

illumina®

NovaSeq 6000

Guida del sistema di sequenziamento

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA

Documento n. 1000000019358 v18

Aprile 2025

Solo per uso di ricerca. Non usare in procedure diagnostiche.

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende a essa affiliate (“Illumina”) e sono destinati esclusivamente a 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 garantire un uso sicuro e corretto dei prodotti ivi descritti, le istruzioni riportate nel presente documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo l’intero contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

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

ILLUMINA DECLINA QUALSIASI RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL’USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I IVI DESCRITTO/I (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSI).

© 2025 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Sommario

Descrizione generale	1
Introduzione	1
Descrizione generale del sequenziamento	2
Flusso di lavoro di sequenziamento	4
Componenti dello strumento	7
Kit e accessori	14
Descrizione del kit	14
Componenti del kit di reagenti	16
Componenti di NovaSeq Xp Kit	20
Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp	21
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	22
Descrizione dei simboli	26
Configurazione del sistema	28
Avvio dello strumento	28
Impostazioni della configurazione	30
Flusso di lavoro Standard: preparazione dei materiali di consumo	38
Migliori pratiche	38
Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster	38
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati	40
Preparazione della cella a flusso	41
Raggruppamento e denaturazione delle librerie per il sequenziamento	41
Flusso di lavoro NovaSeq Xp: preparazione dei materiali di consumo	43
Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp	43
Metodi	44
Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster	45
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati	46
Preparazione della cella a flusso e della stazione di attacco	47
Scongelamento dei reagenti ExAmp	47
Controllare la pressione del vuoto della cella a flusso	48
Raggruppamento in pool, denaturazione e caricamento delle librerie per il sequenziamento	49

Sequenziamento	55
Impostazione di una corsa di sequenziamento	55
Monitoraggio del progresso della corsa	64
Avvio di corse scaglionate	65
Eliminazione di una corsa	66
Posizione rimovibile n. 30	66
Lavaggio post-corsa automatico	67
Manutenzione	68
Manutenzione preventiva	68
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	68
Aggiornamenti del software	73
Risoluzione dei problemi	75
Risorse per la risoluzione dei problemi	75
File di risoluzione dei problemi	75
Errori della verifica pre-corsa	75
Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)	77
Mancata riuscita di una corsa prima della generazione di cluster	77
Terminazione di una corsa	79
Spegnimento dello strumento	79
Real-Time Analysis	80
Descrizione generale di Real-Time Analysis	80
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	83
Cartelle e file di output	87
Struttura della cartella di output del sequenziamento	87
File di output per il sequenziamento	88
Sicurezza Windows	89
Requisiti della password	89
Firewall Windows	89
Enhanced Mitigation Experience Toolkit	89
Software Restriction Policies	90
Considerazione sulla modalità di ricerca di NovaSeq 6000Dx	92
Introduzione	92
Opzioni di pianificazione delle corse NovaSeq 6000Dx	92
Compatibilità dei materiali di consumo NovaSeq 6000Dx	93

Indicatori di modalità dello strumento NovaSeq 6000Dx	93
Risorse e Bibliografia	94
Cronologia revisioni	94

Descrizione generale

Introduzione

Illumina® NovaSeq™ 6000 System offre processività scalabile e tecnologia di sequenziamento flessibile in una piattaforma su scala di produzione con l'efficienza e l'efficacia in termini di costi di un sistema da banco.

Caratteristiche

- **Sequenziamento scalabile:** NovaSeq 6000 è in grado di scalare il sequenziamento fino a livello di produzione con qualità dei dati elevata per un'ampia gamma di applicazioni.
- **Output regolabili:** NovaSeq 6000 è un sistema a doppia cella a flusso con un'ampia gamma di output. È possibile sequenziare una cella a flusso o due celle a flusso simultaneamente con diverse lunghezze di lettura, e utilizzare insieme e abbinare quattro tipi di cella a flusso e diverse lunghezze di lettura.
- **Cella a flusso preconfigurata:** una cella a flusso preconfigurata genera cluster poco spazati tra di loro. La riduzione della distanza tra i nanopozzetti aumenta la densità dei cluster e la produzione di dati.
- **Miscelazione di ExAmp sullo strumento:** NovaSeq 6000 miscela i reagenti ExAmp con la libreria, amplifica la libreria ed esegue la generazione di cluster per un flusso di lavoro ottimizzato per il sequenziamento.
- **Caricamento di singole corsie:** la stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp consente di precaricare le librerie in singole corsie della cella a flusso e di ridurre il volume di caricamento delle librerie.
- **Scansione lineare a elevata produttività:** NovaSeq 6000 utilizza una videocamera dotata della tecnologia di scansione bidirezionale per sottoporre velocemente ad imaging la cella a flusso in due canali colore simultaneamente.
- **Real-Time Analysis (RTA):** NovaSeq 6000 utilizza un'implementazione di RTA denominata RTA3. Questo software integrato analizza le immagini e identifica le basi.
- **Integrazione di BaseSpace Sequence Hub:** il flusso di lavoro di sequenziamento è integrato con BaseSpace Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico Illumina per l'analisi dei dati, l'archiviazione e la collaborazione. Durante l'avanzamento della corsa, i file di output vengono trasferiti a questo ambiente di calcolo in tempo reale.
- **Pronto per BaseSpace Clarity LIMS:** migliora l'efficienza operativa grazie al monitoraggio end-to-end di campioni e reagenti, a flussi di lavoro automatizzati e a operazioni integrate nello strumento.

- **Illumina Connected Analytics:** NovaSeq Control Software v1.8 e versioni successive è integrato con Illumina Connected Analytics, l'ambiente cloud di dati genomici di Illumina per l'analisi, l'archiviazione e la collaborazione. Se ICA è abilitato nella propria regione, è possibile selezionare il dominio ICA durante l'impostazione della corsa. Durante l'avanzamento della corsa, i file di output vengono trasferiti a questo ambiente di calcolo in tempo reale.

Risorse aggiuntive

Le [Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 pagine di supporto](#) sul sito web Illumina forniscono risorse aggiuntive. Tra queste, software, formazione, prodotti compatibili e la seguente documentazione. Controllare sempre le pagine di supporto per verificare le ultime versioni disponibili.

Risorsa	Descrizione
<i>Guida alla sicurezza e conformità della serie NovaSeq (documento n. 1000000019357)</i>	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
<i>Guida alla conformità del modulo del lettore RFID (documento n. 1000000002699)</i>	Fornisce informazioni sul lettore RFID contenuto nello strumento, incluse le certificazioni di conformità e le considerazioni relative alla sicurezza.
<i>Guida ai primer personalizzati per NovaSeq Series (documento n. 1000000022266)</i>	Fornisce informazioni sulla sostituzione dei primer di sequenziamento Illumina con primer di sequenziamento personalizzati.
<i>Guida del sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 (documento n. 1000000019358)</i>	Fornisce una panoramica sui componenti dello strumento, sulle istruzioni per la preparazione dei materiali di consumo per il sequenziamento, sulle istruzioni per il funzionamento dello strumento e sulle procedure di manutenzione e di risoluzione dei problemi.

Descrizione generale del sequenziamento

Generazione di cluster

Durante la generazione di cluster, singole molecole di DNA si legano alla superficie della cella a flusso e vengono sottoposte contemporaneamente ad amplificazione per formare i cluster. Per il flusso di lavoro Standard, Master Mix ExAmp viene miscelata con le librerie sullo strumento prima della generazione dei

cluster. Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, i reagenti ExAmp e le librerie vengono miscelati ed erogati alla cella a flusso al di fuori dello strumento. I volumi variano in base al tipo di cella a flusso e al flusso di lavoro.

Sequenziamento

I cluster sono sottoposti a imaging utilizzando la scansione bidirezionale e la chimica di sequenziamento a due canali. La videocamera utilizza sensori che rilevano la luce rossa e verde per sottoporre a imaging ciascuna striscia e generare simultaneamente le immagini verde e rossa dell'intera striscia. Dopo l'imaging, viene eseguita l'identificazione delle basi per i cluster in ciascuna tile in base al rapporto tra segnali rossi e verdi per ciascun cluster, che a sua volta è basato sulla posizione determinata dalla cella a flusso preconfigurata (patterned). Questo processo viene ripetuto per ogni ciclo di sequenziamento.

Analisi

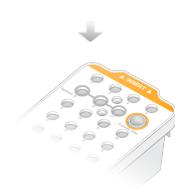
Man mano che la corsa procede, NovaSeq Control Software (NVCS) trasferisce automaticamente i file di identificazione delle basi (*.cbcl) nella cartella di output specificata per l'analisi dei dati.

Sono disponibili diversi metodi di analisi in base all'applicazione in uso. Per maggiori informazioni, visitare le [pagine di supporto BaseSpace Sequence Hub sul sito web Illumina](#).

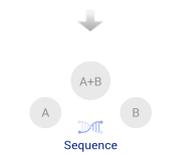
Flusso di lavoro di sequenziamento



Scongelare le cartucce di reagente SBS e con cluster.



Raggruppare e denaturare le librerie. Per il flusso di lavoro Standard, aggiungere le librerie alla provetta delle librerie. Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, caricare la miscela ExAmp/libreria sulla cella a flusso. Per entrambi i flussi di lavoro, caricare la provetta delle librerie nella cartuccia con cluster scongelata. Per maggiori informazioni, consultare [Generatore del protocollo di denaturazione e diluizione](#).



Dall'interfaccia software, selezionare **Sequence** (Sequenziamento) e specificare una corsa con singola cella a flusso o doppia cella a flusso.



Scaricare i materiali di consumo dalla corsa precedente e caricare i nuovi materiali di consumo per l'attuale corsa.



Specificare i parametri della corsa dalla schermata Run Setup (Impostazione corsa). Se è stato configurato BaseSpace Sequence Hub, accedervi mediante la schermata Log In (Accedi). Dopo le verifiche pre-corsa, la corsa viene avviata automaticamente.



Monitorare la corsa dalla schermata Sequence (Sequenziamento), da BaseSpace Sequence Hub se è stato abilitato il monitoraggio della corsa, o dal computer sulla rete utilizzando Sequencing Analysis Viewer. I dati sono trasferiti alla cartella di output specificata.



Al termine del sequenziamento, viene avviato automaticamente un lavaggio dello strumento.

Metodi di caricamento delle librerie

Le librerie vengono caricate su una cella a flusso NovaSeq 6000 utilizzando uno dei due metodi seguenti, in base al flusso di lavoro selezionato. L'impostazione di una corsa di sequenziamento è diversa in base al flusso di lavoro. Assicurarsi di attenersi sempre alle istruzioni per il metodo scelto. Consultare [Flusso di lavoro Standard: preparazione dei materiali di consumo alla pagina 38](#) e [Flusso di lavoro NovaSeq Xp: preparazione dei materiali di consumo alla pagina 43](#).

Tabella 1 Metodi di caricamento delle librerie

Flusso di lavoro	Metodo di caricamento dei pool delle librerie e di miscelazione di ExAmp	Assegnazione di singole corsie e analisi dei dati	Volume di caricamento* Modalità SP/S1-S2-S4 (μ l)
Standard	Un singolo pool di librerie viene caricato nella provetta della libreria, miscelato sullo strumento nella provetta delle librerie con i reagenti ExAmp e automaticamente erogato nella cella a flusso per la generazione di cluster e per il sequenziamento. Una fase di aggiunta prima del sequenziamento utilizza i reagenti contenuti nella cartuccia con cluster e la provetta della libreria per creare una miscela di condizionamento che contribuisce ad aumentare l'efficienza della generazione di cluster.	Un singolo pool di librerie viene distribuito e sequenziato su tutte le corsie della cella a flusso. Le letture ottenute da tutte le corsie vengono analizzate in aggregato.	150-225-465 μ l (intera cella a flusso)

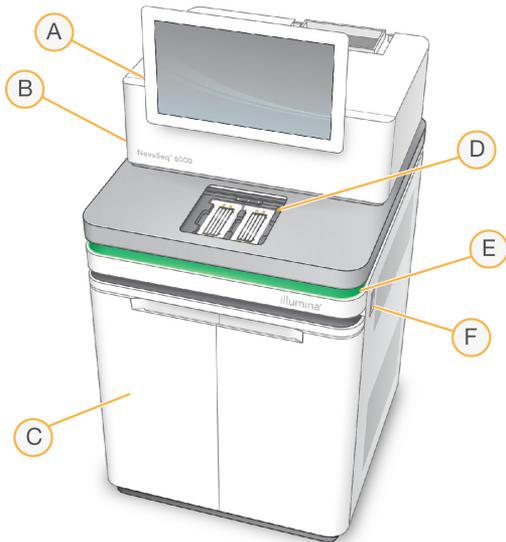
Flusso di lavoro	Metodo di caricamento dei pool delle librerie e di miscelazione di ExAmp	Assegnazione di singole corsie e analisi dei dati	Volume di caricamento* Modalità SP/S1-S2-S4 (µl)
NovaSeq Xp	Una o più librerie (il numero corrisponde al numero di corsie della cella a flusso) vengono miscelate manualmente con i reagenti ExAmp esternamente allo strumento e caricate direttamente sulle singole corsie della cella a flusso utilizzando la stazione di attacco NovaSeq Xp. La cella a flusso viene quindi caricata sullo strumento per la generazione di cluster e per il sequenziamento. Una fase di aggiunta prima del sequenziamento utilizza la provetta delle librerie vuota per miscelare i reagenti contenuti nella cartuccia con cluster per creare una miscela di condizionamento che contribuisce ad aumentare l'efficienza della generazione di cluster.	Ogni libreria viene caricata in una corsia separata della cella a flusso, quindi sequenziata. Possono essere utilizzati diversi pool, aliquote dello stesso pool o combinazioni arbitrarie. Le letture ottenute dalle diverse corsie vengono analizzate, di conseguenza, singolarmente o in aggregato.	27-33-45 µl (singola corsia)

*Il flusso di lavoro NovaSeq Xp richiede una concentrazione di librerie denaturate del 25-50 % inferiore rispetto al flusso di lavoro Standard.

Componenti dello strumento

Il sistema Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 comprende un monitor touch screen, una barra di stato, un interruttore di alimentazione con accanto porte USB e tre scomparti.

Figura 1 Componenti esterni



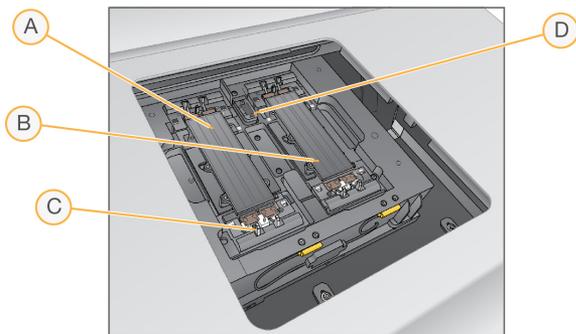
- A. **Monitor touch screen:** consente di visualizzare l'interfaccia di NVCS per la configurazione del sistema e l'impostazione e il monitoraggio della corsa.
- B. **Scomparto ottica:** contiene i componenti ottici che permettono l'imaging a doppia superficie delle celle a flusso.
- C. **Scomparto liquidi:** contiene le cartucce di reagenti e tamponi e flaconi per i reagenti usati.
- D. **Scomparto della cella a flusso:** contiene le celle a flusso.
- E. **Barra di stato:** indica lo stato della cella a flusso come pronta per il sequenziamento (verde), in elaborazione (blu) o da controllare (arancione).
- F. **Porte di alimentazione e USB:** forniscono l'accesso al pulsante di alimentazione e alle connessioni USB per i componenti periferici.

Scomparto della cella a flusso

Lo scomparto della cella a flusso contiene il piano portacelle, che sulla sinistra contiene la cella a flusso A e sulla destra la cella a flusso B. Ciascun lato dispone di quattro morsetti che automaticamente fermano e assicurano in posizione la cella a flusso.

Il target dell'allineamento ottico montato sul piano portacelle esegue la diagnosi e corregge eventuali problemi ottici. Quando suggerito da NVCS, il target dell'allineamento ottico riallinea il sistema e regola la messa a fuoco della videocamera per migliorare i risultati del sequenziamento.

Figura 2 Piano portacelle



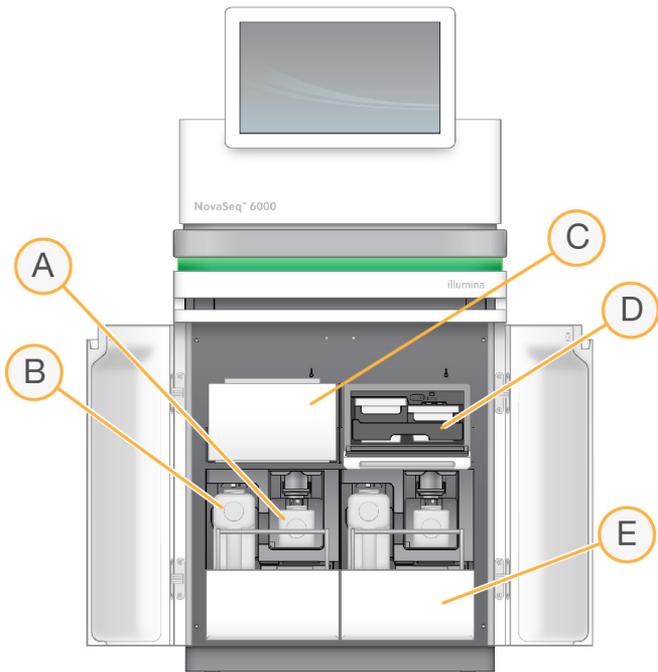
- A. Vano portacella, lato A
- B. Vano portacella, lato B
- C. Coperchio a scatto (uno di quattro per lato)
- D. Target dell'allineamento ottico

Il software controlla l'apertura e la chiusura dello sportello dello scomparto della cella a flusso. Lo sportello si apre automaticamente per caricare una cella a flusso per una corsa o un lavaggio di manutenzione. Dopo il caricamento, il software chiude lo sportello dello scomparto, sposta la cella a flusso in posizione, innesca i morsetti e inserisce la tenuta del vuoto. I sensori verificano la presenza e la compatibilità della cella a flusso.

Scomparto dei liquidi

L'impostazione di una corsa richiede l'accesso allo scomparto dei liquidi per caricare i reagenti e i tamponi e lo svuotamento dei flaconi di reagenti usati. Due sportelli racchiudono lo scomparto dei liquidi, che è diviso in due lati corrispondenti per la cella a flusso A e la cella a flusso B.

Figura 3 Componenti dello scomparto dei liquidi



- A. **Flacone piccolo dei reagenti usati:** contiene i reagenti usati provenienti dalla cartuccia con cluster, con un supporto per tappo per tappare facilmente il flacone per la conservazione.
- B. **Flacone grande dei reagenti usati:** contiene i reagenti usati provenienti dalle cartucce SBS e di tamponi, con un supporto per tappo per tappare facilmente il flacone per la conservazione.
- C. **Vano refrigerato per i reagenti:** raffredda le cartucce SBS e con cluster.
- D. **Cassetto del vano refrigerato per i reagenti:** posizioni codificate a colori che contengono la cartuccia SBS sulla sinistra (etichetta grigia) e la cartuccia con cluster sulla destra (etichetta arancione).
- E. **Cassetto dei tamponi:** contiene sulla sinistra il flacone grande dei reagenti usati e sulla destra la cartuccia di tamponi.

Reagenti usati

Il sistema di fluidica è progettato per portare i reagenti della cartuccia con cluster, potenzialmente pericolosi, al flacone piccolo dei reagenti usati. I reagenti dalle cartucce SBS e dai tamponi sono portati al flacone grande dei reagenti usati. Tuttavia, potrebbe verificarsi la contaminazione incrociata tra i

flussi di reagenti. Considerare entrambi i flaconi di reagenti usati come contenenti sostanze chimiche potenzialmente pericolose. La scheda dei dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) fornisce informazioni chimiche dettagliate.

- i** | Se lo strumento è stato configurato per raccogliere esternamente i reagenti usati, il flusso verso il flacone grande dei reagenti usati viene indirizzato esternamente. I reagenti della cartuccia con cluster vanno sempre verso il flacone piccolo dei reagenti usati.

Software del sistema

Il gruppo di software dello strumento comprende applicazioni integrate che eseguono le corse di sequenziamento, l'analisi integrata sullo strumento e le relative funzioni.

- **NovaSeq Control Software (NVCS):** guida l'utente per tutta la procedura di impostazione di una corsa di sequenziamento, controlla le operazioni dello strumento e consente di visualizzare le statistiche man mano che la corsa avanza. Per dimostrare le corrette operazioni di scaricamento e caricamento dei materiali di consumo, durante l'impostazione della corsa, NVCS consente di visualizzare video didattici.
- **Real-Time Analysis (RTA):** esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante una corsa. NovaSeq 6000 utilizza RTA3, che incorpora miglioramenti dell'architettura, della sicurezza e di altre funzioni per ottimizzare le prestazioni. Per ulteriori informazioni, consultare [Real-Time Analysis alla pagina 80](#).
- **Universal Copy Service (UCS):** copia i file di output da RTA3 e NVCS verso la cartella di output per tutta la corsa. Se pertinente, il servizio trasferisce i dati anche a BaseSpace Sequence Hub. Se Universal Copy Service viene interrotto durante una corsa, il servizio compie più tentativi di riconnessione e riprende automaticamente il trasferimento dei dati.

Icone di stato

Lo stato della corsa è indicato da un'icona di stato nell'interfaccia NVCS. Un numero sull'icona indica il numero di condizioni per uno stato.

Quando uno stato della corsa viene modificato, l'icona lampeggia per avvisare l'utente. Selezionare l'icona per visualizzare una descrizione della condizione. Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per cancellare il messaggio, quindi **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

Tabella 2 Icone di stato NVCS

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Le condizioni del sistema sono normali.

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

Gestione processo

La schermata Process Management (Gestione processo) consente di accedere al motore di calcolo (Compute Engine, CE) e all'unità C. Utilizzare la schermata per monitorare l'avanzamento della corsa, eliminare le corse e altrimenti gestire lo spazio su disco. Non eliminare mai i file e le cartelle direttamente dall'unità C.

Process Management (Gestione processo) consente di visualizzare lo spazio su disco disponibile, lo spazio usato sul motore CE e l'unità C e lo stato delle corse che utilizzano lo spazio su disco. Le colonne Date (Data) e Name (Nome) della corsa identificano ciascuna corsa. Le colonne Run Status (Stato corsa), BaseSpace e Network (Rete) mostrano lo stato di ciascun processo per una corsa.

Tabella 3 Icone di stato della schermata Process Management (Gestione processo)

Processo	Icona	Descrizione
Stato della corsa	 Running (In esecuzione)	La corsa è in elaborazione.
	 Complete (Completato)	La corsa ha completato il sequenziamento.

Processo	Icona	Descrizione
Rete	 Copying (In fase di copia)	I file sono stati copiati nella cartella di output sulla rete.
	 Complete (Completato)	Tutti i file sono stati copiati nella cartella di output sulla rete.
	N/D	Non è applicabile in quanto la corsa non è configurata per il caricamento in una cartella di output sulla rete o non è noto lo stato di caricamento. Per la risoluzione dei problemi, consultare Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo) alla pagina 77.
Sul cloud	 Uploading (In caricamento)	I file vengono caricati nell'opzione di hosting cloud selezionata.
	 Complete (Completato)	Tutti i file vengono caricati nell'opzione di hosting cloud selezionata.
	N/D	Non è applicabile in quanto la corsa non è configurata per il caricamento sul cloud o non è noto lo stato di caricamento. Per la risoluzione dei problemi, consultare Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo) alla pagina 77.

Requisiti minimi di spazio di archiviazione

Affinché possa iniziare una corsa con la cella a flusso, devono essere soddisfatti i requisiti di spazio minimo per il motore CE e l'unità C.

i | Per corse con singola cella a flusso, i requisiti di spazio minimo sono la metà di quelli indicati nella tabella seguente.

Tabella 4 Spazio minimo richiesto per il motore CE e l'unità C per corse con doppia cella a flusso

Cella a flusso	Spazio CE per ciclo (Gb)	Spazio C:\ per coppie di celle a flusso (Gb)
SP	0,5	5
S1	1,35	20
S2	2,7	20
S4	4,3	40

Per calcolare lo spazio totale richiesto per per la corsa sul motore CE, moltiplicare lo spazio minimo CE per ciclo per la somma dei valori di lunghezza di Read 1 (Lettura 1), Read 2 (Lettura 2), Index 1 (Indice 1) e Index 2 (Indice 2) (vedere [Immissione dei parametri della corsa alla pagina 60](#)). Ad esempio, per corse paired-end da 150 cicli, la corsa con doppia cella a flusso S4 con entrambi gli indici lunghi 8 basi, lo spazio richiesto sul motore CE è 1,37 Tb.

Per maggiori informazioni su come liberare spazio su disco, consultare [Eliminazione di una corsa alla pagina 66](#).

Kit e accessori

Descrizione del kit

L'esecuzione di una corsa su NovaSeq 6000 richiede un NovaSeq 6000 Reagent Kit. Anche per il flusso di lavoro NovaSeq Xp è necessario un NovaSeq Xp Kit. Questi kit sono disponibili nelle seguenti configurazioni.

Per un elenco completo di oggetti necessari per una corsa, consultare [Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente alla pagina 22](#).

Tabella 5 Configurazioni dei kit

Nome del kit	Reagenti v1.0 Illumina N. di catalogo	Reagenti v1.5 Illumina N. catalogo
NovaSeq 6000 Kit Reagenti S4 (300 cicli) – Confezione da 40	20039236	N/D
NovaSeq 6000 Kit Reagenti S4 (300 cicli) – Confezione da 20	20039234	N/D
NovaSeq 6000 Kit Reagenti S4 (300 cicli) – Confezione da 10	20039233	N/D
NovaSeq 6000 Kit Reagenti S4 (300 cicli)	20012866	20028312
NovaSeq 6000 Kit Reagenti S4 (200 cicli)	20027466	20028313
NovaSeq 6000 Kit Reagenti S4 (35 cicli)	N/D	20044417
NovaSeq 6000 Kit reagenti S2 (300 cicli)	20012860	20028314
NovaSeq 6000 Kit reagenti S2 (200 cicli)	20012861	20028315
NovaSeq 6000 Kit reagenti S2 (100 cicli)	20012862	20028316
NovaSeq 6000 Kit reagenti S1 (300 cicli)	20012863	20028317
NovaSeq 6000 Kit reagenti S1 (200 cicli)	20012864	20028318
NovaSeq 6000 Kit reagenti S1 (100 cicli)	20012865	20028319
NovaSeq 6000 Kit reagenti SP (500 cicli)	20029137	20028402
NovaSeq 6000 Kit reagenti SP (300 cicli)	20027465	20028400
NovaSeq 6000 Kit reagenti SP (200 cicli)	20040326	20040719
NovaSeq 6000 Kit reagenti SP (100 cicli)	20027464	20028401

Etichettatura per la compatibilità

Per identificare i componenti del kit compatibili, le celle a flusso e le cartucce sono etichettate con simboli che indicano la modalità del kit: **SP**, **S1**, **S2** o **S4**. I collettori NovaSeq Xp supportano diverse modalità e sono etichettati come a due corsie (per le celle a flusso SP, S1 e S2) o a quattro corsie (per le celle a flusso S4).

I componenti che dispongono di diverse modalità non possono essere utilizzati nella stessa corsa. Ad esempio, non abbinare cartucce S1 con una cella a flusso S2.

Non è consentito mischiare le cartucce SBS/CPE v1.0 e le cartucce v1.5 in quanto viene visualizzato un messaggio di errore.

Modalità del kit	Marchio sull'etichetta	Descrizione
Componenti del kit SP		La cella a flusso SP genera da 650 a 800 milioni di letture unidirezionali che passano il filtro, con output fino a 250 Gb a 2 x 150 bp e output fino a 400 Gb a 2 x 250 bp.
Componenti del kit S1		La cella a flusso S1 genera fino a 1,6 miliardi di letture unidirezionali che passano il filtro con un output fino a 500 Gb a 2 x 150 bp. Il kit S1 fornisce il sequenziamento rapido di un numero inferiore di campioni per la maggior parte delle applicazioni ad elevata produttività.
Componenti del kit S2		La cella a flusso S2 genera fino a 4,1 miliardi di letture unidirezionali che passano il filtro con un output fino a 1.250 Gb a 2 x 150 bp. Si tratta di una versione a due corsie della cella a flusso. La cella a flusso S2 fornisce il sequenziamento rapido per la maggior parte delle applicazioni ad elevata produttività, con un numero maggiore di letture rispetto alla cella a flusso S1 per un maggiore output del sequenziamento.
Componenti del kit S4		La cella a flusso S4 genera fino a 10 miliardi di letture unidirezionali che passano il filtro con un output fino a 3.000 Gb a 2 x 150 bp. Si tratta di una versione a quattro corsie della cella a flusso, progettata per il massimo output. Permette un sequenziamento efficace in termine di costi dell'intero genoma in una vasta gamma di specie e profondità di copertura.

Nella [pagina dei prodotti Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000](#) sul sito web di Illumina sono disponibili le specifiche dettagliate di ogni modalità.

Componenti del kit di reagenti

Ogni NovaSeq 6000 Reagent Kit contiene i seguenti componenti. Ciascun componente utilizza l'identificazione a radio frequenza (RFID) per garantire il monitoraggio accurato e la compatibilità dei materiali di consumo.

Non appena si riceve il kit, per assicurare un funzionamento corretto provvedere subito a conservare i componenti del kit alla temperatura indicata.

Tabella 6 Componenti del kit

Quantità	Componente del kit	Temperatura di conservazione
1	Provetta della libreria	Tra 15 °C e 30 °C
1	Cella a flusso	Tra 2 °C e 8 °C
1	Cartuccia di tamponi	Tra 15 °C e 30 °C
1	Cartuccia con cluster	Tra -25 °C e -15 °C
1	Cartuccia SBS	Tra -25 °C e -15 °C

⚠ | Evitare di fare cadere le cartucce. In caso di caduta possono verificarsi danni. Perdite di reagenti dalla cartuccia possono provocare irritazione alla cute. Prima dell'utilizzo, ispezionare la cartuccia per eventuali crepe.

Provetta delle librerie

La provetta delle librerie NovaSeq 6000 è una provetta da 16 mm da mettere nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster. La posizione n. 8 è etichettata **Library Tube** (Provetta delle librerie) e cerchiata in arancione per essere facilmente identificata. La provetta ha un tappo filettato che permette la conservazione delle librerie quando necessario. Assicurarsi che il tappo sia stato rimosso prima del caricamento nella cartuccia con cluster.

Figura 4 Provetta delle librerie



La provetta delle librerie viene utilizzata in uno dei due modi, in base al flusso di lavoro:

- **Standard:** le librerie raggruppate in pool e denaturate sono aggiunte alla provetta delle librerie che viene a sua volta caricata senza tappo nella cartuccia con cluster. Dopo l'avvio della corsa, lo strumento miscela le librerie con i reagenti ExAmp nella provetta della libreria, quindi trasferite automaticamente nella cellaa flusso.

- **NovaSeq Xp:** la provetta delle librerie vuota e senza tappo viene caricata nella cartuccia con cluster. Durante la corsa, i reagenti vengono miscelati nella provetta delle librerie prima della distribuzione alla cella a flusso.

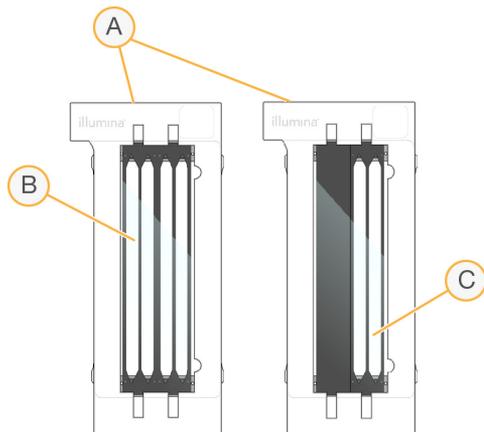
Cella a flusso

La cella a flusso NovaSeq 6000 è una cella a flusso preconfigurata inserita in una cartuccia. La cella a flusso è un substrato in vetro che contiene miliardi di nanopozzetti ordinati per incrementare il numero di letture di output e di dati di sequenziamento. I cluster sono generati nei nanopozzetti nei quali viene eseguito il sequenziamento.

Ciascuna cella a flusso dispone di più corsie per il sequenziamento di librerie raggruppate in pool. Le celle a flusso SP, S1 e S2 hanno due corsie ciascuna e la cella a flusso S4 ne ha quattro. Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in strisce multiple, quindi il software divide l'immagine di ciascuna striscia in porzioni più piccole chiamate tile. Per maggiori informazioni, consultare [Tile della cella a flusso alla pagina 81](#).

- i** | Quando si utilizza una cella a flusso S1, assicurarsi di utilizzare NVCS v1.3.1 o versioni successive. Quando si utilizza una cella a flusso SP, assicurarsi di utilizzare NVCS v1.6 o versioni successive.

Figura 5 Celle a flusso

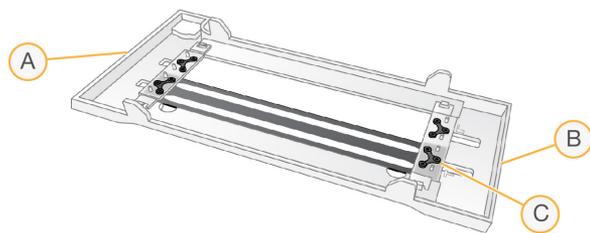


- A. Cartuccia della cella a flusso
 B. Cella a flusso a quattro corsie (S4)
 C. Cella a flusso a due corsie (SP, S1 e S2)

La parte inferiore di ciascuna cella a flusso ha quattro guarnizioni. Le librerie e i reagenti entrano nelle corsie della cella a flusso attraverso le guarnizioni sul lato di entrata della cella a flusso. I reagenti usati vengono drenati dalle corsie attraverso le guarnizioni sul lato di uscita.

- i** | Evitare di toccare le guarnizioni quando si manipola la cella a flusso.

Figura 6 Cella a flusso capovolta



- A. Lato di uscita
- B. Lato di entrata
- C. Guarnizione (una di quattro)

Cartucce di tamponi con cluster e SBS

Le cartucce di tamponi, con cluster e SBS NovaSeq 6000 dispongono di serbatoi sigillati pre-riempiti con reagenti, tamponi e soluzione di lavaggio. I kit di reagenti contengono una cartuccia di ciascun tipo. Le cartucce vengono caricate direttamente sullo strumento, sono codificate a colori ed etichettate per ridurre gli errori di caricamento. Le guide presenti nel cassetto del vano refrigerato per i reagenti e nel cassetto dei tamponi assicurano il corretto orientamento.

L'etichetta per una cartuccia include le modalità supportate, come S1/S2 o SP/S1/S2. Le cartucce possono essere utilizzate solo per le modalità elencate nell'etichetta.

Tabella 7 Cartucce di reagente

Cartuccia	Descrizione
<p>Cartuccia di tamponi NovaSeq 6000</p> 	<p>Pre-riempita con tamponi di sequenziamento e pesa fino a 6,8 kg. Una maniglia in plastica facilita il trasporto, il caricamento e lo scaricamento. La dentellatura sulla piastra superiore permette di mettere le cartucce le une sulle altre.</p>
<p>Cartuccia con cluster NovaSeq 6000</p> 	<p>Pre-riempita con reagenti PE, di indicizzazione, con cluster e soluzione di lavaggio. Include una posizione designata per la provetta delle librerie. L'etichettatura arancione consente di distinguere la cartuccia con cluster dalla cartuccia SBS.</p>

Cartuccia	Descrizione
<p>Cartuccia SBS NovaSeq 6000</p> 	<p>Pre-riempita con i reagenti per il sequenziamento a volumi specifici per il numero di cicli supportati dal kit (500, 300, 200, 100 o 35). Ciascuna delle tre posizioni di reagente presenta una posizione riservata adiacente per il lavaggio post-corsa automatico. L'etichettatura grigia distingue la cartuccia SBS dalla cartuccia con cluster.</p>

Serbatoi delle cartucce con cluster

Serbatoi rimovibili

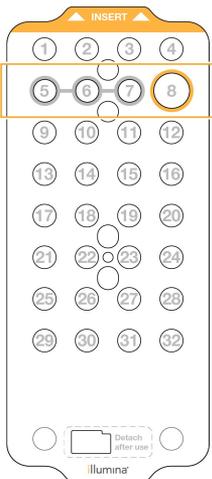
Un reagente di denaturazione nella posizione n. 30 contiene formammide, un'ammide organica e una tossina riprodottrice. Per semplificare lo smaltimento sicuro di qualsiasi reagente non utilizzato dopo una corsa di sequenziamento, questo serbatoio è rimovibile.

i | Non sovrapporre la cartuccia SBS alla cartuccia con cluster, in quanto si potrebbe disinnestare la posizione n. 30.

Serbatoi riservati

Tre serbatoi sono riservati per i primer personalizzati e una posizione vuota è riservata per la provetta delle librerie. Per tracciare i campioni, la provetta delle librerie viene caricata nella cartuccia con cluster durante l'impostazione della corsa e rimane nella cartuccia fino al termine della corsa.

Figura 7 Serbatoi numerati



Posizione	Riservata per
5, 6 e 7	Primer personalizzati facoltativi
8	Provetta della libreria

Per ulteriori informazioni sui primer personalizzati, consultare la *Guida ai primer personalizzati per NovaSeq Series (documento n. 1000000022266)*.

Componenti di NovaSeq Xp Kit

Ogni NovaSeq Xp Kit è monouso e contiene i componenti seguenti. Non appena si riceve il kit, per assicurare un funzionamento corretto provvedere subito a conservare i componenti del kit alla temperatura indicata.

i | I materiali di consumo DPX1 e DPX2 possono essere etichettati come JPX1 e JPX2. Entrambi sono compatibili con i kit di reagenti v1.0 o v1.5. DPX3 è compatibile anche con i kit di reagenti v1.0 e v1.5.

Tabella 8 Componenti di NovaSeq Xp Kit

Quantità	Componente del kit	Temperatura di conservazione
1	DPX1/JPX1	Tra -25 °C e -15 °C
1	DPX2/JPX2	Tra -25 °C e -15 °C
1	DPX3	Tra -25 °C e -15 °C
1	Collettore NovaSeq Xp	Lasciarlo con il kit o conservarlo a temperatura ambiente.

Reagenti del kit Xp

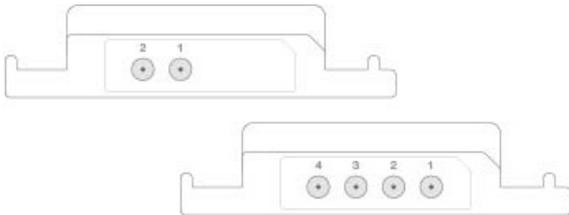
DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3 sono reagenti ExAmp forniti in singole provette per il flusso di lavoro NovaSeq Xp. La combinazione di questi reagenti crea la Master Mix ExAmp che viene miscelata con i pool di librerie prima del caricamento sulla cella a flusso.

Collettore NovaSeq Xp

Il collettore NovaSeq Xp si trova sulla stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp per consentire il caricamento diretto dei pool di librerie nelle singole corsie della cella a flusso. I bracci su entrambi i lati del collettore NovaSeq Xp sono progettati per facilitare il posizionamento sulla stazione di attacco.

I collettori NovaSeq Xp sono forniti nelle configurazioni a due pozzetti e a quattro pozzetti in modo che corrispondano alle celle a flusso a due corsie e quattro corsie. Ciascun pozzetto corrisponde a una corsia della cella a flusso. Poiché la cella a flusso viene caricata nella stazione di accesso della cella a flusso NovaSeq Xp capovolta, i pozzetti sono numerati da destra a sinistra per far sì che corrispondano alla numerazione delle corsie della cella a flusso invertita.

Figura 8 Collettori NovaSeq Xp con pozzetti numerati

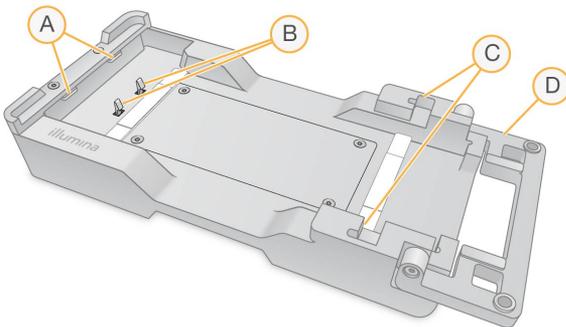


Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp

La stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp è un accessorio riutilizzabile per il caricamento delle librerie direttamente sulla cella a flusso. La cella a flusso viene capovolta e caricata nella stazione di attacco e il collettore NovaSeq Xp viene messo in posizione sulla cella a flusso.

Due sporgenze (sotto la staffa) e due molle guidano l'inserimento della cella a flusso e ne assicurano l'orientamento corretto. Le incisioni mantengono i bracci del collettore NovaSeq Xp nell'orientamento e nella posizione corretti. Un morsetto magnetico ruota di 180° e assicura il collettore NovaSeq Xp sopra la cella a flusso.

Figura 9 Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp



- A. Sporgenze (sotto la staffa) per guidare il caricamento
- B. Molle per allineare la cella a flusso
- C. Incisioni per mantenere i bracci del collettore NovaSeq Xp
- D. Morsetto per bloccare in posizione la cella a flusso e il collettore NovaSeq Xp

Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente

Le apparecchiature e i materiali di consumo forniti dall'utente, indicati di seguito, sono utilizzati per la preparazione dei materiali di consumo, per il sequenziamento e per la manutenzione del sistema.

Materiali di consumo

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
1 N NaOH	Fornitore di laboratorio generico	Diluito a 0,2 N per la denaturazione delle librerie.
Flacone per centrifuga, 500 ml	Fornitore di laboratorio generico	Diluizione di Tween 20 per un lavaggio di manutenzione.
Provetta per centrifuga, 30 ml	Fornitore di laboratorio generico	Diluizione di NaOCl per un lavaggio di manutenzione.
Guanti monouso, privi di polvere	Fornitore di laboratorio generico	Uso generico.
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure Salviettine imbevute di alcol etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 95041-714, o equivalente Fornitore di laboratorio generico	Pulizia dei componenti prima di una corsa e per uso generico.
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026, o equivalente	Asciugatura del piano portacelle e per uso generico.
Provette per microcentrifuga da 1,5 ml	VWR, n. di catalogo 20170-038, o equivalente	Combinazione dei volumi quando si diluisce NaOH e la libreria.
NaOCl di grado reagente, 5%	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 239305	Esecuzione di un lavaggio di manutenzione.
NovaSeq 6000 Reagent Kit	Illumina, consultare Descrizione del kit alla pagina 14	Esecuzione di una corsa di sequenziamento.
Punte per pipette da 20 µl	Fornitore di laboratorio generico	Pipettamento per la diluizione e il caricamento delle librerie.
Punte per pipette da 200 µl	Fornitore di laboratorio generico	Pipettamento per la diluizione e il caricamento delle librerie.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Punte per pipette da 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico	Pipettamento per la diluizione e il caricamento delle librerie.
Reagente o alcol isopropilico per spettrofotometria (99%), flacone da 100 ml	Fornitore di laboratorio generico	Pulizia periodica dei componenti ottici e supporto della cartuccia di pulizia dell'obiettivo.
Tris-HCL, pH 7,0	Fornitore di laboratorio generico	Neutralizzazione delle librerie denaturate.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Esecuzione di un lavaggio di manutenzione.
Acqua da laboratorio	Fornitore di laboratorio generico	Diluizione di NaOH per denaturare le librerie. Diluizione di Tween 20 e di sodio ipoclorito per un lavaggio di manutenzione.
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] Uno dei seguenti kit: <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq Xp 2-Lane Kit • NovaSeq Xp 4-Lane Kit 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N. di catalogo 20021664 • N. di catalogo 20021665 	Caricamento manuale delle librerie in una cella a flusso: <ul style="list-style-type: none"> • Kit a due corsie per celle a flusso SP, S1 e S2 • Kit a quattro corsie per celle a flusso S4
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] Uno dei seguenti kit: <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq Xp 2-Lane Kit v1.5 • NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N. di catalogo 20043130 • N. di catalogo 20043131 	Caricamento manuale delle librerie in una cella a flusso: <ul style="list-style-type: none"> • Kit a due corsie per celle a flusso SP, S1 e S2 • Kit a quattro corsie per celle a flusso S4
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] provette da 0,5 ml e 1,7 ml	Fornitore di laboratorio generico	Necessarie per la miscelazione ExAmp.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] [Facoltativo] Una delle seguenti confezioni di collettori: <ul style="list-style-type: none"> NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack NovaSeq Xp 4-Lane Manifold Pack 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> N. di catalogo 20021666 N. di catalogo 20021667 	Collettori di ricambio NovaSeq Xp per il caricamento manuale delle librerie in una cella a flusso.
[Facoltativo] PhiX Control v3	Illumina, n. di catalogo FC-110-3001	Incremento nel campione di controllo PhiX.

Materiali di consumo nei kit Illumina

Il sequenziamento di una cella a flusso richiede un NovaSeq 6000 Reagent Kit. Ogni kit è composto da diversi materiali di consumo che sono elencati nella tabella seguente. Per una corsa con doppia cella a flusso, usare due kit.

Tabella 9 Materiali di consumo in un NovaSeq 6000 Reagent Kit

Materiali di consumo (uno di ciascuno)	Scopo
Cartuccia di tamponi	Fornisce i tamponi di sequenziamento per la corsa.
Cartuccia con cluster	Fornisce i reagenti PE, di indicizzazione e per la generazione di cluster per la corsa.
Cella a flusso	La generazione di cluster e la reazione di sequenziamento vengono eseguite sulla cella a flusso.
Cartuccia SBS	Fornisce i reagenti per il sequenziamento per la corsa.
Provetta della libreria	Provetta vuota utilizzata per contenere le librerie raggruppate in pool e denaturate fornite dal cliente o per preparare la miscela di condizionamento per incrementare l'efficienza della generazione di cluster per il sequenziamento.

Se si utilizza il flusso di lavoro NovaSeq Xp per caricare le librerie direttamente sulla cella a flusso, aggiungere a ogni kit di reagenti un NovaSeq Xp Kit. Ogni kit NovaSeq Xp contiene i materiali di consumo seguenti.

i | I materiali di consumo DPX1 e DPX2 possono essere etichettati come JPX1 e JPX2. Entrambi sono compatibili con i kit di reagenti v1.0 o v1.5. DPX3 è compatibile anche con i kit di reagenti v1.0 e v1.5.

Tabella 10 Materiali di consumo in un NovaSeq Xp Kit

Materiali di consumo (uno di ciascuno)	Scopo
DPX1/JPX1	Preparazione di Master Mix ExAmp.
DPX2/JPX2	
DPX3	
Collettore NovaSeq Xp	Caricamento delle librerie sulla cella a flusso.

Linee guida per l'acqua da laboratorio

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

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

Apparecchiatura

Apparecchio	Fornitore
Congelatore, tra -25 °C e -15 °C	Fornitore di laboratorio generico
Cilindro graduato, 500 ml, sterile	Fornitore di laboratorio generico
Portaghiaccio	Fornitore di laboratorio generico
Pipette, 20 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette, 200 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette, 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico
Vasca, bagni d'acqua*	Fornitore di laboratorio generico
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp	Illumina, N. di catalogo 20021663

*Utilizzare una vasca in grado di contenere due cartucce di reagenti e il corretto livello di acqua. Ad esempio, (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm)

Descrizione dei simboli

La seguente tabella descrive i simboli presenti sui materiali di consumo o sulla confezione dei materiali di consumo.

Simbolo	Descrizione
	La data di scadenza del materiale di consumo. Per ottenere i risultati migliori, utilizzare i materiali di consumo prima di questa data.
	Indica il fabbricatore (Illumina).
	L'uso previsto è solo a uso di ricerca (RUO).
	Indica il numero di codice per identificare il materiale di consumo. ¹
	Indica il codice del batch per identificare il batch o il lotto in cui è stato fabbricato il materiale di consumo. ¹
	Indica il numero di serie.
	Indica che deve essere protetto dalla luce e dal calore. Conservare lontano dalla luce del sole.
	Indica un pericolo per la salute.
	Indica un avvertenza di pericolo.
	Intervallo della temperatura di conservazione in gradi Celsius. Conservare i materiali di consumo entro l'intervallo indicato. ²

¹REF identifica il singolo componente, mentre LOT identifica il lotto o il batch a cui appartiene il componente.

²La temperatura di conservazione può essere diversa dalla temperatura di spedizione.

Configurazione del sistema

Alla prima accensione, NovaSeq Control Software viene avviato con una serie di schermate che guidano l'utente nella prima configurazione. La prima configurazione comprende l'esecuzione di un controllo del sistema per confermare le prestazioni dello strumento e la configurazione delle impostazioni del sistema.

Se si desidera modificare le impostazioni del sistema dopo l'impostazione iniziale, selezionare il comando System Settings (Impostazioni di sistema) nel software di controllo. Il comando apre le schede Settings (Impostazioni), Network Access (Accesso alla rete) e Customization (Personalizzazione), dove è possibile accedere a tutte le impostazioni del software di controllo e alle impostazioni di rete di Windows.

Account del sistema operativo

Per gli account del sistema operativo e le informazioni sulle password, consultare [Requisiti della password alla pagina 89](#) e [Sicurezza e rete](#).

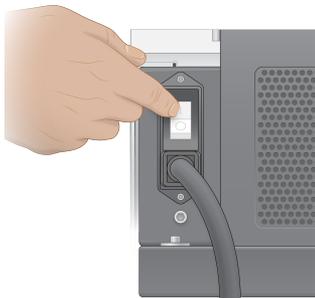
Corse di convalida

Facoltativamente, eseguire una corsa di convalida prima di sequenziare le librerie dell'esperimento per la prima volta. Una corsa di convalida sequenzia PhiX al 100%, che funziona come una libreria di controllo, per confermare il funzionamento del sistema. Per istruzioni, consultare [Sequenziamento alla pagina 55](#).

Avvio dello strumento

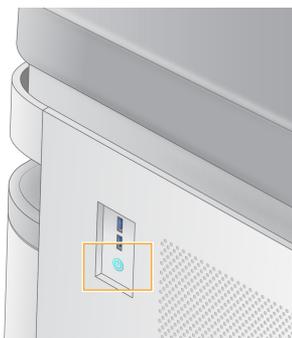
1. Premere il lato di accensione (I) del pulsante di accensione/spegnimento che si trova nella parte posteriore dello strumento.

Figura 10 Posizione dell'interruttore di alimentazione



2. Attendere che l'interruttore di alimentazione che si trova sul lato destro dello strumento emetta una luce blu, quindi premere l'interruttore.

Figura 11 Posizione del pulsante di accensione



Account utente

In NVCS v1.5 e nelle versioni più recenti sono disponibili due tipi di account: amministratore e utente. I permessi per ogni tipo sono mostrati nella tabella seguente.

Permessi	Amministratore	Utente
Impostazione, avvio e monitoraggio delle corse di sequenziamento	X	X
Download e aggiornamento del software	X	
Visualizzare lo stato per la corsa attiva avviata da un altro utente	X	
Terminazione di un processo UCS che non risponde	X	

Applicazione dei file dei dati archiviati in C:/ProgramData. Le applicazioni sono installate in C:/Program Files. NVCS viene lanciato come un'applicazione a schermo intero per entrambi i tipi di account.

Accesso al sistema

1. Quando il sistema operativo è caricato, accedere a Windows utilizzando il nome utente e la password della propria sede.
2. Aprire NVCS.
Il software si avvia e inizializza il sistema. Al termine dell'inizializzazione viene visualizzata la schermata Home (Inizio). NVCS viene avviato come app utente. Se si tenta di utilizzare una funzione che richiede autorizzazioni di amministratore, ad esempio Aggiornamento software, e non si è connessi come amministratore, verrà richiesto di accedere come amministratore.

Per monitorare il progresso di una corsa di sequenziamento, mantenere l'accesso durante l'esecuzione di NVCS e mentre una corsa di sequenziamento è in corso.

Impostazioni della configurazione

NVCS include le impostazioni per le seguenti configurazioni:

- Modalità Run (Corsa) (manuale o basata su file)
- Flusso di lavoro NovaSeq Xp
- Hosting su cloud (BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics)
- Aggiornamenti del software

i | Prima di configurare Workflow Selection (Selezione flusso di lavoro) o Automatic Checks for Software Updates (Controlli automatici per aggiornamenti software), assicurarsi che sia stato configurato Mode Selection (Selezione modalità).

Modalità di impostazione della corsa

- **Manual** (Manuale): modalità predefinita che invia i dati alla cartella di output specificata per la successiva analisi.
- **File-Based** (Basato su file): modalità alternativa che utilizza i file da BaseSpace Clarity LIMS o altri sistemi LIMS per definire i parametri della corsa. Per maggiori informazioni, consultare [Configurazione degli output del sistema LIMS alla pagina 32](#).
- **Server-Based** (Basato su server): modalità che utilizza un URL del server LIMS per definire i parametri della corsa.

Quando viene configurata la modalità di impostazione della corsa, assicurarsi di specificare una posizione esistente per la cartella di output della corsa. Questa cartella è richiesta e un messaggio di posizione non valida indica che la posizione specificata non esiste.

Tutte le modalità di impostazione della corsa includono l'opzione per inviare dati a BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics per l'archiviazione e l'analisi dei dati.

Configurazione della modalità manuale

1. Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni). Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).
2. Selezionare **Manual** (Manuale).
3. **[Facoltativo]** Immettere o cercare una posizione di rete prescelta per la cartella di output. Non specificare una posizione sull'unità C, D o Z, perché si verificherebbe un errore dell'unità non valido.

Questa impostazione è la posizione predefinita. La posizione della cartella di output può essere modificata in base alle singole corse.

4. **[Facoltativo]** Selezionare **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina) per attivare il servizio di monitoraggio proattivo Illumina. In base alla versione di NVCS in uso, il nome di questa impostazione nell'interfaccia del software potrebbe essere diverso dal nome presente in questa guida.
Se questa impostazione è attivata, i dati sulle prestazioni dello strumento vengono inviati a Illumina. 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, consultare la *Nota tecnica sul servizio proattivo Illumina (documento n. 1000000052503)*.
Questo servizio:
 - Non invia i dati del sequenziamento
 - Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet
 - Sia attivato per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, disattivare l'opzione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina).
5. Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione della modalità basata su file

1. Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).
2. Selezionare **File-Based** (Basato su file).
3. Immettere o cercare una posizione di rete prescelta per la cartella di impostazione della corsa, che contiene i file LIMS.
Assicurarsi che, prima dell'impostazione di una corsa, siano aggiunti alla cartella di impostazione della corsa i file LIMS appropriati. Durante l'impostazione della corsa, il software utilizza il RFID della provetta delle librerie o l'ID della cella a flusso per individuare i file per la corsa attuale.
4. **[Facoltativo]** Immettere o cercare una posizione di rete prescelta per la cartella di output.
Non specificare una posizione sull'unità C, D o Z, perché si verificherebbe un errore dell'unità non valido.
La posizione della cartella di output può essere modificata in base alle singole corse.
5. **[Facoltativo]** Selezionare **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina) per attivare il servizio di monitoraggio proattivo Illumina. In base alla versione di NVCS in uso, il nome di questa impostazione nell'interfaccia del software potrebbe essere diverso dal nome presente in questa guida.

Se questa impostazione è attivata, i dati sulle prestazioni dello strumento vengono inviati a Illumina. 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, consultare la *Nota tecnica sul servizio proattivo Illumina (documento n. 1000000052503)*.

Questo servizio:

- Non invia i dati del sequenziamento
- Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet
- Sia attivato per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, disattivare l'opzione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina).

Quando abilitata, questa opzione richiede una connessione Internet esterna.

6. Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione degli output del sistema LIMS

Se il sistema è configurato per la modalità basata su file e si utilizza un software LIMS che non sia BaseSpace Clarity LIMS, configurare il sistema LIMS per generare un file di impostazione della corsa in formato JSON. Per il flusso di lavoro Standard, il nome del file deve corrispondere all'ID della provetta delle librerie. Nel file, il campo dell'ID della cella a flusso può essere lasciato vuoto. Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, il nome del file deve corrispondere all'ID della cella a flusso e l'ID della cella a flusso e l'ID della libreria devono essere specificati nel file. Il nome del file e i valori non distinguono tra maiuscole e minuscole.

Il software LIMS esterno può utilizzare NovaSeq LIMS API per interagire con NovaSeq 6000. Contattare l'Assistenza tecnica Illumina per ulteriori informazioni sugli endpoint API o sulla modalità basata su server LIMS.

Nome del campo	Valore
run_name (nome_corsa)	Un nome della corsa prescelto che può contenere caratteri alfanumerici, trattini e trattini bassi
run_mode (modalità_corsa)	Una delle seguenti modalità: <ul style="list-style-type: none"> • S1 • SP • S2 • S4
workflow_type (tipo_flusso di lavoro)	NoIndex (Nessun indice), SingleIndex (Singolo indice), or DualIndex (Doppio indice)
librarytube_ID (ID_provetta librerie)	Il lettore RFID della provetta delle librerie

Nome del campo	Valore
sample_loading_type	NovaSeqStandard o NovaSeq Xp
Flowcell_ID (ID_cella a flusso)	L'ID della cella a flusso
paired_end (paired_end)	True (Vero) o False (Falso)
read1 (lettura 1)	Un valore fino a 251 (fino a 259 per ulteriori cicli di letture UMI)
read2 (lettura2)	Un valore fino a 251 (fino a 259 per ulteriori cicli di letture UMI)
index_read1 (indice_lettura1)	Qualsiasi valore
index_read2 (indice_lettura2)	Qualsiasi valore
output_folder (cartella_output)	Il percorso della cartella di output con due barre rovesciate per una sequenza di escape
Foglio campioni	Il percorso del foglio campioni o altro file nel formato CSV (*.csv) con due barre rovesciate per una sequenza di escape
use_basespace (utilizzo_basespace)	True (Vero) o False (Falso)
basespace_mode (modalità_basespace)	RunMonitoringOnly (Solomonitoraggiocorsa) o RunMonitoringAndStorage (Monitoraggioearchiviazionecorsa)
use_custom_read1_primer (utilizzo_primer_lettura1_personalizzati)	True (Vero) o False (Falso)
use_custom_read2_primer (utilizzo_primer_lettura2_personalizzati)	True (Vero) o False (Falso)
use_custom_index_read1_primer (utilizzo_primer_indici_lettura1_personalizzati)	True (Vero) o False (Falso)
use_custom_index_read2_primer	True (Vero) o False (Falso)

*La reibridazione non è disponibile in NVCS v1.4.0 o versioni precedenti.

Esempio di file JSON chiamato H6655DMXX.json:

```
{
"run_name": "2x151_PhiX",
"run_mode": "S2",
```

```

"workflow_type": "NoIndex",
"sample_loading_type": "NovaSeqOBEM",
"librarytube_ID": "NV1236655-LIB",
"flowcell_ID": "H6655DMXX",
"paired_end": true,
"read1": 151,
"read2": 151,
"index_read1": 0,
"index_read2": 0,
"output_folder": "\\s\sgnt-prd-isi01\NovaSEQ\SeqRuns",
"attachment": "\\s\sgnt-prd-isi01\NVSQ\SampleSheet.csv",
"use_basespace": false,
"basespace_mode": null,
"use_custom_read1_primer": false,
"use_custom_read2_primer": false,
"use_custom_index_read1_primer": false
}

```

Configurazione di cicli indici predefiniti

Per il flusso di lavoro Standard è possibile configurare il numero di cicli indici predefiniti nel modo seguente.

1. Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).
2. Selezionare la scheda **Workflow Selection** (Selezione del flusso di lavoro).
3. Immettere il numero predefinito di cicli indici nel campo **Index Cycles** (Cicli indici).
4. Selezionare **Save** (Salva).

Flussi di lavoro NovaSeq Standard e NovaSeq Xp

I flussi di lavoro NovaSeq Standard e NovaSeq Xp utilizzano entrambi la chimica ExAmp proprietaria di Illumina.

Flusso di lavoro Standard

Il flusso di lavoro NovaSeq Standard automatizza due fasi fondamentali della chimica con cluster ExAmp proprietaria di Illumina integrate nello strumento.

- Preparazione della Master Mix ExAmp
- Erogazione della Master Mix alla cella a flusso

La preparazione e l'erogazione della Master Mix integrata sullo strumento riduce al minimo l'interazione dell'utente e riduce la variabilità nella miscela preparata.

Come parte dell'impostazione della corsa per il flusso di lavoro Standard, una provetta delle librerie contenente il pool di librerie denaturate e neutralizzate alla concentrazione raccomandata viene inserita nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster. Per maggiori informazioni sulle concentrazioni raccomandate, consultare [Generatore del protocollo di denaturazione e diluizione](#). Dopo l'avvio della corsa, le fasi successive sono integrate sullo strumento e non richiedono l'interazione dell'utente. Le fasi includono il trasferimento dei reagenti ExAmp dalla cartuccia con cluster alla provetta delle librerie, la preparazione della miscela di reagenti e del pool delle librerie e l'erogazione della miscela preparata a tutte le corsie della cella a flusso.

Al termine della generazione di cluster integrata sullo strumento, vengono eseguite una serie di fasi comuni per entrambi i flussi di lavoro. Queste fasi includono l'applicazione di una miscela di condizionamento alla cella a flusso con cluster e ulteriori fasi della chimica per preparare i cluster per il sequenziamento mediante sintesi. La miscela di condizionamento viene preparata durante il processo di generazione di cluster utilizzando i reagenti contenuti nella cartuccia con cluster e la provetta delle librerie viene inserita durante l'impostazione della corsa. La miscela di condizionamento contribuisce ad aumentare l'efficacia della generazione di cluster sullo strumento NovaSeq 6000.

Flusso di lavoro di NovaSeq Xp

Il flusso di lavoro NovaSeq Xp consente di caricare diverse librerie o pool di librerie su singole corsie della cella a flusso NovaSeq utilizzando la stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp e un kit di materiali di consumo specifici della cella a flusso (NovaSeq Xp 2-Lane Kit o NovaSeq Xp 4-Lane Kit). NovaSeq Xp Kit contiene i reagenti ExAmp necessari per la generazione di cluster e il collettore NovaSeq Xp necessario per il caricamento delle corsie.

La miscela ExAmp/libreria viene preparata e caricata in singole corsie della cella a flusso utilizzando la stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp e il collettore NovaSeq Xp. Può essere utilizzato un sistema di gestione dei liquidi automatizzato per la preparazione della miscela ExAmp/libreria e per erogare la miscela al collettore affinché la cella a flusso si riempia da sola. Al termine del caricamento del campione nella cella a flusso, una provetta delle librerie viene caricata nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster, la cella a flusso viene posizionata sullo strumento e viene avviata la corsa di sequenziamento.

Una volta avviata la corsa, vengono eseguite una serie di fasi comuni per entrambi i flussi di lavoro. Queste fasi includono l'applicazione di una miscela di condizionamento alla cella a flusso con cluster e ulteriori fasi della chimica per preparare i cluster per il sequenziamento mediante sintesi. La miscela di condizionamento viene preparata durante il processo di generazione di cluster utilizzando i reagenti contenuti nella cartuccia con cluster e miscelati nella provetta delle librerie vuota inserita durante l'impostazione della corsa. La miscela di condizionamento contribuisce ad aumentare l'efficacia della generazione di cluster sullo strumento NovaSeq 6000.

Configurazione del flusso di lavoro NovaSeq Xp

1. Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).
2. Selezionare la scheda **Workflow Selection** (Selezione del flusso di lavoro).
3. Per abilitare il flusso di lavoro NovaSeq Xp, selezionare **Enable Workflow Selection** (Abilita selezione flusso di lavoro).
4. **[Facoltativo]** Per rendere NovaSeq Xp il flusso di lavoro predefinito, selezionare **NovaSeq Xp**.
5. Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione opzioni cloud

Utilizzare le istruzioni seguenti per configurare le impostazioni predefinite per la connessione al cloud. Durante l'impostazione della corsa, è possibile disattivare le opzioni cloud per la corsa attuale o modificare le impostazioni per il monitoraggio e l'archiviazione della corsa. La connessione a BaseSpace Sequence Hub o a Illumina Connected Analytics richiede una connessione a Internet.

1. Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).
2. Selezionare la casella di controllo **Illumina Cloud Options (Opzioni cloud Illumina)**.
3. Per Configuration (Configurazione), selezionare dalle seguenti opzioni:
 - **Run Monitoring and Storage** (Monitoraggio e archiviazione corsa): invia i dati della corsa all'opzione di hosting cloud selezionata per il monitoraggio remoto e l'analisi dei dati. Questa opzione richiede un foglio campioni con la corsa.
 - **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): invia il file InterOp, il registro e altri file della corsa che non siano CBCL a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio a distanza delle corse.
4. Dal menu a discesa Hosting Location (Posizione Host), selezionare **EU (Frankfurt)** (EU - Francoforte) oppure **USA (N. Virginia)** (U.S.A. - Nord Virginia).
Questa opzione determina dove verranno caricati i dati.
5. Se si dispone di un abbonamento Enterprise per BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics, eseguire le seguenti operazioni.
 - a. Selezionare la casella di controllo **Private Domain** (Dominio privato).
 - b. Immettere il nome di dominio utilizzato per l'autenticazione single sign-on a BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics.
6. Selezionare **Save** (Salva).

Nome del foglio campioni

Quando si esegue NVCS v1.3.1, o versioni precedenti, un foglio campioni utilizzato per una corsa e caricato su BaseSpace Sequence Hub deve essere denominato SampleSheet.csv (con distinzione maiuscole/minuscole). Se il foglio campioni presenta un nome errato ed è stato abilitato Run Monitoring and Storage (Monitoraggio e archiviazione corsa), BaseSpace Sequence Hub segnala che la corsa necessita di attenzione. Per mettere in coda una corsa segnalata per la generazione di file FASTQ, selezionare **More > Fix Sample Sheet and Requeue** (Altro > Modifica foglio campioni e rimetti in coda), quindi immettere il foglio campioni appropriato. Fino al momento in cui non viene fornito il foglio campioni, i dati del sequenziamento non possono essere convertiti in file FASTQ.

Se si esegue NVCS v1.4, o versione successiva, non ci sono limiti ai nomi dei fogli campioni.

Se si utilizza bcl2fastq2 Conversion Software v2.19, o versione successiva, per convertire i dati in file FASTQ localmente, è possibile utilizzare l'opzione di linea di comando `--sample-sheet` per specificare qualsiasi file CSV in qualsiasi posizione. La linea di comando consente l'utilizzo di qualsiasi nome file.

Configurazione degli aggiornamenti del software

La verifica automatica della disponibilità degli aggiornamenti del software è attivata per impostazione predefinita. In Settings (Impostazioni) è possibile disattivare o attivare la verifica automatica degli aggiornamenti.

1. Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
3. Selezionare la casella di controllo **If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available** (Se attivato, lo strumento visualizzerà una notifica quando è disponibile un aggiornamento del software).
4. Selezionare **Save** (Salva).

Flusso di lavoro Standard: preparazione dei materiali di consumo

Migliori pratiche

- Assicurarsi di avere a disposizione le apparecchiature e i materiali di consumo richiesti. Consultare [Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente alla pagina 22](#).
- Controllare sempre l'etichetta quando si preparano i materiali di consumo per assicurare la compatibilità tra i componenti. Non utilizzare insieme o abbinare i componenti di SP, S1, S2 e S4.
- Non mischiare le versioni dei kit di reagenti.
 - Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.0.
 - Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.5.
- Quando si rimuove la cartuccia SBS dalla confezione, ispezionarla visivamente per rilevare eventuali crepe.
- Attenersi alle istruzioni nell'ordine indicato, utilizzando i volumi, le concentrazioni, le temperature e le durate indicate.
- Se le istruzioni non specificano un punto di arresto, passare immediatamente al passaggio successivo.

Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster

1. Se è in corso una corsa di sequenziamento, assicurarsi che entrambi i lati dello strumento siano disponibili al completamento dello scongelamento.
2. Rimuovere le cartucce SBS e con cluster dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.

3. Posizionare ciascuna cartuccia in una griglia di scongelamento.
I rack sono forniti con lo strumento e impediscono il capovolgimento nel bagno d'acqua.

Figura 12 Cartucce in griglie di scongelamento



4. Scongellare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente (da 19 °C a 25 °C).
Sommergere fino a metà.
5. Fare riferimento alla seguente tabella per determinare la durata dello scongelamento.

! L'utilizzo di acqua calda per lo scongelamento dei reagenti può causare una ridotta qualità dei dati o una corsa non riuscita.

Cartuccia	Durata dello scongelamento
Cartuccia SBS SP, S1 e S2	4 ore
Cartuccia con cluster SP, S1 e S2	Fino a 2 ore
Cartuccia SBS S4	4 ore
Cartuccia con cluster S4	Fino a 4 ore

6. Asciugare completamente le basi della cartuccia utilizzando salviette di carta. Asciugare tra i pozzetti per rimuovere tutta l'acqua.
7. Ispezionare i sigilli per l'eventuale presenza di acqua. Se è presente acqua, tamponare con un panno che non lascia residui.
8. Ispezionare la parte inferiore di ogni cartuccia per assicurarsi che i recipienti siano privi di ghiaccio, il che significa che i reagenti sono scongelati.
9. Capovolgere ciascuna cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti.
10. Picchiettare delicatamente la parte inferiore di ciascuna cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria.
11. Se i reagenti non possono essere caricati nello strumento entro 4 ore, conservarli a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 24 ore o riporli nuovamente a una temperatura compresa tra -25° C e -15 °C. Dopo lo scongelamento, non ricongelare più di una volta.

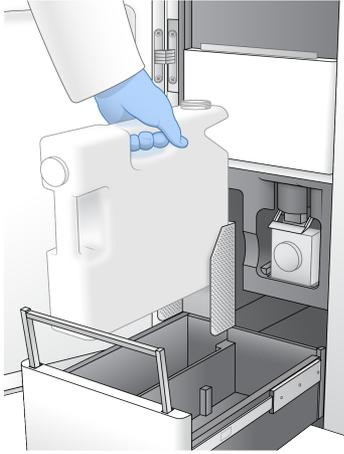
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati

Utilizzare le seguenti istruzioni per svuotare i flaconi di reagenti usati con *ogni* corsa di sequenziamento. Il flacone grande deve rimanere in posizione.

! | **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. Durante la manipolazione di materiali pericolosi nei reagenti deve esservi una ventilazione appropriata. 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 pertinenti a livello regionale, nazionale e locale.** Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS alla pagina web support.illumina.com/sds.html.

1. Rimuovere e svuotare il flacone piccolo dei reagenti usati nel modo seguente.
 - a. Sollevare la leva e rimuovere il flacone piccolo dei reagenti usati dall'alloggiamento. Afferrare il flacone da entrambi i lati.
 - b. Rimuovere il tappo filettato dal supporto dei tappi nella parte anteriore del flacone.
 - c. Sigillare l'apertura del flacone con un tappo per impedire le fuoriuscite.
 - d. Mantenendo i contenuti separati dai contenuti di altri flaconi, smaltire in base agli standard applicabili nella propria regione.
 - e. Rimettere il flacone senza tappo nell'alloggiamento, quindi abbassare la leva. Conservare il tappo sul supporto dei tappi.
2. Rimuovere e svuotare il flacone grande dei reagenti usati nel modo seguente.
 - a. Utilizzando l'impugnatura superiore, rimuovere il flacone grande dei reagenti usati dal lato sinistro del cassetto dei tamponi.
 - b. Rimuovere il tappo filettato dal supporto dei tappi nella parte anteriore del flacone.
 - c. Sigillare l'apertura del flacone con un tappo per impedire le fuoriuscite.
 - d. Smaltire i contenuti in base agli standard vigenti nella propria regione. Tenere saldamente le impugnature durante lo svuotamento.
 - e. Rimettere il flacone senza tappo nel cassetto dei tamponi. Conservare il tappo sul supporto dei tappi.

Figura 13 Riposizionamento del flacone vuoto nel suo alloggiamento



3. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
 4. Chiudere il cassetto dei tamponi, quindi chiudere gli sportelli dello scomparto dei liquidi.
- ⚠ | Se i flaconi di reagenti usati non vengono svuotati si potrebbe verificare una corsa terminata e una fuoriuscita, che potrebbe danneggiare lo strumento e porre un rischio di sicurezza.

Preparazione della cella a flusso

1. Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
2. Tenere la confezione sigillata della cella a flusso a temperatura ambiente per 10-15 minuti. Utilizzare la cella a flusso entro 12 ore dalla rimozione dalla confezione.

Raggruppamento e denaturazione delle librerie per il sequenziamento

La concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e quantificazione delle librerie. Per istruzioni consultare [Generatore del protocollo di denaturazione e diluizione](#). Quando la libreria raggruppata in pool è pronta, procedere a [Preparazione delle cartucce SBS e con cluster alla pagina 42](#).

- ⚠ | Conservare la provetta delle librerie solo se necessario. La conservazione a lungo termine a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C può aumentare i duplicati, il che riduce la resa.

Preparazione delle cartucce SBS e con cluster

1. Ispezionare la parte inferiore di ogni cartuccia per assicurarsi che i recipienti siano privi di ghiaccio, il che significa che i reagenti sono scongelati.
2. Capovolgere ciascuna cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti.
3. Picchiettare delicatamente la parte inferiore di ciascuna cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria.

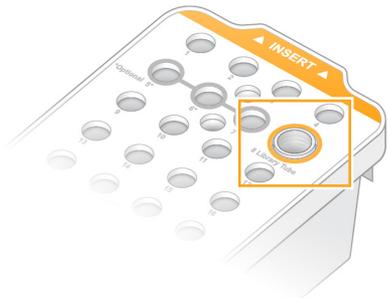
Preparazione dei primer personalizzati

Se la libreria richiede i primer personalizzati, prepararli attenendosi alle istruzioni contenute nella *Guida ai primer personalizzati per NovaSeq Series* (documento n. 1000000022266).

Caricamento della provetta delle librerie

1. Senza alterare la libreria nella parte inferiore, inserire la provetta delle librerie senza tappo contenente il pool di librerie denaturato e diluito nella posizione **Library Tube** (Provetta delle librerie) (n. 8) della cartuccia con cluster.
2. Immettere la provetta della libreria nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster.

Figura 14 Provetta delle librerie senza tappo caricata nella posizione n. 8



Flusso di lavoro NovaSeq Xp: preparazione dei materiali di consumo

Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp

Prima di avviare la preparazione dei campioni o dei materiali di consumo, assicurarsi che la versione di NVCS soddisfi i requisiti minimi per il software elencati nella tabella seguente.

Tabella 11 Requisiti minimi per il software

Cella a flusso	Versione software minima per v1.0 Reagent Kit	Versione software minima per V1.5 Reagent Kit
SP	1,6	1,7
S1	1.3.1	1,7
S2	Tutte	1,7
S4	1.2.0	1,7

i | NVCS supporta l'avvio scaglionato di nuove corse. Consultare [Avvio di corse scaglionate alla pagina 65](#).

Assicurarsi di aver completato tutte le fasi del flusso di lavoro NovaSeq Xp, nell'ordine indicato.

i | Le fasi 1-4 possono essere completate in parallelo e devono essere completate prima di procedere con la fase 5.

1. Scongellare le cartucce SBS e con cluster.
2. Svuotare i flaconi di reagenti usati.
3. Mettere da parte la confezione della cella a flusso sigillata per 10-15 minuti per consentire alla cella a flusso di raggiungere la temperatura ambiente. Utilizzare la cella a flusso entro 12 ore dalla rimozione dalla confezione.
4. Normalizzare e raggruppare in pool le librerie e, facoltativamente, aggiungere il campione di controllo PhiX in base al corretto protocollo per le librerie nel [Generatore di protocolli di denaturazione e diluizione](#).

i | Completare le fasi 5-11 nell'ordine indicato.

5. Scongellare i reagenti ExAmp.
6. Preparare una nuova diluizione di NaOH attenendosi al [Generatore di protocolli di denaturazione e diluizione](#).

7. Denaturare e neutralizzare il pool di librerie attenendosi al [Generatore di protocolli di denaturazione e diluizione](#).
8. Preparare la cella a flusso e la stazione di attacco.
9. Preparare la Master Mix ExAmp.
10. Caricare la miscela ExAmp/libreria sulla cella a flusso.
11. Caricare una provetta delle librerie vuota nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster.

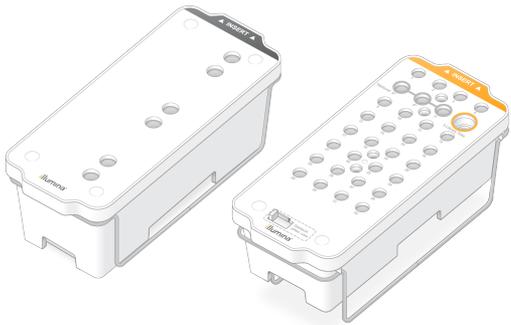
Metodi

- Assicurarsi di avere a disposizione le apparecchiature e i materiali di consumo richiesti. Consultare [Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente alla pagina 22](#).
 - Assicurarsi che lo strumento sia acceso e che lo spazio di archiviazione sia sufficiente per la corsa. Consultare [Gestione processo alla pagina 11](#).
 - Assicurarsi che il lavaggio post-corsa automatico su entrambi i lati dello strumento sia terminato prima di avviare la fase *Scongelo dei reagenti ExAmp* contenuta in [Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp alla pagina 43](#).
 - Controllare sempre l'etichetta quando si preparano i materiali di consumo per assicurare la compatibilità tra i componenti. Non miscelare i componenti di SP, S1, S2 e S4 o i componenti a due corsie e a quattro corsie, su un lato dello strumento.
 - Non mischiare le versioni dei kit di reagenti.
 - Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.0.
 - Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.5.
 - Quando si rimuove la cartuccia SBS dalla confezione, ispezionarla visivamente per rilevare eventuali crepe.
 - Attenersi alle istruzioni nell'ordine indicato, utilizzando i volumi, le temperature e le durate indicate.
 - Quando non si sta miscelando, posizionare tutti i reagenti e le librerie su ghiaccio.
 - Se le istruzioni non specificano un punto di arresto, passare immediatamente al passaggio successivo.
 - Per avviare correttamente il sequenziamento per una cella a flusso a due corsie, devono essere riempite entrambe le corsie. Per avviare correttamente il sequenziamento per una cella a flusso a quattro corsie, una corsia deve essere riempita parzialmente o deve essere vuota.
 - Le cause più comuni della variazione nei risultati quando i reagenti ExAmp vengono miscelati manualmente sono l'erogazione inaccurata dei volumi dei componenti ExAmp e la miscelazione insufficiente. Non miscelare poco i campioni.
- i** | Avviare la corsa di sequenziamento immediatamente dopo il caricamento delle librerie sulla cella a flusso, preferibilmente entro 30 minuti.

Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster

1. Se è in corso una corsa di sequenziamento, assicurarsi che entrambi i lati dello strumento siano disponibili al completamento dello scongelamento.
2. Rimuovere le cartucce SBS e con cluster dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
3. Posizionare ciascuna cartuccia in una griglia di scongelamento.
I rack sono forniti con lo strumento e impediscono il capovolgimento nel bagno d'acqua.

Figura 15 Cartucce in griglie di scongelamento



4. Scongellare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente (da 19 °C a 25 °C).
Sommergere fino a metà.
5. Fare riferimento alla seguente tabella per determinare la durata dello scongelamento.

! L'utilizzo di acqua calda per lo scongelamento dei reagenti può causare una ridotta qualità dei dati o una corsa non riuscita.

Cartuccia	Durata dello scongelamento
Cartuccia SBS SP, S1 e S2	4 ore
Cartuccia con cluster SP, S1 e S2	Fino a 2 ore
Cartuccia SBS S4	4 ore
Cartuccia con cluster S4	Fino a 4 ore

6. Asciugare completamente le basi della cartuccia utilizzando salviette di carta. Asciugare tra i pozzetti per rimuovere tutta l'acqua.
7. Ispezionare i sigilli per l'eventuale presenza di acqua. Se è presente acqua, tamponare con un panno che non lascia residui.
8. Ispezionare la parte inferiore di ogni cartuccia per assicurarsi che i recipienti siano privi di ghiaccio, il che significa che i reagenti sono scongelati.
9. Capovolgere ciascuna cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti.

10. Picchiettare delicatamente la parte inferiore di ciascuna cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria.
11. Se i reagenti non possono essere caricati nello strumento entro 4 ore, conservarli a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 24 ore o riporli nuovamente a una temperatura compresa tra -25° C e -15 °C. Dopo lo scongelamento, non ricongelare più di una volta.

Svuotamento dei flaconi di reagenti usati

Utilizzare le seguenti istruzioni per svuotare i flaconi di reagenti usati con *ogni* corsa di sequenziamento. Il flacone grande deve rimanere in posizione.

! | **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. Durante la manipolazione di materiali pericolosi nei reagenti deve esservi una ventilazione appropriata. 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 pertinenti a livello regionale, nazionale e locale.** Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS alla pagina web support.illumina.com/sds.html.

1. Rimuovere e svuotare il flacone piccolo dei reagenti usati nel modo seguente.
 - a. Sollevare la leva e rimuovere il flacone piccolo dei reagenti usati dall'alloggiamento. Afferrare il flacone da entrambi i lati.
 - b. Rimuovere il tappo filettato dal supporto dei tappi nella parte anteriore del flacone.
 - c. Sigillare l'apertura del flacone con un tappo per impedire le fuoriuscite.
 - d. Mantenendo i contenuti separati dai contenuti di altri flaconi, smaltire in base agli standard applicabili nella propria regione.
 - e. Rimettere il flacone senza tappo nell'alloggiamento, quindi abbassare la leva. Conservare il tappo sul supporto dei tappi.
2. Rimuovere e svuotare il flacone grande dei reagenti usati nel modo seguente.
 - a. Utilizzando l'impugnatura superiore, rimuovere il flacone grande dei reagenti usati dal lato sinistro del cassetto dei tamponi.
 - b. Rimuovere il tappo filettato dal supporto dei tappi nella parte anteriore del flacone.
 - c. Sigillare l'apertura del flacone con un tappo per impedire le fuoriuscite.
 - d. Smaltire i contenuti in base agli standard vigenti nella propria regione. Tenere saldamente le impugnature durante lo svuotamento.
 - e. Rimettere il flacone senza tappo nel cassetto dei tamponi. Conservare il tappo sul supporto dei tappi.

Figura 16 Riposizionamento del flacone vuoto nel suo alloggiamento



3. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
 4. Chiudere il cassetto dei tamponi, quindi chiudere gli sportelli dello scomparto dei liquidi.
- !** | Se i flaconi di reagenti usati non vengono svuotati si potrebbe verificare una corsa terminata e una fuoriuscita, che potrebbe danneggiare lo strumento e porre un rischio di sicurezza.

Preparazione della cella a flusso e della stazione di attacco

1. Rimuovere la confezione di una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
2. Tenere la confezione sigillata della cella a flusso a temperatura ambiente per 10-15 minuti. Utilizzare la cella a flusso entro 12 ore dalla rimozione dalla confezione.
3. Posizionare la stazione di attacco della cella a flusso su una superficie piana.
4. Ispezionare la stazione di attacco e assicurarsi che sia privo di particelle.

Scongelamento dei reagenti ExAmp

1. Rimuovere una provetta di ogni DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3 dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C a -15 °C.
2. Scongelare a temperatura ambiente per 10 minuti.
3. Mettere da parte su ghiaccio.

i | Se i reagenti devono essere congelati nuovamente, farlo immediatamente dopo lo scongelamento. I reagenti ExAmp possono essere ricongelati solo una volta. I reagenti rimasti non possono essere congelati o combinati.

Controllare la pressione del vuoto della cella a flusso

Controllare il vuoto della cella a flusso come segue.

1. Nel menu principale selezionare **Tools** (Strumenti).
2. Selezionare **Flow Cell Vacuum** (Vuoto cella a flusso).
3. Selezionare uno o entrambi i lati pertinenti su cui verranno caricate una o più celle a flusso (lato A, lato B o entrambi).
4. Selezionare **Open** (Apri).

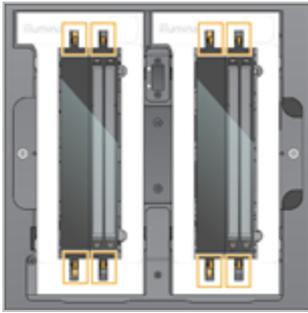
i | Lo stato di pressione del vuoto consente di visualizzare **Fail** (Errore) su entrambi i lati A e B quando si apre per la prima volta lo strumento di vuoto della cella a flusso. Questo è normale quando una cella a flusso non è presente o quando una cella a flusso viene caricata prima dello strumento di vuoto della cella a flusso.

5. Rimuovere una nuova confezione di celle a flusso da 2 °C a 8 °C di conservazione e scongelarla a temperatura ambiente per 10-15 minuti.
6. Rimuovere la cella a flusso dalla confezione come segue.
 - a. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere per evitare di contaminare la superficie in vetro della cella a flusso.
 - b. Tenendo la confezione su una superficie piana, aprirla partendo dal sigillo angolato.
 - c. Rimuovere il contenitore in plastica trasparente che copre la cella a flusso.
 - d. Rimuovere la cella a flusso dalla confezione. Afferrare la cella a flusso dai lati evitando di toccare il vetro o le guarnizioni nella parte inferiore.
 - e. Se sono visibili particelle sulle superfici di vetro, pulire la superficie interessata con una salviettina imbevuta di alcol che non lascia residui e asciugare con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.
 - f. Eliminare la confezione in base alle procedure di smaltimento.

i | Alcuni graffi e altri difetti estetici minori sulla cella a flusso sono normali e si ritiene che non influiscano sulla qualità e sulla resa dei dati. Illumina raccomanda di utilizzare queste celle a flusso secondo la normale prassi.

7. Allineare la cella a flusso sopra i quattro morsetti sollevati e posizionarla sul piano portacelle.

Figura 17 Celle a flusso caricate e allineate sopra i morsetti



8. Selezionare **Close** (Chiudi).

Lo sportello della cella a flusso si chiude, il lettore RFID e la pressione del vuoto vengono controllati e sullo schermo vengono visualizzati il descrittore della cella a flusso, l'ID della cella a flusso e lo stato della pressione del vuoto della cella a flusso.

9. Se lo stato della pressione del vuoto della cella a flusso viene visualizzato come Pass (Superato), selezionare **Open** (Apri) per aprire lo sportello della cella a flusso e procedere a [Caricare la cella a flusso sulla stazione di attacco alla pagina 50](#).

Se lo stato della pressione del vuoto della cella a flusso è Fail (Errore):

- a. Selezionare **Open** (Apri) per aprire lo sportello della cella a flusso.
- b. Rimuovere la cella a flusso dal piano. Afferrare la cella a flusso dai lati evitando di toccare il vetro o le guarnizioni nella parte inferiore.
- c. Controllare che sia la cella a flusso che il piano portacelle siano privi di particolato. Se necessario, pulire la superficie interessata con una salvietta imbevuta di alcol che non lasci residui e asciugare con un panno da laboratorio a basso residuo.
- d. Ricaricare la cella a flusso allineandola sopra i quattro morsetti sollevati e posizionarla sul piano portacelle.
- e. Selezionare **Close** (Chiudi) per chiudere lo sportello della cella a flusso.
- f. Se la pressione del vuoto della cella a flusso continua a indicare errore, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Raggruppamento in pool, denaturazione e caricamento delle librerie per il sequenziamento

La concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e quantificazione delle librerie. Per istruzioni consultare [Generatore del protocollo di denaturazione e diluizione](#). Quando la libreria raggruppata in pool è pronta, procedere a [Caricare la cella a flusso sulla stazione di attacco alla pagina 50](#).

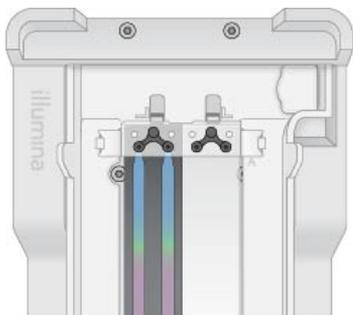
Caricare la cella a flusso sulla stazione di attacco

1. Rimuovere la cella a flusso dalla confezione. Afferrare la cella a flusso dai lati evitando di toccare il vetro o le guarnizioni nella parte inferiore.
2. Se sono visibili particelle sulle superfici di vetro, pulire la superficie interessata con una salviettina imbevuta di alcol che non lascia residui e asciugare con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.
3. Eliminare la confezione in base alle procedure di smaltimento.

i | Alcuni graffi e altri difetti estetici minori sulla cella a flusso sono normali e si ritiene che non influiscano sulla qualità e sulla resa dei dati. Illumina consiglia di utilizzare queste celle a flusso come di consueto.

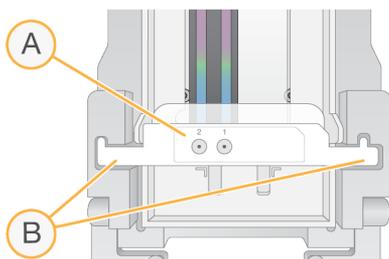
4. Capovolgere la cella a flusso in modo che la superficie superiore sia rivolta verso il **basso**.
5. Fare scorrere l'estremità di uscita della cella a flusso sotto la staffa e posizionarla nella stazione di attacco. Consultare [Cella a flusso alla pagina 17](#) e [Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp alla pagina 21](#).

Figura 18 Posizionamento della cella a flusso



6. Con i pozzetti rivolti verso l'alto, caricare il collettore NovaSeq Xp sull'estremità di entrata della cella a flusso. Assicurarsi che i bracci del collettore NovaSeq Xp siano correttamente posizionati negli intagli della stazione di attacco.

Figura 19 Posizionamento del collettore NovaSeq Xp



- A. Pozzetti del collettore NovaSeq Xp rivolti verso l'alto
- B. Bracci del collettore NovaSeq Xp posizionati sugli intagli della stazione di attacco

7. Chiudere il morsetto per bloccare in posizione la cella a flusso e il collettore NovaSeq Xp e sigillare le guarnizioni.
8. Smaltire il collettore NovaSeq Xp dopo il caricamento dei pool di librerie nella cella a flusso.
Il collettore NovaSeq Xp è esclusivamente monouso.

Preparazione della Master Mix ExAmp

Quando si prepara la Master Mix ExAmp, utilizzare una provetta per microcentrifuga in grado di contenere almeno il doppio del volume richiesto:

- Per la cella a flusso a due corsie, utilizzare una provetta da 0,5 ml o 1,7 ml.
- Per la cella a flusso a quattro corsie, utilizzare una provetta da 1,7 ml.

Le cause più comuni della variazione nei risultati quando i reagenti ExAmp vengono miscelati manualmente sono l'erogazione inaccurata dei volumi e la miscelazione insufficiente. Non miscelare poco i campioni.

i | I materiali di consumo DPX1 e DPX2 possono essere etichettati come JPX1 e JPX2. Entrambi sono compatibili con i kit di reagenti v1.0 o v1.5.

1. Capovolgere o utilizzare brevemente un vortex per miscelare DPX1/JPX1 e DPX2/JPX2.
2. Utilizzare brevemente un vortex per miscelare DPX3.

I reagenti ExAmp potrebbero essersi separati durante la conservazione. I reagenti sono viscosi, in particolare DPX2/JPX2 e DPX3. A causa dell'elevata viscosità, DPX3 non si miscela facilmente quando capovolto.

3. Centrifugare brevemente DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3.
4. Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga adatta nell'ordine indicato:

Ordine di aggiunta	Reagente*	Volume per una cella a flusso a due corsie (SP/S1/S2) (µl)	Volume per una cella a flusso a quattro corsie (S4) (µl)
1	DPX1/JPX1	126	315
2	DPX2/JPX2	18	45
3	DPX3	66	165

*I tappi delle provette di reagente DPX/JPX possono essere codificati a colori (rosso, giallo e blu per DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3, rispettivamente). Assicurarsi che la codifica a colori sia mantenuta quando si sostituiscono i tappi delle provette.

Con questi volumi si ottiene una Master Mix ExAmp di 210 µl per la modalità SP, S1 o S2 oppure una Master Mix di 525 µl per la modalità S4. Questi volumi sono sufficienti per la modalità prescelta. Il volume in più è incluso per gli errori di pipettamento durante il caricamento delle librerie sulla cella a flusso.

5. Pipettare e dispensare lentamente per evitare la formazione di bolle e per assicurarsi che l'intero volume fuoriesca della punta.

- Utilizzare un vortex per 20-30 secondi o fino a completa miscelazione.

i | La Master Mix ExAmp è stabile quando si utilizza un vortex.

La miscela potrebbe apparire torbida e questo è normale.

- Centrifugare fino a un massimo di 280 × g per un minuto.
- Per ottenere le migliori prestazioni del sequenziamento, procedere immediatamente con la fase successiva. Se necessario, sarebbe ideale conservare su ghiaccio la Master Mix per massimo un'ora. Utilizzare entro 30 minuti se la conservazione avviene a temperatura ambiente.**

Caricamento delle librerie sulla cella a flusso

Per ottenere i risultati migliori, svolgere i seguenti passaggi:

- Mantenere la cella a flusso caricata a temperatura ambiente. Non refrigerare o mettere su ghiaccio.
 - L'incubazione prolungata può ridurre la percentuale di cluster che attraversano il filtro (%PF).
 - Avviare la corsa entro 30 minuti dal caricamento dei pool di librerie sulla cella a flusso.
 - L'utilizzo immediato di ExAmp/miscela della libreria consente di ottenere i risultati migliori.
- Aggiungere Master Mix ExAmp a ogni pool di libreria denaturata nel modo seguente, quindi miscelare con un vortex per 20-30 secondi.

Se si utilizzano strisce con provette, pipettare per miscelare fino ad ottenere una soluzione omogenea.

Modalità	Pool di librerie denaturate (µl)	Master Mix ExAmp Master (µl)	Volume risultante (µl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

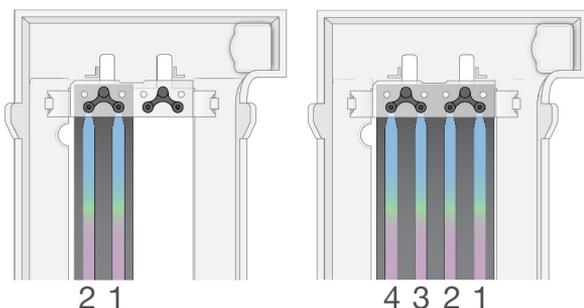
- Centrifugare fino a un massimo di 280 × g per un minuto.
- Utilizzando una pipetta p200 µl, aggiungere il volume appropriato di miscela ExAmp/libreria a ogni pozzetto del collettore NovaSeq Xp.
 - Per evitare la creazione di bolle, caricare i campioni lentamente.
 - Assicurarsi di aggiungere la miscela di pool di librerie al pozzetto che corrisponde alla corsia prevista.
 - Durante il pipettamento, evitare il contatto con il filtro nella parte inferiore del pozzetto.
 - Non è necessario attendere il riempimento completo di una corsia prima di aggiungere la miscela ai restanti pozzetti del collettore.

Modalità	Miscela libreria/ExAmp per pozzetto (µl)
SP/S1	80

Modalità	Miscela libreria/ExAmp per pozzetto (µl)
S2	95
S4	130

I pozzetti numerati del collettore NovaSeq Xp corrispondono al numero della corsia della cella a flusso. Quando la cella a flusso viene capovolta, la numerazione delle corsie è invertita.

Figura 20 Numerazione invertita delle corsie



- Dopo aver aggiunto la miscela ExAmp/libreria a tutti i pozzetti del collettore, attendere circa due minuti affinché la miscela raggiunga la fine di ogni corsia. Una piccola bolla d'aria all'estremità di uscita della corsia è normale. Un piccolo volume della miscela può rimanere nei pozzetti del collettore al termine del riempimento della corsia.

! Non inclinare la cella a flusso per cercare di determinare se le corsie sono riempite o se sono presenti bolle d'aria. L'inclinazione può far fuoriuscire la miscela ExAmp/libreria dalla cella a flusso. Se una corsia non si riempie completamente, non cercare di correggerla. I dati ottenuti da una corsia parzialmente riempita possono essere ridotti. Non cercare di recuperare il campione dalla cella a flusso.

i Non inclinare la cella a flusso durante il trasporto.

Preparazione delle cartucce SBS e con cluster

- Ispezionare la parte inferiore di ogni cartuccia per assicurarsi che i recipienti siano privi di ghiaccio, il che significa che i reagenti sono scongelati.
- Capovolgere ciascuna cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti.
- Picchiettare delicatamente la parte inferiore di ciascuna cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria.

Preparazione dei primer personalizzati

Se la libreria richiede i primer personalizzati, prepararli attenendosi alle istruzioni contenute nella *Guida ai primer personalizzati per NovaSeq Series (documento n. 100000022266)*.

Caricamento della provetta delle librerie vuota

1. Stappare la provetta delle librerie fornita con NovaSeq 6000 Reagent Kit.
2. Inserire la provetta delle librerie vuota e senza tappo nella posizione **Library Tube** (Provetta delle librerie) (n. 8) della cartuccia con cluster.

La provetta delle librerie vuota deve essere presente per la scansione RFID e per la miscelazione dei reagenti sullo strumento. Il codice a barre della provetta delle librerie non è convalidata sul codice a barre specificato nel file LIMS. L'etichetta RFID è convalidata per assicurare che la provetta non sia stata utilizzata.

Figura 21 Provetta delle librerie senza tappo caricata nella posizione n. 8



Sequenziamento

Impostazione di una corsa di sequenziamento

ILLUMINA raccomanda di mantenere l'accesso mentre NVCS è in esecuzione e mentre la corsa di sequenziamento è in corso.

1. Rimuovere qualsiasi oggetto dalla superficie dello strumento.
Mantenere la superficie libera durante la corsa di sequenziamento ed evitare di appoggiarsi allo strumento. Premere sullo sportello della cella a flusso per aprirla. Questa azione arresta la corsa. Le corse arrestate non possono essere riprese.

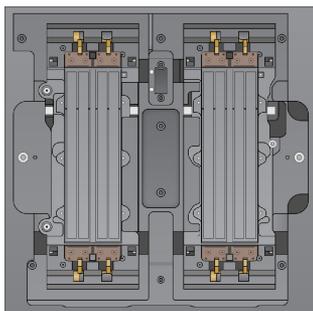
i | È supportato l'avvio scaglionato di nuove corse. Il timer di avvio delle corse scaglionate indica quando può essere avviata una corsa scaglionata. Per maggiori informazioni, fare riferimento a [Avvio di corse scaglionate alla pagina 65](#).

2. Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Sequence** (Sequenziamento) quindi selezionare una corsa con singola cella a flusso o doppia cella a flusso:
 - **A+B**: imposta una corsa con doppia cella a flusso.
 - **A**: imposta una corsa con singola cella a flusso sul lato A.
 - **B**: imposta una corsa con singola cella a flusso sul lato B.
 Il software avvia una serie di schermate per l'impostazione della corsa, a partire da Load (Carica).
3. Selezionare **OK** per accettare l'avvertenza e aprire lo sportello della cella a flusso.

Caricamento della cella a flusso sullo strumento

1. Se presente, rimuovere la cella a flusso utilizzata nella corsa precedente.
2. Se sono visibili particelle sul piano portacelle, pulire l'intero piano, inclusi l'interfaccia della fluidica e la superficie di vetro del target dell'allineamento ottico con una salviettina imbevuta di alcol. Asciugare con un panno che non lascia residui.

Figura 22 Piano portacelle



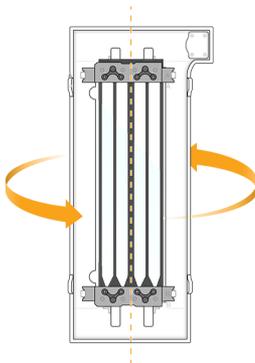
3. **[Flusso di lavoro Standard]** Rimuovere la cella a flusso dalla confezione come indicato di seguito.

- a. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere per evitare di contaminare la superficie in vetro della cella a flusso.
- b. Tenendo la confezione su una superficie piana, aprirla partendo dal sigillo angolato.
- c. Rimuovere il contenitore in plastica trasparente che copre la cella a flusso.
- d. Rimuovere la cella a flusso dalla confezione. Afferrare la cella a flusso dai lati evitando di toccare il vetro o le guarnizioni nella parte inferiore.
- e. Se sono visibili particelle sulle superfici di vetro, pulire la superficie interessata con una salviettina imbevuta di alcol che non lascia residui e asciugare con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.
- f. Eliminare la confezione in base alle procedure di smaltimento.

i | Alcuni graffi e altri difetti estetici minori sulla cella a flusso sono normali e si ritiene che non influiscano sulla qualità e sulla resa dei dati. Illumina consiglia di utilizzare queste celle a flusso come di consueto.

4. **[Flusso di lavoro NovaSeq Xp]** Scaricare la cella a flusso dalla stazione di attacco nel modo seguente.
 - a. Aprire il morsetto che tiene in posizione la cella a flusso e il collettore.
 - b. Senza far gocciolare liquido sulla cella a flusso, rimuovere con attenzione e smaltire il collettore.
 - c. Se del liquido gocciola sulla cella a flusso, pulirla con un panno che non lascia residui con alcol e asciugarla con un panno dal laboratorio che non lascia residui.
 - d. Afferrare i lati della cella a flusso per rimuoverla dalla stazione di attacco. Mantenere la cella a flusso livellata.
 - e. Se sulle guarnizioni è presente materiale residuo, tamponare con un panno che non lascia residui per asciugare le quattro guarnizioni della cella a flusso. Non toccare le guarnizioni.
 - f. Capovolgere la cella a flusso lungo l'asse in modo che la superficie superiore sia rivolta verso l'alto.

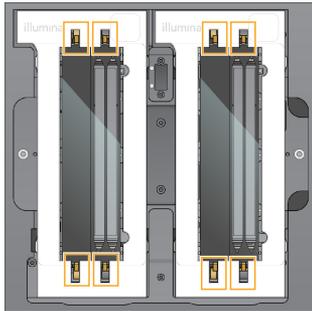
Figura 23 Capovolgimento della cella a flusso lungo l'asse



- g. Prima di rimettere la stazione di attacco nel luogo di conservazione, ispezionarla per assicurarsi che sia priva di particelle.

5. Allineare la cella a flusso sopra i quattro morsetti sollevati e posizionarla sul piano portacelle.

Figura 24 Celle a flusso caricate e allineate sopra i morsetti



6. Selezionare **Close Flow Cell Door** (Chiudi lo sportello della cella a flusso).
Lo sportello della cella a flusso si chiude, i sensori e l'identificazione RFID vengono verificati e l'ID della cella a flusso appare sullo schermo.

Caricamento delle cartucce con cluster e SBS

i | Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, prima di caricare la cartuccia con cluster, assicurarsi che la provetta delle librerie vuota e senza tappo sia caricata nella cartuccia.

1. Aprire gli sportelli dello scomparto dei liquidi, quindi aprire lo sportello del vano refrigerato per i reagenti.
2. Rimuovere le cartucce SBS e con cluster usate.
Le cartucce usate presentano sigilli perforati.
3. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.
Per il corretto smaltimento della posizione n. 30 della cartuccia con cluster, consultare [Posizione rimovibile n. 30 alla pagina 66](#).

4. Caricare le cartucce preparate nel cassetto del vano refrigerato per i reagenti in modo che le etichette **Insert** (Inserisci) siano rivolte verso la parte posteriore dello strumento:
 - Posizionare la cartuccia SBS (etichetta grigia) nella posizione sinistra.
 - Posizionare la cartuccia con cluster (etichetta arancione) contenente la provetta delle librerie senza tappo nella posizione destra.

Figura 25 Cartucce di reagenti caricate

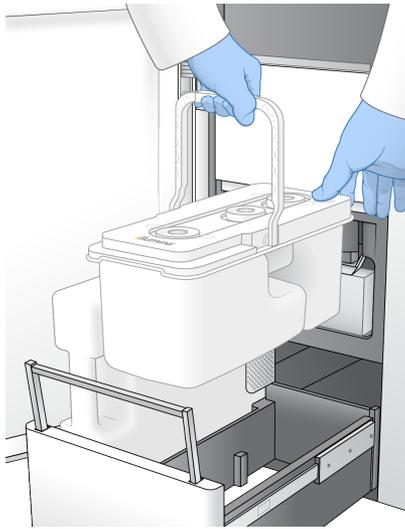


5. Fare scorrere il cassetto nel vano refrigerato per i reagenti, quindi chiudere lo sportello del vano refrigerato.
Vengono verificati i sensori e i RFID. Gli ID per la provetta delle librerie e le due cartucce vengono visualizzati sulla schermata.

Caricamento della cartuccia di tamponi

1. Tirare la maniglia in metallo per aprire il cassetto dei tamponi.
2. Rimuovere la cartuccia di tamponi usati che si trova sul lato destro del cassetto dei tamponi.
La cartuccia di tamponi usata presenta sigilli perforati.
3. Posizionare una nuova cartuccia di tamponi nel cassetto dei tamponi in modo che l'etichetta **Illumina** sia rivolta verso la parte anteriore del cassetto. Allineare la cartuccia con le guide sollevate sul piano e sui lati del cassetto.
Quando la cartuccia di tamponi viene caricata e alloggiata correttamente il cassetto si può chiudere.

Figura 26 Caricamento della cartuccia di tamponi



4. Se entrambi i flaconi di reagenti usati sono stati svuotati, selezionare la casella di controllo per confermare che entrambi i flaconi di reagenti usati sono vuoti.

! | Se i flaconi di reagenti usati non vengono svuotati si potrebbe verificare una corsa terminata e una fuoriuscita, che potrebbe danneggiare lo strumento e porre un rischio di sicurezza.

5. Selezionare il pulsante disponibile:

- **Log In** (Accedi): apre la schermata di accesso per accedere al proprio account cloud. Per BaseSpace Sequence Hub, passare a [Accedi a BaseSpace Sequence Hub alla pagina 59](#). Per Illumina Connected Analytics, passare a [Accedi a Illumina Connected Analytics alla pagina 60](#).
- **Run Setup** (Impostazione corsa): salta BaseSpace Sequence Hub e apre la schermata Run Setup (Impostazione corsa) per immettere i parametri della corsa. Passare a [Immissione dei parametri della corsa alla pagina 60](#).

La presenza di uno o dell'altro pulsante dipende dal fatto che il sistema sia o meno configurato per BaseSpace Sequence Hub.

Accedi a BaseSpace Sequence Hub

Quando NVCS viene aperto, il gruppo di lavoro predefinito in BaseSpace Sequence Hub viene selezionato come il gruppo di lavoro in uso. Se non viene specificato un gruppo di lavoro predefinito, viene selezionato il gruppo di lavoro dell'utente.

1. **[Facoltativo]** Aggiornare le impostazioni di BaseSpace Sequence Hub per la corsa attuale:
 - Per disabilitare BaseSpace Sequence Hub, deselegionare la casella di controllo **BaseSpace Sequence Hub**, quindi selezionare **Run Setup** (Impostazione corsa) per proseguire senza l'accesso.

- Per inviare i dati della corsa a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio remoto e l'analisi dei dati, selezionare **Run Monitoring and Storage** (Monitoraggio e archiviazione corsa). Questa opzione richiede un foglio campioni.
 - Per inviare a BaseSpace Sequence Hub file InterOp, runinfo.xml e runParameters.xml per il monitoraggio della corsa a distanza, selezionare **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa).
2. Inserire il nome utente e la password di BaseSpace Sequence Hub, quindi selezionare **Sign In** (Accedi).
 3. Se suggerito dal software, selezionare un gruppo di lavoro per caricare i dati della corsa, quindi selezionare **Run Setup** (Impostazione corsa).
Il software suggerisce questo passaggio solo se l'utente appartiene a diversi gruppi di lavoro.

Accedi a Illumina Connected Analytics

1. **[Facoltativo]** Aggiornare le seguenti impostazioni Illumina Connected Analytics (ICA) per la corsa attuale:
 - Per disabilitare ICA, deselezionare la Illumina casella di controllo Cloud Options (Opzioni cloud), quindi selezionare **Run Setup** (Impostazione corsa) per procedere senza accedere.
 - Per inviare i dati della corsa a ICA per il monitoraggio remoto e l'analisi dei dati, selezionare **Run Monitoring and Storage** (Monitoraggio e archiviazione corsa). Questa opzione richiede un foglio campioni.
 - Per inviare a ICA file InterOp, runinfo.xml e runParameters.xml per il monitoraggio della corsa a distanza, selezionare **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa).
2. Inserire il nome utente e la password di ICA, quindi selezionare **Sign In** (Accedi).
3. Quando suggerito dal software, selezionare un gruppo di lavoro e un progetto per caricare i dati della corsa, quindi selezionare **Run Setup** (Impostazione corsa).

Immissione dei parametri della corsa

1. Se il flusso di lavoro NovaSeq Xp è abilitato, selezionare un tipo di flusso di lavoro.
 - Se è stato selezionato **NovaSeq Xp**, assicurarsi che sia caricata un provetta della libreria vuota.
 - Se è stato selezionato **NovaSeq Standard**, assicurarsi che il campione sia caricato nella provetta della libreria.
2. Nel campo Run Name (Nome corsa), inserire il nome prescelto per identificare la corsa attuale. Il nome della corsa può contenere caratteri alfanumerici, trattini e trattini bassi.

3. Immettere il numero di cicli per ogni lettura e lunghezza indice nella corsa di sequenziamento. Non esiste un numero massimo di cicli indici, ma la somma dei cicli di lettura e dei cicli indici deve essere inferiore al numero di cicli per il kit.
- **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli per i kit v1.0 da 300 cicli oppure fino a 251 per i kit v1.0 da 500 cicli. Immettere un valore fino a 159 cicli per i kit v1.5 da 300 cicli oppure fino a 259 per i kit v1.5 da 500 cicli.
 - **Index 1** (Indice 1): immettere il numero di cicli per il primer Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).
 - **Index 2** (Indice 2): immettere il numero di cicli per il primer Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).
 - **Read 2** (Lettura 2): immettere un valore fino a 151 cicli per i kit v1.0 da 300 cicli oppure fino a 251 per i kit v1.0 da 500 cicli. Immettere un valore fino a 159 cicli per i kit v1.5 da 300 cicli oppure fino a 259 per i kit v1.5 da 500 cicli. Questo valore è di solito lo stesso del valore per Read 1 (Lettura 1).

i | Il numero di cicli analizzati in Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2) è un ciclo in meno rispetto al valore immesso. Ad esempio, per eseguire una corsa paired-end da 150 cicli (2 × 150 bp per corsa), inserire il valore 151 nei campi Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2).

Per i kit v1.0, la somma dei quattro valori immessi può superare il numero di cicli indicato per il kit di reagenti selezionato: fino a 23 cicli per le corse paired-end e fino a 30 cicli per le corse unidirezionali.

Per i kit v1.5, la somma dei quattro valori immessi può superare il numero di cicli indicato per il kit di reagenti selezionato: fino a 38 cicli sia per le corse paired-end che per le corse unidirezionali.

Il kit S4 da 35 cicli contiene un totale di 72 cicli di sequenziamento. La somma dei quattro valori può superare il numero indicato per un massimo di 37 cicli. I valori di lettura predefiniti sono modificabili e il numero di cicli può essere distribuito sulle 4 corse, ad es.: 36, 10, 10, 0.

4. Allargare **Advanced Options** (Opzioni avanzate) per applicare le impostazioni per la corsa attuale. Queste impostazioni sono facoltative se non diversamente indicato.
- **Primer personalizzati v1.0**: selezionare la casella di controllo **Custom Primers** (Primer personalizzati), quindi selezionare le caselle di controllo appropriate. Le librerie Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation richiedono un primer di sequenziamento Read 1 (Lettura 1) (VP10) personalizzato se si utilizzano kit v1.0. Consultare *Guida ai primer personalizzati per NovaSeq Series* (documento n. 1000000022266) per i dettagli.
 - **Read 1** (Lettura 1): utilizzare i primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
 - **Read 2** (Lettura 2): utilizzare i primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
 - **Custom Index** (Indice personalizzato): utilizzare i primer personalizzati per Index 1 (Indice 1).

- **Primer personalizzati v1.5:** selezionare la casella di controllo **Custom Primers** (Primer personalizzati), quindi selezionare le caselle di controllo appropriate. Le librerie Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation non richiedono primer personalizzati se si utilizzano kit v1.5. Consultare *Guida ai primer personalizzati per NovaSeq Series (documento n. 1000000022266)* per i dettagli.
 - **Read 1** (Lettura 1): utilizzare i primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
 - **Read 2** (Lettura 2): utilizzare i primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
 - **Custom Index** (Indice personalizzato): utilizzare i primer personalizzati sia per le letture Index 1 (Indice 1) che per le letture Index 2 (Indice 2).
- **Output Folder** (Cartella di output): selezionare **Browse** (Sfogliare) per modificare la cartella di output per la corsa attuale. Una cartella di output è richiesta quando la corsa non è collegata a BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics per l'archiviazione.
- **Samplesheet** (Fogliocampioni): selezionare **Browse** (Sfogliare) per caricare un foglio campioni, che è richiesto quando si utilizza BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics per eseguire il monitoraggio e l'archiviazione o altri file CSV. Il file CSV viene copiato nella cartella di output e non incide sui parametri della corsa. Assicurarsi che il foglio campioni caricato sia nel formato corretto (direzione dell'adattatore per Index Read 2 - Lettura indici 2) in base ai flussi di lavoro v1.0 e v1.5 che utilizzano strategie diverse. I flussi di lavoro per i filamenti forward vengono eseguiti con i kit di reagenti v1.0. I flussi di lavoro per i complementi reverse vengono eseguiti con i kit di reagenti v1.5.
- **Custom Recipe** (Ricetta personalizzata): selezionare **Custom Recipe** (Ricetta personalizzata), quindi **Browse** (Sfogliare) per utilizzare una ricetta personalizzata in formato XML per questa corsa. Le ricette personalizzate per la versione v1.0 non saranno compatibili con la versione v1.5. Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

 | Non è supportata la modifica alle fasi di generazione di cluster in una ricetta personalizzata.

5. Selezionare **Review** (Revisione).

Il software conferma che i parametri specificati sono appropriati per la ricetta.

Conferma dei parametri della corsa

1. Rivedere i parametri della corsa sulla schermata Review (Revisione).
2. **[Facoltativo]** Selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla schermata Run Setup (Impostazione corsa) e modificare i parametri della corsa.
3. Selezionare **Start Run** (Avvia corsa).
Le verifiche pre-corsa vengono avviate automaticamente.

Revisione delle verifiche pre-corsa

1. Il completamento della verifica pre-corsa impiega circa cinque minuti.

Dopo il corretto completamento, la corsa viene avviata automaticamente.

i | Per evitare l'eccessivo caricamento del disco rigido, non copiare alcun dato sull'unità C dopo l'avviamento della corsa.

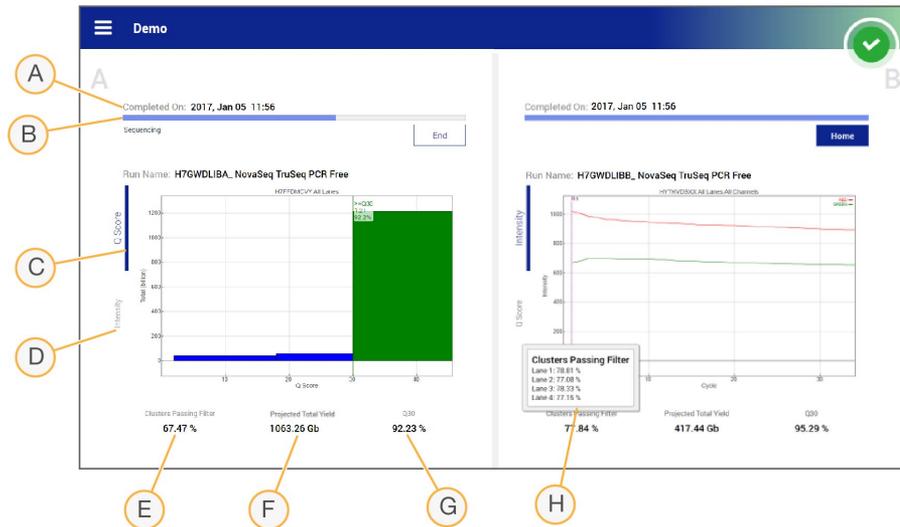
2. Se le verifiche pre-corsa non viene superata a causa di un errore dei sensori, come una cella a flusso non rilevata, è necessario uscire e riavviare il flusso di lavoro.
3. Se altre verifiche pre-corsa non vengono superate, selezionare **Retry** (Riprova) per riavviare le verifiche non superate o **Retry All** (Riprova tutte) per riavviare tutte le verifiche.
Gli errori devono essere risolti prima di poter avviare la corsa. Per ulteriori informazioni sulla risoluzione dei problemi, consultare [Errori della verifica pre-corsa alla pagina 75](#).
4. Selezionare l'icona **Errore** per visualizzare i dettagli relativi all'errore.
5. Se la verifica dell'allineamento non viene superata, risolvere l'errore nel modo seguente.
 - a. Selezionare **Reload** (Ricarica), quindi selezionare **OK** per tornare alla schermata Load (Carica).
 - b. Rimuovere qualsiasi oggetto che si trovi nella parte superiore dello strumento, quindi selezionare **OK**. Lo sportello della cella a flusso si apre.
 - c. Ricaricare la cella a flusso, quindi selezionare **Run Setup** (Impostazione corsa).
 - d. Completare ciascuna schermata per rileggere ogni RFID e tornare alla schermata Pre-Run Checks (Verifiche pre-corsa).
 - e. Rieseguire la verifica.

Monitoraggio del progresso della corsa

1. È possibile monitorare il progresso della corsa, le intensità e i punteggi qualitativi mentre le metriche vengono visualizzate sulla schermata.

Per maggiori informazioni sulle metriche della corsa, consultare [Real-Time Analysis alla pagina 80](#).

Figura 27 Progresso e metriche della corsa di sequenziamento



- A. Time to completion** (Data e ora del completamento): la data e l'ora in cui è stata completata la corsa (aaaa-mm-gg hh:mm).
- B. Run progress** (Progresso della corsa): l'attuale fase della corsa. La dimensione della barra di avanzamento non è proporzionale alla velocità della corsa di ciascuna fase.
- C. Q-scores** (Punteggi qualitativi): la distribuzione dei punteggi qualitativi.
- D. Intensity** (Intensità): il valore delle intensità dei cluster per il 90° percentile per ciascuna tile. I colori del grafico indicano i canali rosso e verde.
- E. Clusters Passing Filter (%)** (Cluster che attraversano il filtro - %): la percentuale di cluster che attraversano il filtro.
- F. Projected Total Yield (Gb)** (Resa totale prevista - Gb): la resa prevista per la corsa FC. Se sono state selezionate le metriche (H) i numeri visualizzati corrispondono alla resa attuale per corsia e verranno aggiornati per ogni ciclo per tutta la durata della corsa.
- G. Q30** (Punteggio qualitativo 30): la percentuale di identificazioni delle basi per la corsa che ottengono un punteggio qualitativo ≥ 30 .
- H. Per lane breakdown** (Dettagli per corsia): la selezione dei valori nelle voci E, F e G visualizza i dettagli per corsia dei dati di ognuno di quei campi.

i | Se durante l'esecuzione di NVCS viene avviato uno spegnimento o un riavvio, confermare questa azione prima di procedere con lo spegnimento o il riavvio.

Metriche della corsa

Il software visualizza le metriche generate durante la corsa. Le metriche vengono visualizzate sotto forma di grafici, diagrammi e tabelle in base ai dati generati da RTA3 e scritti nei file InterOp.

La clusterizzazione dura circa 2 ore, quindi il sequenziamento inizia con il ciclo 1. Le metriche vengono aggiornate man mano che il sequenziamento procede. I cluster che attraversano il filtro, la resa e i punteggi qualitativi sono disponibili dopo il ciclo 26. Prima del ciclo 26, nessun valore viene popolato e vengono indicati come non applicabile.

Stato del processo

La schermata Process Management (Gestione processo) elenca lo stato di ciascuna corsa. Dal menu principale, selezionare **Process Management** (Gestione processo).

Per ciascun nome della corsa, Process Management (Gestione processo) elenca lo stato dei seguenti componenti:

- **Run Status** (Stato corsa): in base all'elaborazione dei file CBCL.
- **Network** (Rete): in base al trasferimento dei file utilizzando Universal Copy Service.
- **BaseSpace**: in base al caricamento dei file su BaseSpace Sequence Hub, se applicabile.

Quando un processo è completato, viene visualizzato un segno di spunta verde. Per maggiori informazioni, fare riferimento a [Gestione processo alla pagina 11](#).

Avvio di corse scaglionate

È possibile impostare e avviare una corsa sul lato inattivo dello strumento mentre una corsa è in corso sull'altro lato, in questo caso si parla di avvio scaglionato. Le corse scaglionate sono impostate a specifici tempi durante una corsa, indicati dagli stati del seguente timer di conto alla rovescia per l'avvio di corse.

- **Run Start: Available** (Avvio corsa: disponibile): l'avvio scaglionato è al momento disponibile. La data e l'ora mostrano quando sarà disponibile l'avvio scaglionato. Selezionare **Sequence** (Sequenziamento) per avviare una nuova corsa scaglionata al completamento del ciclo in corso.
- **Run Start: Unavailable** (Avvio corsa: non disponibile): l'avvio scaglionato non è al momento disponibile. La data e l'ora mostrano quando l'avvio scaglionato sarà disponibile sull'altro lato dello strumento.
- **Waiting...** (In attesa...): se si cerca di avviare una nuova corsa quando l'avvio scaglionato non è disponibile, lo stato cambia in Waiting... (In attesa...) e la data e l'ora mostrano l'ora indicativa in cui lo strumento sarà pronto per la nuova corsa. Lo strumento prosegue con l'impostazione della corsa quando è disponibile l'avvio scaglionato.

Quando si imposta una nuova corsa, il software automaticamente mette in pausa o riprende la corsa sulla cella a flusso adiacente, se necessario. Quando in pausa, il sistema viene messo automaticamente in uno stato sicuro.

Procedura

1. Dalla schermata Home, selezionare **Sequence** (Sequenziamento), quindi selezionare **A** o **B**.
Il lato selezionato deve essere il lato attualmente inattivo.
2. Attendere che la corsa sulla cella a flusso adiacente sia in pausa. Per cancellare la nuova corsa e impedire la messa in pausa, selezionare **Cancel** (Annulla).
Se la corsa adiacente sta eseguendo la generazione di cluster, la risintesi paired-end, l'imaging o il lavaggio, il software completa la fase in corso prima della messa in pausa.
3. Quando la corsa adiacente è messa in pausa e lo sportello della cella a flusso si apre, impostare la nuova corsa.
Dopo che è stata avviata una nuova corsa, la corsa messa in pausa riprende automaticamente.

Eliminazione di una corsa

Una volta completato il trasferimento dei dati, è possibile eliminare la corsa attuale da Process Management (Gestione processo) per liberare spazio per una corsa successiva. L'eliminazione della corsa libera CE e l'unità C senza rimuovere i file di manutenzione del sistema, incidere sulla rete o incidere sulla copia su BaseSpace Sequence Hub. Le corse che sono in corso di sequenziamento non possono essere eliminate.

1. Dal menu principale, selezionare **Process Management** (Gestione processo).
2. **[Facoltativo]** Assicurarsi che ogni processo per la corsa mostri un segno di spunta verde, indicante che il trasferimento dei dati è stato completato.
È possibile eliminare una corsa che non ha completato il trasferimento a una rete o a BaseSpace Sequence Hub, tuttavia tutti i dati della corsa andranno perduti.
3. Selezionare **Delete Run** (Elimina corsa), quindi selezionare **Yes** (Sì) per confermare.
4. Selezionare **Done** (Fatto).

Posizione rimovibile n. 30

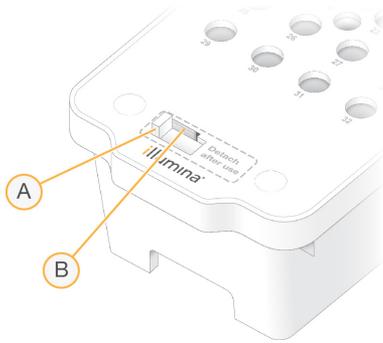
Il serbatoio in posizione n. 30 della cartuccia con cluster contiene formammide. Il serbatoio viene rimosso dalla cartuccia con cluster usata e smaltito separatamente.

- !** | **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. Durante la manipolazione di materiali pericolosi nei reagenti deve esservi una ventilazione appropriata. 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 pertinenti a livello regionale, nazionale e locale.** Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS alla pagina web support.illumina.com/sds.html.

1. Indossando un paio di guanti, spingere la linguetta in plastica bianca etichettata **Detach after use** (Rimuovere dopo l'uso) che si trova sulla destra.
2. Posizionare una mano o una superficie sotto il serbatoio e premere la linguetta in plastica trasparente verso l'etichetta Illumina per rilasciare il serbatoio da sotto la cartuccia con cluster.

i | Evitare di sovrapporre le cartucce con cluster durante la conservazione. La sovrapposizione potrebbe causare il distacco accidentale del serbatoio.

Figura 28 Posizione rimovibile n. 30



- A. Linguetta in plastica bianca per la rimozione
- B. Linguetta in plastica trasparente per il rilascio

3. Smaltire il serbatoio in base agli standard applicabili.

Lavaggio post-corsa automatico

Quando viene completato il sequenziamento, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico che richiede circa 80 minuti. Il sistema pompa ipoclorito sodio (NaOCl) allo 0,24% dalla posizione n. 17 e lo diluisce allo 0,12%. NaOCl allo 0,12% viene pompato nel reagente ExAmp e nelle posizioni della libreria, attraverso la cella a flusso, quindi ai flaconi di reagente usato. Il lavaggio risciacqua il modello dal sistema per impedire la contaminazione incrociata.

Al termine del lavaggio, il sistema viene messo in uno stato di sicurezza e il pulsante Home (Inizio) diventa attivo. Lasciare i materiali di consumo in posizione fino alla corsa successiva. Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nelle cartucce SBS e con cluster per impedire che l'aria entri nel sistema. I pescanti nella cartuccia di tamponi vengono sollevati in modo che i flaconi dei reagenti usati possano essere svuotati.

i | Se si verifica un errore durante un lavaggio post-corsa automatico, e il lavaggio post-corsa è incompleto, è richiesto un lavaggio di manutenzione.

Manutenzione

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

Il software suggerisce un lavaggio di manutenzione nei seguenti momenti:

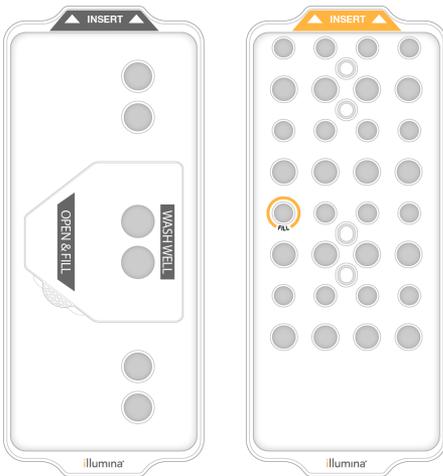
- Quando non è stata eseguita una corsa a quattro corsie con un lavaggio post-corsa negli ultimi 14 giorni.
- Quando non è stato eseguito un lavaggio post-corsa negli ultimi 14 giorni.
- Quando un lavaggio post-corsa è fallito o è incompleto.

Il lavaggio di manutenzione lava il sistema con diluizione di Tween 20 e NaOCl fornite dall'utente. Le diluizioni vengono pompate dalle cartucce di lavaggio alla cella a flusso, ai flaconi di reagenti usati e ad ogni serbatoio della cartuccia per lavare tutti i pettini di aspirazione. Il lavaggio dura circa 80 minuti.

Un lavaggio di manutenzione richiede una cartuccia di tamponi usata e la cartuccia di lavaggio SBS, la cartuccia di lavaggio con cluster e la cella a flusso di lavaggio a quattro corsie fornita con lo strumento (o una cella a flusso a quattro corsie usata). Analogamente alle cartucce di reagente, le cartucce di lavaggio sono codificate in base al colore per evitare errori di caricamento. La cartuccia di lavaggio SBS presenta un pozzetto centrale per la diluizione di Tween 20. La diluizione di NaOCl viene aggiunta a un serbatoio sulla cartuccia di lavaggio con cluster.

 | Se i flaconi di reagenti usati non vengono svuotati si potrebbe verificare un lavaggio terminato e una fuoriuscita, che potrebbe danneggiare lo strumento e porre un rischio di sicurezza.

Figura 29 Cartuccia di lavaggio SBS (sinistra) e cartuccia di lavaggio con cluster (destra)



Preparazione della soluzione di lavaggio

1. Dispensare 400 ml di acqua da laboratorio in un flacone per centrifuga da 500 ml.
2. Dispensare 0,2 ml di Tween 20 al 100 % per ottenere una soluzione di lavaggio di almeno 400 ml di Tween 20 allo 0,05 %.

L'utilizzo di una diluizione di Tween 20 appena preparata limita l'introduzione di contaminanti nel sistema di fluidica.

3. Capovolgere per miscelare.
4. Rimuovere il coperchio dal pozzetto centrale della cartuccia di lavaggio SBS.
5. Aggiungere la soluzione di lavaggio nel pozzetto centrale. Riempire fino alla linea MIN FULL VOLUME (Volume riempimento minimo), che indica il volume minimo richiesto.

Gli altri serbatoi rimangono vuoti.

Figura 30 Centrare il pozzetto riempito fino alla linea MIN FULL VOLUME (Volume riempimento minimo)

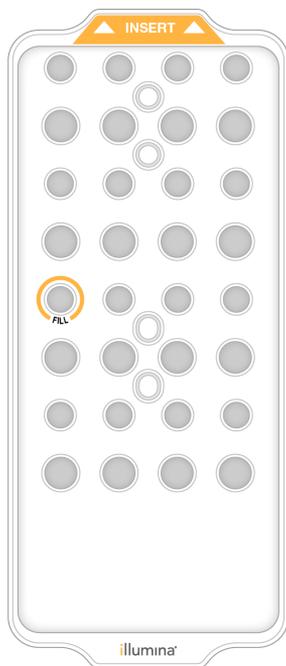


6. Combinare i volumi seguenti in una provetta per centrifuga da 30 ml per preparare 20 ml di NaOCl allo 0,25 %:
 - NaOCl di grado reagente al 5 % (1 ml)
 - Acqua deionizzata (19 ml)

- ! Utilizzare solo NaOCl di grado reagente. Evitare prodotti con candeggina per uso generico in quanto possono contenere composti di ammoniaca che potrebbero causare corse con una bassa percentuale di letture che attraversano il filtro.

7. Capovolgere per miscelare.
8. Aggiungere 5 ml alla cartuccia di NaOCl allo 0,25 % di grado reagente.
La posizione viene indicata come Fill (Riempita) cerchiata di arancione. Tutti gli altri serbatoi rimangono vuoti.

Figura 31 Posizione di NaOCl allo 0,25 %



Caricamento della cella a flusso di lavaggio

1. Rimuovere qualsiasi oggetto dalla superficie dello strumento.
Mantenere la superficie libera durante il lavaggio di manutenzione ed evitare di appoggiarsi allo strumento. Premere sullo sportello della cella a flusso per aprirla. Questa azione arresta il lavaggio.

2. Dalla schermata iniziale selezionare **Wash** (Lavaggio) quindi selezionare il lato da lavare:

- **A+B**: lava entrambi i lati simultaneamente.
- **A**: lava solo il lato A.
- **B**: lava solo il lato B.

Il software avvia la serie di schermate relative al lavaggio.

i | Un lavaggio di manutenzione per un singolo lato può essere avviato solo quando l'altro lato è inattivo o sta eseguendo i cicli di lettura SBS. Il tempo di avvio scaglionato di NVCS indica la disponibilità per l'avvio di una nuova corsa o di un lavaggio. Consultare [Avvio di corse scaglionate alla pagina 65](#).

3. Selezionare **OK** per accettare l'avvertenza e aprire lo sportello della cella a flusso.
4. Se non è ancora presente, caricare una cella a flusso di lavaggio o una cella a flusso a 4 corsie usata.
5. Selezionare **Close Flow Cell Door** (Chiudi lo sportello della cella a flusso).
Lo sportello si chiude, i sensori e l'identificazione RFID vengono verificati e l'ID della cella a flusso appare sullo schermo.

Caricamento delle cartucce di lavaggio

Un lavaggio di manutenzione richiede cartucce di lavaggio. Non utilizzare le cartucce SBS e con cluster usate.

1. Aprire gli sportelli dello scomparto dei liquidi, quindi aprire lo sportello del vano refrigerato per i reagenti.
2. Rimuovere le cartucce di reagenti con cluster e SBS usate. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard vigenti nella propria regione.
Per il corretto smaltimento della posizione n. 30 della cartuccia con cluster, vedere [Posizione rimovibile n. 30 alla pagina 66](#).
3. Caricare le cartucce di lavaggio nel cassetto del vano refrigerato per i reagenti in modo che le etichette **Insert** (Inserisci) siano rivolte verso la parte posteriore dello strumento:
 - Posizionare la cartuccia SBS (etichetta grigia) nella posizione sinistra.
 - Posizionare la cartuccia con cluster (etichetta arancione) nella posizione destra.
4. Fare scorrere il cassetto nel vano refrigerato per i reagenti, quindi chiudere lo sportello del vano refrigerato.
I sensori vengono verificati e i RFID per ciascuna cartuccia vengono scansionati e visualizzati sulla schermata.
5. Aprire il cassetto dei tamponi.
6. Se non è già presente, caricare una cartuccia di tamponi usata.

Svuotamento dei flaconi di reagenti usati

Utilizzare le seguenti istruzioni per svuotare i flaconi di reagenti usati con *ogni* lavaggio di manutenzione. Anche se il sistema è configurato per far defluire i reagenti usati all'esterno, il flacone piccolo raccoglie i reagenti usati e il flacone grande deve essere in posizione.

 **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. Durante la manipolazione di materiali pericolosi nei reagenti deve esservi una ventilazione appropriata. 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 pertinenti a livello regionale, nazionale e locale.** Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS alla pagina web support.illumina.com/sds.html.

1. Rimuovere il flacone piccolo dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard vigenti nella propria regione. Mantenere i contenuti separati dai contenuti di altri flaconi.
2. Riportare il contenitore piccolo dei reagenti usati nell'alloggiamento.
3. Rimuovere il flacone grande dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.
4. Riportare il flacone grande dei reagenti usati nel cassetto dei tamponi.
5. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
6. Chiudere il cassetto dei tamponi, quindi chiudere gli sportelli dello scomparto dei liquidi. Vengono verificati i sensori e i RFID. La schermata visualizza l'ID di ciascun componente di lavaggio.

Avvio del lavaggio

1. Selezionare la casella di controllo per confermare che entrambi i flaconi di reagenti usati sono vuoti, quindi selezionare **Start Wash** (Avvia lavaggio).

Il lavaggio si avvia e viene visualizzato il tempo stimato per il completamento del lavaggio.

 Se i flaconi di reagenti usati non vengono svuotati si potrebbe verificare un lavaggio terminato e una fuoriuscita, che potrebbe danneggiare lo strumento e porre un rischio di sicurezza.

2. Al termine del lavaggio, selezionare **Home** (Inizio).
3. Lasciare i materiali di consumo in posizione fino alla corsa successiva. I pescanti rimangono nelle cartucce SBS e con cluster per impedire che l'aria entri nel sistema. I pescanti nella cartuccia di tamponi vengono sollevati in modo che i flaconi di reagenti usati possano essere svuotati.

Aggiornamenti del software

Gli aggiornamenti del software sono disponibili per NVCS v1.4 o versioni successive. Gli aggiornamenti del software possono essere scaricati e installati da NVCS. La verifica automatica della disponibilità degli aggiornamenti del software è attivata per impostazione predefinita. In Settings (Impostazioni) è possibile attivare o disattivare gli aggiornamenti automatici.

i | NovaSeq 6000 deve essere connesso a Internet per verificare la disponibilità degli aggiornamenti del software e per scaricarli.

La verifica automatica della disponibilità degli aggiornamenti viene eseguita ogni 24 ore. Quando è disponibile un aggiornamento, viene visualizzata una notifica nel menu principale. La notifica di aggiornamenti è visibile a tutti gli utenti, ma solo un amministratore può scaricare e installare gli aggiornamenti.

Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, prima di avviare la preparazione dei campioni o dei materiali di consumo, assicurarsi che la versione di NVCS soddisfi i requisiti minimi per il software elencati nella tabella seguente.

Tabella 12 Requisiti minimi per il software

Cella a flusso	Versione software minima per v1.0 Reagent Kit	Versione software minima per V1.5 Reagent Kit
SP	1,6	1,7
S1	1.3.1	1,7
S2	Tutte	1,7
S4	1.2.0	1,7

i | Non è possibile aggiornare il software se è in corso: un lavaggio, una corsa di sequenziamento, l'impostazione di una corsa o il trasferimento di file alla cartella di output o a BaseSpace Sequence Hub. Se è in corso un flusso di lavoro NovaSeq Xp, prima di aggiornare il software, aspettare che le librerie siano state caricate sulla cella a flusso e il sequenziamento sia stato completato.

Per verificare manualmente la disponibilità degli aggiornamenti o per scaricare e installare un aggiornamento, eseguire le seguenti operazioni.

1. Dal menu principale, selezionare **Software Update** (Aggiornamento software). Viene visualizzata la schermata Software Update (Aggiornamento software) che fornisce le note sulla release per l'aggiornamento disponibile. Se la verifica automatica della disponibilità degli aggiornamenti del software non è attivata, è possibile verificarli manualmente oppure attivare la verifica automatica.
2. Per scaricare e installare l'aggiornamento, selezionare la casella di controllo per confermare che il download e l'installazione richiede circa 30 minuti.

3. Selezionare **Download and Install** (Scarica e installa).

Al termine del download, NVCS si chiude e viene avviato il programma di installazione. Seguire le istruzioni per programma di installazione per completare l'installazione.

Se si verificano errori durante il download o l'installazione, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Risoluzione dei problemi

Risorse per la risoluzione dei problemi

Per domande tecniche, visitare la [pagina di supporto Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 sul sito web Illumina](#). La pagina di supporto fornisce l'accesso alla documentazione, ai download e alle domande frequenti. Per accedere ai bollettini di supporto, accedere al proprio account MyIllumina.

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina. Per semplificare la risoluzione dei problemi, prendere in considerazione la possibilità di condividere un link al riepilogo corsa in BaseSpace Sequence Hub con l'Assistenza Tecnica Illumina.

File di risoluzione dei problemi

File principale	Cartella	Descrizione
File informazioni corsa (RunInfo.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le impostazioni della corsa: <ul style="list-style-type: none"> • Numero di cicli per la corsa • Numero di letture per la corsa • Se la lettura è indicizzata • Numero di strisce e tile sulla cella a flusso
File parametri della corsa (RunParameters.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene il nome della corsa e le informazioni sui parametri della corsa e i componenti della corsa, incluse le seguenti informazioni RFID: numeri di serie, numeri di lotto, date di scadenza e numeri di cataloghi.
File InterOp (*.bin)	InterOp	File report binari utilizzati per il Visualizzatore analisi di sequenziamento. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.
File di registro	Logs	I file di registro descrivono ciascuna fase eseguita dallo strumento per ciascun ciclo, inclusi i reagenti usati e contengono un elenco delle versioni software e firmware usate per la corsa. Il file denominato <code>[InstrumentName]_CurrentHardware.csv</code> elenca i numeri di serie dei componenti dello strumento.

Errori della verifica pre-corsa

Se si verifica un errore durante le verifiche pre-corsa, utilizzare le azioni seguenti per risolverlo. Se si sta impostando una corsa con doppia cella a flusso e un lato non riesce, è possibile cancellare il lato non riuscito e procedere con il lato che ha superato la verifica.

Quando una verifica pre-corsa non riesce, i RFID per la cella a flusso, i reagenti e i tamponi non sono bloccati. In questo modo i materiali di consumo possono essere utilizzati per una corsa successiva. Quando una corsa è avviata, i pescanti forano i sigilli sulle cartucce di reagenti e tutti i RFID sono bloccati.

Verifica del sistema	Motivo della mancata riuscita	Intervento raccomandato
Caricamento della cella a flusso	La cella a flusso non si attiva o il sistema non riesce a leggere il tag RFID.	Ispezionare e pulire la cella a flusso e lo stadio della cella a flusso, quindi ricaricare la cella a flusso.
Sensori	Uno sportello dello scomparto è aperto, un materiale di consumo non è stato caricato correttamente o almeno un sensore non funziona.	Selezionare Retry (Riprova) e attenersi alle indicazioni sullo schermo per risolvere l'errore.
Spazio su disco	Lo spazio su disco non è sufficiente poiché la posizione indicata della cartella di output è piena.	Utilizzare la schermata Process Management (Gestione processo) per liberare spazio su disco dalla cartella di output specificata.
Connettività del sistema	La connessione a RTA3, il sistema di fluidica o altre connessioni sono state interrotte.	Selezionare Retry (Riprova) e attenersi alle indicazioni sullo schermo per risolvere l'errore.
Allineamento	La posizione della cella a flusso impedisce l'imaging.	Attenersi alle indicazioni sullo schermo per ricaricare la cella a flusso.

Vassoio delle perdite

Alla base dello strumento si trova un vassoio delle perdite per raccogliere i reagenti o il refrigerante che gocciola e raccogliere le fuoriuscite dai flaconi di reagenti usati. In condizioni normali, il vassoio delle perdite è asciutto. Una perdita indica che si è verificato un problema con lo strumento e una fuoriuscita si verifica quando i flaconi di reagenti usati non vengono svuotati regolarmente.

Durante le verifiche precorsa, i sensori rilevano se il vassoio delle perdite contiene eventuale liquido:

- Se il vassoio delle perdite contiene liquido ma non è pieno, la corsa può proseguire ma è necessario contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
- Se il vassoio delle perdite è pieno, la corsa non può proseguire ed è necessario contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

- ! | Svuotare i flaconi di reagenti usati con *ogni corsa*. Le corse vengono arrestate quando uno dei flaconi dei reagenti usati è pieno. Una fuoriuscita da uno dei flaconi dei reagenti usati danneggia lo strumento, richiede una visita presso la sede di un rappresentante Illumina e pone rischi di sicurezza.

Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)

La tabella seguente fornisce opzioni di risoluzione dei problemi per icona N/A (Non applicabile) sulla schermata Process Management (Gestione processo):

- L'icona N/A (Non applicabile) viene visualizzata nella colonna BaseSpace e la corsa è configurata per il caricamento su BaseSpace Sequence Hub.
- L'icona N/A (Non applicabile) viene visualizzata nella colonna Network (Rete) e la corsa è configurata per il caricamento su una cartella di output sulla rete.

Stato della corsa	Azione per la risoluzione dei problemi
Una corsa è in fase di elaborazione	Chiudere la schermata Process Management (Gestione processo), attendere cinque minuti, quindi riaprire la schermata.
Una corsa non è in fase di elaborazione	Spegnere e riaccendere lo strumento, quindi riaprire la schermata Process Management (Gestione processo).

Se, dopo aver eseguito l'azione per la risoluzione dei problemi, l'icona N/A (Non applicabile) è ancora visualizzata, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Mancata riuscita di una corsa prima della generazione di cluster

Se il software non porta a termine la corsa prima dell'avvio della generazione di cluster, è possibile salvare le cartucce di reagenti, la provetta delle librerie (incluso il campione) e, se riutilizzata immediatamente, la cella a flusso per una nuova corsa. All'avvio della generazione di cluster, i pescanti forano i sigilli e i reagenti vengono trasferiti nella provetta delle librerie e nella cella a flusso, in modo che i materiali di consumo e le librerie non possano essere utilizzati per un'altra corsa.

Sono disponibili due opzioni per impostare una nuova corsa utilizzando le cartucce di reagenti, la provetta delle librerie e la cella a flusso salvata da una corsa non riuscita:

- **Set up a new run immediately** (Impostazione immediata di una nuova corsa): impostare la nuova corsa entro quattro ore dalla corsa non riuscita. Le cartucce di reagenti, la provetta delle librerie e la cella a flusso rimangono caricate.

i | Per ottenere risultati ottimali per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, avviare la nuova corsa appena possibile.

- **Set up a new run later** (Impostazione successiva di una nuova corsa): impostare la nuova corsa entro quattro ore dalla corsa non riuscita. Le cartucce di reagente e la provetta delle librerie vengono scaricate dallo strumento e conservate. I materiali di consumo salvati devono essere etichettati con la data e conservati nelle condizioni originali.

i | La cella a flusso non può essere riutilizzata e deve essere smaltita. Per ottenere una cella a flusso sostitutiva, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Impostazione di una nuova corsa da eseguire immediatamente

Se una corsa non riuscita ha utilizzato il flusso di lavoro NovaSeq Xp, avviare la nuova corsa appena possibile.

1. Quando la corsa fallisce e l'altro lato dello strumento è inattivo, riavviare lo strumento. In caso contrario, selezionare **Home** (Inizio).
2. Impostare una nuova corsa.
3. Lasciare l'attuale cella a flusso in posizione.
4. Aprire e chiudere lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e il cassetto dei tamponi per suggerire a NVCS di leggere nuovamente i RFID della cartuccia di reagenti.
Le cartucce, la provetta delle librerie e la cella a flusso possono rimanere sullo strumento fino a quattro ore dopo la mancata riuscita della corsa.
5. Svuotare i flaconi di reagenti, se necessario, e rimetterli sullo strumento.
6. Procedere con l'impostazione della corsa.

Impostazione di una nuova corsa da eseguire più tardi

1. Quando una corsa non viene portata a termine, selezionare **Home** (Inizio).
2. Impostare una nuova corsa o un lavaggio di manutenzione per rilasciare i materiali di consumo dallo strumento.
3. Quando suggerito dal software, rimuovere e conservare i seguenti materiali di consumo:
 - Tappare la provetta delle librerie e conservarla a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di tre settimane.
 - Riportare le cartucce SBS e con cluster alla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
 - Riportare la cartuccia di tampone a temperatura ambiente per la conservazione e tenerla lontano dalla luce.
Se non vengono forate, possono essere riutilizzate in una nuova corsa.
4. Selezionare **End** (Termina) per annullare la corsa o il lavaggio di manutenzione, quindi selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando.

È possibile lasciare completare il lavaggio di manutenzione piuttosto che annullarlo.

Terminazione di una corsa

Quando si termina una corsa sul sistema NovaSeq 6000 questo passaggio è *definitivo*. Il software non può riprendere la corsa o salvare i dati del sequenziamento e i materiali di consumo non possono essere riutilizzati.

1. Selezionare **End** (Termina), quindi selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando.
Se la corsa è stata terminata dopo la Read 1 (Lettura 1), il software avvia un lavaggio post-corsa automatico.
2. Se suggerito dal software, selezionare una delle seguenti opzioni di lavaggio:
 - **End Run Without Wash** (Termina corsa senza lavaggio): termina la corsa e avvia un lavaggio di manutenzione.
 - **End Run and Wash** (Termina corsa ed esegui lavaggio): termina la corsa ed esegue un lavaggio post-corsa automatico.
 - **Cancel** (Annulla): prosegue la corsa attuale.Se la corsa è stata terminata tra il completamento della generazione dei cluster e il completamento di Read 1 (Lettura 1), il software mostra le opzioni di lavaggio. In caso contrario, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico.
3. Se è stato selezionato End Run Without Wash (Termina corsa senza lavaggio), attenersi ai suggerimenti del software per impostare un lavaggio di manutenzione.

Spegnimento dello strumento

Quando lo strumento viene spento in sicurezza, vengono spenti tutti i software e i sistemi e si spegne l'alimentazione. La barra di stato passa da verde a bianca, indicando che è in corso lo spegnimento.

In circostanze normali, non è necessario spegnere lo strumento.

Uno spegnimento e un avvio completo deve essere eseguito ogni qualvolta si verifica un'interruzione del software.

Se durante l'esecuzione di NVCS viene avviato uno spegnimento o un riavvio, l'utente deve confermare questa azione prima di procedere con lo spegnimento o il riavvio.

1. Dal menu principale, selezionare **Shutdown Instrument** (Spegni strumento).
2. Quando lo schermo è vuoto, spostare l'interruttore di alimentazione che si trova nella parte posteriore dello strumento in posizione di spegnimento.
3. Attendere almeno 60 secondi prima di accendere nuovamente lo strumento.

 Non riposizionare lo strumento. Lo spostamento improprio può incidere sull'allineamento ottico e compromettere l'integrità dei dati. Per assistenza nello spostamento, rivolgersi al proprio rappresentante Illumina.

Real-Time Analysis

Descrizione generale di Real-Time Analysis

Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 utilizza RTA3, un'implementazione del software Real-Time Analysis, sul Compute Engine (CE) dello strumento. RTA3 estrae le intensità dalle immagini ricevute dalla fotocamera, esegue l'identificazione delle basi, assegna un punteggio di qualità all'identificazione delle basi, si allinea a PhiX e riporta i dati in file InterOp per la visualizzazione in Sequencing Analysis Viewer.

Per ottimizzare il tempo di elaborazione, RTA3 archivia le informazioni in memoria. Se RTA3 viene terminato, l'elaborazione non riprende e tutti i dati della corsa elaborata archiviati in memoria vengono persi.

Input RTA3

RTA3 richiede immagini di tile contenute nella memoria locale del sistema per l'elaborazione. RTA3 riceve informazioni e comandi di esecuzione da NVCS.

Output RTA3

Le immagini per ciascun canale colore sono passate in memoria a RTA3 come tile. In base a queste immagini, RTA3 produce output sotto forma di un set di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate e di file filtro. Tutti gli altri output sono file di output di supporto.

Tipo di file	Descrizione
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata viene inclusa in un file di identificazione delle basi concatenato (*.cbcl). Le tile appartenenti alla stessa corsia e superficie sono aggregate in un file *.cbcl per ciascuna corsia e superficie.
File filtro	Ciascuna tile produce un file filtro (*.filter) che specifica se un cluster ha attraversato il filtro.
File posizione cluster	I file posizione cluster (*.locs) contengono le coordinate X, Y per ciascun cluster in una tile. Un file posizione cluster è generato per ciascuna corsia.

I file di output sono utilizzati per l'analisi a valle in BaseSpace Sequence Hub. In alternativa, utilizzare il software di conversione bcl2fastq per la conversione FASTQ e soluzioni di analisi di terze parti. I file NovaSeq richiedono bcl2fastq2 Conversion Software v2.19, o versione successiva. Per la versione più recente di bcl2fastq2, visitare la [pagina dei download di bcl2fastq](#) sul sito web Illumina.

RTA3 fornisce metriche in tempo reale della qualità della corsa sotto forma di file InterOp, ossia output binari che contengono metriche su tile, ciclo e a livello di lettura. La visualizzazione delle metriche in tempo reale con Sequencing Analysis Viewer richiede file InterOp. Per la versione più recente di Sequencing Analysis Viewer, visitare la [pagina dei download di Sequencing Analysis Viewer](#) sul sito web Illumina.

Gestione degli errori

RTA3 crea file di registro e li scrive nella cartella Logs (Registri). Gli errori vengono registrati in un file di testo in formato file *.log.

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

- info_00000.log riepiloga importanti eventi di una corsa.
- error_00000.log elenca gli errori che si sono verificati durante una corsa.
- warning_00000.log elenca le avvertenze che si sono verificate durante una corsa.

Tile della cella a flusso

Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso. La videocamera acquisisce una singola immagine di ciascuna striscia, che il software divide in tile per l'elaborazione di RTA3. Il numero totale di tile dipende da quante corsie, strisce e superfici sono state sottoposte a imaging sulla cella a flusso.

- Le celle a flusso SP dispongono di 312 tile.
- Le celle a flusso S1 dispongono di 624 tile.
- Le celle a flusso S2 dispongono di 1.408 tile.
- Le celle a flusso S4 dispongono di 3.744 tile.

Tabella 13 Tile della cella a flusso

Componente della cella a flusso	SP	S1	S2	S4	Descrizione
Corsie	2	2	2	4	Una corsia è un canale fisico con porte di ingresso e di uscita.
Superfici	1	2	2	2	Le celle a flusso S1, S2 e S4 sono sottoposte a imaging su due superfici: la superficie superiore e la superficie inferiore. La superficie superiore di una tile viene sottoposta a imaging per prima. La cella a flusso SP viene sottoposta a imaging solo sulla superficie inferiore.

Componente della cella a flusso	SP	S1	S2	S4	Descrizione
Strisce per corsia	2	2	4	6	Una striscia è una colonna in una corsia della cella a flusso che la videocamera cattura come un'immagine.
Tile per striscia	78	78	88	78	Una tile è una porzione di una striscia e rappresenta un'area sottoposta a imaging sulla cella a flusso.
Tile totali generate	312	624	1.408	3.744	Corsie × superfici × strisce × tile per striscia equivalgono al numero totale di tile.

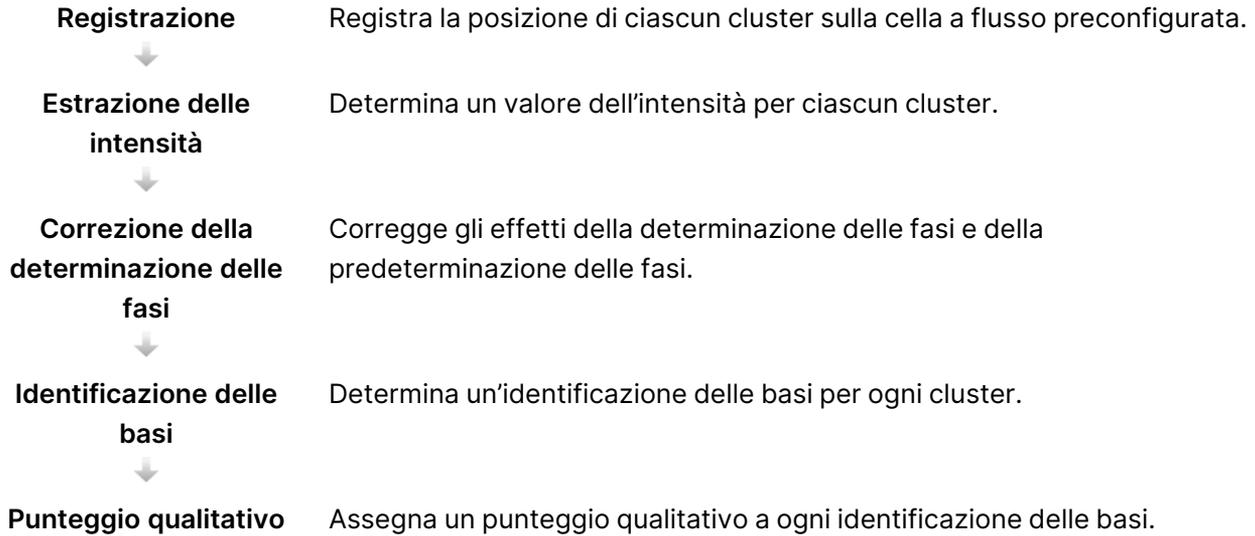
Denominazione delle tile

Il nome della tile è un numero di cinque cifre che rappresenta la posizione sulla cella a flusso. Ad esempio, il nome della tile

1_1205 indica corsia numero 1, superficie superiore, striscia numero 2, tile numero 5.

- La prima cifra rappresenta il numero della corsia:
 - 1 o 2 per una cella a flusso SP, S1 o S2.
 - 1, 2, 3 o 4 per una cella a flusso S4.
- La seconda cifra rappresenta la superficie: 1 per superficie superiore e 2 per superficie inferiore. Per la cella a flusso SP, la seconda cifra è sempre 2 perché questa cella a flusso dispone solo di una superficie inferiore.
- La terza cifra rappresenta il numero di striscia:
 - 1 o 2 per una cella a flusso SP o S1.
 - 1, 2, 3 o 4 per una cella a flusso S2.
 - 1, 2, 3, 4, 5 o 6 per una cella a flusso S4.
- Le ultime due cifre rappresentano il numero della tile. La numerazione inizia da 01 sul lato di uscita della cella a flusso, proseguendo fino a 88 o 78 sul lato di presa.
 - Da 01 a 78 per una cella a flusso SP, S1 o S4.
 - Da 01 a 88 per una cella a flusso S2.

Flusso di lavoro di Real-Time Analysis



Registrazione

La registrazione allinea un'immagine su un array esagonale di nanopozzetti su una cella a flusso preconfigurata (patterned). Grazie alle posizioni ordinate dei nanopozzetti, le coordinate X e Y per ogni cluster in una tile sono predeterminate. Le posizioni dei cluster sono scritte su un file di posizioni cluster (s.locs) per ogni corsa.

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. Sequencing Analysis Viewer consente di identificare le immagini che non sono state registrate.

Estrazione delle intensità

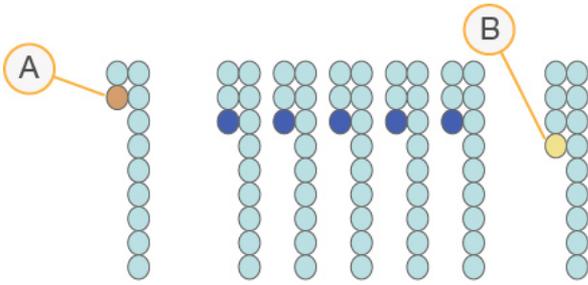
Dopo la registrazione, l'estrazione delle intensità calcola il valore dell'intensità per ogni nanopozzetto in una data immagine. Se la registrazione non riesce, l'intensità per quella tile non può essere estratta.

Correzione della determinazione delle fasi

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 si verifica quando una base rimane indietro.
- La predeterminazione delle fasi si verifica quando una base salta in avanti.

Figura 32 Determinazione delle fasi e predeterminazione delle fasi



- A. Lettura con una base nella determinazione delle fasi
- B. Lettura con una base nella predeterminazione delle fasi

RTA3 corregge gli effetti della determinazione delle fasi e della predeterminazione delle fasi che massimizza la qualità dei dati a ogni ciclo per tutta la corsa.

Identificazione delle basi

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ogni cluster di una data tile a un ciclo specifico. Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 utilizza il sequenziamento a due canali, che richiede solo due immagini per codificare i dati per quattro basi di DNA, una dal canale rosso e una dal canale verde.

Una mancata identificazione viene indicata con una N. Le mancate identificazioni si verificano quando un cluster non attraversa il filtro, non viene eseguita la registrazione o un cluster si è spostato al di fuori dell'immagine.

Le intensità di ciascun cluster sono estratte dalle immagini del canale rosso e del canale verde e sono confrontate tra di loro fornendo quattro popolazioni distinte. Ogni popolazione corrisponde a una base. Il processo di identificazione delle basi determina a quale popolazione appartiene ciascun cluster.

Figura 33 Visualizzazione delle intensità dei cluster

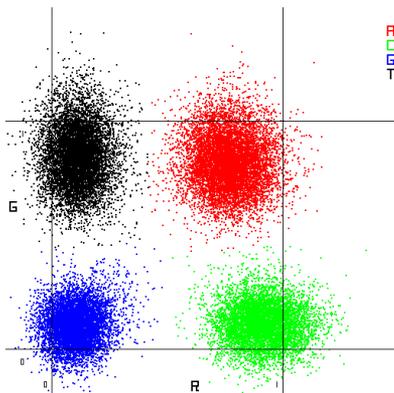


Tabella 14 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

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

Cluster che attraversano il filtro

Durante la corsa, RTA3 filtra i dati non elaborati e rimuove le letture che non soddisfano la soglia per la qualità dei dati. I cluster sovrapposti o di bassa qualità vengono rimossi.

Per l'analisi a due canali, RTA3 utilizza un sistema basato sulla popolazione per determinare il valore chastity (misurazione della purezza dell'intensità) di un'identificazione delle basi. I cluster attraversano il filtro (PF) quando non più di un'identificazione delle basi nei primi 25 cicli presenta un valore chastity inferiore alla soglia fissata. L'allineamento PhiX viene eseguito al ciclo 26 su un sottogruppo di tile per i cluster che hanno attraversato il filtro. I cluster che non attraversano il filtro non sono identificati come basi e non vengono allineati.

Punteggi qualitativi

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. Dopo la determinazione del punteggio qualitativo, i risultati sono registrati nei file per l'identificazione delle basi (*.cbcl).

Il punteggio qualitativo fornisce in modo succinto le probabilità di piccoli errori. I punteggi qualitativi sono rappresentati come $Q(X)$, dove X è il punteggio. La tabella seguente illustra la relazione fra un 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)

Punteggio qualitativo e report

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

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

RTA3 assegna a ciascuna identificazione delle basi uno di tre punteggi qualitativi in base all'affidabilità dell'identificazione delle basi. Questo modello per riportare i punteggi qualitativi riduce lo spazio di archiviazione e i requisiti di ampiezza di banda senza incidere sull'accuratezza o sulle prestazioni.

Per maggiori informazioni sul punteggio qualitativo, consultare *Punteggi qualitativi e software RTA3 per il sistema NovaSeq™ 6000 (Pub.N.770-2017-010)*.

Cartelle e file di output

Struttura della cartella di output del sequenziamento

NVCS genera automaticamente il nome della cartella di output.

 **Config:** le impostazioni di configurazione per la corsa.

 **Logs:** i file di registro che descrivono le fasi operative, l'analitica dello strumento e gli eventi di RTA3.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]:** i file delle identificazione delle basi (*.cbcl) aggregati in un file per corsia, superficie e ciclo.

 `s.locs`: file delle posizioni dei cluster per la corsa.

 **InterOp:** file binari utilizzati da Sequencing Analysis Viewer.

 **Recipe:** il file della ricetta specifico per la corsa.

 **Thumbnail Images:** le immagini in miniatura ogni decima tile.

 **LIMS:** il file di impostazione della corsa (*.json), se applicabile.

 `RTA3.cfg`

 `RunInfo.xml`

 `RunParameters.xml`

 `RTAComplete.txt`

 `CopyComplete.txt`

 `SampleSheet.csv`: foglio campioni o altri file allegati, se applicabile.

 `SequenceComplete.txt`

File di output per il sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	<p>Ciascun cluster analizzato viene incluso in un file delle identificazione delle basi, aggregato in un file per ciclo, corsia e superficie. Il file aggregato contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato per ogni cluster. I file delle identificazioni delle basi sono utilizzati da BaseSpace Sequence Hub o da bcl2fastq2.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface]cbcl, ad esempio L001_1.cbcl</p>
File posizione cluster	<p>Per ciascuna cella a flusso, un file binario della posizione dei cluster contiene le coordinate XY per i cluster in una tile. Un layout esagonale che corrisponde al layout dei nanopozzetti della cella a flusso predefinisce le coordinate.</p> <p>Data\Intensities s_[lane].locs</p>
File filtro	<p>I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. I file filtro sono generati al ciclo 26 utilizzando 25 cicli di dati. Per ogni tile, viene generato un file filtro.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter</p>
File InterOp	<p>File report binari utilizzati per il Visualizzatore analisi di sequenziamento. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.</p> <p>Cartella InterOp</p>
File informazioni corsa	<p>Elenca il nome della corsa, il numero di cicli in ciascuna lettura, se la lettura è un Index Read (Lettura Indici) e il numero di strisce e tile sulla cella a flusso. Il file informazioni corsa viene creato all'inizio della corsa.</p> <p>[Root folder],RunInfo.xml</p>
File immagini in miniatura	<p>In caso di abilitazione, viene creata un'immagine in miniatura per ogni decima tile in ciascun canale colore (rosso e verde).</p> <p>Thumbnail_Images\L001\C[X.1]: i file sono conservati in una sottocartella per ciascun ciclo.</p> <p>s_[corsia]_[tile]_[canale].jpg: l'immagine in miniatura include il numero della tile.</p>

Sicurezza Windows

Requisiti della password

La seguente tabella identifica i criteri richiesti per la password per il computer di controllo. Il software suggerisce di modificare la password al primo accesso.

Tabella 15 Criteri password predefiniti

Criterio	Impostazione sicurezza
Applicare cronologia password	Ricordate cinque password
Maximum password age (Tempo massimo per la password)	180 giorni
Minimum password age (Tempo minimo per la password)	0 giorni
Lunghezza minima per la password	10 caratteri
La password deve corrispondere ai requisiti di complessità	Disattivato
Conservare le password utilizzando la crittografia reversibile	Disattivato

Firewall Windows

Il firewall di Windows protegge il computer di controllo filtrando il traffico in entrata e rimuovendo potenziali minacce. Il firewall è attivato per impostazione predefinita in modo tale da bloccare tutte le connessioni in entrata. Mantenere attivato il firewall e permettere le connessioni in entrata. Consultare *Guida alla preparazione della sede di installazione per la serie NovaSeq (documento n. 1000000019360)* per ulteriori informazioni sulle connessioni in uscita.

Enhanced Mitigation Experience Toolkit

Lo strumento Enhanced Mitigation Experience Toolkit (EMET) impedisce lo sfruttamento delle vulnerabilità del software e fornisce la funzione Certificate Trust (Certificato attendibile). Questa funzione rileva e arresta gli attacchi di certificati malevoli.

Software Restriction Policies

La funzione Criteri di restrizione software (SRP) di Windows utilizza criteri per consentire l'esecuzione solo di determinati software. Per NovaSeq 6000, i criteri SRP si basano sui certificati, sui nomi e sulle estensioni dei file e sulle directory.

Per impostazione predefinita, i criteri di restrizione software vengono attivati per impedire l'esecuzione di software indesiderati sul computer di controllo. Un tecnico informatico o un amministratore di sistema può aggiungere o rimuovere i criteri per personalizzare il livello di sicurezza. Se il sistema viene aggiunto a un dominio, il Group Policy Object (GPO) locale potrebbe modificare automaticamente i criteri e disattivare SRP.

 | La disattivazione del criterio di restrizione software impedisce la protezione che fornisce. La modifica dei criteri sovrascrive le protezioni predefinite.

Criteri SRP consentiti

Su Sistema di sequenziamento NovaSeq 6000, i valori predefiniti di SRP consentono i seguenti criteri.

Certificati

DigitalSystems

Illumina, Inc.

NovaSeq

File eseguibili

Portmon.exe

Procmon.exe

Procmon64.exe

Tcpview.exe

Estensioni file

*.bin

*.cbcl

*.cfg

*.config

*.csv

*.dat

*.focus

*.imf1

*.ims

*.jpg

*.json

*.lnk

Estensioni file

- *.locs
- *.log
- *.manifest
- *.sdf
- *.tif
- *.txt
- *.xml

Directory

```
%HKEY_LOCAL_
MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%
%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows
NT\CurrentVersion\SystemRoot%
C:\CrashDumps\*
C:\Illumina\*
C:\Illumina Maintenance Logs\*
C:\LocalSymbols\*
C:\Program Files (x86)\Chromium\Application\*
C:\Program Files (x86)\EMET 5.5\*
C:\Program Files (x86)\Illumina\*
C:\Program Files (x86)\Internet Explorer\*
C:\Program Files (x86)\LibreOffice 5\*
C:\Program Files\Illumina\*
C:\ProgramData\Illumina\*
C:\ProgramData\Package Cache\*
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix\*
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs\*
C:\Users\sbsuser\Desktop\FSE turn over to customer.bat
D:\Illumina\*
```

Aggiunta e rimozione dei criteri SRP

L'aggiunta o la rimozione dei criteri SRP consente di personalizzare la sicurezza del sistema. La modifica dei criteri richiede lo spegnimento temporaneo di SRP. Per istruzioni su come aggiungere e rimuovere criteri SRP, consultare [Sicurezza e rete](#).

Considerazione sulla modalità di ricerca di NovaSeq 6000Dx

Introduzione

Il sistema di sequenziamento NovaSeq 6000Dx dispone di due modalità di funzionamento separate, la modalità diagnostica *in vitro* (In Vitro Diagnostic, IVD) e la modalità solo a scopo di ricerca (RUO). In modalità RUO, è possibile creare una corsa manualmente o scegliere una corsa predefinita da più origini.

Illumina Run Manager è solo una funzione di NovaSeq 6000Dx Instrument. Per istruzioni sulla creazione di una corsa pianificata in Illumina Run Manager o sull'utilizzo della modalità IVD, consultare *Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument* (n. documento 200010105).

In modalità manuale RUO, le istruzioni contenute in questa guida sono applicabili a NovaSeq 6000Dx Instrument con le seguenti eccezioni:

- Compatibilità dei materiali di consumo
- Indicatori di modalità dello strumento
- Procedure per il lavaggio di manutenzione

Opzioni di pianificazione delle corse NovaSeq 6000Dx

Sono disponibili diverse opzioni per pianificare una corsa su NovaSeq 6000Dx Instrument.

- **Manual** (Manuale): immettere manualmente le informazioni sulla corsa. Disponibile solo quando lo strumento è in modalità RUO. Fare riferimento a [Impostazione di una corsa di sequenziamento alla pagina 55](#).
- **LIMS**: selezionare una corsa da un server LIMS o da un LIMS basato su file. Disponibile solo quando lo strumento è in modalità RUO. Fare riferimento a [Modalità di impostazione della corsa alla pagina 30](#).
- **Illumina Run Manager**: pianificare una corsa su Server DRAGEN utilizzando Illumina Run Manager. Disponibile in modalità IVD o RUO. Per ulteriori informazioni su questo metodo, Server DRAGEN e Illumina Run Manager, consultare *Documentazione tecnica per NovaSeq 6000Dx Instrument* (n. documento 200010105).

Compatibilità dei materiali di consumo NovaSeq 6000Dx

L'esecuzione di una corsa di sequenziamento su NovaSeq 6000Dx Instrument richiede un NovaSeq 6000 Kit o un NovaSeq 6000Dx Kit monouso, una cartuccia tampone e una provetta della libreria. È possibile utilizzare i materiali di consumo NovaSeq 6000Dx per una corsa in modalità RUO. I materiali di consumo NovaSeq 6000 non possono essere utilizzati per un ciclo in modalità IVD.

Indicatori di modalità dello strumento NovaSeq 6000Dx

NovaSeq 6000Dx Instrument è dotato di un tasto di alternanza nella schermata iniziale che può essere utilizzato per passare dalla modalità RUO alla modalità IVD e viceversa. Quando NovaSeq 6000Dx Instrument passa alla modalità RUO, utilizzare i pulsanti di opzione per selezionare la modalità pianificata o la modalità manuale.

La seguente tabella elenca gli indicatori di modalità dello strumento sulla schermata iniziale.

Modalità	Barra dei colori
Modalità IVD	Grigio
Modalità RUO	Blu

Risorse e Bibliografia

Le [pagine di supporto per NovaSeq](#) sono disponibili sul sito web Illumina e forniscono risorse aggiuntive. Controllare sempre le pagine di supporto per verificare le ultime versioni disponibili.

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v18	Aprile 2025	<p>Aggiornamento dei riferimenti alle informazioni sugli account del sistema operativo.</p> <p>Aggiunta di indicazioni che le cartucce SBS e con cluster possono essere ricongelate fino a una volta dopo lo scongelamento.</p> <p>Aggiunta della guida per la risoluzione dei problemi relativi agli errori di caricamento delle celle a flusso.</p> <p>Aggiunta di una guida per ispezionare le cartucce SBS allo scopo di verificare che non siano presenti crepe durante la rimozione dalla confezione.</p>
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v17	Settembre 2022	Aggiunta di considerazioni sulla modalità di ricerca NovaSeq 6000Dx.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v16	Giugno 2022	Rimozione di istruzioni errate per la preparazione della cartuccia del cluster.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v15	Maggio 2022	<p>Aggiunte:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Informazioni su Illumina Connected Analytics. • Il controllo pre-vuoto. • Chiarimento che DPX3 è compatibile con i kit di reagenti v1.0 e 1.5.

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v14	Settembre 2020	Aggiornati i numeri di catalogo dei kit disponibili per riflettere l'attuale offerta di kit di reagenti v1.0 e v1.5.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v13	Luglio 2020	Aggiunta di informazioni su NovaSeq 6000 Reagent Kit v1.7 e sul software v1.7 che consente di visualizzare i dettagli delle metriche per corsia in determinati campi dei dati delle metriche della corsa.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v12	Febbraio 2020	Spostamento delle informazioni su denaturazione e diluizione nel nuovo documento Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000 (documento n. 1000000106351).
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v11	Febbraio 2019	Aggiornata la tabella Plex dei pool delle librerie per il flusso di lavoro Xp.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v10	Gennaio 2019	Aggiunte le informazioni sulla cella a flusso SP. Aggiornate le tabelle sui plex dei pool delle librerie raccomandati per i flussi di lavoro Standard e Xp.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v09	Novembre 2018	Corretto il link alla pagina di supporto per NovaSeq 6000. Corretta l'avvertenza mancante.

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20020483 Documento n. 1000000019358 v08	Settembre 2018	<p>Aggiunte le informazioni per NovaSeq 6000 S4 Kit (200 cicli).</p> <p>Aggiunte le informazioni sull'account utente.</p> <p>Aggiunte le concentrazioni per il caricamento di singole celle a flusso.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'avvio di corse scaglionate.</p> <p>Aggiornate le istruzioni sull'accesso a BaseSpace.</p> <p>Aggiornate le istruzioni sulla verifica pre-corsa.</p> <p>Aggiunte note sui requisiti per la conferma dello spegnimento o del riavvio.</p> <p>Aggiunta la nota sul lavaggio post-corsa incompleto.</p> <p>Chiarite le informazioni sul lavaggio di manutenzione.</p> <p>Chiarite le informazioni sull'aggiornamento del software.</p>
Materiale n. 20020483 Documento n. 1000000019358 v07	Aprile 2018	<p>Chiarito l'utilizzo della provetta delle librerie per miscelare i reagenti nella fase di aumento dell'efficacia prima del sequenziamento.</p> <p>Aggiunta una tabella con la descrizione dei simboli presenti sui materiali di consumo o sulla confezione dei materiali di consumo.</p> <p>Aggiunta di informazioni sul servizio di monitoraggio proattivo Illumina nella sezione Modalità di impostazione della corsa.</p> <p>Aggiunta di informazioni su NovaSeq LIMS API.</p> <p>Aggiornamento delle descrizioni del software dopo il passaggio a NovaSeq Control Software v1.4.0</p> <p>Aggiornato il numero tipico di letture che attraversano il filtro per le celle a flusso S2.</p> <p>Aggiornamento delle concentrazioni di caricamento raccomandate per il flusso di lavoro NovaSeq Xp.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'apertura della confezione della cella a flusso.</p> <p>Chiarita la procedura di caricamento delle librerie sulla cella a flusso.</p> <p>Aggiunta una nota sulla disponibilità dello strumento per l'avvio di un lavaggio di manutenzione.</p> <p>Aggiunte le informazioni sul timer di conto alla rovescia per l'avvio di corse scaglionate.</p> <p>Aggiornamento delle istruzioni su come aggiungere o rimuovere i criteri SRP.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 1000000019358 v06	Febbraio 2018	<p>Aggiunta una nota nella sezione Cella a flusso per indicare che è richiesta la versione software 1.3.1 quando si utilizza una cella a flusso S1.</p> <p>Aggiornate le descrizioni e il volume standard nella tabella <i>Metodi di caricamento delle librerie</i>.</p> <p>Aggiunta un'avvertenza in <i>Componenti del kit di reagenti</i>.</p> <p>Aggiunta delle provette da 0,5 e 1,5 ml, delle punte per pipette per le pipette 20, 200, 1.000 µl nella tabella Materiali di consumo. Aggiunto il cilindro graduato alla tabella <i>Apparecchiature</i>.</p> <p>Aggiunta la sezione <i>Preparazione della cella a flusso</i> nei Capitolo 4 e 5 e spostate le fasi dal Capitolo 6 a queste sezioni.</p> <p>Aggiornato il volume totale per la cella a flusso S1 nel Capitolo 4.</p> <p>Aggiunta la tabella Plex dei pool di librerie raccomandati a <i>Creazione di un pool di librerie normalizzate</i> nel Capitolo 4.</p> <p>Aggiornata la fase <i>Scongelamento delle cartucce con cluster e SBS</i> nei Capitoli 4 e 5.</p> <p>Chiarite le istruzioni di scongelamento in <i>Preparazione della cella a flusso</i>.</p> <p>Aggiornate le istruzioni di scongelamento in <i>Concentrazioni di caricamento raccomandate per NovaSeq Xp</i></p> <p>Aggiornate la tabella Plex dei pool di librerie raccomandati in <i>Creazione di un pool di librerie normalizzate</i> nel Capitolo 5.</p> <p>Aggiunta una frase per indicare che la cella a flusso deve essere utilizzata entro 12 ore dalla rimozione dalla confezione in <i>Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp</i> e <i>Preparazione della cella a flusso</i>.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 1000000019358 v05	Dicembre 2017	<p>Aggiunto un chiarimento sulla provetta delle librerie vuota per Xp nel diagramma Flusso di lavoro di sequenziamento.</p> <p>In Denaturazione della libreria e Campione di controllo PhiX facoltativo per il flusso di lavoro Standard, aggiornati i volumi di Tris-HCl nella tabella per la fase 5.</p> <p>In Preparazione della Master Mix ExAmp per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, aggiunta di una nota dopo la fase 4 per indicare che, per ottenere i risultati migliori, è richiesto un vortex.</p> <p>In Caricamento delle librerie sulla cella a flusso per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, aggiunto un promemoria dopo la fase 3 per caricare i campioni lentamente.</p>
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v04	Ottobre 2017	<p>Aggiunto il caricamento di singole corsie all'elenco delle caratteristiche dello strumento.</p> <p>Materiali di consumo: aggiunta di NovaSeq Xp 2-Lane Kit e NovaSeq Xp 4-Lane kit. Aggiunta di NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack e NovaSeq 4-Lane Manifold Pack.</p> <p>Apparecchiature: aggiunta della stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp e delle pipette P200 per il flusso di lavoro NovaSeq Xp.</p> <p>Aggiunta del capitolo Preparazione dei materiali di consumo per il flusso di lavoro NovaSeq Xp</p> <p>Spostato Svuotamento dei flaconi dei reagenti dal capitolo Sequenziamento all'inizio dei capitoli Flusso di lavoro Standard NovaSeq e Flusso di lavoro NovaSeq Xp.</p> <p>Aggiornate la tabella Concentrazione della libreria raggruppata in pool e la tabella Concentrazioni di caricamento raccomandate per il flusso di lavoro Standard.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
<p>Materiale n. 20020483 Documento n. 1000000019358 v03</p>	<p>Settembre 2017</p>	<p>Aggiornamento delle descrizioni del software dopo il passaggio a NovaSeq Control Software v1.2, che include il supporto per le celle a flusso S1 e S4.</p> <p>Aggiunti i requisiti dello spazio su disco per una corsa con doppia cella a flusso per le celle a flusso S1 e S4.</p> <p>Definiti requisiti di assegnazione dei nomi per determinati file *.json.</p> <p>Riorganizzate le informazioni della descrizione del kit in un capitolo <i>Kit e accessori</i>. In questo capitolo sono descritte le configurazioni, i componenti e le informazioni di compatibilità per i kit di caricamento dei reagenti e delle librerie.</p> <p>Aggiunta di NovaSeq 6000 Reagent Kit ai materiali di consumo forniti dall'utente.</p> <p>Aggiornate le istruzioni di raggruppamento in pool e denaturazione delle librerie per includere le informazioni relative alle celle a flusso S1 e S4.</p> <p>Aggiornamento delle istruzioni di scongelamento delle cartucce di reagente per richiedere un bagno d'acqua di due ore per S1 e S2, nonché un bagno d'acqua di quattro ore per S4.</p> <p>Aggiornate le descrizioni della provetta delle librerie, delle cartucce di reagente e delle celle a flusso per includere i componenti di S4.</p> <p>Aggiunta una sezione sugli aggiornamenti automatici del software nel capitolo Manutenzione.</p> <p>Sostituzione del riferimento a <i>Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint (Pub. No. 970-2012-013)</i> con <i>NovaSeq Series and HiSeq X Ten Data Quality Comparison (Pub.No.770-2017-010)</i>.</p> <p>Aggiunta una nota alla fase 3 in <i>Immissione dei parametri della corsa</i> nel Capitolo 6.</p> <p>Aggiornata la sezione <i>Tile della cella a flusso</i> per includere le informazioni relative alle tile S1 e S4.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20018871 Documento n. 1000000019358 v02	Aprile 2017	<p>Aggiunte le informazioni seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Materiali di consumo forniti da Illumina richiesti per una corsa. • Condizioni di conservazione dei componenti del kit di reagenti. • Raccomandazioni per la concentrazione di caricamento della libreria. • Diluizione di NaOH per due celle a flusso. • Fase per portare la cella a flusso a temperatura ambiente prima del caricamento. • Fase di sostituzione dei guanti dopo lo svuotamento dei flaconi di reagenti. • Configurazione degli output del sistema LIMS per i sistemi LIMS di terze parti. • Convenzione per i nomi dei fogli campioni. • Icone della schermata Process Management (Gestione processo) e risoluzione dei problemi. • Appendice contenente le funzioni di sicurezza Windows e le istruzioni sulla configurazione. • Informazioni di contatto per l'Assistenza Tecnica. <p>Aumentato il tempo di scongelamento della cartuccia di reagente a quattro ore.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'aggiunta del campione di controllo PhiX per modificare il volume di aggiunta di 1 % di campione di controllo PhiX a 0,9 µl e utilizzare 10 mM di Tris-HCl, pH 8.5 per diluire 10 nM di campione di controllo PhiX.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per la pulizia della cella a flusso e del piano portacelle solo quando sono visibili particelle.</p> <p>Aggiornata la frequenza del lavaggio di manutenzione ogni 14 giorni.</p> <p>Riorganizzate e consolidate le istruzioni sulla preparazione dei materiali di consumo per migliorare la continuità.</p> <p>Ridenominati gli sportelli in sportelli dello scomparto dei liquidi.</p>

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20018406 Documento n. 1000000019358 v01	Marzo 2017	Corretto il nome della colonna sulla schermata Process Management (Gestione processo) in Sequencing (Sequenziamento).
Materiale n. 20015871 Documento n. 1000000019358 v00	Febbraio 2017	Versione iniziale.



Illumina, Inc.
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 per uso di ricerca. Non usare in procedure diagnostiche.

© 2025 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina[®]