a Verificare che le guarnizioni non presentino ostruzioni.
 - b Ridurre la velocità di aspirazione a 100.
 - c Pompate altri 125 µl di acqua nella cella a flusso.
 - d Se il problema persiste, rimuovere la cella a flusso, ripetere le fasi di pulizia e riposizionare la cella a flusso.
- Selezionare **Next** (Avanti).

Posizionamento dei tubi e avvio del priming

- Rimuovere gli otto tubi di scarico dal contenitore per gli scarti.

Figura 8 Posizionamento dei tubi



- A** Tubi di scarico della cella a flusso per le posizioni dei reagenti 1-8
B Tubo della pompa di scarico condensa

- Collocare ciascun tubo degli scarti in una provetta da 15 ml separata. Gli scarti vengono raccolti e misurati al termine della fase di priming.
- Selezionare **Start Prime** (Avvia priming). Monitorare l'avanzamento della fase di priming dalla schermata Prime (Priming).

- 4 Al completamento della fase di priming, misurare gli scarti e confermare che il volume in ciascuna provetta sia 1,75 ml per un totale di **14 ml**.
Il totale viene calcolato come segue:
 - ▶ 250 µl per ciascuna posizione SBS, fatta eccezione per la posizione 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
 - ▶ 1,75 ml per ciascuna corsia (1,75 x 8 = 14 ml)
- 5 Riposizionare i tubi di scarico nel contenitore per gli scarti.
- 6 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento

I passaggi per il caricamento della cella a flusso con cluster per il sequenziamento include la rimozione della cella a flusso per il priming, la pulizia del vano portacella, il caricamento della cella a flusso con cluster e la conferma del flusso corretto.

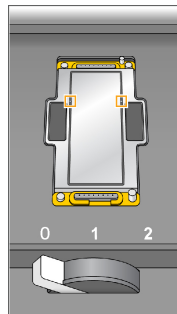
Rimozione di una cella a flusso usata

- 1 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per sbloccare i collettori.
- 2 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 0 per sbloccare la tenuta del vuoto e rilasciare la cella a flusso.
- 3 Sollevare la cella a flusso usata dal vano portacella.

Pulizia del vano portacella

- 1 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.
- 2 Con un panno che non lascia residui inumidito con acqua da laboratorio, pulire la superficie del vano portacella per rimuovere i sali.
- 3 Con una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella. Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori.
- 4 Se necessario, asciugare il piano con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.
- 5 Ispezionare il vano portacella per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

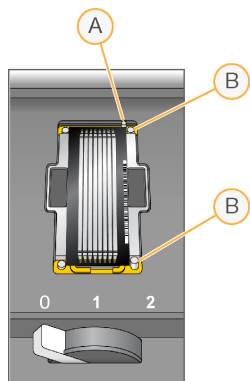
Figura 9 Ispezione dei fori della pompa a vuoto



Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento

- 1 Collocare la cella a flusso sul vano portacella con le porte di ingresso e di uscita rivolte verso il *basso* e il codice a barre a destra. Assicurarsi che la freccia sul bordo sinistro della cella a flusso, che indica la direzione del flusso, punti verso lo strumento.
- 2 Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 10 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro



- A Perno guida superiore
B Perni guida destri

- 3 Rimuovere la mano dalla cella a flusso per impedire spostamenti dell'allineamento nel tempo.
- 4 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione.
Quando la leva della cella a flusso lampeggia verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente. Se la leva non è verde, vedere *Possibili problemi d'impostazione della corsa* a pagina 51.
- 5 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 2.
Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.
- 6 Assicurarsi che la casella di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

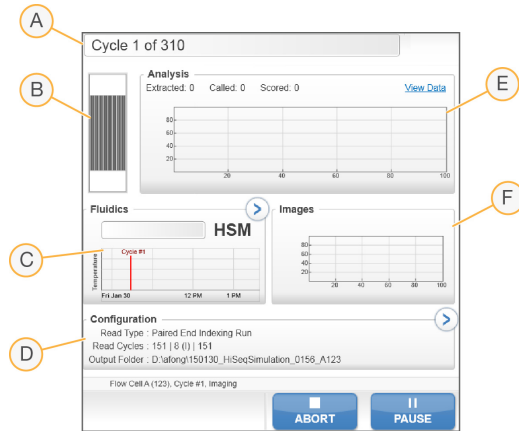
- 1 Selezionare la posizione **5** dall'elenco a tendina.
- 2 Inserire i valori predefiniti seguenti:
 - ▶ Volume (Volume): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
- 3 Selezionare **Pump** (Pompa).

- 4 Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie o di perdite vicino ai collettori.
- 5 Se sono presenti troppe bolle, attenersi a quanto segue:
 - a Verificare che le guarnizioni dei collettori non presentino ostruzioni.
 - b Ripetere la procedura utilizzando la posizione 6 per evitare di esaurire la posizione 5.
 - c Ridurre la velocità di aspirazione a 100.
 - d Pompare altri 250 µl nella cella a flusso.
- 6 Selezionare **Next** (Avanti).
- 7 Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia verde, quindi chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.
- 8 Assicurarsi che le caselle di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) e **Door Closed** (Sportello chiuso) siano selezionate, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 9 Selezionare **Start** (Avvio) per avviare la corsa di sequenziamento.

Monitoraggio della corsa

- 1 Monitorare le metriche della corsa dalla schermata di panoramica della corsa.

Figura 11 Schermata di panoramica della corsa



- A **Barra di avanzamento:** per monitorare quanti cicli sono stati completati.
- B **Immagine della cella a flusso:** per monitorare le corsie che sono state sottoposte a imaging.
- C **Grafico della fluidica:** allargare la sezione della fluidica per monitorare le fasi della chimica.
- D **Configurazione della corsa:** per rivedere i parametri per la corsa attuale.
- E **Grafico dell'analisi:** per monitorare i punteggi qualitativi per ciclo.
- F **Grafico delle immagini:** per monitorare le intensità per ciclo. Viene mostrata un'immagine in miniatura per ciascuna striscia sottoposta a scansione. Nessuna altra immagine viene visualizzata sull'interfaccia software.

Report sulla prima base

Se durante la procedura di impostazione è stata selezionata l'opzione per la conferma relativa all'incorporazione della prima base, viene visualizzata automaticamente la relativa finestra al termine dell'imaging del secondo ciclo. In questa fase la corsa si metterà in pausa.

- 1 Dalla finestra di dialogo di conferma, rivedere First Base Report (Report sulla prima base).
- 2 Se i risultati sono soddisfacenti, selezionare **Continue** (Continua).

Visualizzazione delle metriche della corsa

Quando sono disponibili le metriche della corsa, Sequencing Analysis Viewer (SAV) si apre automaticamente per visualizzarle. Le metriche vengono visualizzate sotto forma di grafici, diagrammi e tabelle. Per maggiori informazioni, consultare la *Guida per l'utente di Sequencing Analysis Viewer (SAV)*, (documento n. 15020619).

- 1 Per visualizzare le metriche aggiornate, selezionare **Refresh** (Aggiorna) in qualsiasi momento durante la corsa.

Rimozione dei reagenti

- 1 Al termine della corsa, aprire lo sportello dello scomparto reagenti.
- 2 Sollevare i pettini di aspirazione per il rack dei reagenti SBS e il rack dei reagenti paired-end nel modo seguente.
 - a Tirare la maniglia del pettine di aspirazione verso l'esterno.
 - b Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione mentre si tira verso l'esterno.
 - c Rilasciare la maniglia del pettine di aspirazione nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia del pettine di aspirazione sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
- 3 Far scorrere ciascun rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti usando le maniglie dei rack.
- 4 Rimuovere ciascun flacone da ciascun rack reagenti.



AVVERTENZA

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

Esecuzione di un lavaggio con acqua

Un lavaggio con acqua è richiesto dopo ciascuna corsa di sequenziamento per lavare il sistema e verificare il sistema di fluidica. Un lavaggio di manutenzione è un'alternativa facoltativa per il lavaggio con acqua post-corsa. Per istruzioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 41.

Se lo strumento è rimasto inattivo per uno o più giorni, eseguire un lavaggio con acqua prima di avviare una nuova corsa di sequenziamento.

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Wash | Water** (Lavaggio | Acqua).
- 2 Selezionare **Yes** (Sì) per lavare le posizioni dei reagenti PE, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 3 Caricare lo strumento con acqua da laboratorio:
 - a Riempire otto flaconi SBS con 250 ml di acqua da laboratorio.
 - b Riempire dieci provette paired-end con 12 ml di acqua da laboratorio.



NOTA

I flaconi e le provette di lavaggio sono solitamente sostituite ogni sei mesi, sebbene l'acqua venga sostituita ogni settimana.

- 4 Accertarsi che sia caricata una cella a flusso usata. Se necessario, caricare una cella a flusso usata.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).
- 6 Eseguire una verifica della fluidica:
 - a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina. Accettare i valori predefiniti della pompa.
 - b Selezionare **Pump** (Pompa).
 - c Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
- 7 Rimuovere i tubi di scarico dal contenitore per gli scarti.
- 8 Fissare assieme i tubi di scarico con parafilm. Assicurarsi che tutte le estremità siano allo stesso livello.
- 9 Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.
- 10 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio con acqua.

Posizioni	Tempo di esecuzione approssimativo
Otto posizioni SBS	20 minuti
Otto posizioni SBS e dieci posizioni paired-end	60 minuti

- 11 Quando il lavaggio è completato, misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume totale erogato	Volume erogato per corsia
Otto posizioni SBS	32 ml	4 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni paired-end	72 ml	9 ml

- 12 Liberare il tubo di scarico e riposizionarlo nel flacone degli scarti.

Formattazione veloce dell'unità di output e dell'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea

Al termine del trasferimento dei dati, eseguire una formattazione veloce dell'unità di output (O:\) e dell'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea (S:\). Una formattazione veloce libera l'unità per una corsa successiva senza rimuovere importanti file di sistema o di manutenzione dello strumento.

Per avviare una corsa sono necessari almeno 2 TB per una lunghezza di corsa pari a 2 x 151. Se durante la corsa lo spazio su disco scende al di sotto della soglia di sicurezza, il software mette in pausa la corsa e pone la cella a flusso in uno stato sicuro. Dopo aver reso disponibile spazio su disco, la corsa riprende automaticamente.



NOTA

I registri di manutenzione dello strumento sono archiviati sull'unità C:\. Quindi, è sicuro eseguire una formattazione veloce delle unità O:\ e S:\ mentre si esegue un lavaggio dello strumento.

- 1 Da Windows, aprire Computer per mostrare l'elenco di unità sul computer.
- 2 Fare clic con il tasto destro del mouse sull'unità O:\ e selezionare **Formatta**.
- 3 Dalla finestra di dialogo Formatta, selezionare la casella di controllo **Formattazione veloce**.
- 4 Selezionare **Start** (Avvio).
- 5 Ripetere le fasi 1-4 per pulire l'unità S:\.

Manutenzione

Introduzione	40
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	41
Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)	46
Spegnimento dello strumento	47



Introduzione

Le procedure di manutenzione assicurano prestazioni durature dello strumento.

- ▶ Nei periodi di inattività, spegnere o mettere lo strumento nello stato di inattività.
- ▶ Al lavaggio con acqua al termine di una corsa aggiungere lavaggi di manutenzione regolari per mantenere il sistema di fluidica.

L'esecuzione di lavaggi dello strumento regolari permette di mantenere le prestazioni dello strumento lavando il sistema di fluidica e impedendo l'accumulo dei sali e la contaminazione incrociata di reagenti.

Manutenzione preventiva

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

Esecuzione di un lavaggio di manutenzione

Eseguire un lavaggio di manutenzione quando indicato dal software ogni dieci giorni o facoltativamente dopo una corsa. Il lavaggio di manutenzione richiede circa 90 minuti e deve essere eseguito dopo 1 o 2 flussi di lavoro. In base alla disponibilità di ProClin 300, seguire il relativo protocollo per il lavaggio di manutenzione:

- ▶ **Lavaggio con Tween 20 e ProClin 300 standard:** effettua il lavaggio del sistema con una soluzione di Tween 20 e ProClin 300 preparata dall'utente. Vedere *Tween 20 e ProClin 300* a pagina 41.
- ▶ **Lavaggio con Tween 20 alternativo:** effettua il lavaggio del sistema con una soluzione di Tween 20 preparata dall'utente e richiede un lavaggio con acqua se lo strumento deve rimanere inattivo. Vedere *Lavaggio con Tween 20* a pagina 44.

Se la schermata Load Gasket (Caricamento guarnizioni) si apre prima di un lavaggio di manutenzione, sostituire le guarnizioni sulla parte anteriore e posteriore del collettore prima di procedere al lavaggio.

Lavaggio di manutenzione con Tween 20 e ProClin 300

Preparazione della soluzione per il lavaggio di manutenzione

Preparare cinque litri di soluzione per il lavaggio di manutenzione da utilizzare con uno strumento. La soluzione può essere conservata per un massimo di 30 giorni a temperatura ambiente e utilizzata per un massimo di tre volte durante questo periodo. Smaltire la soluzione di lavaggio in base agli standard di sicurezza governativi locali.

- 1 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i volumi seguenti per diluire Tween 20:
 - ▶ Acqua da laboratorio (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)
 Con questi volumi si otterrà una soluzione di circa Tween 20 10%.
- 2 Collocare una barra di agitazione in una damigiana da almeno 6 litri.
- 3 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i volumi seguenti nella damigiana:
 - ▶ Acqua da laboratorio (750 ml)
 - ▶ Tween 20 10% (250 ml)
 - ▶ ProClin 300 o tampone HT1 (1,5 ml)
 Con questi volumi si otterrà una soluzione di circa Tween 20 2,5% e ProClin 300 0,15%.
- 4 Miscelare completamente su una piastra di agitazione.
- 5 Aggiungere quattro litri di acqua da laboratorio.

Con questi volumi si otterrà una soluzione di circa Tween 20 0,5% e ProClin 300 0,03%.
- 6 Continuare ad agitare fino a miscelazione completa.
- 7 Mettere da parte in un contenitore chiuso a temperatura ambiente.

Tween 20 e ProClin 300

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Wash | Maintenance** (Lavaggio | Manutenzione).

- 2 Se si utilizza una soluzione per il lavaggio di manutenzione fresca, caricare lo strumento con la soluzione nel modo seguente.
 - a Riempire 8 flaconi SBS con 250 ml di soluzione di lavaggio fresca.
 - b Riempire 10 flaconi paired-end con 12 ml di soluzione di lavaggio fresca.
 - c Assegnare ciascun flacone e provetta a una posizione del rack reagenti. Mantenere queste posizioni per ciascun lavaggio successivo per impedire la contaminazione incrociata dal reagente presente sui pettini di aspirazione.
- 3 Se la soluzione di lavaggio di manutenzione è stata conservata da una corsa precedente, caricare lo strumento con la soluzione nel modo seguente.
 - a Rabboccare la soluzione conservata e capovolgere per miscelare. Rabboccare non più di due volte dopo l'utilizzo originale.
 - b Caricare i flaconi e le provette nelle posizioni del rack reagenti assegnate.

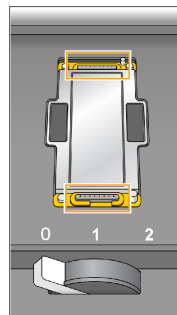


NOTA

Di solito è sufficiente la sostituzione mensile dei flaconi e delle provette di lavaggio.

- 4 Svuotare il flacone degli scarti.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).
- 6 Rimuovere la cella a flusso dal piano portacelle e metterla da parte.
- 7 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.
- 8 Applicare una leggera pressione su un lato della guarnizione anteriore fino a quando si solleva l'altro lato. Utilizzare delle pinzette per afferrare e rimuovere la guarnizione. Ripetere per rimuovere la guarnizione posteriore.

Figura 12 Rimozione delle guarnizioni dei collettori usate



- 9 Posizionare una nuova guarnizione in ciascun alloggiamento sul lato anteriore e posteriore del vano portacella. Premere leggermente fino a quando la guarnizione è in posizione.
- 10 Riposizionare la cella a flusso che era stata rimossa per installare le nuove guarnizioni.
- 11 Assicurarsi che la casella di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 12 Eseguire una verifica della fluidica utilizzando i valori predefiniti della pompa.
 - a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina.
 - b Selezionare **Pump** (Pompa).
 - c Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.

- d Se si osserva una scia costante di bolle, sostituire la guarnizione e ripetere la verifica della fluidica.
- 13 Rimuovere i tubi di scarico per la cella a flusso dal contenitore per gli scarti.
 - 14 Fissare assieme gli otto tubi di scarico con parafilm. Assicurarsi che i tubi siano allo stesso livello.
 - 15 Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.
 - 16 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio con
 - 17 Al termine della corsa, selezionare **Return to Start** (Torna all'avvio).
 - 18 Misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	74 ml
Dieci posizioni paired-end	52 ml
Tutte le posizioni	15,75 ml per corsia



NOTA

Tutti i flaconi e le provette sono riempite del tutto per assicurarsi che i pescanti siano sciacquati. Tuttavia, il volume erogato per ciascuna posizione varia così i flaconi e le provette contengono volumi diversi al termine del lavaggio.

- 19 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli nel contenitore per gli scarti.

Lavaggio di manutenzione con Tween 20

Preparazione della soluzione per il lavaggio di manutenzione

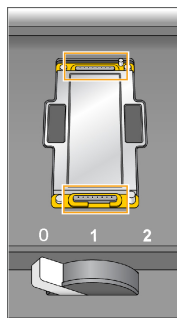
Preparare 5 litri di soluzione per il lavaggio di manutenzione. Sarà sufficiente per lavare entrambi i lati di uno strumento. Preparare sempre una soluzione di lavaggio fresca per un lavaggio di manutenzione con Tween 20. Smaltire la soluzione di lavaggio in base agli standard di sicurezza governativi locali.

- 1 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i volumi seguenti per diluire Tween 20:
 - ▶ Acqua da laboratorio (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)
 Con questi volumi si otterrà una soluzione di circa Tween 20 10%.
- 2 Collocare una barra di agitazione in una damigiana da almeno 6 litri.
- 3 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i volumi seguenti nella damigiana:
 - ▶ Acqua da laboratorio (750 ml)
 - ▶ Tween 20 10% (250 ml)
 Con questi volumi si otterrà una soluzione di circa Tween 20 2,5%.
- 4 Miscelare completamente su una piastra di agitazione.
- 5 Dispensare 4 litri di acqua da laboratorio per ottenere una soluzione di circa Tween 20 0,5%.
- 6 Continuare ad agitare fino a miscelazione completa.
- 7 Procedere immediatamente all'impostazione del lavaggio.

Lavaggio con Tween 20

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Wash | Maintenance** (Lavaggio | Manutenzione).
- 2 Caricare lo strumento con una soluzione di lavaggio di manutenzione fresca nel modo di seguente.
 - a Riempire 8 flaconi SBS con 250 ml di soluzione di lavaggio fresca.
 - b Riempire 10 flaconi paired-end con 12 ml di soluzione di lavaggio fresca.
- 3 Svuotare il flacone degli scarti.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).
- 5 Rimuovere la cella a flusso dal piano portacelle e metterla da parte.
- 6 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.
- 7 Applicare una leggera pressione su un lato della guarnizione anteriore fino a quando si solleva l'altro lato. Utilizzare delle pinzette per afferrare e rimuovere la guarnizione. Ripetere per rimuovere la guarnizione posteriore.

Figura 13 Rimozione delle guarnizioni dei collettori usate



- 8 Posizionare una nuova guarnizione in ciascun alloggiamento sul lato anteriore e posteriore del vano portacella. Premere leggermente fino a quando la guarnizione è in posizione.
- 9 Riposizionare la cella a flusso che era stata rimossa per installare le nuove guarnizioni.
- 10 Assicurarsi che la casella di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 11 Eseguire una verifica della fluidica utilizzando i valori predefiniti della pompa.
 - a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina.
 - b Selezionare **Pump** (Pompa).
 - c Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
 - d Se si osserva una scia costante di bolle, sostituire la guarnizione e ripetere la verifica della fluidica.
- 12 Rimuovere i tubi di scarico per la cella a flusso dal contenitore per gli scarti.
- 13 Fissare assieme gli otto tubi di scarico con parafilm. Assicurarsi che i tubi siano allo stesso livello.
- 14 Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.

- 15 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio con
- 16 Al termine della corsa, selezionare **Return to Start** (Torna all'avvio).
- 17 Misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	74 ml
Dieci posizioni paired-end	52 ml
Tutte le posizioni	15,75 ml per corsia



NOTA

Tutti i flaconi e le provette sono riempite del tutto per assicurarsi che i pescanti siano sciacquati. Tuttavia, il volume erogato per ciascuna posizione varia così i flaconi e le provette contengono volumi diversi al termine del lavaggio.

- 18 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli nel contenitore per gli scarti.

Lavaggio con acqua

Se lo strumento deve rimanere inattivo per oltre cinque giorni dopo il lavaggio con Tween 20, eseguire un lavaggio con acqua per sciacquare Tween 20 dal sistema di fluidica.

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Wash | Water Wash** (Lavaggio | Lavaggio con acqua).
- 2 Caricare lo strumento con acqua da laboratorio come segue:
 - a Caricare otto flaconi SBS con almeno 20 ml di acqua da laboratorio.
 - b Riempire dieci provette paired-end con 10 ml di acqua da laboratorio.



ATTENZIONE

Non riutilizzare la stessa acqua o i flaconi di lavaggio utilizzati per la prima fase di lavaggio. L'acqua della prima fase di lavaggio potrebbe essere contaminata da reagenti presenti sui pescanti.

- 3 Caricare i flaconi e le provette sullo strumento nel rack appropriato dei reagenti.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio finale con acqua.
- 5 Quando il lavaggio finale con acqua è completato, misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	32 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni paired-end	72 ml

- 6 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli nel flacone degli scarti.

Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)

Usare le istruzioni seguenti per preparare lo strumento e porlo nello stato inattivo fino a 10 giorni. Per periodi superiori a 10 giorni, è preferibile spegnere lo strumento.

- 1 Eseguire un lavaggio di manutenzione per lavare il sistema.
- 2 Lasciare la cella a flusso sul piano portacelle con la leva della cella a flusso in posizione 2. Lasciare i collettori nella posizione sollevata.
- 3 Caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione nei rack reagenti, quindi abbassare i pescanti.
- 4 Prima di utilizzare di nuovo lo strumento, eseguire un lavaggio con acqua.

Spegnimento dello strumento

Attenersi alla seguente procedura per porre la fluidica in uno stato di sicurezza e per spegnere il sistema. Spegnere lo strumento solo se si prevede di non utilizzarlo entro i dieci giorni successivi o per un lasso di tempo superiore. Se si prevede di utilizzare lo strumento entro i successivi dieci giorni, mettere lo strumento in stato inattivo (idling).

- 1 Eseguire un lavaggio di manutenzione per lavare il sistema.
- 2 Rimuovere la cella a flusso dal piano portacelle.
- 3 Con una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui, inumidito con etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del vano portacella.



ATTENZIONE

Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

- 4 Caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione nei rack reagenti, quindi abbassare i pescanti.
- 5 Spegnere lo strumento.
- 6 Per riavviare lo strumento:
 - a Caricare acqua in tutte le posizioni dei reagenti.
 - b Accendere lo strumento.
 - c Eseguire un lavaggio con acqua.

Risoluzione dei problemi

File di registro	50
Possibili problemi d'impostazione della corsa	51
Esecuzione di una verifica della fluidica	52
Messa in pausa o arresto di una corsa su HiSeq 3000	53
Possibile reibridazione primer Lettura 1	55



File di registro

Il file di registro elenca qualsiasi errore verificatosi nel software di controllo. Utilizzare questo file per la risoluzione dei problemi.

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Menu | Tools | Show Log** (Menu | Strumenti | Mostra file di registro).

Possibili problemi d'impostazione della corsa

Problema	Possibile causa	Intervento
Il software non ha eseguito l'inizializzazione.	Il software non è stato in grado di inizializzare i dispositivi hardware interni.	Chiudere il messaggio d'errore, quindi riavviare il software dello strumento. Se il problema persiste, riavviare il computer dello strumento. Se si riavvia il computer, prima spegnere lo strumento per assicurarsi che l'unità DoNotEject sia riconosciuto correttamente. Se il problema persiste dopo il riavvio del computer dello strumento, spegnere lo strumento, attendere almeno 60 secondi e poi riavviare lo strumento.
La leva della cella a flusso è arancione.	La cella a flusso non è collocata correttamente. Si è persa la chiusura a vuoto. I collettori non si sono sollevati.	Rimuovere la cella a flusso e ripetere le fasi di pulizia. Verificare che le guarnizioni siano presenti e posizionate correttamente. Riposizionare la cella a flusso. Se i passaggi sopra indicati non risolvono il problema, sostituire le guarnizioni, riposizionare la cella a flusso.
La leva della cella a flusso lampeggia arancione.	Il vuoto è stato fornito ma non è adeguato.	Rimuovere la cella a flusso e ripetere le fasi di pulizia. Verificare che le guarnizioni siano presenti e posizionate correttamente. Riposizionare la cella a flusso. Se i passaggi sopra indicati non risolvono il problema, sostituire le guarnizioni, riposizionare la cella a flusso.
La leva della cella a flusso lampeggia verde.	La pressione del vuoto è buona.	Spostare la leva della cella a flusso in posizione 2.
Erogazione fluido scadente.	Bolle potenziali nel sistema.	Riposizionare la cella a flusso e confermare che i fori siano rivolti verso il <i>basso</i> . Osservare se è presente del precipitato bianco attorno alle guarnizioni. Se è presente del precipitato, sostituire le guarnizioni. Prima del lavaggio di manutenzione dello strumento sostituire sempre le guarnizioni. Confermare che i gruppi dei pescanti siano completamente abbassati e che ciascun pescante sia a contatto con i reagenti.
Perdita di registrazione nella Lettura 1 caratterizzata da assenza di intensità e dallo 0% di cluster che attraversano il filtro in una porzione della cella a flusso. La percentuale di cluster che attraversano il filtro si riduce notevolmente dalla tile 1 (ingresso) alla tile 28 (uscita).	La cella a flusso non è collocata correttamente.	Se la corsa non ha completato l'inversione paired-end, arrestare la corsa e reibridare la cella a flusso. Prima di riavviare la corsa, vedere <i>Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento</i> a pagina 32 al fine di assicurare il posizionamento corretto della cella a flusso. Se la corsa ha completato l'inversione paired-end, impostare una nuova corsa con una nuova cella a flusso.

Esecuzione di una verifica della fluidica

Eeguire una verifica della fluidica durante l'installazione e durante la risoluzione dei problemi della fluidica.

- 1 Selezionare **Check** (Verifica) sulla schermata Welcome (Benvenuto).
- 2 Sottoporre a scansione o inserire l'ID della cella a flusso per il lavaggio (numero del codice a barre) della cella a flusso per il priming. Per questa fase, assicurarsi di usare una cella a flusso *usata*.
- 3 Caricare sullo strumento la cella a flusso usata.
- 4 Riempire otto flaconi SBS con PW1 o con acqua da laboratorio e caricare i flaconi sul rack reagenti SBS.
- 5 Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina.
- 6 Confermare i valori predefiniti seguenti:
 - ▶ Volume (Volume): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
- 7 Selezionare **Pump** (Pompa).
- 8 Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
- 9 Se sono presenti bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni dei collettori, ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 250 µl di acqua nella cella a flusso.

Messa in pausa o arresto di una corsa su HiSeq 3000

Quando si termina una corsa non viene fornita l'opzione per salvare i dati o riprendere la corsa. La messa in pausa di una corsa potrebbe essere necessaria per controllare i componenti della corsa come i volumi dei reagenti.

Messa in pausa di una corsa

In base alle necessità, mettere in pausa una corsa per verificare i componenti della corsa, come i volumi dei reagenti. In condizioni di funzionamento normale, non è necessario mettere in pausa una corsa.

RTA2 riprende automaticamente quando viene ripresa una corsa messa in pausa. In questo modo la corsa riprende senza perdita di dati. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 57.

- 1 Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Pause | Normal Pause** (Pausa | Pausa normale).
- 2 Selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando.
Il software conclude il comando corrente per la chimica o per l'imaging e pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- 3 Selezionare **Resume** (Riprendi) per riprendere la corsa.

Sostituzione dei reagenti durante una corsa

Se si è iniziata la corsa con un volume di reagenti solo parziale, utilizzare la funzione Change Reagents (Cambia reagenti) per mettere in pausa la corsa e riempire i reagenti.



NOTA
Il priming non è necessario.

- 1 Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Pause** (Pausa) per aprire il menu di pausa.
- 2 Selezionare **Change Reagents** (Cambia reagenti).
- 3 Selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando pausa.
Il software conclude il comando corrente per la chimica o per l'imaging, pone la cella a flusso in uno stato sicuro e apre la schermata Reagents (Reagenti).
- 4 Inserire i parametri seguenti:
 - ▶ L'ID del kit di reagenti per i nuovi reagenti.
 - ▶ Il numero di cicli per i quali si prevede che i reagenti dureranno.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti) per passare al caricamento dei reagenti.

Terminazione una corsa

Se RTA2 è stato terminato, il software non riprende l'elaborazione e i dati della corsa non vengono salvati. Non è quindi possibile riprendere una corsa che è stata arrestata.



ATTENZIONE
Quando si termina una corsa su HiSeq 3000 questo passaggio è *definitivo*.

- 1 Per terminare la corsa, selezionare **Abort** (Annulla). Confermare o annullare il comando.
- 2 Confermando la scelta, il comando apre la schermata Welcome (Benvenuto).

- 3 Passare alle procedure post-corsa.



NOTA

Se una corsa è stata arrestata durante la Lettura 1, è possibile eseguire la reibridazione primer su cBot. Dopo la reibridazione primer, avviare una nuova corsa su HiSeq 3000 per sottoporre a sequenziamento la cella a flusso.

Possibile reibridazione primer Lettura 1

Se le metriche della corsa per Lettura 1 indicano un numero basso di cluster, intensità basse di cluster o altri problemi, è possibile eseguire una reibridazione primer Lettura 1 per salvare la cella a flusso. La reibridazione primer Lettura 1 viene eseguita su cBot e non danneggia i cluster sulla cella a flusso.

L'ibridazione dei primer Lettura 1 su una cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq 3000 richiede i materiali di consumo Illumina seguenti:

- ▶ HiSeq 3000/4000 cBot Multi-Primer Rehybridization Kit (n. di catalogo GD-305-2001)
- ▶ Collettore HiSeq cBot (n. di catalogo SY-401-2015)

Per maggiori informazioni, vedere *Reibridazione primer Lettura 1 su una cella a flusso HiSeq 3000/4000* (documento n. 15058794).

Real-Time Analysis (RTA)

Descrizione generale di Real-Time Analysis (RTA)	58
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis (RTA)	60



Descrizione generale di Real-Time Analysis (RTA)

HiSeq 3000 utilizza una implementazione del software Real-Time Analysis denominata RTA2. RTA2 viene eseguito sul computer dello strumento ed estrae le intensità dalle immagini, esegue l'identificazione delle basi e assegna punteggi qualitativi all'identificazione delle basi. RTA2 e il software di controllo comunicano mediante un'interfaccia HTTP sul Web e condividono file di memoria. Se RTA2 viene terminato, l'elaborazione non riprende e i dati della corsa non vengono salvati.



NOTA

Le prestazioni di demultiplex non sono calcolate e la scheda Index (Indice) di Sequencing Analysis Viewer (SAV) non viene popolata.

File di input

RTA2 richiede i file di input seguenti:

- ▶ Le immagini delle tile contenute nella memoria locale del sistema.
- ▶ RunInfo.xml, che il software di controllo genera automaticamente all'inizio della corsa. Da questo file, RTA2 legge 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.

RTA2 riceve i comandi dal software di controllo che includono informazioni relative alla posizione del file RunInfo.xml e se è stata specificata una cartella di output opzionale.

File di output

Le immagini per ciascun canale sono passate in memoria a RTA2 come tile. In base a queste immagini, RTA2 produce output primari sotto forma di un set di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate e di file filtro di punteggi qualitativi. Altri file supportano la generazione di file di output primari.

- ▶ **File di identificazione delle basi:** per ciascuna tile analizzata, viene generato un file compresso di identificazione delle basi (*.bcl) per ciascuna tile per ciclo. Questo file contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato.
- ▶ **File filtro:** ciascuna tile produce informazioni sul filtro che sono incluse in un file filtro (*.filter) per ciascuna tile per l'intera corsa. Questo file specifica se un cluster ha attraversato il filtro.
- ▶ **File posizione cluster:** un file posizione cluster (s.locs) contiene le coordinate X,Y per ciascun cluster sulla cella a flusso.

I file di output primari sono utilizzati per la successiva analisi dei dati. Utilizzare il software di conversione bcl2fastq per eseguire il de-multiplex e la conversione FASTQ. Per convertire i dati da HiSeq 3000, usare bcl2fastq v2.16 o versione successiva. Per informazioni sulla versione software corrente e sui download, vedere la pagina di supporto di HiSeq 3000 sul sito Web Illumina.

RTA2 fornisce metriche in tempo reale sulla qualità della corsa archiviate come file InterOp. I file InterOp sono file binari che contengono tile, ciclo e metriche a livello di lettura e sono richiesti per visualizzare le metriche in Sequencing Analysis Viewer. Per visualizzare le metriche generate da RTA2, usare SAV v1.10.2 o versione successiva.

Per i dettagli su ciascun file di output, vedere *File di output per il sequenziamento* a pagina 66.

Gestione degli errori

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

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

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

Trasferimento dei dati

Per tutta la durata della corsa, RTA2 richiede il trasferimento dei dati da Run Copy Service, il software che gestisce il trasferimento alla posizione della cartella di output specificata. Se viene usato BaseSpace Sequence Hub, BaseSpace Broker gestisce il trasferimento dei dati a BaseSpace Sequence Hub. Se la connessione di rete viene interrotta, RTA2 prosegue con l'elaborazione e scrive i dati localmente. Il trasferimento dei dati riprende quando viene ripristinata la connessione.

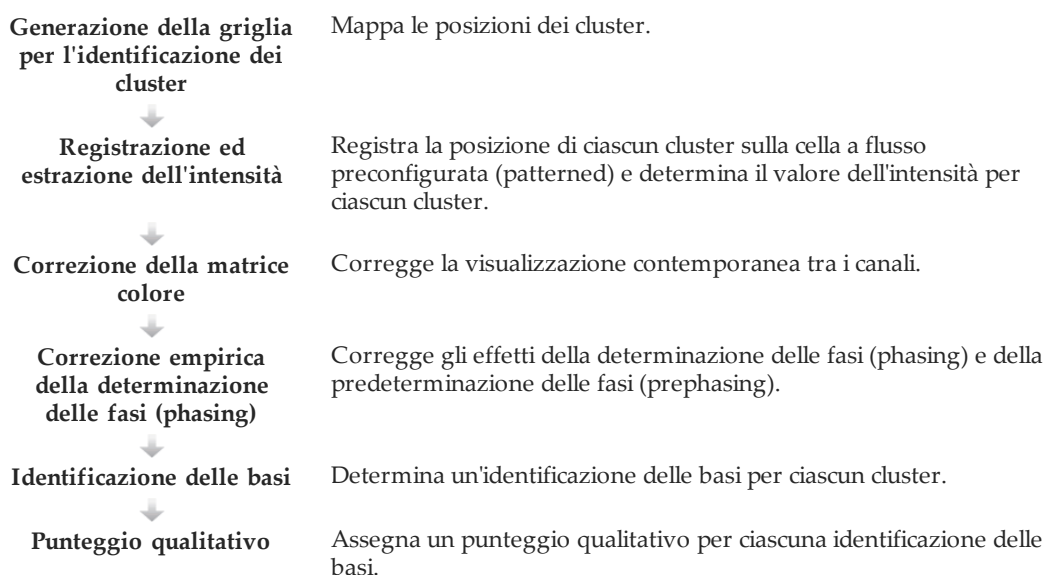


NOTA

Assicurarsi che la connessione di rete corrisponda ai requisiti minimi per il trasferimento dei dati a BaseSpace Sequence Hub. Per maggiori informazioni, vedere la guida alla preparazione della sede di installazione.

Una volta completata l'elaborazione, RTA2 crea un file dei marker denominato RTAComplete.txt. Il trasferimento dei dati è completato dopo la generazione di questo file. Un indicatore di rilevamento nella parte inferiore dello schermo mostra lo stato del trasferimento. Per i dettagli, vedere *Indicatori di attività e di rilevamento* a pagina 6.

Flusso di lavoro di Real-Time Analysis (RTA)



Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

La generazione della griglia per l'identificazione dei cluster definisce la posizione di ciascun cluster in una tile usando le coordinate X e Y. La griglia è usata come un riferimento per la fase successiva di registrazione ed estrazione dell'intensità.

Grazie all'array sulla cella a flusso preconfigurata (patterned), tutte le posizioni cluster sono predeterminate in base al numero di righe, numero di colonne e distanza tra i nano pozzetti sulla cella a flusso. Per maggiori informazioni, vedere *Cella a flusso preconfigurata (patterned)* a pagina 9.

Le posizioni cluster sono scritte su un file di posizioni cluster (s.locs) per tutta la corsa.

Registrazione ed estrazione dell'intensità

La registrazione e l'estrazione dell'intensità inizia dopo la generazione della griglia di identificazione dei cluster relativa alle posizioni dei cluster.

- ▶ La registrazione trasforma le posizioni della griglia dei cluster nella posizione sull'immagine in ciascuno dei quattro canali colore.
- ▶ 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. Utilizzare il software SAV per esaminare le immagini in miniatura e identificare le immagine la cui registrazione non è riuscita.

Correzione della matrice colore

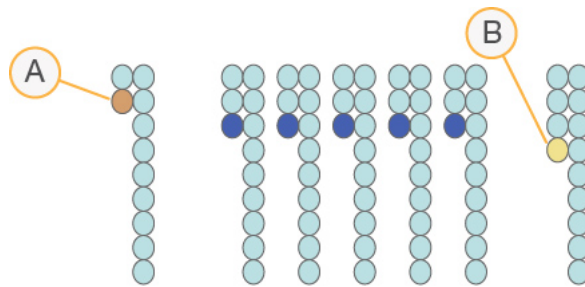
Dopo la registrazione e l'estrazione dell'intensità, RTA2 corregge la visualizzazione contemporanea tra i canali. La visualizzazione contemporanea si verifica quando, ad esempio, un cluster mostra qualche intensità nel canale C e qualche intensità anche nel canale A. Usando una matrice colore 4 x 4, RTA2 genera intensità corrette in base alla matrice per eliminare o ridurre la visualizzazione contemporanea e bilancia le differenze nell'intensità complessiva tra i canali colore.

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



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

RTA2 corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) usando un algoritmo per la correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing), che massimizza la qualità dei dati a ciascun ciclo per tutta la corsa.

Identificazione delle basi

Dopo la correzione delle intensità non elaborate per permettere la visualizzazione contemporanea tra i canali e il calcolo della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing), il canale colore con l'intensità più luminosa rappresenta l'identificazione delle basi per quel cluster in quel ciclo. L'identificazione delle basi su HiSeq 3000 usando RTA2 inizia dopo il ciclo 3.

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ciascun cluster di una data tile a un ciclo specifico. Le identificazioni delle basi sono salvate nei file di identificazione delle basi (*.bcl), che sono file binari con 1 byte per identificazione e punteggio qualitativo. Questo file contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo dell'identificazione delle basi. Per eseguire una identificazione delle basi, i cluster devono prima attraversare il filtro Chastity. I cluster che non attraversano il filtro o che non possono essere identificati perché fuori dall'immagine o perché non si è verificata la registrazione dell'immagine sono etichettati come senza identificazione. I cluster "senza identificazione" sono rappresentati da (N).

Cluster che attraversano il filtro

Durante il primi 25 cicli di Lettura 1, il filtro Chastity rimuove i cluster di bassa qualità dai risultati dell'analisi. I cluster attraversano il filtro se non più di una identificazione delle basi presenta un valore Chastity inferiore a 0,6 durante i primi 25 cicli. Il valore Chastity è definito come il rapporto dell'intensità più luminosa delle basi divisa per la somma dell'intensità più luminosa delle basi e l'intensità più luminosa della seconda base. La percentuale di cluster che attraversano il filtro è rappresentata nei report dell'analisi come %PF.

La cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq 3000 dispone di un array ordinato di cluster. I pozzetti vuoti senza cluster e i pozzetti policlonali in cui è presente più di una sequenza sono inclusi nel conteggio dei cluster non elaborati, ma non attraversano il filtro. Quindi, l'array ordinato su una cella a flusso preconfigurata (patterned) fornisce una percentuale relativamente bassa di cluster che attraversano il filtro.

Figura 15 Pozzetti vuoti e policlonali, inclusi in Raw Cluster Count (Conteggio cluster non elaborati)

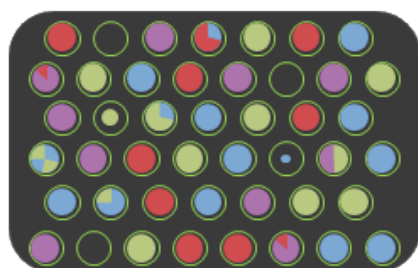
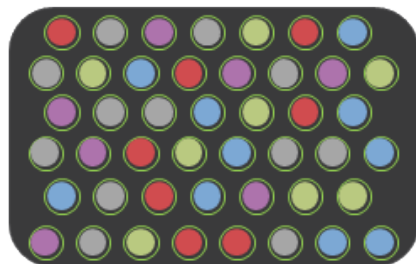


Figura 16 Pozzetti con cluster non PF (mostrati in grigio)



Punteggio qualitativo

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

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

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



NOTA

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

Il punteggio qualitativo calcola un set valori per ciascuna identificazione delle basi, quindi 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).

Raggruppamento dei punteggi qualitativi

RTA2 raggruppa i punteggi qualitativi in base a intervalli, o raggruppamenti, specifici ed assegna un valore a ciascun intervallo. Il raggruppamento dei punteggi qualitativi riduce i requisiti di spazio di archiviazione senza incidere sull'accuratezza e sulle prestazioni delle applicazioni a valle.

Il raggruppamento dei punteggi qualitativi contribuisce a migliorare l'efficienza dei processi di analisi e a soddisfare i requisiti per il trasferimento dei dati associati all'elevata processività di HiSeq 3000. I file *.bcl risulteranno più piccoli perché gli algoritmi di compressione sono in grado di comprimere i file in modo più efficiente. La copia dei file è più veloce grazie alla minor quantità di dati archiviati sul computer dello strumento e trasferiti a una posizione di rete.

File di output


















File di output per il sequenziamento	66
Struttura della cartella di output	67
Numerazione delle tile	68



File di output per il sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File delle identificazione delle basi	<p>Ciascuna tile analizzata è inclusa in un file di identificazione delle basi che contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati nelle cartelle per il ciclo per ciascuna corsia.</p> <p>s_[Corsia]_[Tile].bcl.gz, dove la corsia è il numero a una sola cifra della corsia e la tile è il numero a quattro cifre della tile. I file di identificazione delle basi sono compressi usando gzip.</p>
File posizione cluster	<p>Per ciascuna tile, un file posizione cluster contiene le coordinate XY per ciascun cluster. I file posizione cluster sono il risultato della generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.</p> <p>Data\Intensities: un file per la corsa viene archiviato nella cartella Intensities.</p> <p>s.locs</p>
File filtro	<p>I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. 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 e tile.</p> <p>s_[corsia]_[tile].filter</p>
File InterOp	<p>File report binari usati per Sequencing Analysis Viewer. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.</p> <p>Cartella InterOp</p>
File di configurazione Real-Time Analysis (RTA)	<p>Creati all'inizio di una corsa, i file di configurazione Real-Time Analysis (RTA) elencano le impostazioni per la corsa.</p> <p>[Cartella della corsa, livello base]</p> <p>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]</p> <p>RunInfo.xml</p>
File immagini in miniatura (thumbnail)	<p>Un'immagine in miniatura per ciascun canale e tile in ciascuna striscia 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: la tile è rappresentata da un numero a quattro cifre che indica superficie, striscia e tile. Vedere <i>Numerazione delle tile</i> a pagina 68.</p>

Struttura della cartella di output

-  **Config**: le impostazioni di configurazione per la corsa.
 -  **Data**
 -  **Intensities**
 -  **BaseCalls**
 -  **L00[X]**: i file di identificazione delle basi per ciascuna corsa, aggregate in un file per ciclo.
 -  s.locs
 -  **Images**
 -  **Focus**
 -  **L00[X]**: le immagini di messa a fuoco per ciascuna corsa.
-  **InterOp**: i file binari usati da Sequencing Analysis Viewer.
-  **Logs**: i file di registro che descrivono gli eventi operativi.
-  **Recipe**: il file della ricetta specifico per la corsa denominato con l'ID della cartuccia di reagenti.
-  **RTALogs**: i file di registro che descrivono gli eventi di RTA2.
-  **Thumbnail_Images**: le immagini in miniatura di 9 posizioni da ciascuna sottogruppo di tile, generate per ciascun ciclo e base.
-  RTAConfiguration.xml
-  RunInfo.xml
-  RunParameters.xml

Nome e percorso della cartella della corsa

La cartella della corsa è la cartella al livello base per gli output generati da una corsa di sequenziamento. Durante l'impostazione della corsa, il software chiede all'utente di inserire il percorso della cartella della corsa. Per impostazione predefinita, alla cartella viene assegnato un nome nel formato seguente:

AAMMGG_<Nome computer>_<Numero corsa>_<Lato cella a flusso><ID cella a flusso>

Esempio: 110114_SN106_0716_A90095ACXX

In numero della corsa aumenta di uno ogni volta che lo strumento esegue una corsa di sequenziamento. Il lato della cella a flusso (A) e l'ID della cella a flusso immessi nella procedura di impostazione della corsa fanno parte del nome della cartella della corsa.

La cartella della corsa è scritta nel percorso di output specificato durante l'impostazione della corsa. La cartella temporanea della corsa è scritta nell'unità D:.

- %
- %PF 62
- A**
- accensione strumento 12
- aiuto
 - documentazione 3
 - generazione cluster 18
 - reibridazione primer 55
 - SAV 35
- algoritmo Phred 62
- allestimento del laboratorio 3, 59
- allineamento con PhiX 25
- Allineamento PhiX 25
- applicazioni, installate 6
- array cluster 62
- assistenza clienti 73
- assistenza tecnica 73
- avvertenze
 - descrizione 6
 - risoluzione 6
- B**
- BaseSpace Broker 59
- BaseSpace Enterprise 14
- BaseSpace Onsite Sequence Hub
 - collegamento di una corsa 24
 - configurazione dominio 14
 - integrazione 2
- BaseSpace Sequence Hub
 - collegamento di una corsa 24
 - configurazione dominio 14
 - fogli campioni 26
 - icone 8
 - integrazione 2
 - trasterimento dati 59
- bcl2fastq, versione 58
- bolle 30, 34
- C**
- capacità archiviazione
 - ottimizzazione 63
- caratteristiche hardware 2
- cartelle corsa, temporanee 67
- cartelle output
 - posizioni 13, 24
 - struttura 67
- cartelle temporanee 67
- cavi USB, connessione 12
- cella a flusso
 - array cluster 62
 - ID cella a flusso 24
 - preconfigurata (patterned) 9
- cella a flusso preconfigurata (patterned)
 - 2, 9, 60
- celle a flusso
 - array cluster 60
 - imaging 68
 - ispezione 30, 34
 - posizionamento 5, 29, 33
 - priming 29
- colori barra di stato 4
- colori, barra di stato 4
- conformità 3
- connessione cavi USB 12
- connessione rete 59
- conservazione soluzione lavaggio
 - manutenzione 41, 43
- contaminazione incrociata,
 - prevenzione 42
- conversione dati 58
- conversione FASTQ 58
- corsie
 - cella a flusso 25, 68
- D**
- dati
 - compressione 63
 - conversione 58
 - invio a Illumina 15
- demultiplex 58
- denominazione
 - cartelle corsa 13
 - cartelle corse 67
 - tile 68
- determinazione fasi (phasing) 61
- documentazione 3, 73
- dominio, configurazione 14
- E**
- errori 59
- F**
- fasi chimica, monitoraggio 35
- file configurazione 66
- file identificazioni delle basi 61
- file informazioni corsa 66
- file InterOp 58
- File InterOp 66
- file marker 59
- file memoria 58
- file registro 66
- filtro Chastity 62
- Finestra Menu Options (Opzioni di
 - menu) 13
- fluidica
 - manutenzione 37
- fogli campioni, requisiti 26
- G**
- guarnizioni 41

- guarnizioni, risoluzione dei problemi 51
- guida, tecnica 73
- H**
- HCS 6
 - apertura 12
 - opzioni visualizzazione 13
 - registri errori 50
- I**
- icone 6
 - stato trasferimento dati 7
- icone Run Copy Service 7
- immagini in miniatura (thumbnail) 24, 66
- immagini, salvataggio 24
- impostazione corsa
 - cicli rimanenti 26
 - priming dei reagenti 26
- impostazioni chimica 25
- impostazioni, software 13
- incorporazione prima base 35
- indicatori di rilevamento
 - Run Copy Service 7
- indicatori rilevamento
 - BaseSpace Sequence Hub 8
- inizializzazione software 12
- inizializzazione software, risoluzione dei problemi 51
- installazione, verifica fluidica 52
- intensità, monitoraggio 35
- K**
- kit SBS 9
- L**
- lato cella a flusso 67
- lavaggi
 - acqua rispetto a manutenzione 40
 - benefici 40
 - requisiti sistema 41
 - soluzione lavaggio
 - manutenzione 41, 43
- lavaggi con acqua
 - durata e frequenza 37
 - volumi erogati 37
- lavaggi di sistema 37
- lavaggi manutenzione 41
 - frequenza 41
 - riutilizzo soluzione 41-43
 - volumi erogati 43, 45
- lavaggio post-corsa 37
- leva arancione cella a flusso 51
- leva cella a flusso 4
 - arancione 51
 - lampeggiante 51
- leva cella a flusso lampeggiante 51
- LIMS
 - impostazioni 13
 - server 13
- M**
- manutenzione preventiva 40
- manutenzione, preventiva 40
- materiali di consumo
 - forniti dall'utente 16
 - kit di sequenziamento Illumina 9
- materiali di consumo per il sequenziamento 9, 19
- metriche corsa 35, 58
- modulo ottica 4
- monitoraggio a distanza 24
- N**
- nano-pozzetti 9
- nessuna identificazione (N) 61
- nome esperimento 24
- numeri di catalogo
 - collettori 55
 - kit reibridazione Illumina 55
 - materiali di consumo forniti dall'utente 16
- numero di cicli
 - eseguiti e immessi 25
- O**
- opzioni di indicizzazione 25
- opzioni di messa in pausa 53
- P**
- pagine di supporto 3
- parametri corsa, revisione 26
- perdita dati 53, 58
- perdita di registrazione 51
- perdita registrazione, Lettura 1 51
- perdite 30, 34
- perni guida 29, 33
- posizionamento celle a flusso 29, 33
- posizione cartella corsa 67
- posizioni cartelle 13, 67
- posizioni cartelle predefinite 13
- posizioni cluster 9, 60
- posizioni file 66-67
- posizioni reagenti
 - rack SBS 27
- posizioni reagenti SBS 27
- posizioni, reagenti
 - SBS 27
- pozzetti policlonali 62
- predeterminazione fasi (prephasing) 61
- preparazione della sede 3, 59
- preparazione per il priming 30
- priming
 - impostazione opzionale 26
- priming cella a flusso 29
- probabilità di errore 62
- procedura sequenziamento,
 - panoramica 23
 - RTA 60
- pulizia spazio su disco 38
- punteggi qualitativi 62
 - monitoraggio 35
- Q**
- qualità cluster 62
- R**
- rack reagenti 5
- rack, reagenti 5

reagenti
 manipolazione post-corsa 36
 preparazione 18
 registrazione ID kit 26
 sequenziamento 19
 sostituzione metà corsa 53
 registrazione, risoluzione dei
 problemi 60
 registri errori 50, 59
 reibridazione 54-55
 report sulla prima base 25
 report, incorporazione prima base 35
 riavvio dello strumento 47
 ricette personalizzate 25
 ricette, personalizzate 25
 risoluzione dei problemi Lettura 1 51,
 55
 riutilizzo soluzione lavaggio
 manutenzione 42
 RTA 6
 RTA2
 file di input 58
 terminazione 58
 terminazione corsa 53
 Run Copy Service 7, 59

S

salvataggio immagini in miniatura
 (thumbnail) 24
 SAV 6
 documentazione 35
 file InterOp 66
 scheda Index (Indice) 58
 versione 58
 schema indicizzazione 26
 schermata Flow Cell Setup
 (Impostazione cella a flusso) 24
 schermata Reagents (Reagenti) 26
 schermata Run Overview (Panoramica
 corsa) 35
 scomparti 4
 sensori 7
 sicurezza 3
 sistema fluidica 4
 accesso 4
 manutenzione 40
 risoluzione dei problemi 51-52
 sistema vuoto 4
 software
 applicazioni installate 6
 caratteristiche 2
 risoluzione dei problemi 51
 soluzione lavaggio manutenzione 41,
 43
 sostituzione reagenti metà corsa 53
 spazio su disco disponibile 38
 spazio su disco richiesto 38
 stato inattivo (idling), periodo
 accettabile 46
 stato trasferimento dati
 BaseSpace Sequence Hub 8
 Run Copy Service 7
 strisce 24, 68
 struttura cartelle 67
 supporto online 3

T

tappi a imbuto 27
 temperatura, vano refrigerato reagenti 5
 tile 58, 68
 trasferimento dati 38, 59
 tubi scarico 30, 43-44

U

unità memoria virtuale per
 archiviazione temporanea 38
 unità output 38

V

valori di intensità 60
 vano refrigerato reagenti, temperatura 5
 visualizzazione contemporanea 61
 volume priming raccolto 31
 volumi erogati
 lavaggi con acqua 37
 lavaggi manutenzione 43, 45
 priming 31
 volumi previsti
 lavaggi con acqua 37
 lavaggi manutenzione 43, 45
 priming 31

Assistenza tecnica

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

Tabella 4 Informazioni di contatto generali Illumina

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

Tabella 5 Numeri di telefono dell'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
Cina	400.635.9898	Regno Unito	0800.917.0041
Danimarca	80882346	Singapore	1.800.579.2745
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Giappone	0800.111.5011	Taiwan	00806651752
Hong Kong	800960230	Altri paesi	+44.1799.534000
Irlanda	1.800.812949		

Schede dei dati 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 Illumina. Andare al sito support.illumina.com, selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).

