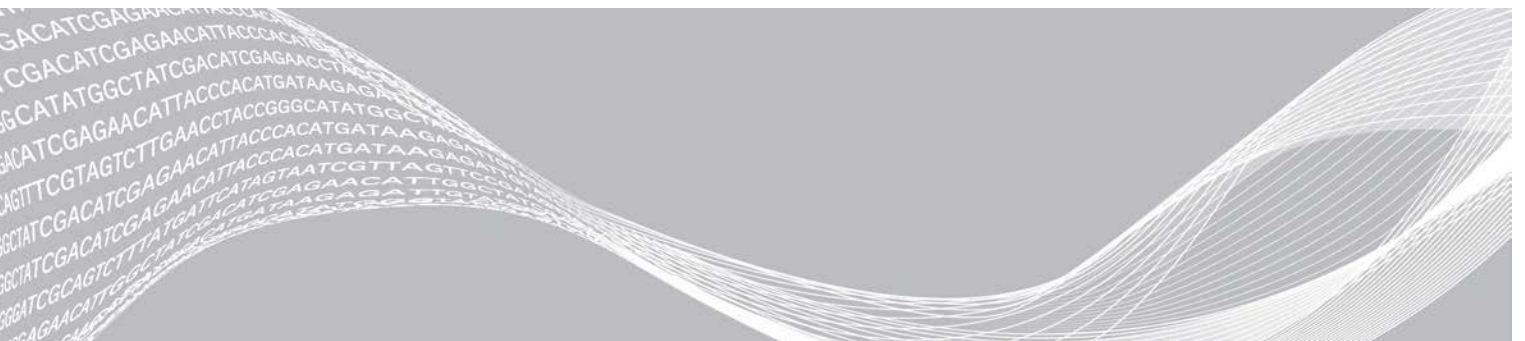


# MiniSeq

## Guida del sistema



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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina Web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20014309 Documento n. 1000000002695 v05	Aprile 2021	Cambiato l'indice da 8 cicli a 10 cicli.
Materiale n. 20014309 Documento n. 1000000002695 v04	Settembre 2020	Aggiornate le informazioni sulla concentrazione di caricamento e sul software per includere i kit rapidi.
Materiale n. 20014309 Documento n. 1000000002695 v03	Febbraio 2020	Aggiornate le informazioni sul flusso di lavoro per le opzioni di corsa Manual (Manuale) e Local Run Manager. Aggiornati i genomi preinstallati: rimosso <i>Bacillus_cereus_ATCC_10987</i> e aggiunto HumanRNAFusion. Rimosse le informazioni su BaseSpace Onsite in quanto non è più supportato. Modifiche di minore entità al testo.
Materiale n. 20014309 Documento n. 1000000002695 v02	Marzo 2018	Aggiunte informazioni sul servizio di monitoraggio proattivo Illumina nella sezione Configurazione delle impostazioni del sistema. Rimossi nome utente e password predefiniti richiesti per l'accesso al sistema operativo. Illumina raccomanda di utilizzare le credenziali specifiche per il laboratorio. Modifiche di minore entità al testo.
Materiale n. 20014309 Documento n. 1000000002695 v01	Settembre 2016	Aggiornate le descrizioni del software a MiniSeq Control Software v1.1.8, che include la modalità demo. Aggiornata la durata del lavaggio post-corsa automatico a 60 minuti. Aggiunta alle istruzioni una fase di configurazione del server per selezionare BaseSpace per l'analisi. Annotato che le unità mappate non sono supportate dal software Local Run Manager.
Materiale n. 20002370 Documento n. 1000000002695 v00	Gennaio 2016	Versione iniziale.

# Sommario

Capitolo 1 Descrizione generale .....	1
Introduzione .....	1
Risorse aggiuntive .....	1
Componenti dello strumento .....	2
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento .....	5
Database e genomi preinstallati .....	7
Capitolo 2 Informazioni preliminari .....	8
Avvio dello strumento .....	8
Personalizzazione delle impostazioni del sistema .....	9
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente .....	11
Capitolo 3 Sequenziamento .....	12
Introduzione .....	12
Preparazione dei materiali di consumo .....	13
Preparazione delle librerie per il sequenziamento .....	14
Impostazione di una corsa di sequenziamento .....	15
Monitoraggio del progresso della corsa .....	24
Lavaggio post-corsa automatico .....	25
Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 9 .....	26
Capitolo 4 Manutenzione .....	28
Introduzione .....	28
Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento .....	28
Aggiornamenti del software .....	31
Appendice A Risoluzione dei problemi .....	34
File di risoluzione dei problemi .....	34
Errori della verifica automatica .....	35
Errori di RTA .....	37
Flusso di lavoro di reibridazione .....	37
Verifica del sistema .....	39
Impostazioni della configurazione della rete .....	41
Genomi personalizzati .....	43
Spegnimento dello strumento .....	43
Appendice B Real-Time Analysis .....	44
Descrizione generale di Real-Time Analysis .....	44
File di input e output .....	44
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis .....	45
Appendice C File di output .....	50

File di output del sequenziamento .....	50
Struttura della cartella di output del sequenziamento .....	51
Requisiti dei file di input dell'analisi .....	51
Indice .....	52
Assistenza Tecnica .....	55

# Capitolo 1 Descrizione generale

Introduzione .....	1
Risorse aggiuntive .....	1
Componenti dello strumento .....	2
Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento .....	5
Database e genomi preinstallati .....	7

## Introduzione

Il sistema MiniSeq™ Illumina® fornisce la tecnologia di sequenziamento di elevata qualità Illumina, standard nel settore, con la praticità di un sistema da banco economico e di facile utilizzo.

## Caratteristiche

- ▶ **Sequenziamento di elevata qualità:** il sistema MiniSeq consente di ottenere genoma piccolo, amplicone, arricchimento mirato e sequenziamento dell'RNA utilizzando bassi volumi delle librerie.
- ▶ **Software del sistema MiniSeq:** il sistema MiniSeq comprende un gruppo di software integrati che controlla le operazioni dello strumento, elabora le immagini e genera le identificazioni delle basi. Il gruppo di software comprende software di analisi dei dati integrata sullo strumento e strumenti di trasferimento dei dati utilizzando altre opzioni, quali BaseSpace Sequence Hub.
  - ▶ **Analisi dei dati integrata sullo strumento:** il software Local Run Manager analizza i dati della corsa in base al modulo di analisi indicato per la corsa. Nel software è incluso un gruppo di moduli di analisi.
  - ▶ **Integrazione con 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. I file di output sono trasferiti in tempo reale a BaseSpace Sequence Hub per l'analisi.
- ▶ **Praticità del caricamento della cella a flusso:** un meccanismo a morsetti posiziona la cella a flusso quando viene caricata sullo strumento. Una cartuccia di reagenti monouso e precaricata fornisce i reagenti necessari per una corsa e per il successivo lavaggio dello strumento. La cella a flusso e la cartuccia di reagenti include l'identificazione integrata che consente il monitoraggio accurato.

## Risorse aggiuntive

Le [pagine di supporto del sistema MiniSeq](#) sul sito Web Illumina forniscono risorse aggiuntive su software, formazione, prodotti compatibili e la seguente documentazione. Controllare sempre le pagine di supporto per verificare le ultime versioni disponibili.

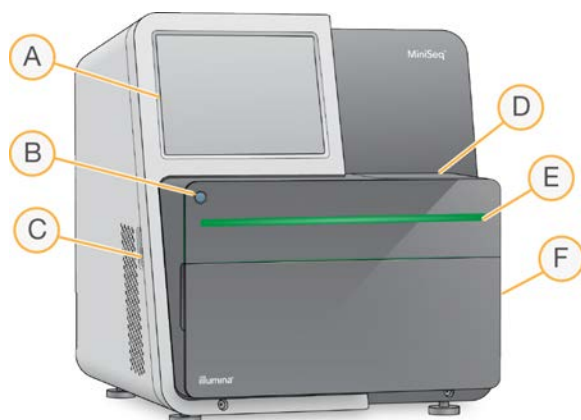
Risorsa	Descrizione
<a href="#">Custom Protocol Selector</a>	Una procedura guidata per creare documentazione end-to-end personalizzata per il metodo di preparazione delle librerie, i parametri della corsa e il metodo di analisi utilizzati per la corsa di sequenziamento.
<a href="#">Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema MiniSeq (documento n. 100000002696)</a>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
<a href="#">Guida sulla sicurezza e conformità del sistema MiniSeq (documento n. 100000002698)</a>	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.

Risorsa	Descrizione
<i>Guida alla conformità del modulo del lettore RFID (documento n. 1000000002699)</i>	Fornisce informazioni sul lettore RFID nello strumento, certificazioni di conformità e considerazioni relative alla sicurezza.
<i>MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000002697) (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie del sistema MiniSeq)</i>	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX facoltativo.
<i>Local Run Manager Software Guide (documento n. 1000000002702) (Guida del software Local Run Manager)</i>	Fornisce informazioni sull'utilizzo del software Local Run Manager e sulle opzioni di analisi disponibili.

## Componenti dello strumento

Il sistema MiniSeq include un monitor touch screen, una barra di stato, uno scomparto della cella a flusso e uno scomparto reagenti.

**Figura 1** Componenti dello strumento

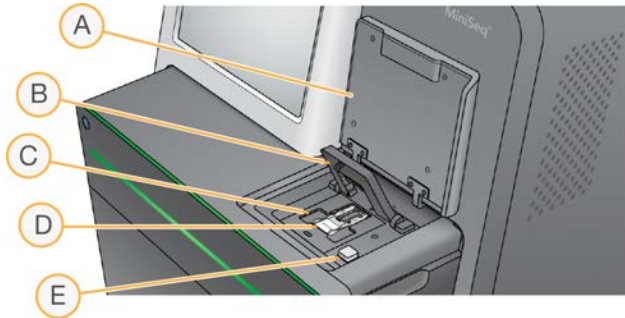


- A **Monitor touch screen:** consente la configurazione e l'impostazione della corsa integrate sullo strumento utilizzando l'interfaccia del software di controllo.
- B **Pulsante di accensione:** accende il computer integrato allo strumento e il sistema operativo.
- C **Porte USB:** comode connessioni per i componenti periferici.
- D **Scomparto della cella a flusso:** contiene la cella a flusso durante una corsa di sequenziamento.
- E **Barra di stato:** indica lo stato dello strumento come in elaborazione (blu), richiede attenzione (arancione), pronto per il sequenziamento (verde) o quando è necessario eseguire un lavaggio entro 24 ore (giallo).
- F **Scomparto reagenti:** contiene la cartuccia di reagenti e il flacone dei reagenti usati.

## Scomparto della cella a flusso

Il piano portacelle comprende il coperchio a scatto della cella a flusso, che assicura la cella a flusso quando è chiusa. Quando il coperchio a scatto si chiude, i perni accanto alla base del coperchio a scatto allineano le porte della cella a flusso con le connessioni della fluidica.

**Figura 2** Scomparto della cella a flusso



- A Sportello dello scomparto della cella a flusso
- B Coperchio a scatto della cella a flusso
- C Piano portacelle
- D Cella a flusso
- E Pulsante di sblocco del coperchio a scatto della cella a flusso

La stazione termica, situata sotto il piano portacelle, controlla le variazioni di temperatura necessarie per la generazione di cluster e il sequenziamento.



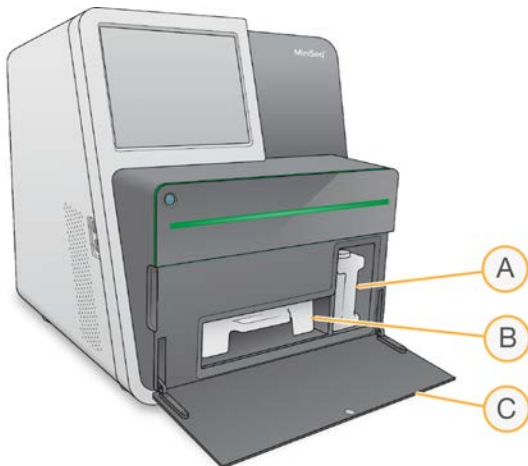
**NOTA**

Non porre oggetti sullo strumento accanto allo scomparto della cella a flusso.

## Scomparto reagenti

L'impostazione di una corsa di sequenziamento sul sistema MiniSeq richiede l'accesso allo scomparto reagenti per caricare i materiali di consumo della corsa e per svuotare il flacone dei reagenti usati.

**Figura 3** Scomparto reagenti



- A **Flacone dei reagenti usati:** include un tappo filettato per impedire fuoriuscite durante il trasporto.
- B **Cartuccia di reagenti:** fornisce i reagenti in un materiale di consumo monouso preimpresso.
- C **Sportello dello scomparto reagenti:** fornisce accesso allo scomparto reagenti.

Lo sportello dello scomparto reagenti si apre verso l'esterno mediante le cerniere poste sul bordo dello strumento. Per aprire lo sportello, tirare delicatamente in avanti a partire dalle cerniere laterali dello sportello.



**NOTA**

Non posizionare oggetti sullo sportello dello scomparto reagenti. Lo sportello dello scomparto non è progettato per essere utilizzato come un ripiano di appoggio.

## Pulsante di alimentazione

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

Stato di accensione	Intervento
Lo strumento è spento	Premere brevemente il pulsante per accendere l'alimentazione.
Lo strumento è acceso	Premere brevemente il pulsante per spegnere l'alimentazione. Sullo schermo viene visualizzata una finestra di dialogo per confermare uno spegnimento normale dello strumento.
Lo strumento è acceso	Premere e tenere premuto il pulsante di alimentazione per 10 secondi per forzare lo spegnimento dello strumento e del computer dello strumento. Utilizzare questo metodo per spegnere lo strumento solo se lo strumento non risponde.

**NOTA**

In condizioni normali, non spegnere lo strumento.

Spegnere lo strumento durante una corsa di sequenziamento termina la corsa immediatamente. La terminazione di una corsa è definitiva. I materiali di consumo non possono essere riutilizzati e i dati di sequenziamento non sono salvati.






## Software del sistema

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

- ▶ **MiniSeq Control Software:** il software di controllo guida l'utente nella procedura d'impostazione di una corsa di sequenziamento, controlla le operazioni dello strumento e mostra una panoramica delle statistiche della corsa mentre la corsa è in elaborazione.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA):** RTA esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante la corsa. Vedere *Descrizione generale di Real-Time Analysis a pagina 44*.
- ▶ **Local Run Manager:** prima di eseguire il sequenziamento, utilizzare Local Run Manager per specificare i parametri della corsa e il metodo di analisi. Dopo il sequenziamento, l'analisi dei dati integrata sullo strumento si avvia automaticamente. Per maggiori informazioni, vedere la *Local Run Manager Software Guide (documento n. 1000000002702)* (Guida del software Local Run Manager).

## Icone di stato

Un'icona di stato situata nell'angolo superiore destro della schermata dell'interfaccia del software di controllo indica qualsiasi cambiamento nella condizione durante l'impostazione della corsa o durante la corsa.

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

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona lampeggia per avvertire l'utente. Selezionare l'icona per visualizzare una descrizione della condizione. Selezionare **Acknowledge** (Conferma) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

## Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento

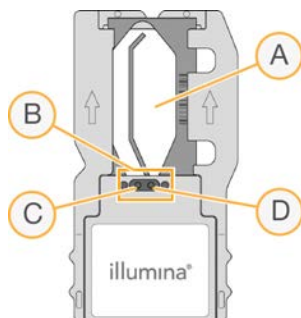
L'esecuzione di una corsa di sequenziamento sul sistema MiniSeq richiede un MiniSeq Kit monouso. Ogni kit include una cella a flusso e i reagenti richiesti per una corsa di sequenziamento.

La cella a flusso e la cartuccia di reagenti utilizzano l'identificazione a radio frequenza (Radio-Frequency IDentification, RFID) per il corretto monitoraggio dei materiali di consumo e per assicurare la compatibilità con determinati parametri della corsa.

## Cella a flusso

La cella a flusso è un substrato su vetro su cui vengono generati i cluster e viene eseguita la reazione di sequenziamento. La cella a flusso è racchiusa in una cartuccia della cella a flusso.

Figura 4 Componenti della cella a flusso



- A Area di imaging
- B Guarnizione della cella a flusso
- C Porta di uscita
- D Porta di ingresso

I reagenti penetrano nella cella a flusso tramite la porta di ingresso, attraversano l'area di imaging a singola corsia e defluiscono dalla porta di uscita.

La cella a flusso viene fornita asciutta in una provetta per cella a flusso avvolta in una confezione in alluminio. Conservare la cella a flusso nella confezione in alluminio sigillata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino all'utilizzo. Per maggiori informazioni, vedere *Preparazione della cella a flusso* a pagina 13.

## Panoramica sulla cartuccia di reagenti

La cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso dotato di serbatoi sigillati preriempiti con reagenti per la generazione di cluster, per il sequenziamento e per il lavaggio.

Figura 5 Cartuccia di reagenti



La cartuccia di reagenti comprende un serbatoio designato al caricamento delle librerie preparate. Dopo l'avvio della corsa, le librerie vengono trasferite automaticamente dalla cartuccia di reagenti alla cella a flusso.



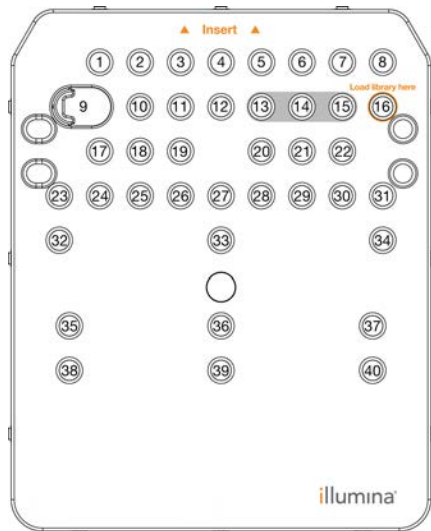
### AVVERTENZA

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

Conservare la cartuccia di reagenti a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino all'utilizzo. Per maggiori informazioni, vedere *Preparazione della cartuccia di reagenti* a pagina 13.

## Serbatoi riservati

Figura 6 Serbatoi numerati



Posizione	Descrizione
13, 14 e 15	Riservate per i primer personalizzati facoltativi
16	Caricamento delle librerie

### Serbatoio rimovibile in posizione n. 9

La cartuccia di reagenti preriempita include un reagente di denaturazione nella posizione n. 9 che contiene formammide. Per semplificare lo smaltimento sicuro di qualsiasi reagente non utilizzato dopo una corsa di sequenziamento, questo serbatoio è rimovibile. Per maggiori informazioni, vedere [Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 9 a pagina 26](#).

## Database e genomi preinstallati

Per la maggior parte dei metodi di analisi, è richiesto un riferimento per eseguire l'allineamento. Diversi database e genomi di riferimento sono preinstallati sul computer dello strumento.

Preinstallato	Descrizione
<b>Database</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• miRbase, umano</li> <li>• dbSNP, umano</li> <li>• RefGene, umano</li> </ul>
<b>Genomi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Arabidopsis thaliana</i></li> <li>• <i>Bacillus cereus</i>_ATCC_10987</li> <li>• Mucca (<i>Bos taurus</i>)</li> <li>• <i>E. coli</i> ceppo DH10B</li> <li>• <i>E. coli</i> ceppo MG1655</li> <li>• Mosca della frutta (<i>Drosophila melanogaster</i>)</li> <li>• Umano (<i>Homo sapiens</i>) build hg19</li> <li>• <i>HumanRNAFusion</i></li> <li>• Topo (<i>Mus musculus</i>)</li> <li>• PhiX</li> <li>• Ratto (<i>Rattus norvegicus</i>)</li> <li>• <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325</li> <li>• Lievito (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C)</li> </ul>

# Capitolo 2 Informazioni preliminari

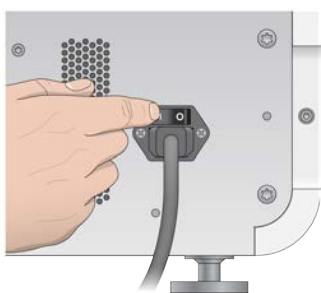
Avvio dello strumento .....	8
Personalizzazione delle impostazioni del sistema .....	9
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente .....	11

## Avvio dello strumento

Assicurarsi che lo strumento sia stato installato e inizializzato correttamente e che sia stata completata l'impostazione dello strumento. L'avvio dello strumento prima che questo sia pronto potrebbe danneggiare il sistema.

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

**Figura 7** Interruttore di alimentazione sulla parte posteriore dello strumento



- 2 Premere il pulsante di alimentazione sopra lo scomparto reagenti. Il pulsante di alimentazione accende il computer integrato allo strumento e il sistema operativo.

**Figura 8** Pulsante di alimentazione sulla parte anteriore dello strumento



- 3 Attendere che il sistema operativo completi il caricamento. La finestra iniziale di Windows si apre dopo l'inizializzazione. Premere qualsiasi tasto per aprire la finestra di accesso di Windows.
- 4 Accedere all'account Windows desiderato. Se necessario, rivolgersi all'amministratore della struttura per ottenere il nome utente e la password.
- 5 Se viene selezionato un account utente generico, MiniSeq Control Software viene avviato e inizializza il sistema automaticamente. Se viene selezionato un account di amministratore, MiniSeq Control Software deve essere lanciato facendo doppio clic sull'icona del sistema MiniSeq che si trova sul desktop.

## Personalizzazione delle impostazioni del sistema

Il software di controllo include impostazioni personalizzabili per l'identificazione dello strumento e per le preferenze del flusso di lavoro seguenti:

- ▶ Utilizzare la tastiera sullo schermo per la procedura d'impostazione della corsa.
- ▶ Spurgare i materiali di consumo al termine della corsa.
- ▶ Attivare gli indicatori audio.
- ▶ Invio dei dati delle prestazioni dello strumento a Illumina.
- ▶ Saltare la conferma della verifica pre-corsa per avviare la corsa automaticamente.
- ▶ Controllare automaticamente gli aggiornamenti del software (in BaseSpace Sequence Hub).
- ▶ Abilitare le ricette personalizzate.

## Personalizzazione dell'identificazione dello strumento

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 Per assegnare un'immagine avatar allo strumento, selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare all'immagine preferita.
- 3 Nel campo Nick Name (Nome personalizzato), immettere un nome preferito per lo strumento.
- 4 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e passare alla schermata successiva. L'immagine e il nome vengono visualizzati nell'angolo superiore sinistro di ogni schermata.

## Impostazione dell'opzione di spurgo automatico

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 Selezionare la casella di controllo **Purge consumables at end of run** (Spurga i materiali di consumo al termine della corsa).  
Questa impostazione spurga automaticamente i reagenti non utilizzati dalla cartuccia di reagenti al flacone dei reagenti usati dopo ogni corsa. Se questa impostazione è disattivata, i reagenti non usati rimangono nella cartuccia di reagenti.



### NOTA

Lo spurgo automatico dei materiali di consumo allunga il flusso di lavoro. Ad esempio, lo spurgo dei reagenti dopo una corsa da 300 cicli (2 x 151), impiega circa 50 minuti.

- 3 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e uscire dalla schermata.

## Impostazione dell'opzione di avvio automatico

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 Selezionare la casella di controllo **Skip pre-run check confirmation** (Salta conferma della verifica pre-corsa).

Questa impostazione avvia automaticamente la corsa di sequenziamento dopo una verifica automatica completata correttamente. Se questa impostazione è disattivata, avviare la corsa manualmente dopo la verifica pre-corsa.

- 3 Selezionare **Save** (Salva).

## Impostazione della verifica automatica per gli aggiornamenti software

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 Selezionare la casella di controllo **Automatically check for software updates** (Verifica automaticamente gli aggiornamenti software).  
È richiesta una connessione Internet.
- 3 Selezionare **Save** (Salva) per salvare le impostazioni e uscire dalla schermata.

## Impostazione dell'opzione della tastiera sullo schermo

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 Selezionare la casella di controllo **Use on-screen keyboard** (Utilizza la tastiera sullo schermo).  
Questa impostazione abilita la tastiera sullo schermo per l'immissione dei dati durante la procedura d'impostazione della corsa.
- 3 Selezionare **Save** (Salva).

## Attivazione degli indicatori audio

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Customization** (Personalizzazione sistema).
- 2 Selezionare la casella di controllo **Play audio** (Attiva audio) per attivare gli indicatori audio per i seguenti eventi.
  - ▶ All'inizializzazione dello strumento
  - ▶ All'avvio di una corsa
  - ▶ Al verificarsi di un errore
  - ▶ Alla richiesta di intervento da parte dell'utente
  - ▶ Al termine di una corsa
- 3 Selezionare **Save** (Salva).

## Invio dei dati delle prestazioni dello strumento a Illumina

L'opzione Send Instrument Performance Data to Illumina (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina) è attivato per impostazione predefinita. Questa opzione invia i dati delle prestazioni dello strumento (ma non i dati della corsa) a un server BaseSpace Sequence Hub.

## Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente

Le apparecchiature e i materiali indicati di seguito sono utilizzati per il sequenziamento e la manutenzione del sistema.

### Materiali di consumo per il sequenziamento

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

### Materiali di consumo per la manutenzione e la risoluzione dei problemi

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
NaOCl, 5% (ipoclorito di sodio)	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 239305 (o equivalente da laboratorio)	Esecuzione di un lavaggio post-corsa manuale; diluito allo 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento; diluito allo 0,05%
Acqua da laboratorio	Fornitore di laboratorio generico	Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento

### 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, temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, antibrina	Fornitore di laboratorio generico
Portaghiaccio	Fornitore di laboratorio generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico



# Capitolo 3 Sequenziamento

Introduzione .....	12
Preparazione dei materiali di consumo .....	13
Preparazione delle librerie per il sequenziamento .....	14
Impostazione di una corsa di sequenziamento .....	15
Monitoraggio del progresso della corsa .....	24
Lavaggio post-corsa automatico .....	25
Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 9 .....	26

## Introduzione

Per eseguire una corsa di sequenziamento sul sistema MiniSeq, preparare tutti i materiali di consumo per la corsa e attenersi ai suggerimenti del software per impostare la corsa di sequenziamento.

## Descrizione generale del flusso di lavoro

### Generazione di cluster

Durante la generazione di cluster, singole molecole di DNA si legano alla superficie della cella a flusso e in seguito vengono sottoposte ad amplificazione per formare i cluster.

### Sequenziamento

I cluster vengono sottoposti a imaging utilizzando la chimica di sequenziamento a due canali e una combinazione di filtri specifici per ciascun terminatore di catena marcato con coloranti fluorescenti. Al termine dell'imaging di una tile sulla cella a flusso, la tile successiva viene sottoposta a imaging. Il processo è ripetuto per ciascun ciclo di sequenziamento. Dopo l'analisi delle immagini, il software esegue l'identificazione delle basi, il filtraggio e il calcolo dei punteggi qualitativi.

### Analisi

Man mano che la corsa procede, il software di controllo trasferisce automaticamente i file di identificazione delle basi (BCL) alla posizione di output specificata per l'analisi dei dati. Sono disponibili diversi metodi di analisi in base all'applicazione e alla configurazione di analisi selezionata per il sistema.

## Durata della corsa di sequenziamento

La durata della corsa di sequenziamento dipende dal numero di cicli eseguiti. La lunghezza massima di una corsa è una corsa paired-end da 150 cicli, con l'aggiunta di un massimo di due letture indici di dieci cicli ciascuna.

Per le durate previste e altre specifiche di sistema, visitare la [pagina delle specifiche del sistema MiniSeq](#) sul sito Web Illumina.

## Numero di cicli di sequenziamento in una lettura

In una corsa di sequenziamento, il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, per eseguire una corsa paired-end da 150 cicli, impostare la corsa con 151 cicli per lettura ( $2 \times 151$ ) per un totale di 302 cicli. Al termine della corsa, si analizzano  $2 \times 150$  cicli. Il ciclo extra in ogni lettura viene utilizzato per i calcoli della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing).

## Preparazione dei materiali di consumo

### Preparazione della cartuccia di reagenti

- 1 Rimuovere la cartuccia di reagenti dal luogo di conservazione con temperatura tra  $-25^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Scongellare i reagenti mediante le opzioni di bagno d'acqua seguenti. Non sommergere la cartuccia. Una volta scongelata la cartuccia, asciugarne la base prima di procedere.

Metodo	Tempo di scongelamento	Limite di stabilità
Bagno d'acqua a $37^{\circ}\text{C}$	35 minuti	Fino a 2 ore
Bagno d'acqua a temperatura ambiente (tra $19^{\circ}\text{C}$ e $25^{\circ}\text{C}$ )	90 minuti	Fino a 24 ore

Se si scongelano più cartucce nello stesso bagnomaria, consentire più tempo per lo scongelamento. In alternativa, scongelare i reagenti utilizzando le opzioni seguenti.

Metodo	Tempo di scongelamento	Limite di stabilità
Aria a temperatura ambiente (tra $19^{\circ}\text{C}$ e $25^{\circ}\text{C}$ )	5 ore	Fino a 24 ore
Refrigerata a una temperatura compresa tra $2^{\circ}\text{C}$ e $8^{\circ}\text{C}$	18 ore	Fino a 72 ore

- 3 Capovolgere la cartuccia cinque volte per miscelare i reagenti.
- 4 Ispezionare i serbatoi grandi dalla parte inferiore della cartuccia per assicurarsi che i reagenti siano scongelati e che i serbatoi siano privi di cristalli di ghiaccio.
- 5 Picchiettare delicatamente sul banco per ridurre le bolle d'aria.

### Preparazione della cella a flusso

- 1 Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Tenere la confezione della cella a flusso chiusa a temperatura ambiente per 30 minuti.



#### NOTA

Evitare il raffreddamento e il riscaldamento ripetuti della cella a flusso.

- 3 Rimuovere il contenitore della cella a flusso dalla confezione in alluminio.
- 4 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
- 5 Afferrare la cella a flusso dalla cartuccia in plastica e rimuoverla dal contenitore.

**Figura 9** Rimozione della cella a flusso



- 6 Pulire la superficie in vetro della cella a flusso con una salvietta imbevuta di alcool che non lascia residui.
- 7 Asciugare con un panno pulente per lenti che non lascia residui. Prestare attenzione intorno alla guarnizione nera della cella a flusso.
- 8 Ispezionare le porte della cella a flusso per eventuali ostruzioni. Assicurarsi che la guarnizione sia posizionata correttamente.

## Preparazione delle librerie per il sequenziamento

### Denaturazione e diluizione delle librerie

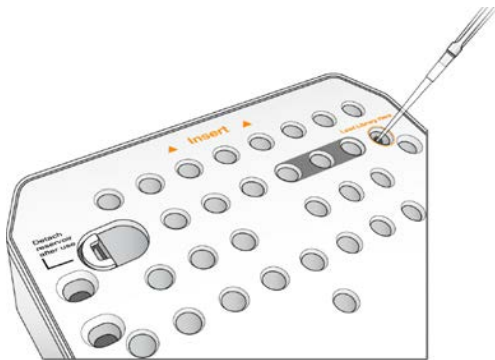
Prima di caricare le librerie sulla cartuccia di reagenti, denaturare e diluire le librerie e aggiungere un campione di controllo PhiX facoltativo. Per maggiori informazioni, vedere *MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide* (documento n. 1000000002697) (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie del sistema MiniSeq).

Il volume di caricamento per il sistema MiniSeq è di 500 µl. La concentrazione di caricamento è 1,4 pM per i kit standard e di 1,6 pM per i kit rapidi. In pratica, la concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e di quantificazione delle librerie.

### Caricamento delle librerie sulla cartuccia di reagenti

- 1 Pulire il sigillo che copre il serbatoio n. 16 etichettato **Load Library Here** (Carica qui le librerie) con un panno a bassissimo rilascio di particelle.
- 2 Forare il sigillo con la punta di una pipetta pulita da 1 ml.
- 3 Dispensare 500 µl di librerie preparate a una concentrazione di caricamento di 1,4 pM o 1,6 pM nel serbatoio n. 16. Non toccare il sigillo mentre si dispensano le librerie.

**Figura 10** Caricamento delle librerie



## Impostazione di una corsa di sequenziamento

La procedura d'impostazione della corsa dipende dalla configurazione del sistema:

- ▶ **Configurazione indipendente:** il sistema suggerisce all'utente di definire i parametri della corsa sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa) del software di controllo.
- ▶ **Configurazione Local Run Manager:** selezionare da un elenco di corse predefinite in Local Run Manager. Se in System Settings (Impostazioni sistema) è stato abilitato User Management (Gestione utente), sono richieste le informazioni di accesso. Per impostazione predefinita, la funzione User Management (Gestione utente) è disattivata.

## Impostazione di una corsa (configurazione manuale)

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Sequence** (Sequenziamento).  
Il comando Sequence (Sequenzia) rilascia i materiali di consumo utilizzati in una corsa precedente e apre la serie di schermate per l'impostazione della corsa.
- 2 Nella schermata Run Mode (Modalità corsa), selezionare **Manual** (Manuale).
- 3 **Facoltativo:** selezionare **Use BaseSpace Sequence Hub** (Utilizza BaseSpace Sequence Hub).  
Selezionare monitoraggio e archiviazione della corsa o solo monitoraggio della corsa. Quando abilitato, sono richiesti un login a BaseSpace Sequence Hub e una connessione Internet.

## Immissione dei parametri della corsa

- 1 Immettere un nome della corsa scelto dall'utente.
- 2 **[Facoltativo]** Immettere un ID della libreria scelto dall'utente.
- 3 Selezionare un tipo di lettura, **Single read** (Unidirezionale) oppure **Paired end** (Paired-end).
- 4 Inserire il numero di cicli per ciascuna lettura nella corsa di sequenziamento.
  - ▶ **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli.
  - ▶ **Index 1** (Indice 1): immettere fino a 10 cicli per il primer Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).
  - ▶ **Index 2** (Indice 2): immettere fino a 10 cicli per il primer Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).
  - ▶ **Read 2** (Lettura 2): immettere un valore fino a 151 cicli. Di solito questo valore è lo stesso numero di cicli di Read 1 (Lettura 1).

Il software di controllo conferma il numero dei cicli specificati utilizzando i seguenti criteri:

- ▶ I cicli totali non superano i cicli massimi consentiti in base alla cartuccia di reagenti caricata per la corsa.
- ▶ I cicli per Read 1 (Lettura 1) sono superiori ai sei cicli richiesti per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
- ▶ I cicli di Index Read (Lettura indici) non superano i cicli Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2).



### NOTA

Assicurarsi di specificare il numero di cicli di Index Read (Lettura indici) appropriato per le librerie che si stanno sequenziando. Per maggiori informazioni, vedere la documentazione relativa alla preparazione delle librerie.

- 5 **[Facoltativo]** Se si stanno usando primer personalizzati, selezionare la casella di controllo per i primer usati.
  - ▶ **Read 1** (Lettura 1): primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
  - ▶ **Index 1** (Indice 1): primer personalizzati per Index 1 (Indice 1).

- ▶ **Index 2** (Indice 2): primer personalizzati per Index 2 (Indice 2).
  - ▶ **Read 2** (Lettura 2): primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
- 6 **[Facoltativo]** Modificare le impostazioni per la corsa attuale.
- ▶ **Purge consumables for this run** (Spurgo dei materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa attuale.
  - ▶ **Output folder** (Posizione cartella di output): modificare la posizione della cartella di output per la corsa attuale. Selezionare **Browse** (Sfogliare) e andare alla posizione della cartella.
- 7 Selezionare **Next** (Avanti).



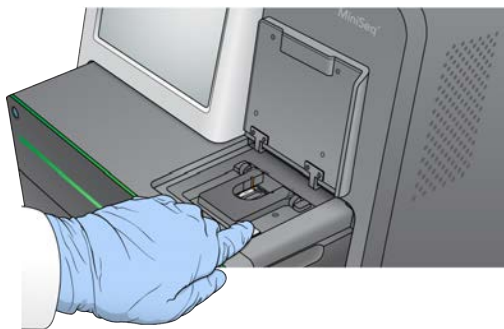
#### NOTA

Non aprire lo sportello dello scomparto reagenti o lo sportello dello scomparto della cella a flusso durante la verifica automatica o durante la corsa di sequenziamento.

## Caricamento della cella a flusso

- 1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.
- 2 Premere il pulsante di sblocco a destra del coperchio a scatto della cella a flusso.

**Figura 11** Apertura del coperchio a scatto della cella a flusso



- 3 Se presente, rimuovere la cella a flusso usata in una corsa precedente.
- 4 Accertarsi che il piano portacelle sia pulito. Se sono presenti residui, pulire il piano portacelle con una salvietta imbevuta di alcol.
- 5 Posizionare la cella a flusso sul piano portacelle sopra i perni di allineamento.

**Figura 12** Posizionamento della cella a flusso sul piano portacelle



- 6 Chiudere il coperchio a scatto per assicurare in posizione la cella a flusso.

**Figura 13** Chiusura del coperchio a scatto della cella a flusso



- 7 Chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

## Caricamento della cartuccia di reagenti

- 1 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.
- 2 Se presente, rimuovere la cartuccia di reagenti usati.

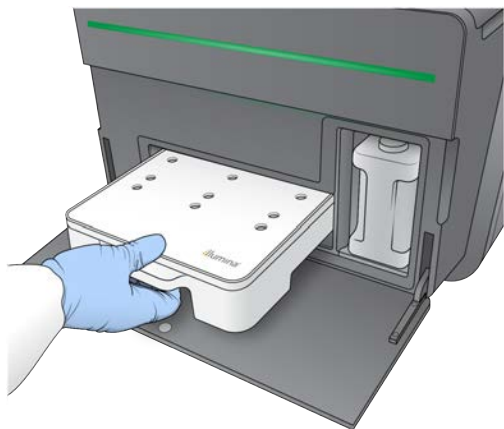


### NOTA

Per semplificare lo smaltimento sicuro dei reagenti non usati contenenti formammide, il serbatoio in posizione n. 9 è rimovibile. Vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 9 a pagina 26*.

- 3 Fare scorrere la cartuccia di reagenti nello scomparto reagenti fino a quando la cartuccia si arresta.

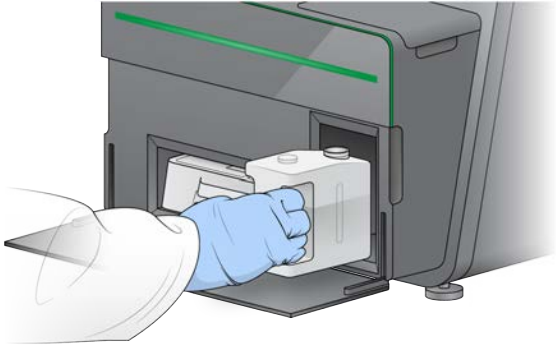
**Figura 14** Caricamento della cartuccia di reagenti



## Svuotamento del flacone dei reagenti usati

- 1 Rimuovere il flacone dei reagenti usati dallo scomparto.

**Figura 15** Rimozione del flacone dei reagenti usati



- 2 Per evitare fuoriuscite quando si trasporta il flacone dei reagenti usati, sigillare l'apertura del flacone con il tappo filettato.

**Figura 16** Sigillo del flacone dei reagenti usati



- 3 Smaltire i contenuti in base agli standard applicabili.



### AVVERTENZA

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

- 4 Con il tappo filettato rimosso, fare scorrere il flacone dei reagenti usati nello scomparto fino all'arresto.
- 5 Chiudere lo sportello dello scomparto e selezionare **Next** (Avanti).

## Conferma dei parametri della corsa

- 1 Confermare i parametri della corsa.

Il software di controllo conferma il numero dei cicli specificati utilizzando i seguenti criteri:

- ▶ I cicli totali non superano i cicli massimi consentiti in base alla cartuccia di reagenti caricata per la corsa.
- ▶ I cicli per Read 1 (Lettura 1) sono superiori ai sei cicli richiesti per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
- ▶ I cicli di Index Read (Lettura indici) non superano i cicli Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2).



### NOTA

Assicurarsi di specificare il numero di cicli di Index Read (Lettura indici) appropriato per le librerie che si stanno sequenziando. Per maggiori informazioni, vedere la documentazione relativa alla preparazione delle librerie.

- 2 **[Facoltativo]** Selezionare **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).
  - ▶ **Run parameters** (Parametri della corsa): modificare il tipo di lettura o il numero di cicli per la lettura.
  - ▶ **Custom primers** (Primer personalizzati): modificare le impostazioni per i primer personalizzati.
- 3 Selezionare **Next** (Avanti).



### NOTA

Non aprire lo sportello dello scomparto reagenti o lo sportello dello scomparto della cella a flusso durante la verifica automatica o durante la corsa di sequenziamento.

## Revisione della verifica pre-corsa

- 1 Rivedere i risultati della verifica automatica.
  - ▶ Per interrompere una verifica in corso, selezionare **Cancel** (Annulla).
  - ▶ Per qualsiasi voce che non supera la verifica, è richiesta un'azione prima di poter procedere. Vedere [Errori della verifica automatica a pagina 35](#).
  - ▶ Per riavviare la verifica, selezionare **Retry** (Riprova). La verifica riprende dalla prima verifica non completata o non superata.
- 2 Per avviare la corsa, selezionare dalle seguenti opzioni.
  - ▶ Se il sistema non è stato configurato per l'avvio automatico dopo una verifica completata correttamente, selezionare **Start** (Avvia).
  - ▶ Se il sistema è stato configurato per l'avvio automatico dopo una verifica completata correttamente, la corsa di sequenziamento si avvia automaticamente. Non è necessaria la presenza dell'utente. Tuttavia, se si verifica un errore durante la verifica, la corsa non viene avviata automaticamente.

## Impostazione di una corsa (configurazione Local Run Manager)

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Sequence** (Sequenziamento).  
Il comando Sequence (Sequenza) rilascia i materiali di consumo utilizzati in una corsa precedente e apre la serie di schermate per l'impostazione della corsa.
- 2 Dalla schermata Run Setup (Impostazione corsa), selezionare **Local Run Manager**.



- 3 **Facoltativo:** selezionare **Use BaseSpace Sequence Hub** (Utilizza BaseSpace Sequence Hub). Selezionare monitoraggio e archiviazione della corsa o solo monitoraggio della corsa. Quando abilitato, sono richiesti un login a BaseSpace e una connessione Internet.

## Accesso a Local Run Manager

- 1 Immettere il nome utente e la password.  
Quando Local Run Manager User Management è spento non sono richieste le credenziali di accesso.
- 2 Selezionare **Next** (Avanti).

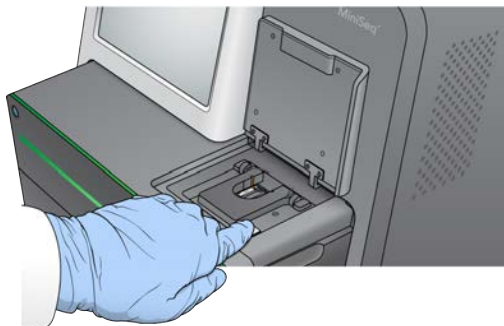
## Selezione di una corsa disponibile

- 1 Selezionare un nome della corsa dall'elenco delle corse disponibili.  
Utilizzare le frecce verso l'alto e verso il basso per scorrere nell'elenco o inserire un nome della corsa nel campo Search (Cerca).
- 2 Selezionare **Next** (Avanti).

## Caricamento della cella a flusso

- 1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.
- 2 Premere il pulsante di sblocco a destra del coperchio a scatto della cella a flusso.

**Figura 17** Apertura del coperchio a scatto della cella a flusso



- 3 Se presente, rimuovere la cella a flusso usata in una corsa precedente.
- 4 Accertarsi che il piano portacelle sia pulito. Se sono presenti residui, pulire il piano portacelle con una salvietta imbevuta di alcol.
- 5 Posizionare la cella a flusso sul piano portacelle sopra i perni di allineamento.

**Figura 18** Posizionamento della cella a flusso sul piano portacelle



- 6 Chiudere il coperchio a scatto per assicurare in posizione la cella a flusso.

**Figura 19** Chiusura del coperchio a scatto della cella a flusso



- 7 Chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

## Caricamento della cartuccia di reagenti

- 1 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.
- 2 Se presente, rimuovere la cartuccia di reagenti usati.

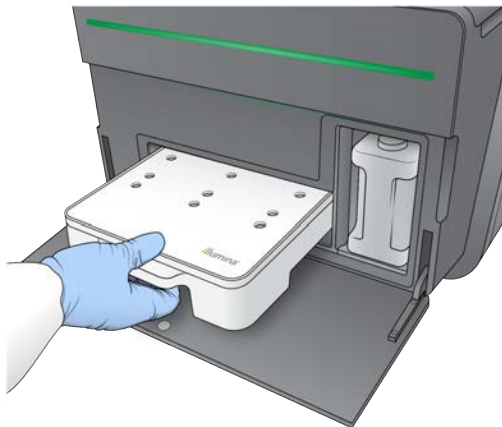


### NOTA

Per semplificare lo smaltimento sicuro dei reagenti non usati contenenti formammide, il serbatoio in posizione n. 9 è rimovibile. Vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 9* a pagina 26.

- 3 Fare scorrere la cartuccia di reagenti nello scomparto reagenti fino a quando la cartuccia si arresta.

**Figura 20** Caricamento della cartuccia di reagenti

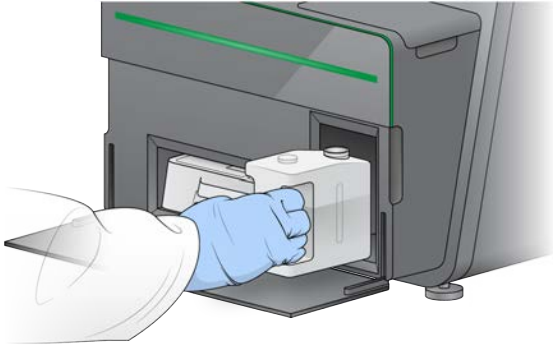


- 4 Dall'elenco a discesa Recipe (Ricetta), selezionare una ricetta. Sono elencate solo le ricette compatibili.

## Svuotamento del flacone dei reagenti usati

- 1 Rimuovere il flacone dei reagenti usati dallo scomparto.

**Figura 21** Rimozione del flacone dei reagenti usati



- 2 Per evitare fuoriuscite quando si trasporta il flacone dei reagenti usati, sigillare l'apertura del flacone con il tappo filettato.

**Figura 22** Sigillo del flacone dei reagenti usati



- 3 Smaltire i contenuti in base agli standard applicabili.



### AVVERTENZA

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

- 4 Con il tappo filettato rimosso, fare scorrere il flacone dei reagenti usati nello scomparto fino all'arresto.
- 5 Chiudere lo sportello dello scomparto e selezionare **Next** (Avanti).

## Conferma dei parametri della corsa

- 1 Confermare i parametri della corsa.

Il software di controllo conferma il numero dei cicli specificati utilizzando i seguenti criteri:

- ▶ I cicli totali non superano i cicli massimi consentiti in base alla cartuccia di reagenti caricata per la corsa.
- ▶ I cicli per Read 1 (Lettura 1) sono superiori ai sei cicli richiesti per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
- ▶ I cicli di Index Read (Lettura indici) non superano i cicli Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2).



### NOTA

Assicurarsi di specificare il numero di cicli di Index Read (Lettura indici) appropriato per le librerie che si stanno sequenziando. Per maggiori informazioni, vedere la documentazione relativa alla preparazione delle librerie.

- 2 **[Facoltativo]** Selezionare **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).
  - ▶ **Run parameters** (Parametri della corsa): modificare il tipo di lettura o il numero di cicli per la lettura.
  - ▶ **Custom primers** (Primer personalizzati): modificare le impostazioni per i primer personalizzati.
- 3 Selezionare **Next** (Avanti).



### NOTA

Non aprire lo sportello dello scomparto reagenti o lo sportello dello scomparto della cella a flusso durante la verifica automatica o durante la corsa di sequenziamento.

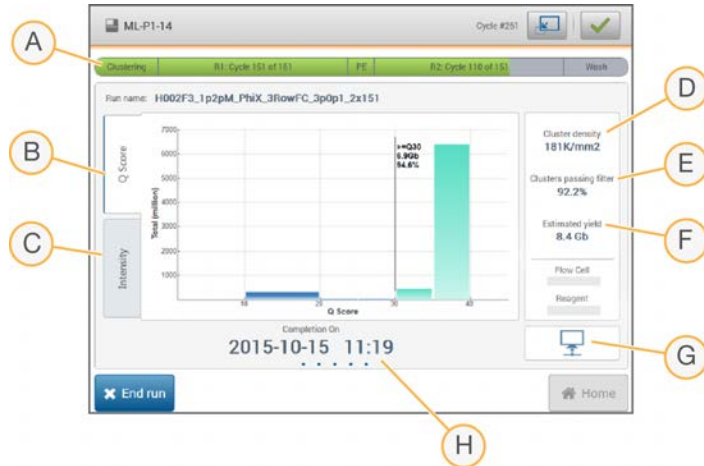
## Revisione della verifica pre-corsa

- 1 Rivedere i risultati della verifica automatica.
  - ▶ Per interrompere una verifica in corso, selezionare **Cancel** (Annulla).
  - ▶ Per qualsiasi voce che non supera la verifica, è richiesta un'azione prima di poter procedere. Vedere [Errori della verifica automatica a pagina 35](#).
  - ▶ Per riavviare la verifica, selezionare **Retry** (Riprova). La verifica riprende dalla prima verifica non completata o non superata.
- 2 Per avviare la corsa, selezionare dalle seguenti opzioni.
  - ▶ Se il sistema non è stato configurato per l'avvio automatico dopo una verifica completata correttamente, selezionare **Start** (Avvia).
  - ▶ Se il sistema è stato configurato per l'avvio automatico dopo una verifica completata correttamente, la corsa di sequenziamento si avvia automaticamente. Non è necessaria la presenza dell'utente. Tuttavia, se si verifica un errore durante la verifica, la corsa non viene avviata automaticamente.

## Monitoraggio del progresso della corsa

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

Figura 23 Progresso e metriche della corsa di sequenziamento



- A **Progresso della corsa:** mostra la fase in corso di elaborazione e il numero di cicli completati per ogni lettura. La barra di progresso non è proporzionale alla velocità della corsa di ogni fase.
- B **Q-Score (Punteggi qualitativi):** mostra la distribuzione dei punteggi qualitativi. Vedere *Punteggio qualitativo a pagina 47*.
- C **Intensity (Intensità):** mostra il valore delle intensità dei cluster per il 90° percentile per ogni tile. I colori del grafico indicano ciascuna base: rosso è A, verde è C, blu è G e nero è T.
- D **Cluster Density (K/mm<sup>2</sup>) (Densità dei cluster - K/mm<sup>2</sup>):** mostra il numero di cluster rilevati per la corsa.
- E **Clusters Passing Filter (%) (Cluster che attraversano il filtro - %):** mostra la percentuale di cluster che attraversano il filtro. Vedere *Cluster che attraversano il filtro a pagina 47*.
- F **Estimated Yield (Gb) (Resa prevista - Gb):** mostra il numero di basi previste per la corsa.
- G **Stato del trasferimento dei dati:** mostra lo stato di trasferimento dei dati in base alla configurazione dell'analisi.
- H **Data e ora del completamento:** mostra la data e l'ora in cui è stata completata la corsa (aaaa-mm-gg hh:mm).



### NOTA

Dopo aver selezionato Home (Inizio), non è possibile tornare a visualizzare le metriche della corsa. Tuttavia, le metriche della corsa sono accessibili su BaseSpace, mediante un computer sulla rete utilizzando Sequencing Analysis Viewer, oppure da un computer sulla rete utilizzando Local Run Manager.













## Cicli per le metriche della corsa

Le metriche della corsa vengono visualizzate in diversi punti in una corsa.

- ▶ Durante le fasi di generazione di cluster non appare alcuna metrica.
- ▶ I primi cinque cicli sono riservati per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
- ▶ Al ciclo sei, sono disponibili la densità dei cluster e l'intensità del ciclo uno non elaborate.
- ▶ Dopo il ciclo 25, sono disponibili i cluster che attraversano il filtro, la resa e i punteggi qualitativi.

## Stato del trasferimento dei dati

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

Stato	BaseSpace	Local Run Manager	Indipendente
Collegato			
In fase di trasferimento dei dati			
Scollegato			
Disattivato			

Sullo schermo potrebbero apparire diverse icone. Ad esempio, se i dati della corsa sono in fase di trasferimento a BaseSpace e a un'ulteriore cartella di output, vengono visualizzate un'icona BaseSpace e un'icona indipendente.

## Universal Copy Service

MiniSeq System Software Suite include un Universal Copy Service. Mentre il software RTA genera file, il servizio copia i file nella cartella di output specificata.

Se durante la corsa viene interrotto il trasferimento dei dati, i dati vengono archiviati temporaneamente sul computer dello strumento. Quando la connessione viene ripristinata, il trasferimento dei dati riprende automaticamente durante la corsa. Se la connessione non viene ripristinata prima del termine della corsa, spostare manualmente i dati nella posizione prescelta.

## Trasferimento a BaseSpace

Universal Copy Service trasferisce i dati della corsa a BaseSpace. I dati vengono trasferiti in modo continuo da Universal Copy Service a BaseSpace.

Se viene specificata un'ulteriore posizione per i dati della corsa, i dati vengono trasferiti a quella posizione indipendentemente dallo stato di Universal Copy Service.

## Lavaggio post-corsa automatico

Al completamento della corsa di sequenziamento, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico utilizzando la soluzione di lavaggio e NaOCl forniti nella cartuccia di reagenti.

Il lavaggio post-corsa automatico dura circa 60 minuti. Al termine del lavaggio, il pulsante Home (Inizio) diventa attivo. Durante il lavaggio, i risultati del sequenziamento rimangono visibili sulla schermata.

## Dopo il lavaggio

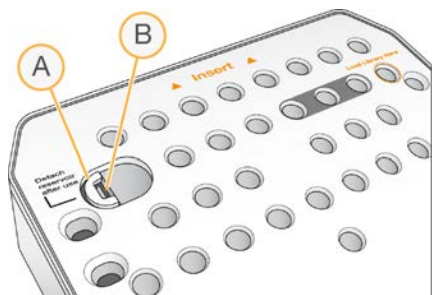
Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nella posizione abbassata per impedire che aria entri nel sistema. Lasciare la cartuccia in posizione fino alla corsa successiva.

## Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 9

Il serbatoio in posizione n. 9 della cartuccia di reagenti contiene formammide. Prima di smaltire la cartuccia di reagenti usati, è possibile rimuovere il serbatoio dalla posizione n. 9 per smaltirlo separatamente.

- 1 Indossando guanti, premere verso il basso sulla linguetta di rilascio bianca alla posizione n. 9 per rompere i tre punti di connessione.

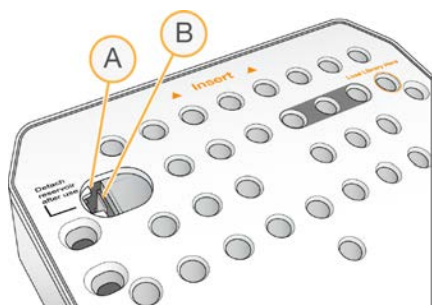
**Figura 24** Linguetta di rilascio alla posizione n. 9



- A Linguetta di rilascio intatta
- B Clip del serbatoio

- 2 Fare scorrere lateralmente la linguetta di rilascio verso il bordo sinistro della cartuccia, in modo che la linguetta di rilascio scorra sotto la copertura della cartuccia.

**Figura 25** Linguetta di rilascio rimossa, clip del serbatoio esposta



- A Linguetta di rilascio mostrata sotto la copertura della cartuccia
- B Clip del serbatoio

- 3 Premere verso il basso e verso destra la clip del serbatoio in plastica trasparente. Il serbatoio viene rilasciato dalla sua posizione sotto la cartuccia di reagenti.
- 4 Smaltire il serbatoio in base agli standard applicabili.



### AVVERTENZA

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





# Capitolo 4 Manutenzione

Introduzione .....	28
Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento .....	28
Aggiornamenti del software .....	31

## Introduzione

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

- ▶ **Lavaggi dello strumento:** un lavaggio post-corsa automatico dopo ogni corsa di sequenziamento mantiene le prestazioni dello strumento. Tuttavia, un lavaggio manuale è richiesto in determinate condizioni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento a pagina 28*.
- ▶ **Aggiornamenti software:** quando è disponibile una nuova versione del software del sistema, è possibile installare l'aggiornamento automaticamente mediante una connessione a BaseSpace oppure manualmente dopo aver scaricato l'installer dal sito Web Illumina. Vedere *Aggiornamenti del software a pagina 31*.

## Manutenzione preventiva

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

## Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento

Le opzioni di lavaggio manuale dello strumento comprendono Quick Wash (Lavaggio rapido) e Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale).

Tipi di lavaggio	Descrizione
Quick Wash (Lavaggio rapido) Durata: 20 minuti	Un lavaggio rapido è richiesto ogni sette giorni di stato inattivo o dopo uno spegnimento dello strumento. Il lavaggio pulisce il sistema con una soluzione di lavaggio fornita dall'utente composta da acqua da laboratorio e Tween 20.
Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale) Durata: 90 minuti	Un lavaggio post-corsa manuale è richiesto quando non viene eseguito un lavaggio post-corsa automatico, ossia quando una corsa è terminata in anticipo e la cella a flusso è stata salvata per la successiva reibridazione. Il lavaggio lava il sistema con ipoclorito di sodio allo 0,12% fornito dall'utente e una soluzione di lavaggio composta da acqua da laboratorio e Tween 20.



### NOTA

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

Un lavaggio manuale dello strumento richiede una cartuccia di lavaggio e una cella a flusso di lavaggio fornite con lo strumento. In alternativa, utilizzare una cella a flusso usata per il lavaggio.

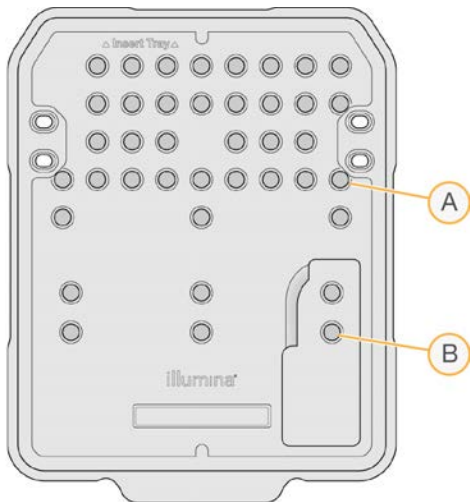
Figura 26 Cartuccia di lavaggio



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

- 1 Combinare i volumi seguenti per ottenere NaOCl allo 0,12%.
  - ▶ NaOCl al 5% (31  $\mu$ l)
  - ▶ Acqua da laboratorio (1.269  $\mu$ l)
- 2 Dispensare 1,3 ml di NaOCl allo 0,12% nella cartuccia di lavaggio.  
Il recipiente corretto corrisponde alla posizione n. **31** sulla cartuccia di reagenti pre-riempita.

Figura 27 Posizione per NaOCl e per la soluzione di lavaggio



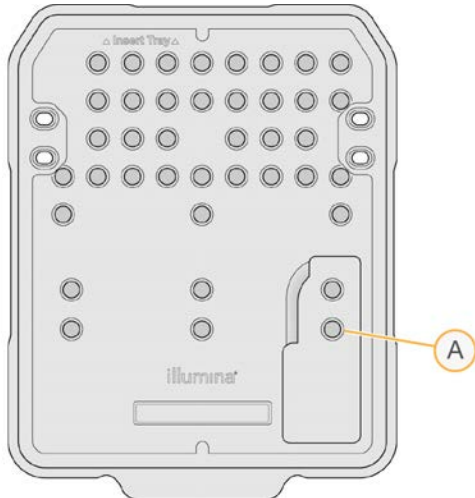
- A NaOCl allo 0,12%
- B Soluzione di lavaggio

- 3 Combinare i volumi seguenti per ottenere una soluzione di lavaggio di Tween 20 allo 0,05%.
  - ▶ Tween 20 al 100% (40  $\mu$ l)
  - ▶ Acqua da laboratorio (80 ml)
- 4 Dispensare 80 ml di soluzione di lavaggio nella cartuccia di lavaggio.  
Il recipiente corretto corrisponde alla posizione n. **40** sulla cartuccia di reagenti pre-riempita.
- 5 Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Perform Wash** (Esegui lavaggio), quindi selezionare **Manual post-run wash** (Lavaggio post-corsa manuale).

## Preparazione per Quick Wash (Lavaggio rapido)

- 1 Combinare i volumi seguenti per ottenere una soluzione di lavaggio di Tween 20 allo 0,05%.
  - ▶ Tween 20 al 100% (20 µl)
  - ▶ Acqua da laboratorio (40 ml)
- 2 Dispensare 40 ml di soluzione di lavaggio nella cartuccia di lavaggio. Il recipiente corretto corrisponde alla posizione **n. 40** sulla cartuccia di reagenti preriempita.

**Figura 28** Posizione della soluzione di lavaggio



A Soluzione di lavaggio

- 3 Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Perform wash** (Esegui lavaggio), quindi selezionare **Quick Wash** (Lavaggio rapido).

## Caricamento della cella a flusso di lavaggio e della cartuccia di lavaggio

- 1 Caricare la cella a flusso di lavaggio. Chiudere il coperchio a scatto e lo sportello della cella a flusso.



### NOTA

In alternativa, caricare una cella a flusso usata.

- 2 Rimuovere la cartuccia dei reagenti usata nella corsa precedente, se presente.
- 3 Caricare la cartuccia di lavaggio preparata.
- 4 Rimuovere il flacone dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.



### AVVERTENZA

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

- 5 Fare scorrere il flacone dei reagenti usati nello scomparto fino all'arresto.

- 6 Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.
- 7 Selezionare **Next** (Avanti).

## Avvio del lavaggio

- 1 Al termine della verifica automatica, selezionare **Start** (Avvia).
- 2 Al termine del lavaggio, selezionare **Home** (Inizio).

## Dopo il lavaggio

Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nella posizione abbassata per impedire che aria entri nel sistema. Lasciare la cartuccia in posizione fino alla corsa successiva.


## Aggiornamenti del software

Gli aggiornamenti del software sono riuniti in un gruppo di software denominato System Suite, che include i seguenti software:

- ▶ MiniSeq Control Software
- ▶ Ricette MiniSeq
- ▶ RTA2
- ▶ Local Run Manager
- ▶ MiniSeq Service Software
- ▶ Universal Copy Service

Le note sulla versione del software sono disponibili alla pagina di supporto del sistema MiniSeq sul sito Web Illumina.

È possibile installare gli aggiornamenti del software automaticamente mediante una connessione a Internet o manualmente da una posizione di rete o USB.

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



### NOTA

Se si annulla un aggiornamento prima del completamento dell'installazione, l'aggiornamento viene arrestato in quell'esatto punto dell'installazione. Qualsiasi cambiamento eseguito fino a questo punto di interruzione non viene disinstallato o ripristinato alla versione precedente.

## Aggiornamento automatico del software

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
- 3 Selezionare **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Installare l'aggiornamento già scaricato da BaseSpace).
- 4 Selezionare **Update** (Aggiorna) per avviare l'aggiornamento. Si apre una finestra di dialogo di conferma del comando.

5 Attenersi alle istruzioni indicate nella procedura guidata all'installazione:

- a Accettare il contratto di licenza.
- b Rivedere l'elenco di software inclusi nell'aggiornamento.

Al termine dell'aggiornamento, il software di controllo si riavvia automaticamente.



#### **NOTA**

Se è incluso un aggiornamento firmware, è richiesto un riavvio automatico dopo l'aggiornamento del firmware.

## **Aggiornamento manuale del software**

- 1 Scaricare l'installer della System Suite dal sito Web Illumina e salvarlo in una posizione di rete. Illumina raccomanda D:\Illumina o C:\Illumina. In alternativa, copiare il file di installazione del software su un dispositivo USB portatile.
- 2 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 3 Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
- 4 Selezionare **Manually install the update from the following location** (Installa manualmente l'aggiornamento dalla posizione seguente).
- 5 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione del file di installazione del software, quindi selezionare **Update** (Aggiorna).
- 6 Attenersi alle istruzioni indicate nella procedura guidata all'installazione:
  - a Accettare il contratto di licenza.
  - b Rivedere l'elenco di software inclusi nell'aggiornamento.

Al termine dell'aggiornamento, il software di controllo si riavvia automaticamente.



#### **NOTA**

Se è incluso un aggiornamento firmware, è richiesto un riavvio automatico dopo l'aggiornamento del firmware.

## **Requisiti software per i kit rapidi**

Per utilizzare i kit rapidi con il sistema MiniSeq è richiesto MiniSeq Control Software v2.1 o versione successiva. È richiesto un utente Administrator (Amministratore) per l'aggiornamento da v2.0 a v2.1. Windows 10 è richiesto per l'installazione di MiniSeq Control Software v2.0 o versione successiva.



# Appendice A Risoluzione dei problemi

File di risoluzione dei problemi .....	34
Errori della verifica automatica .....	35
Errori di RTA .....	37
Flusso di lavoro di reibridazione .....	37
Verifica del sistema .....	39
Impostazioni della configurazione della rete .....	41
Genomi personalizzati .....	43
Spegnimento dello strumento .....	43

## File di risoluzione dei problemi

File principale	Cartella	Descrizione
File informazioni corsa (RunInfo.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le informazioni seguenti: <ul style="list-style-type: none"><li>• Nome della corsa</li><li>• Numero di cicli per la corsa</li><li>• Numero di cicli in ciascuna lettura</li><li>• Se la lettura è una lettura indicizzata</li><li>• Numero di strisce e tile sulla cella a flusso</li></ul>
File parametri della corsa (RunParameters.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le informazioni relative ai parametri della corsa e ai componenti della corsa. Le informazioni comprendono l'etichetta RFID, il numero di serie, il numero di lotto e la data di scadenza.
File configurazione RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Contiene le impostazioni della configurazione di RTA per la corsa. Il file RTAConfiguration.xml viene creato all'inizio della corsa.
File InterOp (*.bin)	InterOp	File report binari utilizzati per Sequencing Analysis Viewer. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.
File di registro	Logs	I file di registro descrivono ciascuna fase eseguita dallo strumento per ciascun ciclo ed elenca le versioni software e firmware usate per la corsa. Il file denominato [Nomestrumento]_Hardwareattuale.csv elenca i numeri di serie dei componenti dello strumento.
File registro errori (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs	Registro degli errori di RTA. I file registro errori sono aggiornati ogni volta che si verifica un errore.
File registro globale (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs	Registro di tutti gli eventi RTA. I file registro globale sono aggiornati durante tutta la corsa.
File registro corsia (*LaneLog*.txt)	RTA Logs	Registro degli eventi di elaborazione di RTA. I file registro corsia sono aggiornati durante tutta la corsa.

## Risorse per la risoluzione dei problemi

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

Eseguire l'accesso all'account MyIllumina per accedere ai bollettini di supporto.

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Vedere [Assistenza Tecnica a pagina 55](#).

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

## Stato del processo

MiniSeq Control Software elenca lo stato di almeno tre corse nella cartella Temp (Temporaneo) del sistema. Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **Process status** (Stato processo).

Per ciascun nome della corsa, il sistema elenca lo stato dei seguenti componenti:

- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)**: in base all'elaborazione dei file BCL
- ▶ **Local Run Manager**: se Local Run Manager è stato utilizzato per la corsa
- ▶ **File Copy** (Copia file): in base al trasferimento dei file utilizzando Run Copy Service
- ▶ **BaseSpace**: se BaseSpace è stato utilizzato per la corsa

## Cartella di archiviazione del sequenziamento

MiniSeq Control Software salva i file di riepilogo corsa sul computer del sistema in D:\Illumina\MiniSeq Sequencing Archive per ciascuna corsa eseguita sullo strumento.

In questa cartella, è presente una sottocartella per ogni corsa eseguita sullo strumento che contiene i seguenti file:

- ▶ **RunCompletionStatus.xml**: contiene lo stato di completamento, il nome della cartella della corsa, il numero di cicli pianificati ed eseguiti, la densità cluster, i cluster che attraversano il filtro e la resa stimata per la corsa.
- ▶ **RunParameters.xml**: contiene le informazioni relative ai parametri della corsa e ai componenti della corsa. Le informazioni comprendono l'etichetta RFID, il numero di serie, il numero di lotto e la data di scadenza.

## Errori della verifica automatica

Se si verificano errori durante la verifica pre-corsa automatica, utilizzare i seguenti interventi raccomandati per risolvere l'errore.

Se la verifica pre-corsa non viene superata, l'etichetta RFID della cartuccia di reagenti non viene bloccata e può essere utilizzata per una corsa successiva. Tuttavia, l'etichetta RFID viene bloccata dopo che i sigilli in alluminio sono stati perforati.

Verifiche del sistema	Intervento raccomandato
Doors closed (Sportelli chiusi)	Assicurarsi che gli sportelli dello scomparto siano chiusi.
Consumables loaded (Materiali di consumo caricati)	I sensori dei materiali di consumo non eseguono la registrazione. Assicurarsi che ogni materiale di consumo sia caricato correttamente. Sulle schermate per l'impostazione della corsa, selezionare <b>Back</b> (Indietro) per tornare alla fase di caricamento e ripetere l'impostazione della corsa.
Required software (Software richiesto)	Mancano componenti critici del software. Eseguire un aggiornamento manuale del software per ripristinare i componenti del software.
Instrument disk space (Spazio su disco dello strumento)	Il disco rigido dello strumento non ha spazio su disco sufficiente per eseguire una corsa. Liberare i dati della corsa dal disco rigido dello strumento.



Verifiche del sistema	Intervento raccomandato
Network connection (Connessione di rete)	La connessione alla posizione specificata della cartella di output è stata interrotta. Sebbene la verifica sia etichettata come connessione di rete, il sistema verifica la connessione a una posizione specificata della cartella di output su un server, un disco rigido esterno o un disco locale. Verificare lo stato della connessione alla posizione specificata della cartella di output.
Network Disk Space (Spazio su disco della rete)	La posizione specificata della cartella di output è piena. Sebbene la verifica sia etichettata come spazio su disco della rete, il sistema verifica la connessione a qualsiasi posizione specificata della cartella di output su un server, un disco rigido esterno o un disco rigido locale. Liberare lo spazio su disco dalla posizione indicata della cartella di output.
Temperatura	Intervento raccomandato
Temperature ramp (Rampa di temperatura)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Temperature sensors (Sensori della temperatura)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Fans (Ventole)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Sistema di imaging	Intervento raccomandato
Imaging limits (Limiti di imaging)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Z Steps-and-Settle (Incremento e tempo transitorio del piano Z)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Bit error rate (Frequenza bit errore)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Flow cell registration (Registrazione cella a flusso)	La cella a flusso potrebbe essere in posizione errata. <ul style="list-style-type: none"> <li>Sulle schermate per l'impostazione della corsa, selezionare <b>Back</b> (Indietro) per tornare alla fase della cella a flusso.</li> <li>Scaricare e ricaricare la cella a flusso per assicurarsi che sia posizionata correttamente.</li> </ul>
Erogazione dei reagenti	Intervento raccomandato
Valve response (Risposta valvola)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Pump (Pompa)	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

## Spazio su disco rigido

Il disco rigido del computer dello strumento può contenere circa 45 corse in base ai dati generati da una corsa utilizzando i seguenti parametri:

- ▶ Sono richiesti circa 5-6 GB di spazio per una corsa paired-end da 150 cicli.
- ▶ Ulteriori 10 GB di spazio sono richiesti per i file dell'analisi quando si utilizza il modulo di analisi Local Run Manager Resequencing.

Per ciascuna corsa eseguita, viene creata una cartella della corsa temporanea come parte del funzionamento del software. Mentre i file sono scritti sulla cartella della corsa temporanea, i file sono copiati nella cartella di output. Tuttavia, se è stata specificata una cartella di output sul disco rigido dello strumento, sul disco rigido sono scritte due copie di quella corsa. Il software salva le tre cartelle della corsa temporanee più recenti.

Quando si utilizza il software Local Run Manager per l'analisi, i file temporanei, per impostazione predefinita, non sono eliminati. Le politiche di conservazione vengono impostate manualmente nella schermata Local Run Manager System Settings (Impostazioni del sistema Local Run Manager).

Con il passare del tempo, i file temporanei possono riempire lo spazio del disco rigido. Prendere in considerazione l'utilizzo di una posizione di rete per i dati della corsa e l'impostazione di una politica di conservazione ragionevole su Local Run Manager in base al numero di corse da eseguire.

## Errori di RTA

Per risolvere gli errori di RTA, controllare prima il registro degli errori di RTA, che è archiviato nella cartella RTALogs. Questo file non è presente per le corse prive di errori. Includere il registro degli errori quando si comunicano i problemi all'Assistenza Tecnica Illumina.

## Gestione degli errori

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

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

- ▶ \*GlobalLog\*.tsv riassume importanti eventi della corsa.
- ▶ \*LaneNLog\*.tsv elenca gli eventi dell'elaborazione. N è sempre 1 su una cella a flusso MiniSeq.
- ▶ \*Error\*.tsv elenca gli errori che si sono verificati durante una corsa.
- ▶ \*WarningLog\*.tsv elenca gli avvertimenti che si sono verificati durante una corsa.

## Flusso di lavoro di reibridazione

Potrebbe essere necessario eseguire una corsa di reibridazione nel caso in cui le metriche generate durante il primi pochi cicli mostrano intensità inferiori a 2.500. Alcune librerie a bassa diversità possono mostrare intensità inferiori a 1.000, il che è previsto e non può essere risolto con la reibridazione.



### NOTA

Il comando End Run (Termina corsa) è definitivo. La corsa non può essere ripresa, i materiali di consumo della corsa non possono essere riutilizzati e i dati di sequenziamento della corsa non sono salvati.

Prima del termine di una corsa e del salvataggio della cella a flusso, il software esegue i seguenti passaggi:

- ▶ Pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- ▶ Sblocca l'etichetta RFID della cella a flusso per una corsa successiva.
- ▶ Assegna alla cella a flusso una data di scadenza per la reibridazione.
- ▶ Scrive i registri della corsa per i cicli completati. Un ritardo è normale.
- ▶ Bypassa il lavaggio post-corsa automatico.

Quando viene avviata una corsa di reibridazione, il software esegue i seguenti passaggi prima di eseguire la corsa:

- ▶ Crea una cartella per la corsa in base a un nome univoco per la corsa.
- ▶ Verifica che la data della cella a flusso per la reibridazione non sia scaduta.
- ▶ Esegue il priming dei reagenti. Un ritardo è normale.
- ▶ Salta il passaggio di generazione di cluster.
- ▶ Rimuove il primer Read 1 (Lettura 1) precedente.

- ▶ Ibridizza un primer Read 1 (Lettura 1) fresco.
- ▶ Prosegue con Read 1 (Lettura 1) e il resto della corsa in base ai parametri specificati della corsa.

## Momenti in cui terminare una corsa per la reibridazione

La reibridazione successiva è possibile solo se si termina la corsa nei seguenti momenti:

- ▶ **Dopo il ciclo 5:** le intensità appaiono dopo la registrazione della griglia, che richiede i primi cinque cicli di sequenziamento. Sebbene sia sicuro terminare una corsa dopo il ciclo 1, si raccomanda di terminare una corsa dopo il ciclo 5. Non terminare una corsa durante la generazione di cluster.
- ▶ **Read 1 (Lettura 1) o Index 1 Read (Lettura indice 1):** terminare la corsa *prima* dell'avvio della risintesi paired-end. La cella a flusso non può essere salvata per la successiva reibridazione dopo l'avvio della risintesi paired-end.

## Materiali di consumo richiesti

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

## Terminazione della corsa attuale

- 1 Selezionare **End Run** (Termina corsa). Quando richiesto di confermare il comando, selezionare **Yes (Sì)**.
- 2 Quando richiesto di salvare la cella a flusso, selezionare **Yes (Sì)**. Annotare la data di scadenza per la reibridazione.
- 3 Rimuovere la cella a flusso salvata e metterla da parte a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a quando si è pronti a impostare la corsa di reibridazione.



### NOTA

La cella a flusso può essere conservata per un massimo di sette giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C nel contenitore della cella a flusso con il tappo chiuso. Per ottenere i risultati migliori, reibridare la cella a flusso salvata entro tre giorni.

## Esecuzione di un lavaggio manuale

- 1 Nella schermata Home (Inizio), selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio).
- 2 Dalla schermata Wash Selection (Selezione lavaggio), selezionare **Manual Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa manuale). Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale dello strumento a pagina 28*.



### NOTA

Se la cartuccia di reagenti non è ancora stata rimossa dalla corsa arrestata, è possibile utilizzare questa cartuccia per il lavaggio manuale. In caso contrario, eseguire un lavaggio manuale con la cartuccia di lavaggio.

## Impostazione di una corsa sullo strumento

- 1 Preparare una nuova cartuccia di reagenti.
- 2 Se la cella a flusso salvata è stata conservata, permettere alla cella a flusso di raggiungere la temperatura ambiente (15-30 minuti).
- 3 Pulire e caricare la cella a flusso salvata.

Il sistema legge l'etichetta RFID della cella a flusso come una cella a flusso salvata e conferma una data valida per la reibridazione.

- 4 Rimuovere il flacone dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in modo appropriato, quindi ricaricare il contenitore vuoto.
- 5 Caricare la nuova cartuccia di reagenti.
- 6 Dalla schermata Run Setup (Impostazione corsa), selezionare le seguenti opzioni:
  - ▶ **Local Run Manager configuration** (Configurazione di Local Run Manager): selezionare la corsa e confermare i parametri della corsa.
  - ▶ **Manual configuration** (Configurazione manuale): immettere il nome della corsa e specificare gli stessi parametri della corsa originaria.
- 7 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere alla verifica pre-corsa e avviare la corsa.

## Verifica del sistema

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

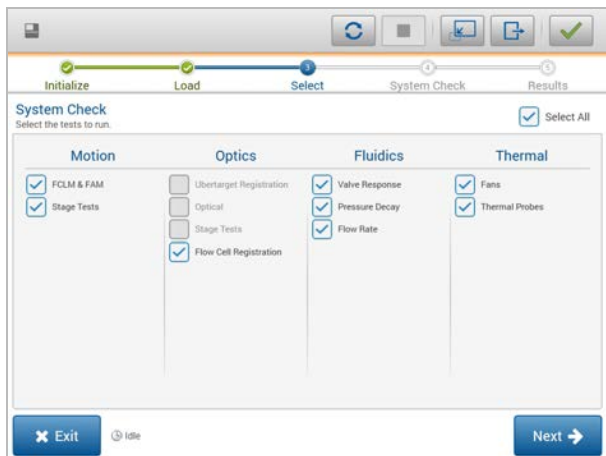


### NOTA

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

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

Figura 29 Verifiche del sistema disponibili

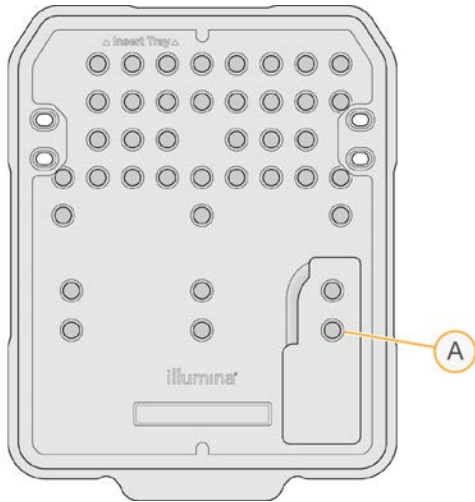


Dopo aver caricato i materiali di consumo, si apre la schermata Select (Selezione), che elenca le verifiche del sistema disponibili. Le caselle di controllo inattive sulla schermata Select (Selezione) indicano i test che richiedono l'assistenza da parte di un rappresentante dell'assistenza Illumina.

## Esecuzione di una verifica del sistema

- 1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Check** (Verifica sistema). Quando richiesto di chiudere il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì).
- 2 Dispensare 40 ml di acqua deionizzata nella cartuccia di lavaggio. Il recipiente corretto corrisponde alla posizione **n. 40** sulla cartuccia di reagenti preriempita.

**Figura 30** Posizione della soluzione di lavaggio



A Soluzione di lavaggio

- 3 Caricare i materiali di consumo nel modo seguente:
  - a Se una cella a flusso usata non è già sullo strumento, caricare una cella a flusso usata.
  - b Svuotare il flacone dei reagenti usati e rimetterlo sullo strumento.
  - c Caricare la cartuccia di lavaggio.
- 4 Selezionare **Load** (Carica). Il software sposta in posizione la cella a flusso e la cartuccia di lavaggio.
- 5 Selezionare **Next** (Avanti). Viene avviata la verifica del sistema.
- 6 **[Facoltativo]** Al termine della verifica del sistema, selezionare **View** (Visualizza) accanto al nome della verifica per visualizzare i valori associati a ciascuna verifica.
- 7 Selezionare **Next** (Avanti). Si apre il report della verifica del sistema.
- 8 Selezionare **Save** (Salva) per salvare il report in formato zip. Andare alla posizione di rete in cui salvare il file.
- 9 Una volta terminato, selezionare **Exit** (Esci).
- 10 Quando richiesto di chiudere il software di controllo e di riavviare il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì). Il software di controllo si riavvia automaticamente.

## Verifiche del movimento

Verifica del sistema	Descrizione
FCLM & FAM	Verifica il guadagno e la resistenza del meccanismo di caricamento della cella a flusso (Flow Cell Load Mechanism - FCLM) e del modulo di automazione della fluidica (Fluidics Automation Module - FAM) per stabilire se i moduli funzionano correttamente.
Stage Tests (Test del piano)	Verifica i limiti di spostamento e le prestazioni del piano XY e del piano Z.

## Verifica del modulo ottica

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

## Verifiche della fluidica

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

## Verifiche termiche

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

## Impostazioni della configurazione della rete

Le configurazioni della rete sono impostate durante l'installazione. Se il sistema deve essere riconfigurato, è possibile modificare le configurazioni o reimpostare le configurazioni nella schermata Network Configuration (Configurazione rete). Le impostazioni di configurazione includono indirizzo IP, indirizzo del server dei nomi di dominio (Domain Name Server, DNS) e nome di dominio.



### NOTA

Per modificare queste impostazioni è necessario accedere come amministratore del sistema operativo Windows.

## Impostazione della configurazione della rete

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



### NOTA

Il protocollo di configurazione host dinamico (Dynamic Host Configuration Protocol, DHCP) è un protocollo di rete standard utilizzato sulle reti IP per distribuire dinamicamente i parametri di configurazione della rete.

Altrimenti, selezionare **Use the following IP address** (Usa l'indirizzo IP seguente) per collegare lo strumento a un altro server manualmente nel modo seguente. Contattare l'amministratore della rete per ottenere gli indirizzi specifici per la struttura.

- ▶ Immettere l'indirizzo IP. L'indirizzo IP è una serie di quattro numeri separati da un punto, ad esempio 168.62.20.37.
  - ▶ Immettere la maschera di sottorete, che è una sottodivisione della rete IP.
  - ▶ Immettere il gateway predefinito, che è un router sulla rete che collega a Internet.
- 4 Selezionare **Obtain a DNS server address automatically** (Ottieni un indirizzo DNS automaticamente) per collegare lo strumento al server di nomi di dominio associato con l'indirizzo IP.  
In alternativa, selezionare **Use the following DNS server addresses** (Usa gli indirizzi del server DNS seguenti) per collegare manualmente lo strumento a un altro server del nome di dominio nel modo seguente.
    - ▶ Immettere l'indirizzo DNS prescelto. L'indirizzo DNS è il nome del server usato per tradurre i nomi di dominio in indirizzi IP.
    - ▶ Immettere l'indirizzo DNS alternativo. L'indirizzo alternativo è usato se il DNS prescelto non è in grado di tradurre un determinato nome di dominio in un indirizzo IP.
  - 5 Selezionare **Save** (Salva).

## Configurazione del dominio del computer



### NOTA

Il nome del computer dello strumento è il nome assegnato al computer dello strumento al momento della fabbricazione. Qualsiasi modifica al nome del computer può incidere sulla connettività e richiede un amministratore di rete.

- 1 Collegare il computer dello strumento a un dominio o a un gruppo di lavoro nel modo seguente.
  - ▶ **Per gli strumenti collegati a Internet:** selezionare **Member of domain** (Membro del dominio) e immettere il nome del dominio associato con la connessione Internet presso la sede.



### NOTA

Le modifiche al dominio richiedono il nome utente e la password di amministratore.

- ▶ **Per gli strumenti non collegati a Internet:** selezionare **Member of work group** (Membro del gruppo di lavoro) e immettere il nome di un gruppo di lavoro. Il nome del gruppo di lavoro è univoco per la struttura.
- 2 Selezionare **Save** (Salva).

## Genomi personalizzati

È possibile caricare sul computer dello strumento i propri riferimenti in formato FASTA. Possono essere caricati diversi singoli file FASTA *oppure* un singolo file multiplo FASTA (raccomandato), ma non una combinazione di entrambi.

Per la risoluzione di problemi con un file di genomi personalizzati, confermare i seguenti requisiti.

- 1 Assicurarsi che il file utilizzi un'estensione \*.fa o \*.fasta e che sia archiviato in una cartella dedicata per il riferimento.
- 2 Assicurarsi che il nome del cromosoma non contenga alcuno dei caratteri seguenti:  
# - ? ( ) [ ] / \ = + < > : ; " ' , \* ^ | &

Per ottenere i risultati migliori, denominare i cromosomi solo con caratteri alfanumerici.

## Spegnimento dello strumento

Durante il normale funzionamento, non è necessario spegnere lo strumento.

- 1 Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
- 2 Selezionare **Shutdown options** (Opzioni di spegnimento).
- 3 Selezionare **Shut down** (Spegni).

Il comando spegne in sicurezza il software e spegne lo strumento. Attendere almeno 60 secondi prima di accendere nuovamente lo strumento. Prima di avviare la corsa di sequenziamento successiva, è richiesto un lavaggio.



### ATTENZIONE

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



# Appendice B Real-Time Analysis

Descrizione generale di Real-Time Analysis .....	44
File di input e output .....	44
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis .....	45

## Descrizione generale di Real-Time Analysis

Real-Time Analysis è un software che viene eseguito sul computer dello strumento, estrae le intensità dalle immagini per eseguire l'identificazione delle basi, quindi assegna un punteggio qualitativo all'identificazione delle basi.

Il sistema MiniSeq utilizza un'implementazione di Real-Time Analysis denominata RTA2. Il software di controllo del sistema e di RTA2 comunicano mediante un'interfaccia HTTP sul Web e file di memoria condivisi. Se RTA2 viene terminato, l'elaborazione non riprende e i dati della corsa non vengono salvati.

## File di input e output

### File di input

Il software Real-Time Analysis richiede gli input seguenti per eseguire l'elaborazione:

- ▶ Le immagini delle tile contenute nella memoria locale del sistema.
- ▶ **RunInfo.xml**, che viene generato automaticamente all'inizio della corsa e fornisce il nome della corsa, il numero di cicli, se una lettura è indicizzata e il numero di tile sulla cella a flusso.

Il software Real-Time Analysis riceve i comandi dal software di controllo sulla posizione del file **RunInfo.xml** e se è stata specificata una cartella di output facoltativa.

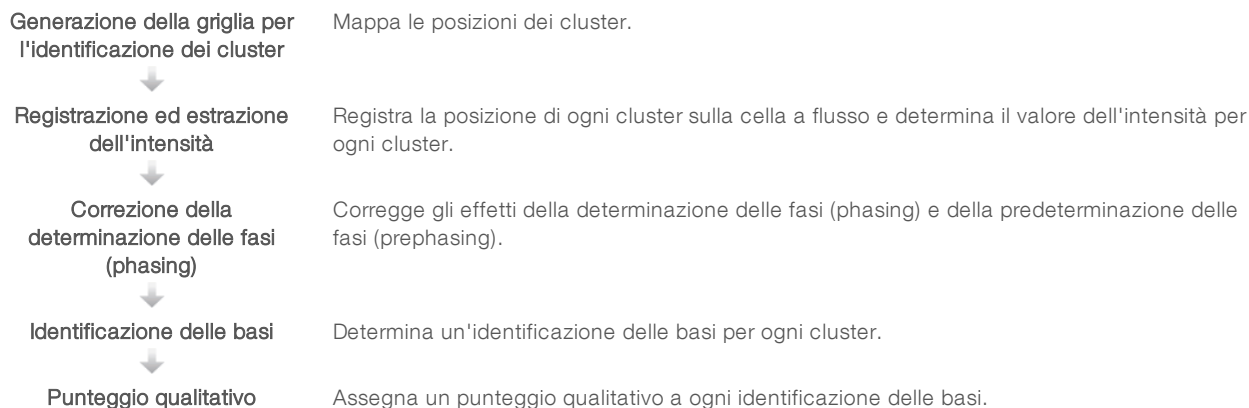
### File di output

Le immagini per ciascun canale sono passate in memoria come tile. Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso definite come il campo visivo della videocamera. In base a queste immagini, il software produce output sotto forma di un set di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate e di file filtro. I file di output sono utilizzati per l'analisi a valle sui moduli di analisi BaseSpace o Local Run Manager.

Tipo di file	Descrizione
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata viene inclusa in un file aggregato di identificazione delle basi (*.bcl) per ciascuna corsia e per ciascun ciclo. Il file aggregato dell'identificazione delle basi contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato per ogni cluster in quella corsia.
File filtro	Ciascuna tile produce informazioni sul filtro che vengono aggregate in un file filtro (*.filter) per ciascuna corsia. I file filtro specificano se un cluster attraversa i filtri.
File posizione cluster	I file posizione cluster (*.locs) contengono le coordinate X, Y per ciascun cluster in una tile. Un file posizione cluster viene generato per ciascuna corsia durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
File indice identificazione delle basi	Un file indice identificazione delle basi (*.bci) viene generato per ciascuna corsia per preservare le informazioni originali della tile. Il file indice contiene una coppia di valori per ciascuna tile, ossia il numero di tile e il numero di cluster per quella tile.

RTA2 fornisce metriche in tempo reale sulla qualità della corsa archiviate come file InterOp. I file InterOp sono file di output binari che contengono tile, ciclo e metriche a livello di lettura e sono utilizzati per visualizzare le metriche in tempo reale utilizzando Sequencing Analysis Viewer.

## Flusso di lavoro di Real-Time Analysis



## Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

Il primo passaggio del flusso di lavoro RTA è la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, che definisce la posizione di ciascun cluster in una tile usando le coordinate X e Y.

La generazione della griglia per l'identificazione dei cluster richiede i dati dell'immagine ottenuti dai primi cinque cicli della corsa. Dopo che l'ultimo ciclo della griglia per una tile è stato sottoposto a imaging, viene generata la griglia.



### NOTA

Per rilevare un cluster durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, deve essere presente una base che non sia G nei primi **cinque** cicli.

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

## Registrazione ed estrazione dell'intensità

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

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

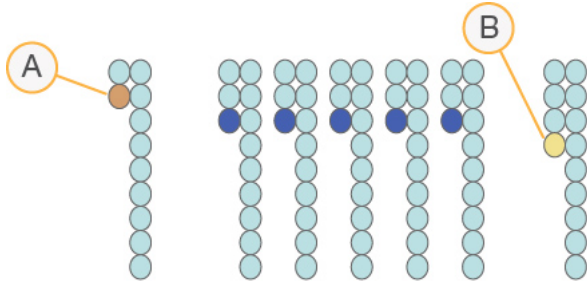
Se la registrazione non riesce per una qualsiasi immagine in un ciclo, non viene estratta alcuna intensità e tutte le basi sono identificate come N per quella tile in quel ciclo. Utilizzare il software Sequencing Analysis Viewer per identificare le tile e i cicli che non hanno superato la registrazione. Le mancate registrazioni sono facilmente identificate come tile e cicli che presentano 0 nella colonna P90 sulla scheda Imaging (Imaging).

## Correzione della determinazione delle fasi (phasing)

Durante la reazione di sequenziamento, ciascun filamento di DNA in un cluster si estende di una base per ciclo. La determinazione delle fasi (phasing) e la predeterminazione delle fasi (prephasing) si verificano quando un filamento fuoriesce dalla fase con il ciclo di incorporazione attuale.

- ▶ La determinazione delle fasi (phasing) si verifica quando una base rimane indietro.
- ▶ La predeterminazione delle fasi (prephasing) si verifica quando una base salta in avanti.

**Figura 31** Determinazione delle fasi (phasing) e predeterminazione delle fasi (prephasing)



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

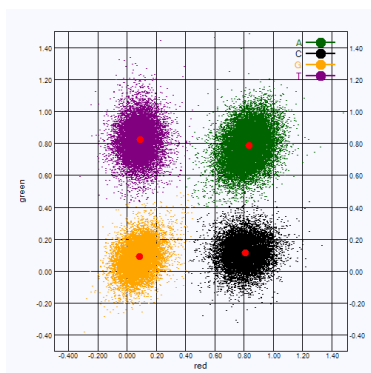
RTA2 corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) che massimizza la qualità dei dati a ogni ciclo per tutta la corsa.

## Identificazione delle basi

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

Le intensità estratte da un'immagine e confrontate con un'altra immagine forniscono quattro popolazioni distinte, ciascuna corrispondente a un nucleotide. Il processo di identificazione delle basi determina a quale popolazione appartiene ogni cluster.

**Figura 32** Visualizzazione delle intensità dei cluster



**Tabella 1 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali**

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

## Cluster che attraversano il filtro

Durante la corsa, RTA2 filtra i dati non elaborati e rimuove i cluster che non corrispondono alla soglia per la qualità dei dati.

Per l'analisi a due canali, RTA2 utilizza un sistema basato sulla popolazione per determinare il valore chastity di un'identificazione delle basi. I cluster attraversano il filtro (PF) quando non più di un'identificazione delle basi nei primi 25 cicli presenta un valore chastity inaccettabile. I cluster che non attraversano il filtro non sono identificati come basi nei cicli successivi.

## Considerazioni sull'indicizzazione

La procedura di identificazione delle basi per le letture indici è diversa rispetto all'identificazione delle basi durante altre letture.

Le letture indici devono iniziare con almeno una base che non sia G in uno o nell'altro dei primi due cicli. Se Index Read (Lettura indici) inizia con due identificazioni delle basi di G, non viene generata alcuna intensità di segnale. Il segnale deve essere presente in entrambi i primi due cicli per assicurare prestazioni di demultiplex.

Per aumentare l'efficienza del demultiplex, selezionare le sequenze d'indice che forniscono segnale in almeno un canale, preferibilmente in entrambi i canali, per ogni ciclo. Attenendosi a queste linee guida si evitano combinazioni indici che risultano solo in basi G a qualsiasi ciclo.

- ▶ Canale rosso: A o C
- ▶ Canale verde: A o T

Questa procedura di identificazione delle basi assicura l'accuratezza quando si analizzano campioni con basso plex.

## Punteggio qualitativo

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

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

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



## NOTA

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

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

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



# Appendice C File di output

## File di output

File di output del sequenziamento .....	50
Struttura della cartella di output del sequenziamento .....	51
Requisiti dei file di input dell'analisi .....	51

### File di output del sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata è inclusa in un file di identificazione delle basi, aggregata in un file per ciascun ciclo. Il file aggregato contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato per ogni cluster. Data\Intensities\BaseCalls\L001 [Ciclo].bcl.bgzf, dove [ciclo] rappresenta il numero di ciclo in formato a quattro cifre. I file di identificazione delle basi sono compressi usando gzip.
File indice identificazione delle basi	Un file indice binario elenca le informazioni originali della tile in una coppia di valori per ciascuna tile, che sono numero di tile e numero di cluster per la tile. I file indice individuazione delle basi vengono generati al momento della prima creazione di un file di identificazione delle basi. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[Corsia].bci
File posizione cluster	Per ciascuna tile, le coordinate XY per ciascun cluster sono aggregate in un file posizione cluster. I file posizione cluster sono il risultato della generazione della griglia per l'identificazione dei cluster. Data\Intensities\L001 s_[corsia].locs
File filtro	I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. Le informazioni sui filtri sono aggregate in un file filtro per ogni lettura. I file filtro sono generati al ciclo 26 utilizzando 25 cicli di dati. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[corsia].filter
File InterOp	File report binari utilizzati per Sequencing Analysis Viewer. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa. Cartella InterOp
File configurazione RTA	Creati all'inizio di una corsa, i file configurazione RTA elencano le impostazioni per la corsa. [Cartella della corsa - livello base], RTAConfiguration.xml
File informazioni corsa	Elenca il nome della corsa, il numero di cicli in ciascuna lettura, se la lettura è 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. [Cartella della corsa - livello base], RunInfo.xml

## Struttura della cartella di output del sequenziamento

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

### 📁 Configs

### 📁 Data

#### 📁 Intensities

#### 📁 BaseCalls

📁 L001: file di identificazione delle basi, aggregati per ciclo

📁 L001: un file \*.locs aggregato

### 📁 Images

#### 📁 Focus

📁 L001: immagini di messa a fuoco

📁 **InstrumentAnalyticsLogs**: i file di registro che descrivono le fasi analitiche dello strumento

📁 **InterOp**: i file binari utilizzati da Sequenzi Analisi Viewer

📁 **Logs**: i file di registro che descrivono le fasi operative

📁 **Recipe**: il file della ricetta specifico per la corsa denominato con l'ID della cartuccia di reagenti

📁 **RTALogs**: i file di registro che descrivono le fasi dell'analisi

📄 RTAComplete.xml

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

## Requisiti dei file di input dell'analisi

Local Run Manager richiede i seguenti file generati durante la corsa di sequenziamento per eseguire l'analisi o per rimettere in coda l'analisi. Alcuni moduli di analisi richiedono ulteriori file di input per eseguire l'analisi. Per maggiori informazioni, vedere la guida al flusso di lavoro specifica per il modulo di analisi in uso.

Nome/tipo file	Descrizione
RTAComplete.txt	File di marker che indica che l'elaborazione RTA è stata completata. La presenza di questo file innesca la messa in coda dell'analisi da parte di Local Run Manager.
RunInfo.xml	Contiene informazioni ad alto livello sulla corsa, ad esempio il numero di letture e cicli nella corsa di sequenziamento e se si tratta o meno di una lettura indicizzata.
File di identificazione delle basi (*.bcl)	Contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato per ogni cluster di ogni tile, aggregati in un file per ogni ciclo.
File filtro (*.filter)	Specifica se un cluster ha attraversato i filtri. Le informazioni sui filtri sono aggregate in un file filtro per ogni lettura.
File posizione cluster (*.locs)	Contiene le coordinate XY per ogni cluster di ogni tile, aggregati in un file posizione cluster.



# Indice

## A

- aggiornamento software 31
- algoritmo Phred 47
- analisi
  - file output 50
  - software 4
- analisi, primaria
  - purezza segnale 47
- assistenza clienti 55
- assistenza tecnica 55
- attraversano il filtro (PF) 47
- avvisi stato 4

## B

- barra di stato 2
- BaseSpace 1
  - icone trasferimento 25

## C

- cartuccia reagenti
  - panoramica 6
  - preparazione 13
  - serbatoio n. 28 29
- cella a flusso
  - panoramica 5
  - preparazione 13
  - reibridazione 37
  - tipi 1
- cicli in una lettura 12
- cluster che attraversano il filtro 47
- compatibilità
  - cella a flusso, cartuccia reagenti 5
  - monitoraggio RFID 5-6
- componenti
  - barra di stato 2
  - scomparto della cella a flusso 2
  - scomparto di imaging 2
  - scomparto reagenti 2
- configurazione analisi 15
- configurazione manuale 15
- considerazioni sull'indicizzazione 47
- coperchio a scatto 2

## D

- database dbSNP 7

- database miRbase 7
- database RefGene 7
- database, preinstallati 7
- determinazione fasi (phasing) 46
- documentazione 1, 55
- durata della corsa 12

## E

- errori
  - probabilità 47
- errori e avvertenze 4
- errori e avvertimenti
  - in file di output 37
- errori verifica pre-corsa 35

## F

- file filtro 50
- file identificazione delle basi 50
- file InterOp 34, 50
- file locs 50
- file output 50
- file output, sequenziamento 50
- file registro
  - GlobalLog 37
  - LaneNLog 37
- filtro chastity 47
- flusso di lavoro
  - cartuccia reagenti 13, 17, 21
  - configurazione analisi 15
  - considerazioni sull'indicizzazione 47
  - durata della corsa 12
  - ipoclorito di sodio 29
  - metriche corsa 24
  - modalità manuale 15
  - opzione avanzata caricamento 9
  - reagenti usati 18, 22
  - sequenziamento 45
  - verifica pre-corsa 19, 23
- flusso di lavoro di sequenziamento 45
- formammide, posizione n. 6 26
- formazione 1

## G

- generazione griglia 45
- genomi di riferimento
  - formato file 7

- genomi personalizzati 43
  - preinstallati 7
- gestione strumento
  - spegnimento 43
- guida, tecnica 55

## I

- icone
  - errori e avvertenze 4
  - stato 4
- identificazione delle basi
  - considerazioni sull'indicizzazione 47
  - due canali 46
- imaging a due canali 46
- imaging, sequenziamento a due canali 46
- impostazione corsa, opzione avanzata 9
- impostazioni configurazione 41
- intensità 46
- ipoclorito di sodio, lavaggio 29

## L

- lavaggio
  - automatico 25
  - componenti lavaggio 28
  - lavaggio manuale 28
  - materiali di consumo forniti dall'utente 28
- lavaggio post-corsa 25
- lavaggio strumento 28
- linee guida acqua da laboratorio 11
- Local Run Manager 4
- lunghezza lettura 12

## M

- manutenzione preventiva 28
- manutenzione strumento
  - materiali di consumo 11
- manutenzione, preventiva 28
- materiali di consumo 5
  - acqua da laboratorio 11
  - cartuccia reagenti 6
  - cella a flusso 5
  - corse di sequenziamento 11
  - forniti dall'utente 11
  - manutenzione strumento 11
  - materiali di consumo lavaggio 28-29
- materiali di consumo forniti dall'utente 11

- metriche
  - cicli densità cluster 24
  - cicli intensità 24
  - identificazione delle basi 46
- metriche corsa 24
- monitoraggio RFID 5

## N

- nome utente e password utente 8
- nome utente e password utente sistema 8

## O

- opzione avanzata caricamento 9

## P

- pagine di supporto 1
- parametri corsa
  - modalità manuale 15
- posizione cartella 15
- posizione cluster
  - file 50
  - generazione griglia 45
- predeterminazione fasi (prephasing) 46
- pulsante alimentazione 8
- pulsante di alimentazione 4, 8
- punteggi qualitativi 47

## R

- reagenti
  - confezionati 5
  - smaltimento corretto 17, 21
- reagenti usati
  - smaltimento 18, 22, 30
- reibridazione primer 37
- reibridazione, Read 1 (Lettura 1) 37
- risoluzione dei problemi
  - file specifici per la corsa 34
  - metriche bassa qualità 37
  - opzioni di contatto 34
  - spazio disco rigido 36
  - verifica pre-corsa 35
  - verifica sistema 39
- RTA v2
  - descrizione generale 44
  - terminazione 44

RTA2  
gestione errori 37  
RunInfo.xml 34, 50

## S

scomparto della cella a flusso 2  
scomparto di imaging 2  
scomparto reagenti 2  
Sequencing Analysis Viewer 12  
software  
aggiornamento automatico 31  
aggiornamento manuale 32  
analisi 4  
analisi immagini, identificazioni basi 4  
controllo strumento 4  
durata della corsa 12  
impostazioni configurazione 41  
inizializzazione 8  
verifica degli aggiornamenti 10  
software di controllo 4  
software Real-Time Analysis 1, 4  
risultati 50  
spazio disco rigido 36  
spegnimento strumento 43  
spurgo materiali di consumo 9  
strumento  
avvio 8  
impostazioni configurazione 41  
pulsante di alimentazione 4

## T

tabelle qualità 47  
trasferimento dati  
icone attività 25  
Universal Copy Service 25

## U

Universal Copy Service 25

## V

verifica pre-corsa 19, 23  
verifica sistema 39

# Assistenza Tecnica

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

**Sito Web:** [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
**E-mail:** [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Gratuito	Regionale
<b>Nord America</b>	+1 8008094566	
<b>Australia</b>	+1 800775688	
<b>Austria</b>	+43 800006249	+43 19286540
<b>Belgio</b>	+32 80077160	+32 34002973
<b>Cina</b>	4000665835	
<b>Corea del Sud</b>	+82 802345300	
<b>Danimarca</b>	+45 80820183	+45 89871156
<b>Finlandia</b>	+358 800918363	+358 974790110
<b>Francia</b>	+33 805102193	+33 170770446
<b>Germania</b>	+49 8001014940	+49 8938035677
<b>Giappone</b>	08001115011	
<b>Hong Kong, Cina</b>	800960230	
<b>Irlanda</b>	+353 1800936608	+353 016950506
<b>Italia</b>	+39 800985513	+39 236003759
<b>Norvegia</b>	+47 800 16836	+47 21939693
<b>Nuova Zelanda</b>	0800451650	
<b>Paesi Bassi</b>	+31 8000222493	+31 207132960
<b>Regno Unito</b>	+44 8000126019	+44 2073057197
<b>Singapore</b>	1.800.579.2745	
<b>Spagna</b>	+34 911899417	+34 800300143
<b>Svezia</b>	+46 850619671	+46 200883979
<b>Svizzera</b>	+41 565800000	+41 800200442
<b>Taiwan, Cina</b>	00806651752	
<b>Altri paesi</b>	+44 1799534000	

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

Documentazione sul prodotto: disponibile per il download all'indirizzo [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

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

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

**illumina®**