

HiSeq 4000

Guida del sistema



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

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

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

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

© 2018 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20015630 Documento n. 15066496 v05	Marzo 2018	Aggiunte le informazioni sul servizio di monitoraggio proattivo Illumina nella sezione Visualizzazione e invio dei dati dello strumento. Aggiornate le informazioni sui reagenti per sostituire HP12 con HP14.
Materiale n. 20015630 Documento n. 15066496 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. 20013047 Documento n. 15066496 v03	Settembre 2016	Aggiunto Custom Protocol Selector a Risorse aggiuntive. 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 l'avvio dello 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
Materiale n. 20007157 Documento n. 15066496 v02	Maggio 2016	<p>Aggiornate le descrizioni del software per HiSeq Control Software v3.3.76:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiunte le istruzioni per gli utenti che dispongono dell'abbonamento a BaseSpace Enterprise per la configurazione di un dominio. • Aggiornate le istruzioni per le corse scaglionate per includere l'utilizzo del pulsante Pause (Pausa). <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 per la generazione di 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 in Read 1 (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.
Materiale n. 20000063 Documento n. 15066496 v01	Agosto 2015	<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>Aggiunte le istruzioni per le corse scaglionate sulla cella a flusso A e sulla cella a flusso B.</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>

Documento	Data	Descrizione della modifica
N. codice 15066496 Rev. A	Febbraio 2015	Versione iniziale.

Sommario

Cronologia revisioni	iii
Capitolo 1 Descrizione generale	1
Introduzione	1
Risorse aggiuntive	1
Componenti dello strumento	2
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	6
Capitolo 2 Informazioni preliminari	8
Avvio di HiSeq 4000	8
Personalizzazione delle impostazioni del sistema	8
Visualizzazione e invio dei dati dello strumento	10
Materiali di consumo forniti dall'utente	10
Capitolo 3 Preparazione dei reagenti	12
Introduzione	12
Preparazione dei reagenti SBS	12
Preparazione dei reagenti paired-end e di indicizzazione	12
Capitolo 4 Sequenziamento	14
Introduzione	14
Flusso di lavoro per il sequenziamento	14
Immissione dei parametri della corsa	15
Caricamento e priming dei reagenti	18
Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento	22
Monitoraggio della corsa	24
Rimozione dei reagenti	25
Esecuzione di un lavaggio con acqua	26
Formattazione veloce dell'unità di output e dell'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea	27
Capitolo 5 Manutenzione	28
Introduzione	28
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	28
Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)	33
Spegnimento dello strumento	33
Appendice A Risoluzione dei problemi	35
File di registro	35
Possibili problemi d'impostazione della corsa	35
Esecuzione di una verifica della fluidica	36
Messa in pausa o arresto di una corsa su HiSeq 4000	36

Corse scaglionate sulla cella a flusso A e sulla cella a flusso B	37
Possibile reibridazione primer Read 1 (Lettura 1)	38
Appendice B Real-Time Analysis (RTA)	39
Descrizione generale di Real-Time Analysis (RTA)	39
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis (RTA)	40
Appendice C File di output	45
File di output per il sequenziamento	45
Struttura della cartella di output	45
Numerazione delle tile	46
Indice	48
Assistenza Tecnica	52

Capitolo 1 Descrizione generale

Introduzione	1
Risorse aggiuntive	1
Componenti dello strumento	2
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento	6

Introduzione

Il sistema HiSeq® 4000 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 4000 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.
- ▶ **Doppie celle a flusso:** HiSeq 4000 è un sistema a doppia cella a flusso, che permette il sequenziamento di una singola cella a flusso o di due celle a flusso simultaneamente con diverse lunghezze di lettura.
- ▶ **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 di Read 2 (Lettura 2) e per il sequenziamento indicizzato.
- ▶ **Opzioni dell'interfaccia di controllo:** l'interfaccia software dello strumento fornisce opzioni per l'impostazione di una corsa e il funzionamento dello strumento. Utilizzare il monitor touch screen o la tastiera integrata per fornire gli input.
- ▶ **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. Questo metodo consente il monitoraggio delle metriche di qualità durante una corsa e fa risparmiare tempo 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

Dal sito Web di Illumina è possibile scaricare la seguente documentazione. Controllare sempre le pagine di supporto per verificare le ultime versioni disponibili.

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 4000 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 4000 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

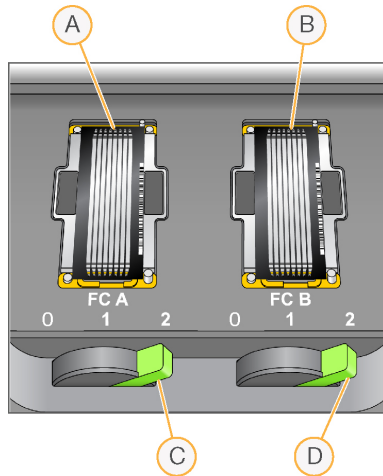


- A **Modulo ottica:** contiene componenti ottici che consentono l'imaging a doppia superficie della cella a flusso, per l'acquisizione contemporanea di A, C, G e T mediante epifluorescenza. Il fascio laser di eccitazione passa attraverso l'obiettivo e la fluorescenza viene raccolta simultaneamente attraverso 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, le stazioni termiche, il sistema della pompa a vuoto e le connessioni della fluidica per ciascuna cella a flusso.

Figura 2 Piano portacelle con due celle a flusso



- A Cella a flusso A
- B Cella a flusso B
- C Leva della cella a flusso A
- D Leva della cella a flusso B

La cella a flusso A si trova a sinistra, la cella a flusso B a destra. Ciascuna cella a flusso è posizionata sul piano portacelle, che si sposta dentro e fuori il modulo ottica come indicato dal software di controllo. Il piano portacelle deve essere nella posizione più anteriore per aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso e caricare o rimuovere una cella a flusso.

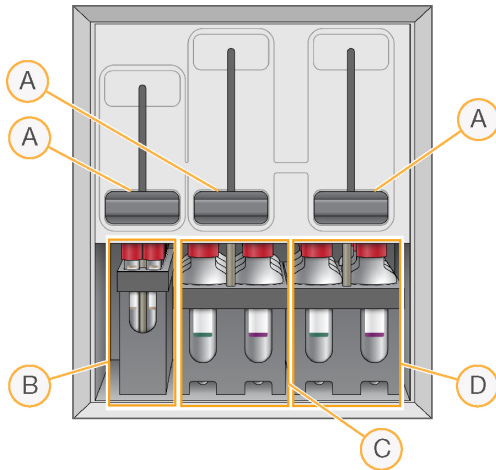
La cella a flusso viene posizionata sul vano portacella con le porte di entrata e di uscita rivolte verso il basso. Il vuoto sotto il vano portacella tiene la cella a flusso in posizione. La leva della cella a flusso illuminata di fronte a ciascun vano portacella controlla la pompa a vuoto. La leva della cella a flusso diventa verde quando la tenuta del vuoto è corretta.

Scomparto reagenti

Lo scomparto reagenti è un vano refrigerato per i reagenti a elevata capacità che contiene tre rack reagenti: due per i reagenti SBS e uno per i reagenti PE e di indicizzazione. Le maniglie dei pettini di aspirazione abbassano i pescanti nei flaconi di reagente.

- ▶ **Rack reagenti SBS:** contiene flaconi conici da 250 ml. Il rack reagenti per la cella a flusso A si trova nella posizione centrale e il rack reagenti per la cella a flusso B si trova nella posizione all'estrema destra. Ciascun rack reagenti dispone di posizioni numerate che corrispondono ai collegamenti sulla valvola di selezione interna dei reagenti.
- ▶ **Rack reagenti di indicizzazione e reagenti PE:** posizionato a sinistra. Dispone di due righe di posizioni numerate che contengono flaconi conici da 15 ml contenenti i reagenti PE e i reagenti di indicizzazione. La riga a sinistra è per la cella a flusso A e la riga a destra è per la cella a flusso B.
- ▶ **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 SBS per la cella a flusso A
- D Rack reagenti SBS per la cella a flusso B

Software HiSeq 4000




Sul computer dello strumento sono installate tre applicazioni software:

- ▶ **HiSeq 4000 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 gestisce l'hardware dello strumento e 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 39.
- ▶ **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.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Attenzione	Informazione che richiama l'attenzione dell'utente.
	Avvertenza	Le avvertenze non provocano l'arresto di una corsa, ma possono subordinarne il proseguimento a un intervento dell'utente.
	Errore	In genere gli errori provocano l'arresto di una 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 una serie di icone ubicate nell'angolo inferiore destro della schermata. Le icone indicano l'attività dello strumento e lo stato di determinati componenti in base a quanto rilevato dai sensori 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 A, la temperatura del vano refrigerato per i reagenti, lo stato del trasferimento dei dati, lo stato di BaseSpace Hub sul cloud e la temperatura della cella a flusso B.





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 4000 sono necessari un SBS HiSeq 3000/4000 Kit e un Cluster Kit. I kit per la generazione di cluster sono disponibili nelle versioni paired-end (PE) e unidirezionale (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 fiaschi da 250 ml che si caricano direttamente sugli appositi rack. Le etichette dei reagenti sono codificate a colori per ridurre gli errori di caricamento.

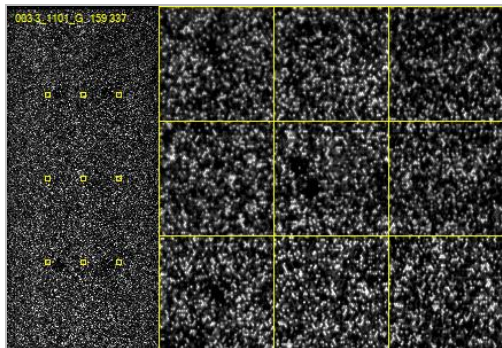
I kit per la generazione di cluster contengono i reagenti di generazione cluster usati su cBot e i reagenti di indicizzazione e paired-end usati su HiSeq 4000. Ciascun kit per la generazione di cluster include un kit di accessori con guarnizioni della cella a flusso, tappi a imbuto per i fiaschi di reagente SBS e una provetta di conservazione della cella a flusso.

Cella a flusso preconfigurata (patterned)

HiSeq 4000 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)



Capitolo 2 Informazioni preliminari

Avvio di HiSeq 4000	8
Personalizzazione delle impostazioni del sistema	8
Visualizzazione e invio dei dati dello strumento	10
Materiali di consumo forniti dall'utente	10

Avvio di HiSeq 4000

- 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, utilizzare 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 di 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 i dati sull'integrità dello strumento, 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 ridurre a icona 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 le posizioni di output predefinite, immettere una posizione per ciascuna cartella seguente:
 - ▶ **Default Output Folder** (Cartella di output predefinita): la cartella di output predefinita per le corse sulla cella a flusso A.
 - ▶ **Default Output Folder2** (Cartella di output predefinita 2): la cartella di output predefinita per le corse sulla cella a flusso B.



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 le modifiche 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 seguenti impostazioni per LIMS:
 - ▶ **LIMS Server** (Server LIMS): il nome del server che consente di interagire con il sistema LIMS supportato da Illumina.
 - ▶ **LIMS User Name** (Nome utente LIMS): il nome utente LIMS utilizzato per l'autenticazione del sistema LIMS Illumina.
 - ▶ **LIMS Password** (Password LIMS): la password LIMS utilizzata per l'autenticazione del sistema LIMS Illumina.
- 3 Selezionare **OK** (Ok) per salvare le modifiche 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).
- ▶ Selezionare **Menu | Tools | Options** (Menu | Strumenti | Opzioni), quindi selezionare **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Invia le informazioni sullo stato di integrità dello strumento a Illumina per migliorare i prodotti) per attivare il servizio di monitoraggio proattivo Illumina. Il nome dell'impostazione presente nell'interfaccia software potrebbe essere diverso dal nome presente in questa guida, in base alla versione di HCS in uso.

L'attivazione di questa impostazione consente di inviare a Illumina i dati delle prestazioni dello strumento. Questi dati consentono a Illumina di risolvere facilmente eventuali problemi, di rilevare possibili malfunzionamenti, di eseguire una manutenzione proattiva e di massimizzare il tempo di funzionamento dello strumento. Per maggiori informazioni sui vantaggi di questo servizio, fare riferimento a *Illumina Proactive Technical Note (documento n. 1000000052503)* (Nota tecnica sul servizio proattivo Illumina).

Questo servizio:

- ▶ Non invia i dati del sequenziamento.
- ▶ Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet.
- ▶ È acceso per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, disattivare l'impostazione **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Invia le informazioni sullo stato di integrità dello strumento a Illumina per migliorare i prodotti).



NOTA

Questa impostazione viene riattivata dopo un aggiornamento software. Se non si desidera inviare i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina, disattivare questo servizio dopo ogni aggiornamento software.

Materiali di consumo forniti dall'utente

Materiale 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 sei litri	Fornitore di laboratorio generico	Per la preparazione della soluzione di lavaggio di manutenzione.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
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 PE, posizioni contenenti PW1. Lavaggio dello strumento.

Capitolo 3 Preparazione dei reagenti

Introduzione	12
Preparazione dei reagenti SBS	12
Preparazione dei reagenti paired-end e di indicizzazione	12

Introduzione

Prima di impostare la corsa, preparare tutti i reagenti per il sequenziamento: reagenti SBS, reagenti di indicizzazione e reagenti PE. 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.

Scongelamento dei reagenti SBS

- 1 Rimuovere HCM, HIM e HSM dal contenitore per la conservazione a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
- 2 Scongellarli a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °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 risintesi di Read 2 (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. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Scongelamento e preparazione dei reagenti di indicizzazione e paired-end

- 1 Rimuovere i seguenti reagenti 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 con indicizzazione doppia: HDR, HP14 e HRM.
 - ▶ Librerie con indicizzazione singola: HDR e HP14.
- 2 Scongelare in un becher riempito con acqua deionizzata a temperatura ambiente per circa 20 minuti.
- 3 Capovolgere ogni provetta per miscelare.
- 4 Centrifugare a 1.000 giri/min per un minuto.
- 5 Mettere da parte su ghiaccio HAM, HLM2 e HRM.
- 6 Mettere da parte a temperatura ambiente HDR, HP11, HP14, HP14 e HPM.


Capitolo 4 Sequenziamento

Introduzione	14
Flusso di lavoro per il sequenziamento	14
Immissione dei parametri della corsa	15
Caricamento e priming dei reagenti	18
Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento	22
Monitoraggio della corsa	24
Rimozione dei reagenti	25
Esecuzione di un lavaggio con acqua	26
Formattazione veloce dell'unità di output e dell'unità di memoria virtuale per l'archiviazione temporanea	27

Introduzione

Per eseguire una corsa su HiSeq 4000, preparare tutti i reagenti e attenersi ai suggerimenti del software per impostare la corsa. La procedura d'impostazione della corsa include l'immissione 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 4000](#) sul sito Web Illumina.

Corse scaglionate

È possibile avviare una nuova corsa sulla cella a flusso A o sulla cella a flusso B quando una corsa sulla cella a flusso adiacente è in fase di elaborazione. Per maggiori informazioni, vedere [Corse scaglionate sulla cella a flusso A e sulla cella a flusso B](#) a pagina 37.

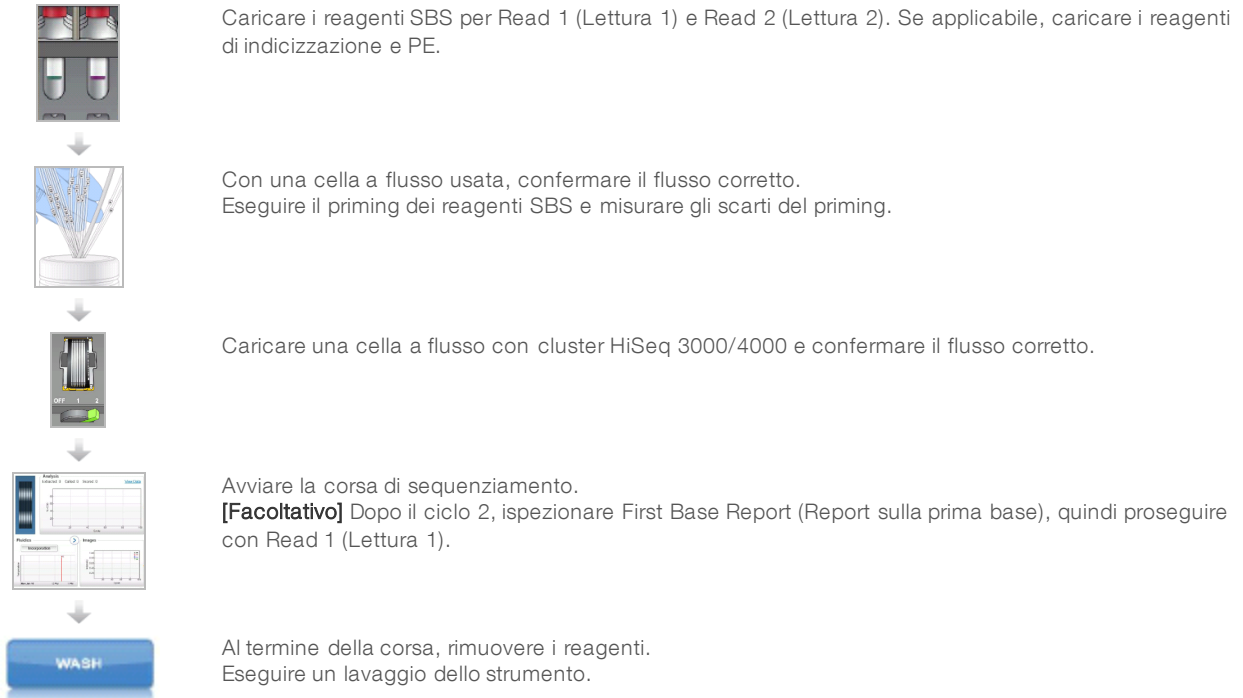
Flusso di lavoro per il sequenziamento



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.



Immissione dei parametri della corsa

Avviare 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 **[Facoltativo]** 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 seguenti opzioni:
 - ▶ **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** (Sfogliare) 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.

- 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 utilizzata per la corsa. Sono richiesti tutti i campi.

- 1 Sottoporre a scansione o immettere 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 ogni schermata per consentire l'identificazione della corsa in fase di elaborazione.
- 4 Immettere un nome utente.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Advanced (Avanzato)

- 1 **[Facoltativo]** 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 **[Facoltativo]** 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 Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (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 Read 1 (Lettura 1), immettere 126.

- Se l'utente ha selezionato l'opzione di indicizzazione **Custom** (Personalizzata), inserire il numero di cicli per ciascun Index Read (Lettura indici).

**NOTA**

Le lunghezze delle letture non devono necessariamente corrispondere.

- Confermare le seguenti impostazioni per la chimica che sono popolate automaticamente.
 - ▶ **SBS: HiSeq 3000/4000 SBS Kit**: mostra la chimica SBS usata per Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (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 risintesi paired-end.
- [Facoltativo]** Selezionare la casella di controllo **Use Existing Recipe** (Usa ricetta esistente) per utilizzare 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.

- Selezionare **Browse** (Sfogliare) per individuare il foglio campioni.
- Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Reagents (Reagenti)

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

- Eseguire la scansione o immettere l'ID del codice a barre del kit di reagenti SBS.
- Per le corse paired-end, eseguire la scansione o immettere l'ID del kit per la generazione di cluster.
- 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 più kit 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 un conteggio alla rovescia sul numero di cicli inserito. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi.

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

Schermata Review (Revisione)

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

Caricamento e priming dei reagenti

Dopo aver immesso i parametri per la corsa, caricare i reagenti SBS, i reagenti di indicizzazione e i reagenti PE per la corsa, quindi eseguire il priming dei reagenti nel sistema di fluidica. Il software guida l'utente in questa procedura 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 per ultimo HCM, 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 che si trova sull'estremità superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
- 5 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti utilizzando 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 che si trova sull'estremità 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 che si trova sull'estremità superiore della scanalatura. Assicurarsi che la maniglia sia posizionata correttamente nell'alloggiamento.
- 3 Far scorrere il rack fuori dallo scomparto reagenti utilizzando 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 - Read 2 (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

Posizione	Reagente	Descrizione
17	HP14	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 con indicizzazione doppia. 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 che si trova sull'estremità 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.



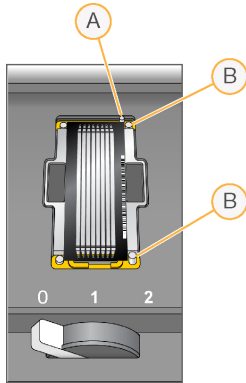
ATTENZIONE

Per il priming dei reagenti utilizzare sempre una cella a flusso **usata**. Utilizzare la cella a flusso proveniente da una corsa precedente per eseguire 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 Perna guida destra

- 6 Rimuovere la mano dalla cella a flusso per impedire spostamenti dell'allineamento.
- 7 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione n. 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 35*.
- 8 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione n. 2.
Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta.
- 9 Assicurarsi che la casella di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attivata) 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.

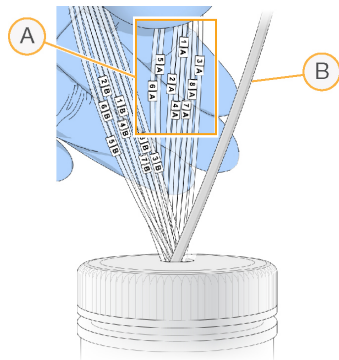
- 1 Selezionare la posizione n.2 dall'elenco a discesa.
- 2 Confermare i seguenti valori predefiniti:
 - ▶ Volume (Volume): **125**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2.000**
- 3 Selezionare **Pump** (Pompa).
- 4 Ispezionare la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
- 5 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.

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

Posizionamento dei tubi e avvio del priming

- 1 Rimuovere gli otto tubi di scarico per la cella a flusso appropriata 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

- 2 Collocare ciascun tubo degli scarti in una provetta da 15 ml separata. Gli scarti vengono raccolti e misurati al termine della fase di priming.
- 3 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 ogni posizione SBS, fatta eccezione per la posizione 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
 - ▶ 1,75 ml per ogni 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

Il caricamento della cella a flusso 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

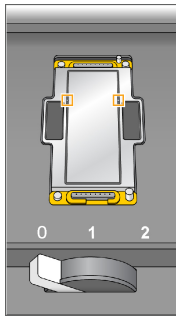
- 1 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione n. 1 per sbloccare i collettori.
- 2 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione n. 0 per sbloccare la tenuta del vuoto e rilasciare la cella a flusso.
- 3 Sollevare la cella a flusso usata dal vano portacella.

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.

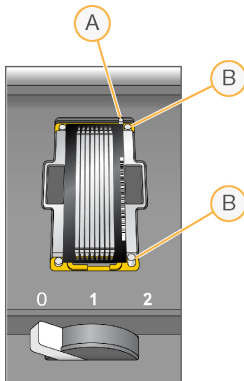
Figura 9 Ispezione dei fori della pompa a vuoto



Caricamento della cella a flusso per il sequenziamento

- 1 Posizionare 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, sia rivolta 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 n. 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 35.
- 5 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione n. 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 Assicurarci che la casella di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attivata) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

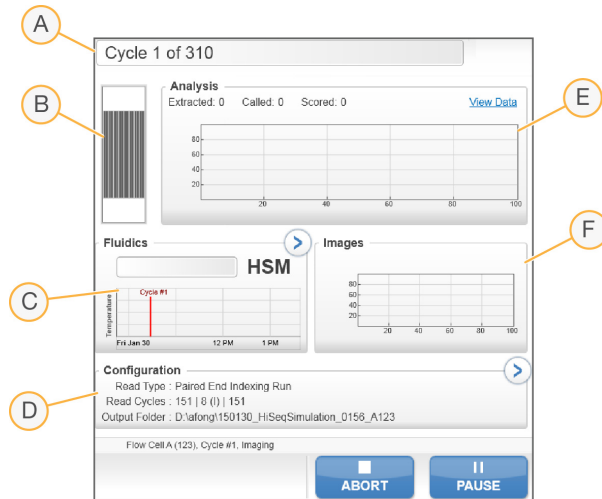
La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

- 1 Selezionare la posizione n.5 dall'elenco a discesa.
- 2 Immettere i seguenti valori:
 - ▶ Volume (Volume): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2.000**
- 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 per la pompa utilizzando la posizione n. 6 per evitare di esaurire la posizione n. 5.
 - c Ridurre la velocità di aspirazione a 100.
 - d Pompate altri 250 µl nella cella a flusso.
- 6 Selezionare **Next** (Avanti).
- 7 Assicurarci che la leva della cella a flusso sia verde, quindi chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.
- 8 Assicurarci che le caselle di controllo **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attivata) e **Door Closed** (Sportello chiuso) siano selezionate, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 9 Selezionare **Start** (Avvia) 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**: consente di monitorare quanti cicli sono stati completati.
- B **Immagine della cella a flusso**: consente di monitorare le corsie sottoposte a imaging.
- C **Grafico Fluidics (Fluidica)**: consente di allargare la sezione della fluidica per monitorare le fasi della chimica.
- D **Configurazione della corsa**: consente di rivedere i parametri per la corsa attuale.
- E **Grafico Analysis (Analisi)**: consente di monitorare i punteggi qualitativi per ciclo.
- F **Grafico Images (Immagini)**: consente di 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 consentirne la visualizzazione. 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 PE appropriato 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. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Esecuzione di un lavaggio con acqua

Un lavaggio con acqua è richiesto dopo ogni 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 28*. Per istruzioni vedere la Guida del sistema HiSeq 4000 (documento n. 15066496).

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 n. 2 dall'elenco a discesa.
 - b Accettare i valori predefiniti della pompa.
 - c Selezionare **Pump** (Pompa).
 - d 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 per la cella a flusso appropriata 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
8 posizioni SBS	20 minuti
8 posizioni SBS e 10 posizioni paired-end	60 minuti

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

Posizioni	Volume totale erogato	Volume erogato per corsia
8 posizioni SBS	32 ml	4 ml
8 posizioni SBS e 10 posizioni paired-end	72 ml	9 ml

- 12 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli 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:\.

Capitolo 5 Manutenzione

Introduzione	28
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	28
Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)	33
Spegnimento dello strumento	33

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. Un lavaggio di manutenzione impiega circa 90 minuti e si attiene a uno dei due flussi di lavoro, in base alla disponibilità di ProClin 300:

- ▶ **Lavaggio con Tween 20 e ProClin 300:** esegue il lavaggio del sistema con una soluzione di Tween 20 e ProClin 300 preparata dall'utente. Vedere *Lavaggio di manutenzione con Tween 20 e ProClin 300 a pagina 28*.
- ▶ **Lavaggio con Tween 20:** esegue il lavaggio del sistema con una soluzione di Tween 20 preparata dall'utente e potrebbe richiedere un lavaggio con acqua. Vedere *Lavaggio di manutenzione con Tween 20 a pagina 31*.

Quando viene visualizzata la schermata Load Gasket (Carica guarnizione) prima di un lavaggio di manutenzione, devono essere sostituite le guarnizioni del collettore anteriore e del collettore posteriore prima di avviare il lavaggio.

Lavaggio di manutenzione con Tween 20 e ProClin 300

Preparazione della soluzione di lavaggio per la manutenzione

Preparare cinque litri di soluzione di lavaggio per la 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 seguenti volumi per diluire Tween 20:
 - ▶ Acqua da laboratorio (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)Con questi volumi si otterrà una soluzione di Tween 20 a circa il 10%.

- 2 Collocare una barra di agitazione in una damigiana da almeno sei litri.
- 3 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i seguenti volumi nella damigiana:
 - ▶ Acqua da laboratorio (750 ml)
 - ▶ 10% di Tween 20 (250 ml)
 - ▶ ProClin 300 (1,5 ml)Con questi volumi si otterrà una soluzione di Tween 20 a circa il 2,5% e di ProClin 300 a circa lo 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 Tween 20 a circa lo 0,5% e di ProClin 300 a circa lo 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 appena preparata, caricare lo strumento con la soluzione nel modo seguente.
 - a Riempire otto flaconi SBS con 250 ml di soluzione di lavaggio appena preparata.
 - b Riempire dieci flaconi paired-end con 12 ml di soluzione di lavaggio appena preparata.
 - 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.

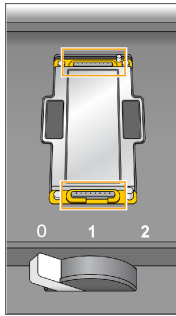


NOTA

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 attivata) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 12 Eseguire una verifica della fluidica utilizzando i valori predefiniti della pompa:
 - a Selezionare la soluzione n. 2 dall'elenco a discesa.
 - 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 appropriata dal contenitore per gli scarti.
- 14 Fissare assieme gli otto tubi di scarico con parafilm. Assicurarsi che le estremità dei 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.
- 17 Al termine della corsa, selezionare **Return to Start** (Torna all'avvio).
- 18 Misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
8 posizioni SBS	74 ml
10 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 assicurare 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 di lavaggio per la manutenzione

Preparare sempre una soluzione di lavaggio al momento per un lavaggio di manutenzione con Tween 20. Preparare cinque litri di soluzione per il lavaggio di manutenzione. Questo volume è sufficiente per lavare entrambi i lati di uno strumento.

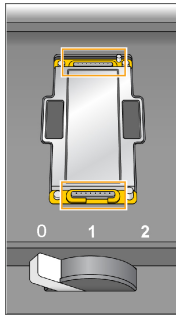
Smaltire la soluzione di lavaggio in base agli standard di sicurezza governativi locali.

- 1 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i seguenti volumi per diluire Tween 20:
 - ▶ Acqua da laboratorio (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)Con questi volumi si otterrà una soluzione di Tween 20 a circa il 10%.
- 2 Collocare una barra di agitazione in una damigiana da almeno sei litri.
- 3 Prima aggiungere acqua, quindi combinare i seguenti volumi nella damigiana:
 - ▶ Acqua da laboratorio (750 ml)
 - ▶ 10% di Tween 20 (250 ml)Con questi volumi si otterrà una soluzione di circa 2,5% di Tween 20.
- 4 Miscelare completamente su una piastra di agitazione.
- 5 Dispensare quattro litri di acqua da laboratorio per ottenere una soluzione di circa 0,5% di Tween 20.
- 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 appena preparata nel modo di seguente.
 - a Riempire otto flaconi SBS con 250 ml di soluzione di lavaggio appena preparata.
 - b Riempire dieci flaconi paired-end con 12 ml di soluzione di lavaggio appena preparata.
- 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 attivata) sia selezionata, quindi selezionare **Next** (Avanti).
- 11 Eseguire una verifica della fluidica utilizzando i valori predefiniti della pompa:
 - a Selezionare la soluzione n. 2 dall'elenco a discesa.
 - 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 appropriata dal contenitore per gli scarti.
- 13 Fissare assieme gli otto tubi di scarico con parafilm. Assicurarsi che le estremità dei 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.
- 16 Al termine della corsa, selezionare **Return to Start** (Torna all'avvio).
- 17 Misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
8 posizioni SBS	74 ml
10 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 assicurare 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 più di cinque giorni dopo il lavaggio con Tween 20, eseguire un lavaggio con acqua. Il lavaggio con acqua lava 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 l'acqua, i flaconi o i tubi utilizzati per il lavaggio con Tween 20. L'acqua potrebbe essere contaminata con i reagenti presenti nei pescanti.

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

Posizioni	Volume erogato
8 posizioni SBS	32 ml
8 posizioni SBS e 10 posizioni paired-end	72 ml

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

Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)

Utilizzare le seguenti istruzioni 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 n. 2. Lasciare i collettori in posizione sollevata.
- 3 Caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione nei rack reagenti, quindi abbassare i pescanti.
- 4 Prima di utilizzare 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 Spegnerlo 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.

Appendice A Risoluzione dei problemi

File di registro	35
Possibili problemi d'impostazione della corsa	35
Esecuzione di una verifica della fluidica	36
Messa in pausa o arresto di una corsa su HiSeq 4000	36
Corse scaglionate sulla cella a flusso A e sulla cella a flusso B	37
Possibile reibridazione primer Read 1 (Lettura 1)	38

File di registro

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

Per accedere al file di registro, selezionare **Menu | Tools | Show Log** (Menu | Strumenti | Mostra registro) dalla schermata Welcome (Benvenuto).

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 tenuta del 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 n. 2.
Erogazione fluido scadente.	Possibile presenza di bolle nel sistema.	Riposizionare la cella a flusso e confermare che i fori siano rivolti verso il basso . 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.

Problema	Possibile causa	Intervento
Perdita di registrazione in Read 1 (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 22 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

Eseguire 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 immettere l'ID della cella a flusso (numero del codice a barre) per il lavaggio della cella a flusso per il priming. Per questa fase, assicurarsi di utilizzare 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 n. 2 dall'elenco a discesa.
- 6 Confermare i seguenti valori predefiniti:
 - ▶ Volume (Volume): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2.000**
- 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 si rileva una presenza eccessiva di bolle:
 - a Verificare che le guarnizioni dei collettori non presentino ostruzioni.
 - b Ridurre la velocità di aspirazione a 100.
 - c Pompate altri 250 µl di acqua nella cella a flusso.

Messa in pausa o arresto di una corsa su HiSeq 4000

Quando si termina una corsa non viene fornita l'opzione per salvare i dati o riprendere la corsa. Potrebbe essere necessario mettere in pausa una corsa per verificarne i componenti o per impostare una corsa sulla cella a flusso adiacente.

Messa in pausa di una corsa

In base a 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 39.

- 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 la corsa è stata avviata 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 Immettere 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 4000 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 Read 1 (Lettura 1), è possibile eseguire la reibridazione primer su cBot. Dopo la reibridazione primer, avviare una nuova corsa su HiSeq 4000 per sottoporre a sequenziamento la cella a flusso.

Corse scaglionate sulla cella a flusso A e sulla cella a flusso B

- 1 Selezionare **Pause | Normal Pause** (Pausa | Pausa normale).
- 2 Attendere che il software completi la fase della chimica o di imaging in corso.
Il sistema viene messo automaticamente in uno stato sicuro.

- 3 Confermare che la corsa è stata messa in pausa correttamente.
Quando una corsa è in pausa, viene visualizzato il pulsante Resume (Riprendi).
- 4 Impostare la nuova corsa.
- 5 Dopo aver caricato la nuova cella a flusso per la nuova corsa, chiudere lo sportello dello scomparto.
- 6 Selezionare **Start** (Avvia) per avviare la nuova corsa.
- 7 Sulla cella a flusso adiacente selezionare **Resume** (Riprendi) per riprendere la corsa messa in pausa.
Il software controlla automaticamente i processi della chimica e di imaging su entrambe le celle a flusso.

Possibile reibridazione primer Read 1 (Lettura 1)

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

L'ibridazione dei primer Read 1 (Lettura 1) su una cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq 4000 richiede i materiali di consumo Illumina seguenti:

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

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

Appendice B Real-Time Analysis (RTA)

Descrizione generale di Real-Time Analysis (RTA)	39
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis (RTA)	40

Descrizione generale di Real-Time Analysis (RTA)

HiSeq 4000 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, ossia 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 facoltativa.

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 4000, usare bcl2fastq v2.16 o versione successiva. Per informazioni sulla versione software corrente e sui download, vedere la pagina di supporto di HiSeq 4000 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 relativi a ogni file di output, vedere *File di output per il sequenziamento a pagina 45*.

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.

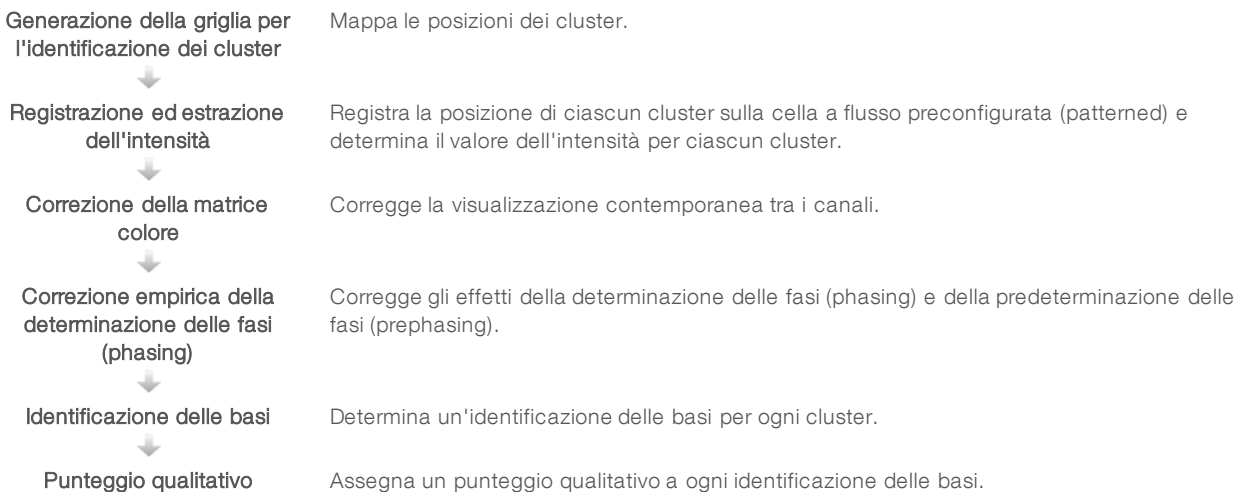


NOTA

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 5*.

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 utilizzata come un riferimento per la fase successiva di registrazione ed estrazione dell'intensità.

L'array sulla cella a flusso preconfigurata (patterned) predetermina le posizioni dei cluster in base al numero di righe e corsie e alla distanza tra i nano-pozzetti. Per maggiori informazioni, vedere [Cella a flusso preconfigurata \(patterned\)](#) a pagina 7.

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 dell'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

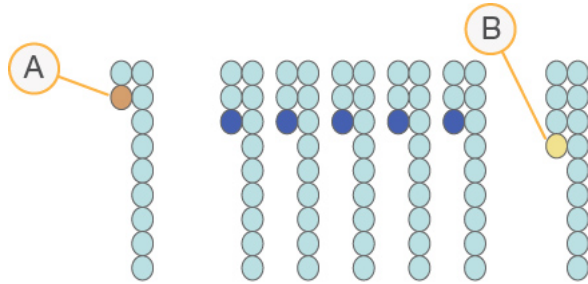
Dopo la registrazione e l'estrazione dell'intensità, RTA2 corregge la visualizzazione contemporanea tra i canali. La visualizzazione contemporanea si verifica quando, ad esempio, un cluster mostra intensità nel canale C e una certa intensità anche nel canale A. Usando una matrice colore 4 x 4, RTA2 genera 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

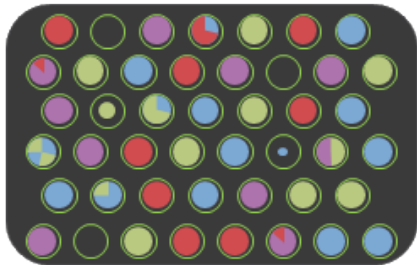
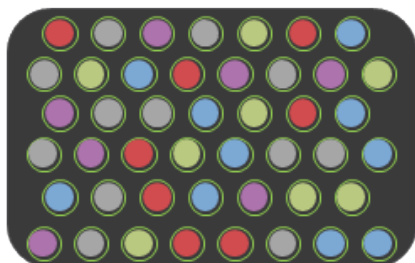
Dopo la correzione delle intensità non elaborate per permettere la visualizzazione contemporanea tra i canali, il calcolo della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing), il canale con l'intensità più luminosa rappresenta l'identificazione per quel cluster in quel ciclo. L'identificazione delle basi su HiSeq 4000 usando RTA2 inizia dopo il ciclo 3.

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ogni 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 Read 1 (Lettura 1), il filtro Chastity rimuove dai risultati dell'analisi i cluster di bassa qualità. 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 4000 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. $Q(X)$ rappresenta i punteggi qualitativi, dove X è il punteggio. La tabella seguente illustra la relazione fra il punteggio qualitativo e la probabilità di errore.

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



NOTA

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

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

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

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 4000. Il file *.bcl risulterà più piccolo 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.

Appendice C File di output

File di output per il sequenziamento	45
Struttura della cartella di output	45
Numerazione delle tile	46

File di output per il sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File delle identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata è inclusa in un file di identificazione delle basi che contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati nelle cartelle per il ciclo per ogni corsia. 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.
File posizione cluster	Per ogni tile, un file posizione cluster contiene le coordinate XY per ogni cluster. I file posizione cluster sono il risultato della generazione della griglia per l'identificazione dei cluster. Data\Intensities: un file per la corsa viene archiviato nella cartella Intensities. s.locs
File filtro	I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. I file filtro sono generati al ciclo 26 usando 25 cicli di dati. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e tile. s_[corsia]_[tile].filter
File InterOp	File report binari usati per Sequencing Analysis Viewer. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa. Cartella InterOp
File di configurazione Real-Time Analysis (RTA)	Creati all'inizio di una corsa, i file di configurazione Real-Time Analysis (RTA) elencano le impostazioni per la corsa. [Cartella della corsa, livello base] RTAConfiguration.xml
File informazioni corsa	Elenca il nome della corsa, il numero di cicli in ciascuna lettura, se la lettura è indicizzata e il numero di strisce e tile sulla cella a flusso. Il file informazioni corsa viene creato all'inizio della corsa. [Cartella della corsa, livello base] RunInfo.xml
File immagini in miniatura (thumbnail)	Un'immagine in miniatura per ciascun canale e tile in ciascuna striscia a ogni ciclo durante l'imaging. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e una sotto cartella per ciascun ciclo. 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 46.

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 corsia, aggregate in un file per ciclo.

 **s.locs**

 **Images**

 **Focus**

-  **L00[X]**: le immagini di messa a fuoco per ogni corsia.
-  **InterOp**: i file binari utilizzati 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 nove posizioni ottenute da ciascun sottogruppo di tile e 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 immettere 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

Il numero della corsa aumenta di uno ogni volta che lo strumento esegue una corsa di sequenziamento. Il lato della cella a flusso (A o B) e l'ID della cella a flusso immessi nella procedura d'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 per la cella a flusso A è scritta nell'unità D: e la cartella temporanea della corsa per la cella a flusso B è scritta nell'unità E:.

Numerazione delle tile

La cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq 3000/4000 viene sottoposta a imaging in 112 tile su ciascuna corsia, nella parte superiore e nella parte inferiore, per ciascun ciclo. Ciascuna delle otto corsie dispone di due strisce con 28 tile per striscia. Le tile sono numerate in base alla posizione.



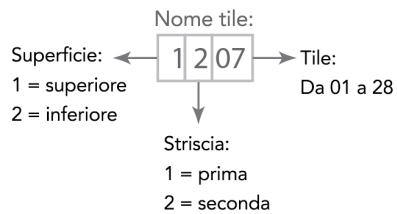
NOTA

Una striscia è una colonna di tile all'interno di una corsia di una cella a flusso.

Il nome della tile è un numero di quattro cifre che rappresenta la posizione sulla cella a flusso.

- ▶ La prima cifra rappresenta la superficie:
 - ▶ 1 è per la superficie superiore
 - ▶ 2 è per la superficie inferiore
- ▶ La seconda cifra rappresenta la striscia:
 - ▶ 1 è per la prima striscia
 - ▶ 2 è per la seconda striscia
- ▶ Le ultime due cifre rappresentano la tile, da 01 a 28. La numerazione delle tile inizia da 01 sul lato di output della cella a flusso, proseguendo fino a 28 sul lato di input.

Figura 17 Numerazione delle tile



L'esempio indica una tile sulla superficie superiore della cella a flusso, nella seconda striscia, settima tile.

Indice

%

% PF 42

A

accensione strumento 8
aiuto
 documentazione 1
 generazione cluster 12
 reibridazione primer 38
 SAV 25
algoritmo Phred 43
allestimento del laboratorio 2, 40
allineamento con PhiX 16
Allineamento PhiX 16
applicazioni, installate 4
array cluster 42
assistenza clienti 52
assistenza tecnica 52
avvertenze
 descrizione 4
 risoluzione 5

B

BaseSpace Broker 40
BaseSpace Enterprise 9
BaseSpace Onsite Sequence Hub
 collegamento di una corsa 15
 configurazione dominio 9
 integrazione 1
BaseSpace Sequence Hub
 collegamento di una corsa 15
 configurazione dominio 9
 fogli campioni 17
 icone 6
 integrazione 1
 trasferimento dati 40
bcl2fastq, versione 39
bolle 21, 24

C

capacità archiviazione
 ottimizzazione 44
caratteristiche hardware 1
cartelle corsa, temporanee 46

cartelle output
 posizioni 9, 15
 struttura 45
cartelle temporanee 46
cavi USB, connessione 8
cella a flusso
 array cluster 42
 ID cella a flusso 16
 preconfigurata (patterned) 7
cella a flusso preconfigurata (patterned) 1, 7, 41
celle a flusso
 array cluster 41
 imaging 46
 ispezione 21, 24
 posizionamento 3, 20, 23
 priming 20
colori barra di stato 2
colori, barra di stato 2
conformità 2
connessione cavi USB 8
connessione rete 40
conservazione soluzione lavaggio
 manutenzione 28, 31
contaminazione incrociata, prevenzione 29
conversione dati 39
conversione FASTQ 39
corse adiacenti 37
corsie
 cella a flusso 16, 46

D

dati
 compressione 44
 conversione 39
 invio a Illumina 10
 servizio proattivo Illumina 10
demultiplex 39
denominazione
 cartelle corsa 9
 cartelle corse 46
 tile 46
determinazione fasi (phasing) 41
documentazione 1, 52
dominio, configurazione 9

E

errori 40
 probabilità 43

F

fasi chimica, monitoraggio 24
 file configurazione 45
 file identificazioni delle basi 42
 file informazioni corsa 45
 file InterOp 39
 File InterOp 45
 file marker 40
 file memoria 39
 file registro 45
 filtro Chastity 42
 Finestra Menu Options (Opzioni di menu) 8
 fluidica
 manutenzione 26
 fogli campioni, requisiti 17

G

guarnizioni 28
 guarnizioni, risoluzione dei problemi 35
 guida, tecnica 52

H

HCS 4
 apertura 8
 opzioni visualizzazione 8
 registri errori 35

I

icone 4-5
 stato trasferimento dati 5
 icone Run Copy Service 5
 immagini in miniatura (thumbnail) 15, 45
 immagini, salvataggio 15
 impostazione corsa
 cicli rimanenti 17
 priming dei reagenti 17
 impostazioni chimica 17
 impostazioni, software 8
 incorporazione prima base 25

indicatori di rilevamento
 Run Copy Service 5
 indicatori rilevamento
 BaseSpace Sequence Hub 6
 inizializzazione software 8
 inizializzazione software, risoluzione dei
 problemi 35
 installazione, verifica fluidica 36
 intensità, monitoraggio 24

K

kit SBS 6

L

lato cella a flusso 3, 46
 lavaggi
 acqua rispetto a manutenzione 28
 requisiti sistema 28
 soluzione lavaggio manutenzione 28, 31
 vantaggi 28
 lavaggi con acqua
 durata e frequenza 26
 volumi erogati 27
 lavaggi di sistema 26
 lavaggi manutenzione 28
 frequenza 28
 riutilizzo soluzione 28-29, 31
 volumi erogati 30, 32
 lavaggio post-corsa 26
 leva arancione cella a flusso 35
 leva cella a flusso 3
 arancione 35
 lampeggiante 35
 leva cella a flusso lampeggiante 35
 LIMS
 impostazioni 9
 server 9

M

manutenzione preventiva 28
 manutenzione, preventiva 28
 materiali di consumo
 forniti dall'utente 10
 kit di sequenziamento Illumina 6
 materiali di consumo per il sequenziamento 6, 12
 metriche corsa 24, 39
 modulo ottica 2

monitoraggio a distanza 15

N

nano-pozzetti 7
nessuna identificazione (N) 42
nome esperimento 16
numeri di catalogo
 collettori 38
 kit reibridazione Illumina 38
 materiali di consumo forniti dall'utente 10
numero di cicli
 eseguiti e immessi 16

O

opzioni di indicizzazione 16
opzioni di messa in pausa 37
opzioni messa in pausa 37

P

pagine di supporto 2
parametri corsa, revisione 18
perdita dati 37, 39
perdita di registrazione 36
perdita registrazione, Read 1 (Lettura 1) 36
perdite 21, 24
perni guida 20, 23
posizionamento celle a flusso 20, 23
posizione cartella corsa 46
posizioni cartelle 9, 45-46
posizioni cartelle predefinite 9
posizioni cluster 7, 41
posizioni file 45
posizioni reagenti
 rack SBS 18
posizioni reagenti SBS 18
posizioni, reagenti
 SBS 18
pozzetti policlonali 42
predeterminazione fasi (prephasing) 41
preparazione della sede 2, 40
preparazione per il priming 22
priming
 impostazione facoltativo 17
priming cella a flusso 20
procedura sequenziamento, panoramica 14
 RTA 40
pulizia spazio su disco 27

punteggi qualitativi 43
monitoraggio 24

Q

qualità cluster 42

R

rack reagenti 3
rack, reagenti 3
reagenti
 manipolazione post-corsa 25
 preparazione 12
 registrazione ID kit 17
 sequenziamento 12
 sostituzione metà corsa 37
registrazione, risoluzione dei problemi 41
registri errori 35, 40
reibridazione 37-38
report sulla prima base 16
report, incorporazione prima base 25
riavvio dello strumento 34
ricette personalizzate 17
ricette, personalizzate 17
risoluzione dei problemi Read 1 (Lettura 1) 36, 38
riutilizzo soluzione lavaggio manutenzione 29
RTA 4
RTA2
 file di input 39
 terminazione 39
 terminazione corsa 37
Run Copy Service 5, 40

S

salvataggio immagini in miniatura (thumbnail) 15
SAV 4
 documentazione 25
 file InterOp 45
 scheda Index (Indice) 39
 versione 39
scarico priming 22
schema indicizzazione 17
schermata Flow Cell Setup (Impostazione cella a
 flusso) 16
schermata Reagents (Reagenti) 17
schermata Run Overview (Panoramica corsa) 24
scomparti 2
sensori 5

Servizio di monitoraggio proattivo Illumina 10
sicurezza 2
sistema fluidica 3
 accesso 2
 manutenzione 28
 risoluzione dei problemi 35-36
sistema vuoto 3
software
 applicazioni installate 4
 caratteristiche 1
 risoluzione dei problemi 35
soluzione lavaggio manutenzione 28, 31
sostituzione reagenti metà corsa 37
spazio su disco disponibile 27
spazio su disco richiesto 27
stato inattivo (idling), periodo accettabile 33
stato trasferimento dati
 BaseSpace Sequence Hub 6
 Run Copy Service 5
strisce 15, 46
struttura cartelle 45
supporto online 1

priming 22

T

tabelle qualità 43
tappi a imbuto 18
temperatura, vano refrigerato reagenti 3
tile 39, 46
trasferimento dati 27, 40
tubi scarico 22, 30, 32

U

unità memoria virtuale per archiviazione
 temporanea 27
unità output 27

V

valori di intensità 41
vano refrigerato reagenti, temperatura 3
visualizzazione contemporanea 41
volumi erogati
 lavaggi con acqua 27
 lavaggi manutenzione 30, 32
 priming 22
volumi previsti
 lavaggi con acqua 27
 lavaggi manutenzione 30, 32

Assistenza Tecnica

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

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

Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Gratuito	Locale
Nord America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	400.066.5835	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940	+49 8938035677
Giappone	0800.111.5011	
Hong Kong	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Norvegia	+47 800 16836	+47 21939693
Nuova Zelanda	0800.451.650	
Paesi Bassi	+31 8000222493	+31 207132960
Regno Unito	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapore	+1.800.579.2745	
Spagna	+34 911899417	+34 800300143
Svezia	+46 850619671	+46 200883979
Svizzera	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	00806651752	
Altri paesi	+44.1799.534000	

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

Documentazione 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).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2018 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®