

NovaSeq 6000

Guida del sistema di sequenziamento



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 VI 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).

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v14	Settembre 2020	Aggiornati i numeri di catalogo dei kit disponibili per riflettere l'attuale offerta di kit di reagenti v1.0 e v1.5.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v13	Luglio 2020	Aggiunte informazioni su NovaSeq 6000 Reagent Kit v1.5 e sul software v1.7 che consente di visualizzare i dettagli delle metriche per corsia su determinati campi dei dati delle metriche della corsa.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v12	Febbraio 2020	Spostate le informazioni sulla denaturazione e sulla diluizione nella nuova guida NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000).
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v11	Febbraio 2019	Aggiornata la tabella Plex dei pool delle librerie per il flusso di lavoro Xp.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v10	Gennaio 2019	Aggiunte le informazioni sulla cella a flusso SP. Aggiornate le tabelle sui plex dei pool delle librerie raccomandati per i flussi di lavoro Standard e Xp.
Materiale n. 20023471 Documento n. 1000000019358 v09	Novembre 2018	Corretto il link alla pagina di supporto per NovaSeq 6000. Corretta l'avvertenza mancante.
Materiale n. 20020483 Documento n. 1000000019358 v08	Settembre 2018	Aggiunte le informazioni per NovaSeq 6000 S4 Kit (200 cicli). Aggiunte le informazioni sull'account utente. Aggiunte le concentrazioni per il caricamento di singole celle a flusso. Aggiornate le istruzioni per l'avvio di corse scaglionate. Aggiornate le istruzioni sull'accesso a BaseSpace. Aggiornate le istruzioni sulla verifica pre-corsa. Aggiunte note sui requisiti per la conferma dello spegnimento o del riavvio. Aggiunta la nota sul lavaggio post-corsa incompleto. Chiarite le informazioni sul lavaggio di manutenzione. Chiarite le informazioni sull'aggiornamento del software.

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20020483 Documento n. 1000000019358 v07	Aprile 2018	<p>Chiarito l'utilizzo della provetta delle librerie per miscelare i reagenti nella fase di aumento dell'efficacia prima del sequenziamento.</p> <p>Aggiunta una tabella con la descrizione dei simboli presenti sui materiali di consumo o sulla confezione dei materiali di consumo.</p> <p>Aggiunte informazioni sul servizio di monitoraggio proattivo Illumina nella sezione Modalità di impostazione della corsa.</p> <p>Aggiunte le informazioni su NovaSeq LIMS API.</p> <p>Aggiornate le descrizioni software a NovaSeq Control Software v1.4.0.</p> <p>Aggiornato il numero tipico di letture che attraversano il filtro per le celle a flusso S2.</p> <p>Aggiornate le concentrazioni di caricamento raccomandate per il flusso di lavoro NovaSeq Xp.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'apertura della confezione della cella a flusso.</p> <p>Chiarita la procedura di caricamento delle librerie sulla cella a flusso.</p> <p>Aggiunta una nota sulla disponibilità dello strumento per l'avvio di un lavaggio di manutenzione.</p> <p>Aggiunte le informazioni sul timer di conto alla rovescia per l'avvio di corse scaglionate.</p> <p>Aggiornate le istruzioni su come aggiungere o rimuovere le regole SRP.</p>
Documento n. 1000000019358 v06	Febbraio 2018	<p>Aggiunta una nota nella sezione Cella a flusso per indicare che è richiesta la versione software 1.3.1 quando si utilizza una cella a flusso S1.</p> <p>Aggiornate le descrizioni e il volume standard nella tabella <i>Metodi di caricamento delle librerie</i>.</p> <p>Aggiunta un'avvertenza in <i>Componenti del kit di reagenti</i>.</p> <p>Aggiunte le provette da 0,5 e 1,5 ml, le punte per pipette per le pipette 20, 200, 1000 ul nella tabella Materiali di consumo. Aggiunto il cilindro graduato alla tabella Apparecchiature.</p> <p>Aggiunta la sezione <i>Preparazione della cella a flusso</i> nei Capitolo 4 e 5 e spostate le fasi dal Capitolo 6 a queste sezioni.</p> <p>Aggiornato il volume totale per la cella a flusso S1 nel Capitolo 4.</p> <p>Aggiunta la tabella Plex dei pool di librerie raccomandati a <i>Creazione di un pool di librerie normalizzate</i> nel Capitolo 4.</p> <p>Aggiornata la fase <i>Scongelamento delle cartucce con cluster e SBS</i> nei Capitoli 4 e 5.</p> <p>Chiarite le istruzioni di scongelamento in <i>Preparazione della cella a flusso</i>.</p> <p>Aggiornate le istruzioni di scongelamento in <i>Concentrazioni di caricamento raccomandate per NovaSeq Xp</i></p> <p>Aggiornate la tabella Plex dei pool di librerie raccomandati in <i>Creazione di un pool di librerie normalizzate</i> nel Capitolo 5.</p> <p>Aggiunta una frase per indicare che la cella a flusso deve essere utilizzata entro 12 ore dalla rimozione dalla confezione in <i>Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp</i> e <i>Preparazione della cella a flusso</i>.</p>

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

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

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20018871 Documento n. 1000000019358 v02	Aprile 2017	<p>Aggiunte le informazioni seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Materiali di consumo forniti da Illumina richiesti per una corsa. • Condizioni di conservazione dei componenti del kit di reagenti. • Raccomandazioni per la concentrazione di caricamento della libreria. • Diluizione di NaOH per due celle a flusso. • Fase per portare la cella a flusso a temperatura ambiente prima del caricamento. • Fase di sostituzione dei guanti dopo lo svuotamento dei flaconi di reagenti. • Configurazione degli output del sistema LIMS per i sistemi LIMS di terze parti. • Convenzione per i nomi dei fogli campioni. • Icone della schermata Process Management (Gestione processo) e risoluzione dei problemi. • Appendice contenente le funzioni di sicurezza Windows e le istruzioni sulla configurazione. • Informazioni di contatto per l'Assistenza Tecnica. <p>Aumentato il tempo di scongelamento della cartuccia di reagente a quattro ore.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'aggiunta del campione di controllo PhiX per modificare il volume di aggiunta di 1% di campione di controllo PhiX a 0,9 µl e utilizzare 10 mM di Tris-HCl, pH 8.5 per diluire 10 nM di campione di controllo PhiX.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per la pulizia della cella a flusso e del piano portacelle solo quando sono visibili particelle.</p> <p>Aggiornata la frequenza del lavaggio di manutenzione ogni 14 giorni.</p> <p>Riorganizzate e consolidate le istruzioni sulla preparazione dei materiali di consumo per migliorare la continuità.</p> <p>Ridenominati gli sportelli in sportelli dello scomparto dei liquidi.</p>
Materiale n. 20018406 Documento n. 1000000019358 v01	Marzo 2017	Corretto il nome della colonna sulla schermata Process Management (Gestione processo) in Sequencing (Sequenziamento).
Materiale n. 20015871 Documento n. 1000000019358 v00	Febbraio 2017	Versione iniziale.

Sommario

Capitolo 1 Descrizione generale	1
Introduzione	1
Risorse aggiuntive	2
Descrizione generale del sequenziamento	2
Flusso di lavoro di sequenziamento	3
Componenti dello strumento	5
Capitolo 2 Kit e accessori	11
Descrizione del kit	11
Componenti del kit di reagenti	12
Componenti di NovaSeq Xp Kit	16
Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp	17
Descrizione dei simboli	18
Capitolo 3 Informazioni preliminari	19
Avvio dello strumento	19
Impostazioni della configurazione	20
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	26
Capitolo 4 Flusso di lavoro Standard: preparazione dei materiali di consumo	29
Metodi	29
Scongellamento delle cartucce SBS e con cluster	29
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati	30
Preparazione della cella a flusso	32
Raggruppamento e denaturazione delle librerie per il sequenziamento	32
Capitolo 5 Flusso di lavoro NovaSeq Xp: preparazione dei materiali di consumo	34
Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp	34
Metodi	35
Scongellamento delle cartucce SBS e con cluster	35
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati	36
Preparazione della cella a flusso	38
Scongellamento dei reagenti ExAmp	38
Raggruppamento in pool, denaturazione e caricamento delle librerie per il sequenziamento	38
Capitolo 6 Sequenziamento	43
Impostazione di una corsa di sequenziamento	43
Monitoraggio del progresso della corsa	50
Avvio di corse scaglionate	51
Eliminazione di una corsa	52
Posizione rimovibile n. 30	52
Lavaggio post-corsa automatico	53

Capitolo 7 Manutenzione	54
Manutenzione preventiva	54
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	54
Aggiornamenti del software	58
Appendice A Risoluzione dei problemi	60
Risorse per la risoluzione dei problemi	60
File di risoluzione dei problemi	60
Errori della verifica pre-corsa	60
Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)	61
Mancata riuscita di una corsa prima della generazione di cluster	62
Terminazione di una corsa	63
Spegnimento dello strumento	63
Appendice B Real-Time Analysis	65
Descrizione generale di Real-Time Analysis	65
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	67
Appendice C Cartelle e file di output	70
Struttura della cartella di output del sequenziamento	70
File di output per il sequenziamento	71
Appendice D Sicurezza Windows	72
Configurazioni di sicurezza	72
Requisiti della password	72
Firewall Windows	72
Enhanced Mitigation Experience Toolkit	73
Criteri di restrizione software	73
Indice	76
Assistenza Tecnica	80

Capitolo 1 Descrizione generale

Introduzione	1
Risorse aggiuntive	2
Descrizione generale del sequenziamento	2
Flusso di lavoro di sequenziamento	3
Componenti dello strumento	5

Introduzione

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

Caratteristiche

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

Risorse aggiuntive

Le [pagine di supporto del sistema di sequenziamento NovaSeq 6000](#) 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
Custom Protocol Selector	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.
Guida alla preparazione della sede di installazione per la serie NovaSeq (documento n. 1000000019360)	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici, ambientali e di rete.
Guida alla sicurezza e conformità della serie NovaSeq (documento n. 1000000019357)	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
Guida alla conformità del modulo del lettore RFID (documento n. 1000000002699)	Fornisce informazioni sul lettore RFID contenuto nello strumento, incluse le certificazioni di conformità e le considerazioni relative alla sicurezza.
NovaSeq Series Custom Primers Guide (documento n. 1000000022266) (Guida ai primer personalizzati per la serie NovaSeq)	Fornisce informazioni sulla sostituzione dei primer di sequenziamento Illumina con primer di sequenziamento personalizzati.
NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000)	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX facoltativo.

Descrizione generale del sequenziamento

Generazione di cluster

Durante la generazione di cluster, singole molecole di DNA si legano alla superficie della cella a flusso e vengono sottoposte contemporaneamente ad amplificazione per formare i cluster. Per il flusso di lavoro Standard, Master Mix ExAmp viene miscelata con le librerie sullo strumento prima della generazione dei cluster. Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, i reagenti ExAmp e le librerie vengono miscelate ed erogate alla cella a flusso al di fuori dello strumento. I volumi variano in base al tipo di cella a flusso e al flusso di lavoro.

Sequenziamento

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

Analisi

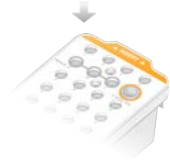
Man mano che la corsa procede, NovaSeq Control Software (NVCS) trasferisce automaticamente i file delle identificazione delle basi (*.cbcl) alla posizione di output specificata per l'analisi dei dati.

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

Flusso di lavoro di sequenziamento



Scongelare le cartucce di reagente SBS e con cluster.



Raggruppare e denaturare le librerie. Per il flusso di lavoro Standard, aggiungere le librerie alla provetta delle librerie. Per il flusso di lavoro NovaSeq Xp, caricare la miscela ExAmp/libreria sulla cella a flusso. Per entrambi i flussi di lavoro, caricare la provetta delle librerie nella cartuccia con cluster scongelata. Per maggiori informazioni, vedere NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000).



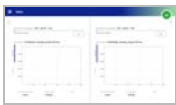
Dall'interfaccia software, selezionare **Sequence** (Sequenziamento) e specificare una corsa con singola cella a flusso o doppia cella a flusso.



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



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



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



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

Metodi di caricamento delle librerie

Le librerie vengono caricate su una cella a flusso NovaSeq 6000 utilizzando uno dei due metodi seguenti, in base al flusso di lavoro selezionato. L'impostazione di una corsa di sequenziamento è diversa in base al flusso di lavoro. Assicurarsi di attenersi sempre alle istruzioni per il metodo scelto. Vedere *Flusso di lavoro Standard: preparazione dei materiali di consumo* a pagina 29 e *Flusso di lavoro NovaSeq Xp: preparazione dei materiali di consumo* a pagina 34.

Tabella 1 Metodi di caricamento delle librerie

Flusso di lavoro	Metodo di caricamento dei pool delle librerie e di miscelazione di ExAmp	Assegnazione di singole corsie e analisi dei dati	Volume di caricamento* Modalità SP/S1-S2-S4 (μ l)
Standard	Un singolo pool di librerie viene caricato nella provetta della libreria, miscelato sullo strumento nella provetta delle librerie con i reagenti ExAmp e automaticamente erogato nella cella a flusso per la generazione di cluster e per il sequenziamento. Una fase di aggiunta prima del sequenziamento utilizza i reagenti contenuti nella cartuccia con cluster e la provetta della libreria per creare una miscela di condizionamento che contribuisce ad aumentare l'efficienza della generazione di cluster.	Un singolo pool di librerie viene distribuito e sequenziato su tutte le corsie della cella a flusso. Le letture ottenute da tutte le corsie vengono analizzate in aggregato.	150-225-465 μ l (intera cella a flusso)
NovaSeq Xp	Una o più librerie (il numero corrisponde al numero di corsie della cella a flusso) vengono miscelate manualmente con i reagenti ExAmp esternamente allo strumento e caricate direttamente sulle singole corsie della cella a flusso utilizzando la stazione di attacco NovaSeq Xp. La cella a flusso viene quindi caricata sullo strumento per la generazione di cluster e per il sequenziamento. Una fase di aggiunta prima del sequenziamento utilizza la provetta delle librerie vuota per miscelare i reagenti contenuti nella cartuccia con cluster per creare una miscela di condizionamento che contribuisce ad aumentare l'efficienza della generazione di cluster.	Ogni libreria viene caricata in una corsia separata della cella a flusso, quindi sequenziata. Possono essere utilizzati diversi pool, aliquote dello stesso pool o combinazioni arbitrarie. Le letture ottenute dalle diverse corsie vengono analizzate, di conseguenza, singolarmente o in aggregato.	27-33-45 μ l (singola corsia)

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

Componenti dello strumento

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

Figura 1 Componenti esterni



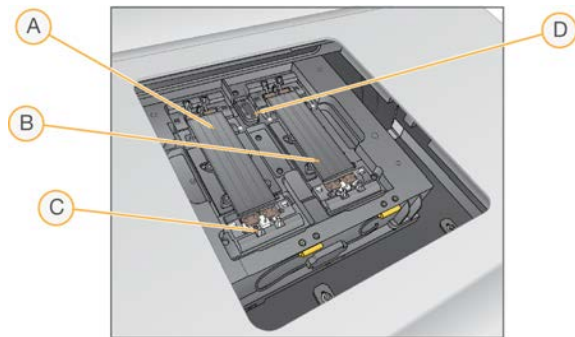
- A **Monitor touch screen:** visualizza l'interfaccia di NVCS per la configurazione del sistema e l'impostazione della corsa.
- B **Scomparto ottico:** contiene i componenti ottici che permettono l'imaging a doppia superficie delle celle a flusso.
- C **Scomparto dei liquidi:** contiene le cartucce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

Scomparto della cella a flusso

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

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

Figura 2 Piano portacelle



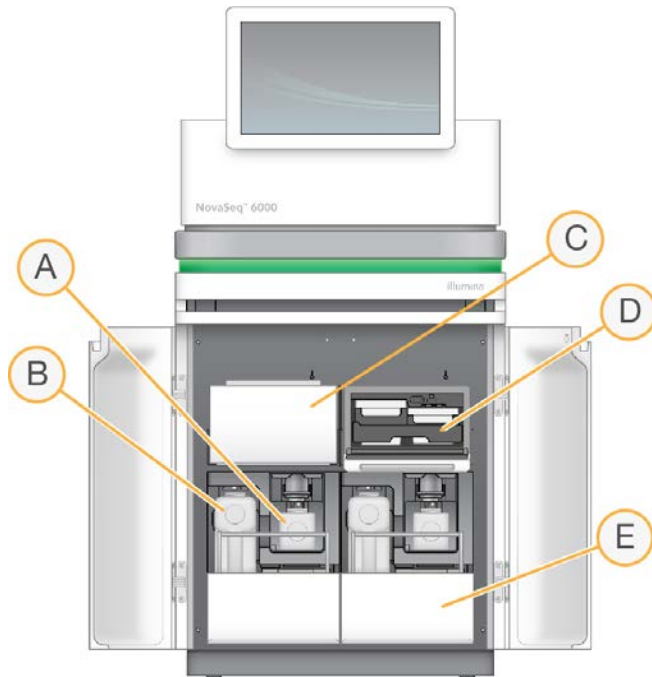
- A Vano portacella, lato A
- B Vano portacella, lato B
- C Coperchio a scatto (uno di quattro per lato)
- D Target dell'allineamento ottico

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

Scomparto dei liquidi

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

Figura 3 Componenti dello scomparto dei liquidi



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

Reagenti usati

Il sistema di fluidica è progettato per portare i reagenti della cartuccia con cluster, potenzialmente pericolosi, al flacone piccolo dei reagenti usati. I reagenti dalle cartucce SBS e dai tamponi sono portati al flacone grande dei reagenti usati. Tuttavia, potrebbe verificarsi la contaminazione incrociata tra i flussi di reagenti. Per sicurezza, considerare entrambi i flaconi di reagenti usati come contenenti sostanze chimiche potenzialmente pericolose. La scheda dei dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) fornisce informazioni chimiche dettagliate).

**NOTA**

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

Software del sistema

La Software Suite del software dello strumento comprende applicazioni integrate che eseguono le corse di sequenziamento, l'analisi integrata sullo strumento e le relative funzioni.





- ▶ **NovaSeq Control Software (NVCS):** guida l'utente per tutta la procedura d'impostazione di una corsa di sequenziamento, controlla le operazioni dello strumento e visualizza le statistiche man mano che la corsa avanza. Per dimostrare le corrette operazioni di scaricamento e caricamento dei materiali di consumo, durante l'impostazione della corsa, NVCS visualizza video didattici.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA):** esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante una corsa. NovaSeq 6000 utilizza RTA3, che incorpora miglioramenti dal punto di vista dell'architettura, della sicurezza e di altre caratteristiche per ottimizzarne le prestazioni. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis a pagina 65*.
- ▶ **Universal Copy Service:** copia i file di output da RTA3 a NVCS nella cartella di output per tutta la durata della corsa. Se applicabile, il servizio trasferisce inoltre i dati a BaseSpace Sequence Hub. Se Universal Copy Service viene interrotto durante una corsa, il servizio compie più tentativi di riconnessione e riprende automaticamente il trasferimento dei dati.

Icone di stato

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

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

Tabella 2 Icone di stato di NVCS







Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Status okay (Stato OK)	Le condizioni del sistema sono normali.
	Processing (Elaborazione)	Il sistema è in fase di elaborazione.
	Warning (Avvertenza)	Si è verificata un'avvertenza che richiede attenzione. 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.

Schermata Process Management (Gestione processo)

La schermata Process Management (Gestione processo) permette di accedere a Compute Engine (CE) e al disco rigido (C:\). Utilizzare la schermata per monitorare il progresso della corsa, annullare le corse e comunque gestire lo spazio su disco. Non eliminare mai i file e le cartelle direttamente da C:\.

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

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

Processo	Icona	Descrizione
Stato della corsa	 Running	La corsa è in elaborazione.
	 Complete	La corsa ha completato il sequenziamento.
Rete	 Copying	I file sono stati copiati nella cartella di output sulla rete.
	 Complete	Tutti i file sono stati copiati nella cartella di output sulla rete.
	N/A	Non è applicabile in quanto la corsa non è configurata per il caricamento in una cartella di output sulla rete o non è noto lo stato di caricamento. Per la risoluzione dei problemi, vedere <i>Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)</i> a pagina 61.
BaseSpace	 Uploading	I file sono stati caricati su BaseSpace Sequence Hub.
	 Complete	Tutti i file sono stati caricati su BaseSpace Sequence Hub.
	N/A	Non è applicabile in quanto la corsa non è configurata per il caricamento su BaseSpace Sequence Hub o non è noto lo stato di caricamento. Per la risoluzione dei problemi, vedere <i>Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)</i> a pagina 61.

Affinché possa iniziare una corsa con la cella a flusso, devono essere soddisfatti i requisiti di spazio minimo per CE e C:\.



NOTA

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

Tabella 4 Spazio minimo richiesto per CE e C:\ percorse con doppia cella a flusso

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

Per calcolare lo spazio totale richiesto per CE per la corsa, moltiplicare il valore sotto 'CE Space per cycle' (Requisito di spazio minimo CE per ciclo) per la somma dei valori di lunghezza di Read 1 (Lettura 1), Read 2 (Lettura 2), Index 1 (Indice 1) e Index 2 (Indice 2) (vedere *Immissione dei parametri della corsa* a pagina 47). Ad esempio, per corse paired-end da 150 cicli, la corsa con doppia cella a flusso S4 con entrambi gli indici lunghi 8 basi, lo spazio richiesto su CE è $(151 * 2 + 8 * 2) * 4,3 = 1,37$ Tb.

Per maggiori informazioni su come liberare spazio su disco, vedere *Eliminazione di una corsa* a pagina 52.

Capitolo 2 Kit e accessori

Descrizione del kit	11
Componenti del kit di reagenti	12
Componenti di NovaSeq Xp Kit	16
Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp	17
Descrizione dei simboli	18

Descrizione del kit

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

Selezionare la dimensione di kit appropriata per la progettazione dell'esperimento. Illumina raccomanda di utilizzare i kit da 500 cicli solo per lunghezze di corsa superiori a 300 cicli.

Per un elenco completo di oggetti necessari per una corsa, vedere *Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente a pagina 26*.

Tabella 5 Configurazioni dei kit





Nome del kit	N. di catalogo dei reagenti v1.0 Illumina	N. di catalogo dei reagenti v1.5 Illumina
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cicli) - confezione da 40	20039236	N/D
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cicli) - confezione da 20	20039234	N/D
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cicli) - confezione da 10	20039233	N/D
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cicli)	20012866	20028312
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (200 cicli)	20027466	20028313
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (35 cicli)	N/D	20044417
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (300 cicli)	20012860	20028314
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (200 cicli)	20012861	20028315
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (100 cicli)	20012862	20028316
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (300 cicli)	20012863	20028317
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (200 cicli)	20012864	20028318
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (100 cicli)	20012865	20028319
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cicli)	20029137	20028402
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (300 cicli)	20027465	20028400
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (200 cicli)	20040326	20040719
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (100 cicli)	20027464	20028401
NovaSeq Xp 2-Lane Kit	20021664	20043130
NovaSeq Xp 4-Lane Kit	20021665	20043131

Etichettatura per la compatibilità

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

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

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

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

Nella [pagina dei prodotti di NovaSeq Reagent Kit](#) sul sito Web di Illumina sono disponibili le specifiche dettagliate di ogni modalità.

Componenti del kit di reagenti

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

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

Tabella 6 Componenti del kit

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



ATTENZIONE

Evitare di fare cadere le cartucce. Se fatta cadere possono verificarsi lesioni. Perdite di reagenti dalla cartuccia possono provocare irritazione alla cute. Prima dell'utilizzo, ispezionare la cartuccia per eventuali crepe.

Provetta delle librerie

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

Figura 4 Provetta delle librerie



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

- ▶ **Standard:** le librerie raggruppate in pool e denaturate sono aggiunte alla provetta delle librerie che viene a sua volta caricata senza tappo nella cartuccia con cluster. Dopo l'avvio della corsa, lo strumento miscela le librerie con i reagenti ExAmp nella provetta della libreria, quindi trasferite automaticamente nella cella a flusso.
- ▶ **NovaSeq Xp:** la provetta delle librerie vuota e senza tappo viene caricata nella cartuccia con cluster. Durante la corsa, i reagenti vengono miscelati nella provetta delle librerie prima della distribuzione alla cella a flusso.

Cella a flusso

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

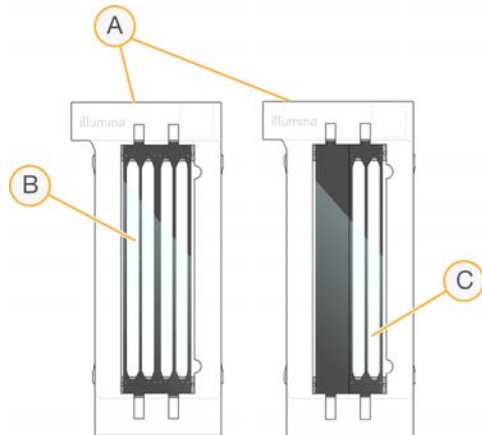
Ciascuna cella a flusso dispone di più corsie per il sequenziamento di librerie raggruppate in pool. Le celle a flusso SP, S1 e S2 dispongono di due corsie ciascuna e la cella a flusso S4 dispone di quattro corsie. Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in strisce multiple, quindi il software divide l'immagine di ciascuna striscia in porzioni più piccole chiamate tile. Per maggiori informazioni, vedere [Tile della cella a flusso a pagina 66](#).



NOTA

Quando si utilizza una cella a flusso S1, assicurarsi di utilizzare NVCS v1.3.1, o versione successiva. Quando si utilizza una cella a flusso SP, assicurarsi di utilizzare NVCS v1.6, o versione successiva.

Figura 5 Celle a flusso



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

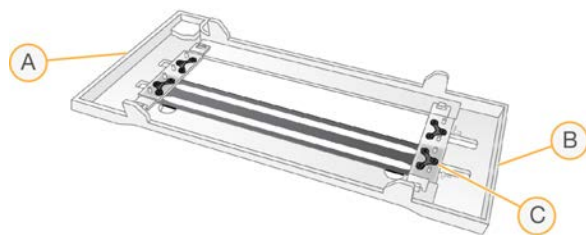
La parte inferiore di ciascuna cella a flusso ha quattro guarnizioni. Le librerie e i reagenti entrano nelle corsie della cella a flusso attraverso le guarnizioni sul lato di entrata della cella a flusso. I reagenti usati vengono drenati dalle corsie attraverso le guarnizioni sul lato di uscita.



NOTA

Evitare di toccare le guarnizioni quando si manipola la cella a flusso.

Figura 6 Cella a flusso capovolta



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




Cartucce di tamponi, con cluster e SBS

Le cartucce di tamponi, con cluster e SBS NovaSeq 6000 dispongono di serbatoi sigillati pre-riempiti con reagenti, tamponi e soluzione di lavaggio. I kit di reagenti contengono una cartuccia di ciascun tipo.

Le cartucce vengono caricate direttamente sullo strumento, sono codificate a colori ed etichettate per ridurre gli errori di caricamento. Le guide presenti nel cassetto del vano refrigerato per i reagenti e nel cassetto dei tamponi assicurano il corretto orientamento.

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

Tabella 7 Cartucce di reagente

Cartuccia	Descrizione
<p>Cartuccia di tamponi NovaSeq 6000</p> 	<p>Pre-riempita con tamponi di sequenziamento e pesa fino a 6,8 kg. Una maniglia in plastica facilita il trasporto, il caricamento e lo scaricamento. La dentellatura sulla piastra superiore permette di mettere le cartucce le une sulle altre.</p>
<p>Cartuccia con cluster NovaSeq 6000</p> 	<p>Pre-riempita con reagenti PE, di indicizzazione, con cluster e soluzione di lavaggio. Include una posizione designata per la provetta delle librerie. L'etichettatura arancione distingue la cartuccia con cluster dalla cartuccia SBS.</p>
<p>Cartuccia SBS NovaSeq 6000</p> 	<p>Pre-riempita con i reagenti per il sequenziamento a volumi specifici per il numero di cicli supportati dal kit (500, 300, 200, 100 o 35). Ciascuna delle tre posizioni di reagente presenta una posizione riservata adiacente per il lavaggio post-corsa automatico. L'etichettatura grigia distingue la cartuccia SBS dalla cartuccia con cluster.</p>

Serbatoi delle cartucce con cluster

Serbatoi rimovibili

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



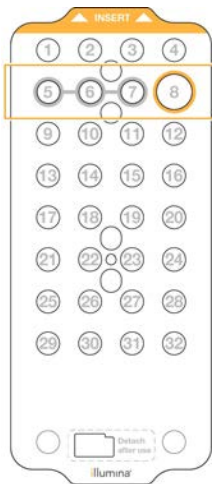
NOTA

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

Serbatoi riservati

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

Figura 7 Serbatoi numerati



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

Per maggiori informazioni sui primer personalizzati, vedere *NovaSeq Series Custom Primers Guide* (documento n. 100000022266) (Guida ai primer personalizzati per la serie NovaSeq).

Componenti di NovaSeq Xp Kit

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



NOTA

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

Tabella 8 Componenti di NovaSeq Xp Kit

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

Reagenti del kit Xp

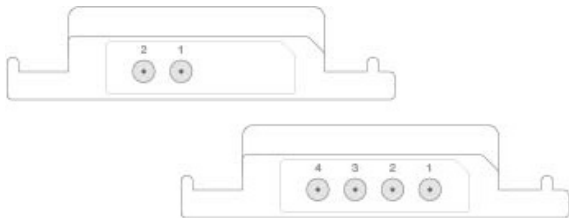
DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3 sono reagenti ExAmp forniti in singole provette per il flusso di lavoro NovaSeq Xp. La combinazione di questi reagenti crea la Master Mix ExAmp che viene miscelata con i pool di librerie prima del caricamento sulla cella a flusso.

Collettore NovaSeq Xp

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

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

Figura 8 Collettori NovaSeq Xp con pozzetti numerati

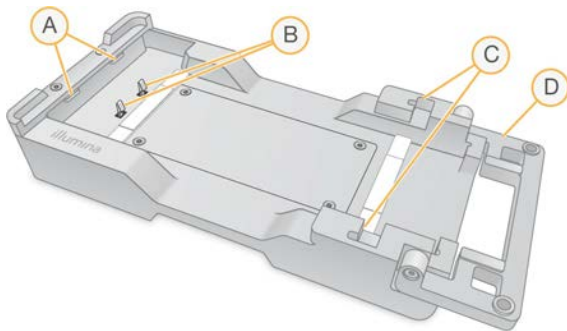


Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp

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

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



Figura 9 Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp



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

Descrizione dei simboli

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

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

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

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

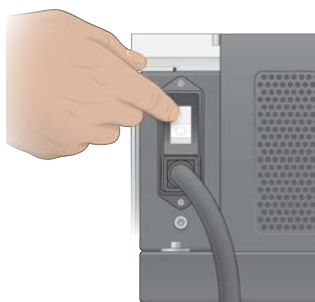
Capitolo 3 Informazioni preliminari

Avvio dello strumento	19
Impostazioni della configurazione	20
Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente	26

Avvio dello strumento

- 1 Spostare l'interruttore di alimentazione che si trova nella parte posteriore dello strumento in posizione | (acceso).

Figura 10 Posizione dell'interruttore di alimentazione



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

Figura 11 Posizione dell'interruttore di alimentazione



Account utente

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

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

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

Accesso al sistema

- 1 Quando il sistema operativo è caricato, accedere a Windows utilizzando il nome utente e la password della propria sede.
- 2 Aprire NVCS.
Il software si avvia e inizializza il sistema. Al termine dell'inizializzazione viene visualizzata la schermata Home (Inizio).

NVCS viene lanciato come un'applicazione utente. Se si cerca di utilizzare una funzione che richiede permessi di amministratore, come Software Update (Aggiornamento software), e non è stato eseguito l'accesso come amministratore, il software suggerisce di accedere come amministratore.

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

Impostazioni della configurazione

NVCS include le impostazioni per quanto segue:

- ▶ Modalità Run (Corsa) (manuale o basata su file)
- ▶ Flusso di lavoro NovaSeq Xp
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Aggiornamenti del software



NOTA

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

Modalità di impostazione della corsa

- ▶ **Manual** (Manuale): la modalità predefinita che invia i dati alla cartella di output specificata per la successiva analisi.
- ▶ **File-Based** (Basato su file): una modalità alternativa che utilizza i file da BaseSpace Clarity LIMS o altri sistemi LIMS per definire i parametri della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Configurazione degli output del sistema LIMS a pagina 22*.

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

Entrambe le modalità di impostazione includono l'opzione per inviare i dati a BaseSpace Sequence Hub per l'analisi.

Configurazione della modalità manuale

- 1 Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).

- 2 Selezionare **Manual** (Manuale).
- 3 **[Facoltativo]** Immettere o cercare una posizione di rete prescelta per la cartella di output.
Non specificare una posizione sulle unità C:\, D:\ o Z:\. Tale operazione causa un errore di unità non valida.
Questa impostazione è la posizione predefinita. La posizione della cartella di output può essere modificata in base alle singole corse.
- 4 **[Facoltativo]** Selezionare **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina) per attivare il servizio di monitoraggio proattivo Illumina. In base alla versione di NVCS in uso, il nome di questa impostazione nell'interfaccia del software potrebbe essere diverso dal nome presente in questa guida.
L'attivazione di questa impostazione consente di inviare a Illumina i dati delle prestazioni dello strumento. Questi dati consentono a Illumina di risolvere facilmente eventuali problemi, di rilevare possibili malfunzionamenti, di eseguire una manutenzione proattiva e di massimizzare il tempo di funzionamento dello strumento. Per maggiori informazioni sui vantaggi di questo servizio, vedere *Illumina Proactive Technical Note (documento n. 1000000052503)* (Nota tecnica sul servizio proattivo Illumina).
Questo servizio:
 - ▶ Non invia i dati del sequenziamento
 - ▶ Richiede che lo strumento sia connesso a una rete con accesso a Internet
 - ▶ Sia attivato per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, disattivare l'opzione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina).
- 5 Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione della modalità basata su file

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

malfunzionamenti, di eseguire una manutenzione proattiva e di massimizzare il tempo di funzionamento dello strumento. Per maggiori informazioni sui vantaggi di questo servizio, vedere *Illumina Proactive Technical Note (documento n. 1000000052503)* (Nota tecnica sul servizio proattivo Illumina).

Questo servizio:

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

Quando abilitata, questa opzione richiede una connessione Internet esterna.

6 Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione degli output del sistema LIMS

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

Il software LIMS esterno può utilizzare NovaSeq LIMS API per interagire con NovaSeq 6000. Per maggiori informazioni sugli endpoint API, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Nome del campo	Valore
run_name (nome_corsa)	Un nome della corsa prescelto che può contenere caratteri alfanumerici, trattini e trattini bassi
run_mode (modalità_corsa)	Una delle seguenti modalità: <ul style="list-style-type: none"> • SP • S1 • S2 • S4
workflow_type (tipo_flusso di lavoro)	NoIndex (Nessun indice), SingleIndex (Singolo indice), or DualIndex (Doppio indice)
librarytube_ID (ID_provetta librerie)	Il RFID della provetta delle librerie
rehyb* (reibridazione)	True (Vero) o False (Falso)
sample_loading_type	NovaSeqStandard o NovaSeqXp
Flowcell_ID (ID_cella a flusso)	L'ID della cella a flusso
paired_end (paired_end)	True (Vero) o False (Falso)
read1 (lettura 1)	Un valore fino a 251 (fino a 259 per ulteriori cicli di letture UMI)
read2 (lettura2)	Un valore fino a 251 (fino a 259 per ulteriori cicli di letture UMI)
index_read1 (indice_lettura1)	Qualsiasi valore
index_read2 (indice_lettura2)	Qualsiasi valore
output_folder (cartella_output)	Il percorso della cartella di output con due barre rovesciate per una sequenza di escape
samplesheet (fogliocampioni)	Il percorso del foglio campioni o altro file nel formato *.csv con due barre rovesciate per una sequenza di escape
use_basespace (utilizzo_basespace)	True (Vero) o False (Falso)

Nome del campo	Valore
basespace_mode (modalità_basespace)	RunMonitoringOnly (Solomonitoraggiocorsa) o RunMonitoringAndStorage (Monitoraggioearchiviazionecorsa)
use_custom_read1_primer (utilizzo_primer_lettura1_personalizzati)	True (Vero) o False (Falso)
use_custom_read2_primer (utilizzo_primer_lettura2_personalizzati)	True (Vero) o False (Falso)
use_custom_index_read1_primer (utilizzo_primer_indici_lettura1_personalizzati)	True (Vero) o False (Falso)
use_custom_index_read2_primer	True (Vero) o False (Falso)

* La reibridazione non è disponibile in NVCS v1.4.0, o versione precedente.

Esempio di file *.json chiamato H6655DMXX.json:

```
{
  "run_name": "2x151_PhiX",
  "run_mode": "S2",
  "workflow_type": "NoIndex",
  "sample_loading_type": "NovaSeqXp",
  "librarytube_ID": "NV1236655-LIB", "flowcell_ID": "H6655DMXX",
  "rehyb": false,
  "paired_end": true,
  "read1": 151,
  "read2": 151,
  "index_read1": 0,
  "index_read2": 0,
  "output_folder": "\\sant-prd-isi01\\NovaSEQ\\SeqRuns",
  "attachment": "\\sant-prd-isi01\\NVSQ\\SampleSheet.csv",
  "use_basespace": false,
  "basespace_mode": null,
  "use_custom_read1_primer": false,
  "use_custom_read2_primer": false,
  "use_custom_index_read1_primer": false
}
```

Configurazione di cicli indici predefiniti

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

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

Flussi di lavoro NovaSeq Standard e NovaSeq Xp

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

► Flusso di lavoro Standard

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

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

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

Come parte dell'impostazione della corsa per il flusso di lavoro Standard, una provetta delle librerie contenente il pool di librerie denaturate e neutralizzate alla concentrazione raccomandata viene inserita nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster. Per maggiori informazioni sulle concentrazioni raccomandate, vedere NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000). Dopo l'avvio della corsa, le fasi successive sono integrate sullo strumento e non richiedono l'interazione dell'utente. Le fasi includono il trasferimento dei reagenti ExAmp dalla cartuccia con cluster alla provetta delle librerie, la preparazione della miscela di reagenti e del pool delle librerie e l'erogazione della miscela preparata a tutte le corsie della cella a flusso.

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

► Flusso di lavoro NovaSeq Xp

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

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

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

Configurazione del flusso di lavoro NovaSeq Xp

- 1 Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).

- 2 Selezionare la scheda **Workflow Selection** (Selezione del flusso di lavoro).
- 3 Per attivare il flusso di lavoro NovaSeq Xp, selezionare **Enable Workflow Selection** (Attiva selezione flusso di lavoro).
- 4 [Facoltativo] Per rendere NovaSeq Xp il flusso di lavoro predefinito, selezionare **NovaSeq Xp**.
- 5 Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione di BaseSpace Sequence Hub

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

- 1 Dal menu principale, selezionare **Settings** (Impostazioni).
Viene visualizzata la schermata Settings (Impostazioni) con la scheda Mode Selection (Selezione modalità).
- 2 Selezionare la casella di controllo **BaseSpace Sequence Hub**.
- 3 Select a Configuration opzion:
 - ▶ **Run Monitoring and Storage** (Monitoraggio e archiviazione corsa): invia i dati della corsa a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio e l'analisi dei dati a distanza. Questa opzione richiede un foglio campioni con la corsa.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): invia il file InterOp, il registro e altri file della corsa che non siano CBCL a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio a distanza delle corse.
- 4 Dal menu a discesa Hosting Location (Posizione Host), selezionare **EU (Frankfurt)** (EU - Francoforte) oppure **USA (N. Virginia)** (U.S.A. - Nord Virginia).
Questa opzione determina dove verranno caricati i dati.
- 5 Se l'utente dispone di un abbonamento a BaseSpace Enterprise:
 - a Selezionare la casella di controllo **Private Domain** (Dominio privato).
 - b Inserire il nome del dominio utilizzato per accedere singolarmente a BaseSpace Sequence Hub.
- 6 Selezionare **Save** (Salva).

Nome del foglio campioni

Quando si esegue NVCS v1.3.1, o versione precedente, un foglio campioni utilizzato per una corsa NovaSeq 6000 e caricato in BaseSpace Sequence Hub deve essere denominato SampleSheet.csv (sensibile alle maiuscole e alle minuscole). Se il foglio campioni presenta un nome errato e sono state attivate le funzioni Run Monitoring and Storage (Monitoraggio e archiviazione corsa), BaseSpace Sequence Hub segnala che la corsa necessita di attenzione. Una corsa segnalata può essere messa in coda per la generazione di file FASTQ selezionando **More | Fix Sample Sheet and Queue** (Altro | Modifica foglio campioni e rimetti in coda), quindi immettere il foglio campioni appropriato. Fino al momento in cui non viene fornito il foglio campioni, i dati del sequenziamento non possono essere convertiti in file FASTQ.

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

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

Configurazione degli aggiornamenti del software

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

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

Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente

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

Materiali di consumo

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
1 N di NaOH	Fornitore di laboratorio generico	Diluito a 0,2 N per la denaturazione delle librerie.
Flacone per centrifuga, 500 ml	Fornitore di laboratorio generico	Diluizione di Tween 20 per un lavaggio di manutenzione.
Provetta per centrifuga, 30 ml	Fornitore di laboratorio generico	Diluizione di NaOCl per un lavaggio di manutenzione.
Guanti monouso, privi di polvere	Fornitore di laboratorio generico	Uso generico.
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure Salviettine imbevute di alcol etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 95041-714, o equivalente Fornitore di laboratorio generico	Pulizia dei componenti prima di una corsa e per uso generico.
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026, o equivalente	Asciugatura del piano portacelle e per uso generico.
Provette per microcentrifuga da 1,5 ml	VWR, n. di catalogo 20170-038, o equivalente	Combinazione dei volumi quando si diluisce NaOH e la libreria.
NaOCl di grado reagente, 5%	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 239305	Esecuzione di un lavaggio di manutenzione.
NovaSeq 6000 Reagent Kit	Illumina, vedere Descrizione del kit a pagina 11	Esecuzione di una corsa di sequenziamento.
Punte per pipette, da 20 µl	Fornitore di laboratorio generico	Pipettamento per la diluizione e il caricamento delle librerie.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Punte per pipette da 200 µl	Fornitore di laboratorio generico	Pipettamento per la diluizione e il caricamento delle librerie.
Punte per pipette, da 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico	Pipettamento per la diluizione e il caricamento delle librerie.
Reagente o alcol isopropilico per spettrofotometria (99%), flacone da 100 ml	Fornitore di laboratorio generico	Pulizia periodica dei componenti ottici e supporto della cartuccia di pulizia dell'obiettivo.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Esecuzione di un lavaggio di manutenzione.
Acqua da laboratorio	Fornitore di laboratorio generico	Diluizione di NaOH per denaturare le librerie. Diluizione di Tween 20 e di sodio ipoclorito per un lavaggio di manutenzione.
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] Uno dei seguenti kit: <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq Xp 2-Lane Kit • NovaSeq Xp 4-Lane Kit 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N. di catalogo 20021664 • N. di catalogo 20021665 	Caricamento manuale delle librerie in una cella a flusso: <ul style="list-style-type: none"> • Kit a due corsie per celle a flusso SP, S1 e S2 • Kit a quattro corsie per celle a flusso S4
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] Uno dei seguenti kit: <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq Xp 2-Lane Kit v1.5 • NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N. di catalogo 20043130 • N. di catalogo 20043131 	Caricamento manuale delle librerie in una cella a flusso: <ul style="list-style-type: none"> • Kit a due corsie per celle a flusso SP, S1 e S2 • Kit a quattro corsie per celle a flusso S4
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] provette da 0,5 ml e 1,7 ml	Fornitore di laboratorio generico	Necessarie per la miscelazione ExAmp.
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] [Facoltativo] Una delle seguenti confezioni di collettori: <ul style="list-style-type: none"> • NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack • NovaSeq Xp 4-Lane Manifold Pack 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N. di catalogo 20021666 • N. di catalogo 20021667 	Collettori di ricambio NovaSeq Xp per il caricamento manuale delle librerie in una cella a flusso.
[Facoltativo] Campione di controllo PhiX v3	Illumina, n. di catalogo FC-110-3001	Incremento nel campione di controllo PhiX.

Materiali di consumo contenuti nei kit Illumina

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

Tabella 9 Materiali di consumo in un NovaSeq 6000 Reagent Kit

Materiali di consumo (uno di ciascuno)	Scopo
Cartuccia di tamponi	Fornisce i tamponi di sequenziamento per la corsa.
Cartuccia con cluster	Fornisce i reagenti PE, di indicizzazione e per la generazione di cluster per la corsa.
Cella a flusso	La generazione di cluster e la reazione di sequenziamento vengono eseguite sulla cella a flusso.
Cartuccia SBS	Fornisce i reagenti per il sequenziamento per la corsa.

Materiali di consumo (uno di ciascuno)	Scopo
Provetta della libreria	Provetta vuota utilizzata per contenere le librerie raggruppate in pool e denaturate (fornite dal cliente) o per preparare la miscela di condizionamento per incrementare l'efficienza della generazione di cluster per il sequenziamento.

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



NOTA

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

Tabella 10 Materiali di consumo contenuti in un NovaSeq Xp Kit

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

Linee guida per l'acqua da laboratorio

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

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

Apparecchiatura

Apparecchio	Fornitore
Congelatore, tra -25 °C e -15 °C	Fornitore di laboratorio generico
Cilindro graduato, 500 ml, sterile	Fornitore di laboratorio generico
Portaghiaccio	Fornitore di laboratorio generico
Pipette, 20 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette, 200 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette, 1000 µl	Fornitore di laboratorio generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico
Vasca, bagni d'acqua*	Fornitore di laboratorio generico
[Flusso di lavoro NovaSeq Xp] NovaSeq Xp Flow Cell Dock	Illumina, n. di catalogo 20021663

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

Capitolo 4 Flusso di lavoro Standard: preparazione dei materiali di consumo

Metodi	29
Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster	29
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati	30
Preparazione della cella a flusso	32
Raggruppamento e denaturazione delle librerie per il sequenziamento	32

Metodi

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

Tabella 11 Requisiti minimi per il software

Cella a flusso	Versione software minima per v1.0 Reagent Kit	Versione software minima per v1.5 Reagent Kit
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Tutte	1.7
S4	1.2.0	1.7

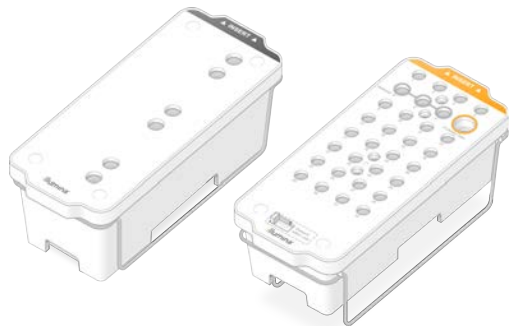
- ▶ Assicurarsi di avere a disposizione le apparecchiature e i materiali di consumo richiesti. Vedere *Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente a pagina 26*.
- ▶ Controllare sempre l'etichetta quando si preparano i materiali di consumo per assicurare la compatibilità tra i componenti. Non utilizzare insieme o abbinare i componenti di SP, S1, S2 e S4.
- ▶ Non mischiare le versioni dei kit di reagenti.
 - ▶ Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.0.
 - ▶ Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.5.
- ▶ Attenersi alle istruzioni nell'ordine indicato, utilizzando i volumi, le concentrazioni, le temperature e le durate indicate.
- ▶ Se le istruzioni non specificano un punto di arresto, passare immediatamente al passaggio successivo.

Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster

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

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

Figura 12 Cartucce in griglie di scongelamento



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



ATTENZIONE

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

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

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

Svuotamento dei flaconi di reagenti usati

Utilizzare le seguenti istruzioni per svuotare i flaconi di reagenti usati con **ogni** corsa di sequenziamento. Se il sistema è configurato per far defluire i reagenti usati all'esterno, il flacone piccolo raccoglie i reagenti usati e deve essere svuotato per ogni corsa di sequenziamento. Il flacone grande deve rimanere in posizione.

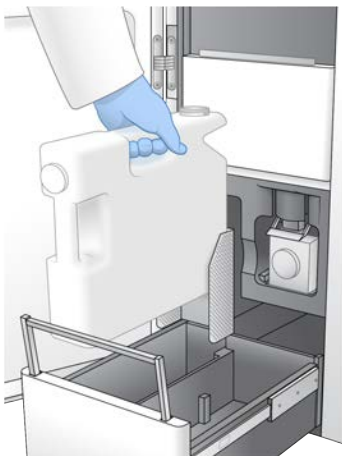


AVVERTENZA

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.

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

Figura 13 Riposizionamento del flacone vuoto nel suo alloggiamento



- 3 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere per evitare di contaminare la superficie dello strumento.
- 4 Chiudere il cassetto dei tamponi, quindi chiudere gli sportelli dello scomparto dei liquidi.



AVVERTENZA

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

Preparazione della cella a flusso

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

Raggruppamento e denaturazione delle librerie per il sequenziamento

La concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e quantificazione delle librerie. Per istruzioni, vedere NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000). Quando la libreria raggruppata in pool è pronta, procedere con *Preparazione delle cartucce SBS e con cluster a pagina 42*.



ATTENZIONE

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

Preparazione delle cartucce SBS e con cluster

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

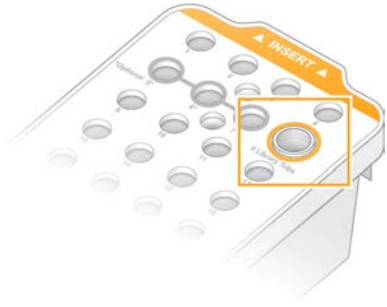
Preparazione dei primer personalizzati

Se la libreria richiede i primer personalizzati, prepararli attenendosi alle istruzioni contenute in NovaSeq Series Custom Primers Guide (documento n. 1000000022266) (Guida ai primer di sequenziamento per NovaSeq).

Caricamento della provetta delle librerie

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

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



Capitolo 5 Flusso di lavoro NovaSeq Xp: preparazione dei materiali di consumo

Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp	34
Metodi	35
Scongelamento delle cartucce SBS e con cluster	35
Svuotamento dei flaconi di reagenti usati	36
Preparazione della cella a flusso	38
Scongelamento dei reagenti ExAmp	38
Raggruppamento in pool, denaturazione e caricamento delle librerie per il sequenziamento	38

Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp

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

Tabella 12 Requisiti minimi per il software

Cella a flusso	Versione software minima per v1.0 Reagent Kit	Versione software minima per v1.5 Reagent Kit
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Tutte	1.7
S4	1.2.0	1.7



NOTA

NVCS supporta l'avvio scagionato di nuove corse. Vedere *Avvio di corse scagionate* a pagina 51.

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



NOTA

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

- 1 Scongelare le cartucce SBS e con cluster.
- 2 Svuotare i flaconi di reagenti usati.
- 3 Mettere da parte la confezione della cella a flusso sigillata per 10-15 minuti per consentire alla cella a flusso di raggiungere la temperatura ambiente. Utilizzare la cella a flusso entro 12 ore dalla rimozione dalla confezione.
- 4 Normalizzare e raggruppare in pool le librerie e, facoltativamente, aggiungere il campione di controllo PhiX in base al corretto protocollo per le librerie contenuto in NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000).



NOTA

Completare le fasi 5-11 nell'ordine indicato.

- 5 Scongelare i reagenti ExAmp.

- 6 Preparare al momento una diluizione di NaOH in base a quanto indicato in NovaSeq 6000 and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000).
- 7 Denaturare e neutralizzare il pool di librerie in base a quanto indicato in NovaSeq 6000 and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000).
- 8 Preparare la cella a flusso e la stazione di attacco.
- 9 Preparare la Master Mix ExAmp.
- 10 Caricare la miscela ExAmp/libreria sulla cella a flusso.
- 11 Caricare una provetta delle librerie vuota nella posizione n. 8 della cartuccia con cluster.

Metodi

- ▶ Assicurarsi di avere a disposizione le apparecchiature e i materiali di consumo richiesti. Vedere *Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente a pagina 26*.
- ▶ Assicurarsi che lo strumento sia acceso e che lo spazio di archiviazione sia sufficiente per la corsa. Vedere *Schermata Process Management (Gestione processo) a pagina 9*.
- ▶ Assicurarsi che il lavaggio post-corsa automatico su entrambi i lati dello strumento sia terminato prima di avviare la fase *Scongellamento dei reagenti ExAmp* contenuta in *Riepilogo del flusso di lavoro NovaSeq Xp a pagina 34*.
- ▶ Controllare sempre l'etichetta quando si preparano i materiali di consumo per assicurare la compatibilità tra i componenti. Non miscelare i componenti di SP, S1, S2 e S4 o i componenti a due corsie e a quattro corsie, su un lato dello strumento.
- ▶ Non mischiare le versioni dei kit di reagenti.
 - ▶ Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.0.
 - ▶ Dovrebbero essere accoppiate solo le cartucce SBS e CPE v1.5.
- ▶ Attenersi alle istruzioni nell'ordine indicato, utilizzando i volumi, le temperature e le durate indicate.
- ▶ Quando non si sta miscelando, posizionare tutti i reagenti e le librerie su ghiaccio.
- ▶ Se le istruzioni non specificano un punto di arresto, passare immediatamente al passaggio successivo.
- ▶ Per avviare correttamente il sequenziamento per una cella a flusso a due corsie, devono essere riempite entrambe le corsie. Per avviare correttamente il sequenziamento per una cella a flusso a quattro corsie, una corsia deve essere riempita parzialmente o deve essere vuota.
- ▶ Le cause più comuni delle variazioni nei risultati quando i reagenti ExAmp vengono miscelati manualmente sono l'erogazione inaccurata dei volumi dei componenti ExAmp e la miscelazione insufficiente. Non miscelare poco i campioni.



NOTA

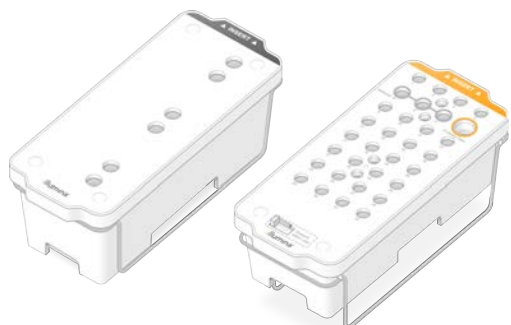
Avviare la corsa di sequenziamento immediatamente dopo il caricamento delle librerie sulla cella a flusso, preferibilmente entro 30 minuti.

Scongellamento delle cartucce SBS e con cluster

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

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

Figura 15 Cartucce in griglie di scongelamento



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



ATTENZIONE

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

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

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

Svuotamento dei flaconi di reagenti usati

Utilizzare le seguenti istruzioni per svuotare i flaconi di reagenti usati con *ogni* corsa di sequenziamento. Se il sistema è configurato per far defluire i reagenti usati all'esterno, il flacone piccolo raccoglie i reagenti usati e deve essere svuotato per ogni corsa di sequenziamento. Il flacone grande deve rimanere in posizione.

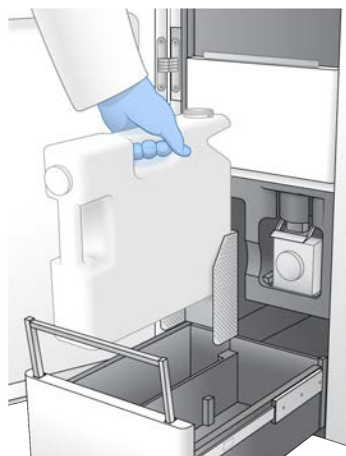


AVVERTENZA

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.

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

Figura 16 Riposizionamento del flacone vuoto nel suo alloggiamento



- 3 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere per evitare di contaminare la superficie dello strumento.
- 4 Chiudere il cassetto dei tamponi, quindi chiudere gli sportelli dello scomparto dei liquidi.



AVVERTENZA

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

Preparazione della cella a flusso

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

Scongelamento dei reagenti ExAmp

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



NOTA

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

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

La concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e quantificazione delle librerie. Per istruzioni, vedere NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (documento n. 1000000106351) (Guida alla denaturazione e diluizione per NovaSeq 6000). Quando la libreria raggruppata in pool è pronta, procedere con *Preparazione della cella a flusso e della stazione di attacco* a pagina 38.

Preparazione della cella a flusso e della stazione di attacco

- 1 Posizionare la stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp su una superficie piana. Tenere la cella a flusso livellata fino a quando viene caricata sullo strumento.
- 2 Ispezionare la stazione di attacco e assicurarsi che sia privo di particelle.
- 3 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere per evitare di contaminare la superficie in vetro della cella a flusso.
- 4 Tenendo la cella a flusso su una superficie piana, aprirla partendo dal sigillo angolato.
- 5 Rimuovere il contenitore in plastica trasparente che copre la cella a flusso.
- 6 Rimuovere la cella a flusso dalla confezione. Afferrare la cella a flusso dai lati evitando di toccare il vetro o le guarnizioni nella parte inferiore.

- 7 Se sono visibili particelle sulle superfici di vetro, pulire la superficie interessata con una salviettina imbevuta di alcol che non lascia residui e asciugare con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.
- 8 Eliminare la confezione in base alle procedure di smaltimento.

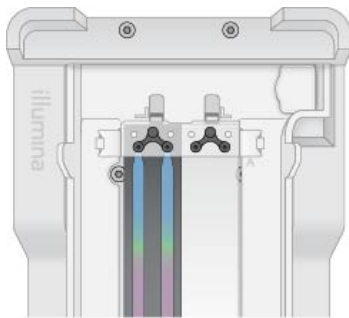


NOTA

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

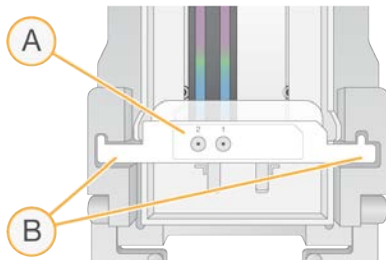
- 9 Capovolgere la cella a flusso in modo che la superficie superiore sia rivolta verso il **basso**.
- 10 Fare scorrere l'estremità di uscita della cella a flusso sotto la staffa e posizionarla nella stazione di attacco. Vedere *Cella a flusso a pagina 13* e *Stazione di attacco della cella a flusso NovaSeq Xp a pagina 17*.

Figura 17 Posizionamento della cella a flusso



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

Figura 18 Posizionamento del collettore NovaSeq Xp



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

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

Preparazione della Master Mix ExAmp

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

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

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



NOTA

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

- 1 Capovolgere o utilizzare brevemente un vortex per miscelare DPX1/JPX1 e DPX2/JPX2.
- 2 Utilizzare brevemente un vortex per miscelare DPX3.
I reagenti ExAmp potrebbero essersi separati durante la conservazione. I reagenti sono viscosi, in particolare DPX2/JPX2 e DPX3. A causa dell'elevata viscosità, DPX3 non si miscela facilmente quando capovolto.
- 3 Centrifugare brevemente DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3.
- 4 Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga adatta nell'ordine indicato:

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

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

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

- 5 Pipettare e dispensare lentamente per evitare la formazione di bolle e per assicurarsi che l'intero volume fuoriesca dalla punta.
- 6 Utilizzare un vortex per 20-30 secondi o fino a completa miscelazione.



NOTA

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

La miscela potrebbe apparire torbida e questo è normale.

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

Caricamento delle librerie sulla cella a flusso

Per ottenere i risultati migliori, attenersi a quanto segue:

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

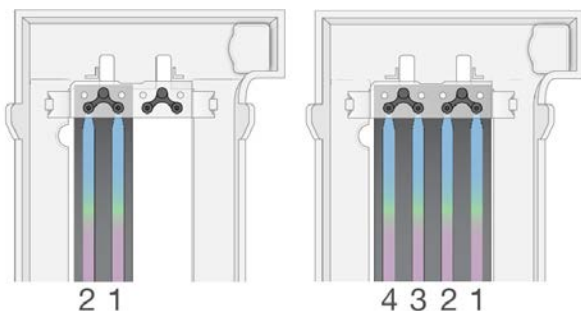
Modalità	Pool di librerie denaturate (µl)	Master Mix ExAmp Master (µl)	Volume risultante (µl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

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

Modalità	Miscela libreria/ExAmp per pozzetto (µl)
SP/S1	80
S2	95
S4	130

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

Figura 19 Numerazione invertita delle corsie



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



ATTENZIONE

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



NOTA

Non inclinare la cella a flusso durante il trasporto.

Preparazione delle cartucce SBS e con cluster

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

Preparazione dei primer personalizzati

Se la libreria richiede i primer personalizzati, prepararli attenendosi alle istruzioni contenute in NovaSeq Series Custom Primers Guide (documento n. 100000022266) (Guida ai primer di sequenziamento per NovaSeq).

Caricamento della provetta delle librerie vuota

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

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

Figura 20 Provetta delle librerie senza tappo caricata nella posizione n. 8



Capitolo 6 Sequenziamento

Impostazione di una corsa di sequenziamento	43
Monitoraggio del progresso della corsa	50
Avvio di corse scaglionate	51
Eliminazione di una corsa	52
Posizione rimovibile n. 30	52
Lavaggio post-corsa automatico	53

Impostazione di una corsa di sequenziamento

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

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



NOTA

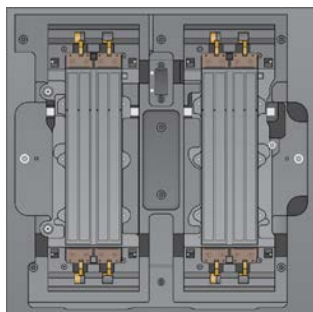
È supportato l'avvio scagionato di nuove corse. Il timer di avvio delle corse scaglionate indica quando può essere avviata una corsa scaglionata. Per maggiori informazioni, vedere *Avvio di corse scaglionate a pagina 51*.

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

Caricamento della cella a flusso sullo strumento

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

Figura 21 Piano portacelle



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

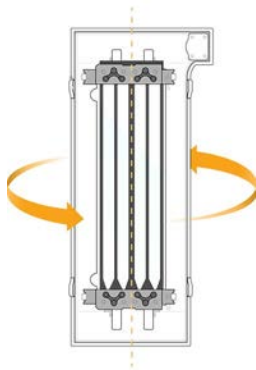


NOTA

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

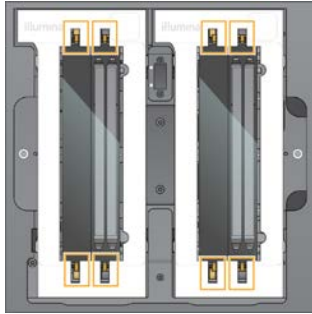
- 4 **[Flusso di lavoro NovaSeq Xp]** Scaricare la cella a flusso dalla stazione di attacco nel modo seguente.
 - a Aprire il morsetto che tiene in posizione la cella a flusso e il collettore.
 - b Senza far gocciolare liquido sulla cella a flusso, rimuovere con attenzione e smaltire il collettore.
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

Figura 22 Capovolgimento della cella a flusso lungo l'asse



- g Prima di rimettere la stazione di attacco nel luogo di conservazione, ispezionarla per assicurarsi che sia priva di particelle.
- 5 Allineare la cella a flusso sopra i quattro morsetti sollevati e posizionarla sul piano portacelle.

Figura 23 Celle a flusso caricate e allineate sopra i morsetti



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

Caricamento delle cartucce con cluster e SBS



NOTA

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

- 1 Aprire gli sportelli dello scomparto dei liquidi, quindi aprire lo sportello del vano refrigerato per i reagenti.
- 2 Rimuovere le cartucce SBS e con cluster usate.
Le cartucce usate presentano sigilli perforati.
- 3 Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.
Per il corretto smaltimento della posizione n. 30 della cartuccia con cluster, vedere *Posizione rimovibile n. 30 a pagina 52*.
- 4 Caricare le cartucce preparate nel cassetto del vano refrigerato per i reagenti in modo che le etichette **Insert** (Inserisci) siano rivolte verso la parte posteriore dello strumento:
 - ▶ Posizionare la cartuccia SBS (etichetta grigia) nella posizione sinistra.
 - ▶ Posizionare la cartuccia con cluster (etichetta arancione) contenente la provetta delle librerie senza tappo nella posizione destra.

Figura 24 Cartucce di reagenti caricate



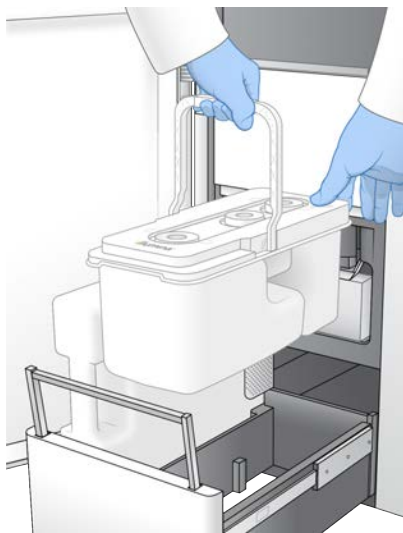
- 5 Fare scorrere il cassetto nel vano refrigerato per i reagenti, quindi chiudere lo sportello del vano refrigerato.

Vengono verificati i sensori e i RFID. Gli ID per la provetta delle librerie e le due cartucce vengono visualizzati sulla schermata.

Caricamento della cartuccia di tamponi

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

Figura 25 Caricamento della cartuccia di tamponi



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



AVVERTENZA

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

- 5 Selezionare il pulsante disponibile:
 - ▶ **Log In** (Accedi): apre la schermata Log In (Accesso) per accedere a BaseSpace Sequence Hub. Passare a [Accesso a BaseSpace Sequence Hub](#) (Accedi a).
 - ▶ **Run Setup** (Impostazione corsa): salta BaseSpace Sequence Hub e apre la schermata Run Setup (Impostazione corsa) per immettere i parametri della corsa. Passare a [Immissione dei parametri della corsa a pagina 47](#).

La presenza di uno o dell'altro pulsante dipende da se il sistema è configurato per BaseSpace Sequence Hub.

Accesso a BaseSpace Sequence Hub

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

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

Immissione dei parametri della corsa

- 1 Se il flusso di lavoro NovaSeq Xp è attivato, selezionare un tipo di flusso di lavoro.
 - ▶ Se è stato selezionato **NovaSeq Xp**, assicurarsi che sia caricata un provetta della libreria vuota.
 - ▶ Se è stato selezionato **NovaSeq Standard**, assicurarsi che il campione sia caricato nella provetta della libreria.
- 2 Nel campo Run Name (Nome corsa), inserire il nome prescelto per identificare la corsa attuale. Il nome della corsa può contenere caratteri alfanumerici, trattini e trattini bassi.
- 3 Immettere il numero di cicli per ogni lettura e lunghezza indice nella corsa di sequenziamento. Non esiste un numero massimo di cicli indici, ma la somma dei cicli di lettura e dei cicli indici deve essere inferiore al numero di cicli per il kit.
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli per i kit v1.0 da 300 cicli oppure fino a 251 per i kit v1.0 da 500 cicli. Immettere un valore fino a 159 cicli per i kit v1.5 da 300 cicli oppure fino a 259 per i kit v1.5 da 500 cicli.
 - ▶ **Index 1** (Indice 1): immettere il numero di cicli per il primer Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).
 - ▶ **Index 2** (Indice 2): immettere il numero di cicli per il primer Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).
 - ▶ **Read 2** (Lettura 2): immettere un valore fino a 151 cicli per i kit v1.0 da 300 cicli oppure fino a 251 per i kit v1.0 da 500 cicli. Immettere un valore fino a 159 cicli per i kit v1.5 da 300 cicli oppure fino a 259 per i kit v1.5 da 500 cicli. Questo valore è di solito lo stesso del valore per Read 1 (Lettura 1).

**NOTA**

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

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

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

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

- 4 Allargare **Advanced Options** (Opzioni avanzate) per applicare le impostazioni per la corsa attuale. Queste impostazioni sono facoltative se non diversamente indicato.
 - ▶ **v1.0 Custom Primers** (Primer personalizzati v1.0): selezionare la casella di controllo **Custom Primers** (Primer personalizzati), quindi selezionare le caselle di controllo appropriate. Se si utilizzano i kit v1.0, le librerie di tagmentazione DNA PCR-Free Prep Illumina richiedono primer di sequenziamento Read 1 (Lettura 1) (VP10). Per i dettagli, vedere NovaSeq Series Custom Primers Guide (documento n. 1000000022266) (Guida ai primer personalizzati per la serie NovaSeq).
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): utilizzare i primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
 - ▶ **Read 2** (Lettura 2): utilizzare i primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
 - ▶ **Custom Index** (Indice personalizzato): utilizzare i primer personalizzati per Index 1 (Indice 1).
 - ▶ **v1.5 Custom Primers** (Primer personalizzati v1.5): selezionare la casella di controllo **Custom Primers** (Primer personalizzati), quindi selezionare le caselle di controllo appropriate. Se si utilizzano i kit v1.5, le librerie di tagmentazione DNA PCR-Free Prep Illumina non richiedono primer di sequenziamento. Per i dettagli, vedere NovaSeq Series Custom Primers Guide (documento n. 1000000022266) (Guida ai primer personalizzati per la serie NovaSeq).
 - ▶ **Read 1** (Lettura 1): utilizzare i primer personalizzati per Read 1 (Lettura 1).
 - ▶ **Read 2** (Lettura 2): utilizzare i primer personalizzati per Read 2 (Lettura 2).
 - ▶ **Custom Index** (Indice personalizzato): utilizzare i primer personalizzati sia per le letture Index 1 (Indice 1) che per le letture Index 2 (Indice 2).
 - ▶ **Output Folder** (Cartella di output): selezionare **Browse** (Sfogliala) per modificare la cartella di output per la corsa attuale. Una cartella di output è richiesta quando la corsa non è collegata a BaseSpace Sequence Hub per l'archiviazione dei dati.
 - ▶ **Samplesheet** (Fogliocampioni): selezionare **Browse** (Sfogliala) per caricare un foglio campioni, che è richiesto quando si utilizza BaseSpace Sequence Hub per eseguire il monitoraggio e l'archiviazione o altri file CSV. Il file CVS viene copiato nella cartella di output e non incide sui parametri della corsa. Assicurarsi che il foglio campioni caricato sia nel formato corretto (direzione dell'adattatore per Index Read 2 - Lettura indici 2) in base ai flussi di lavoro v1.0 e v1.5 che utilizzano strategie diverse. I flussi di lavoro per i filamenti forward vengono eseguiti con i kit di reagenti v1.0. I flussi di lavoro per i complementi reverse vengono eseguiti con i kit di reagenti v1.5.
 - ▶ **Custom Recipe** (Ricetta personalizzata): selezionare **Custom Recipe** (Ricetta personalizzata), quindi **Browse** (Cerca) per utilizzare una ricetta personalizzata in formato XML per questa corsa. Le ricette personalizzate per v1.0 non sono compatibili per v1.5. Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

**NOTA**

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

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

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

Conferma dei parametri della corsa

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

Revisione delle verifiche pre-corsa

- 1 Il completamento della verifica pre-corsa impiega circa cinque minuti.
Dopo il corretto completamento, la corsa viene avviata automaticamente.



NOTA

Per evitare l'eccessivo caricamento del disco rigido, non copiare alcun dato su C:\ dopo l'avviamento della corsa.

- 2 Se le verifiche pre-corsa non viene superata a causa di un errore dei sensori, come una cella a flusso non rilevata, è necessario uscire e riavviare il flusso di lavoro.
- 3 Se altre verifiche pre-corsa non vengono superate, selezionare **Retry** (Riprova) per riavviare le verifiche non superate o **Retry All** (Riprova tutte) per riavviare tutte le verifiche.
Gli errori devono essere risolti prima di poter avviare la corsa. Per informazioni sulla risoluzione dei problemi, vedere *Errori della verifica pre-corsa a pagina 60*.
- 4 Selezionare l'icona **Errore** per visualizzare i dettagli relativi all'errore.
- 5 Se la verifica dell'allineamento non viene superata, risolvere l'errore nel modo seguente.
 - a Selezionare **Reload** (Ricarica), quindi selezionare **OK** (Ok) per confermare e tornare alla schermata Load (Carica).
 - b Rimuovere qualsiasi oggetto che si trovi nella parte superiore dello strumento, quindi selezionare **OK**.
 - c Ricaricare la cella a flusso, quindi selezionare **Run Setup** (Impostazione corsa).
 - d Completare ciascuna schermata per rileggere ogni RFID e tornare alla schermata Pre-Run Checks (Verifiche pre-corsa).
 - e Rieseguire la verifica.

Monitoraggio del progresso della corsa

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

Per maggiori informazioni sulle metriche della corsa, vedere *Real-Time Analysis* a pagina 65.

Figura 26 Progresso e metriche della corsa di sequenziamento



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



NOTA

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

Metriche della corsa

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

La generazione di cluster richiede circa due ore, quindi il sequenziamento viene avviato con il ciclo 1. Le metriche vengono aggiornate mano a mano che il sequenziamento prosegue. I cluster che attraversano il filtro, la resa e i punteggi qualitativi sono disponibili dopo il ciclo 26. Prima del ciclo 26, nessun valore viene popolato e vengono indicati come N/A.

Processing Status (Stato del processo)

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

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

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

Quando un processo è completato, viene visualizzato un segno di spunta verde. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Process Management (Gestione processo) a pagina 9*.

Avvio di corse scaglionate

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

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

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

Procedura

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

Eliminazione di una corsa

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

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

Posizione rimovibile n. 30

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



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.

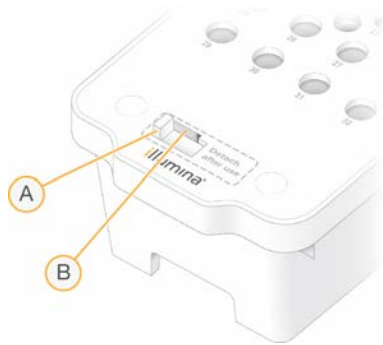
- 1 Indossando un paio di guanti, spingere la linguetta in plastica bianca etichettata **Detach after use** (Rimuovere dopo l'uso) che si trova sulla destra.
- 2 Posizionare una mano o una superficie sotto il serbatoio, premere la linguetta in plastica trasparente verso l'etichetta Illumina per rilasciare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



NOTA

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

Figura 27 Posizione rimovibile n. 30



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

3 Smaltire il serbatoio in base agli standard applicabili.

Lavaggio post-corsa automatico

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

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



NOTA

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

Capitolo 7 Manutenzione

Manutenzione preventiva	54
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione	54
Aggiornamenti del software	58

Manutenzione preventiva

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

Esecuzione di un lavaggio di manutenzione

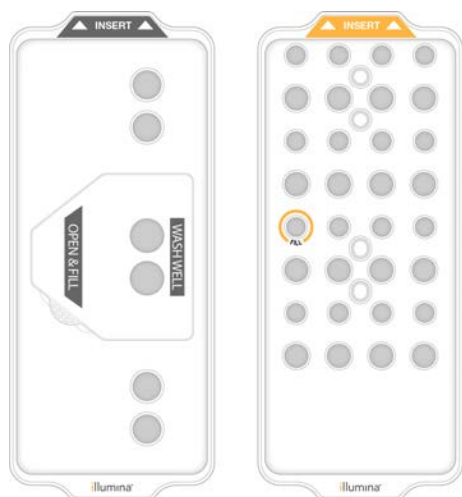
Il software suggerisce un lavaggio di manutenzione nei seguenti momenti:

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

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

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

Figura 28 Cartuccia di lavaggio SBS (sinistra) e cartuccia di lavaggio con cluster (destra)



Preparazione della soluzione di lavaggio

- 1 Dispensare 400 ml di acqua da laboratorio in un flacone per centrifuga da 500 ml.

- 2 Dispensare 0,2 ml di Tween 20 al 100% per ottenere una soluzione di lavaggio di almeno 400 ml di Tween 20 allo 0,05%.
L'utilizzo di una diluizione di Tween 20 appena preparata limita l'introduzione di biocontaminanti nel sistema di fluidica.
- 3 Capovolgere per miscelare.
- 4 Rimuovere il coperchio dal pozzetto centrale della cartuccia di lavaggio SBS.
- 5 Aggiungere la soluzione di lavaggio nel pozzetto centrale. Riempire fino alla linea di riempimento, che indica il volume minimo richiesto.
Gli altri serbatoi rimangono vuoti.

Figura 29 Centraggio del pozzetto riempito fino alla linea MIN FILL VOLUME (Volume riempimento minimo)



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

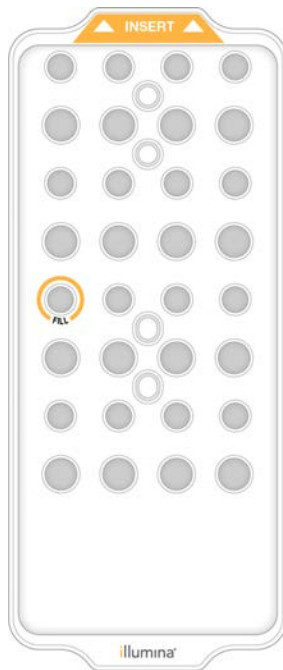


ATTENZIONE

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

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

Figura 30 Posizione di NaOCl allo 0,25%



Caricamento della cella a flusso di lavaggio

- 1 Rimuovere qualsiasi oggetto dalla superficie dello strumento.
Mantenere la superficie libera durante il lavaggio di manutenzione ed evitare di appoggiarsi allo strumento. Premere sullo sportello della cella a flusso per aprirla. Questa azione arresta il lavaggio.
- 2 Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Wash** (Lavaggio) quindi selezionare il lato da lavare:
 - ▶ **A+B**: lava entrambi i lati simultaneamente.
 - ▶ **A**: lava solo il lato A.
 - ▶ **B**: lava solo il lato B.
 Il software avvia la serie di schermate relative al lavaggio.



NOTA

Un lavaggio di manutenzione per un singolo lato può essere avviato solo quando l'altro lato è inattivo o sta eseguendo i cicli di lettura SBS. Il tempo di avvio scaglionato di NVCS indica la disponibilità dello strumento per l'avvio di una nuova corsa o di un lavaggio. Vedere *Avvio di corse scaglionate a pagina 51*.

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

Caricamento delle cartucce di lavaggio

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

- 1 Aprire gli sportelli dello scomparto dei liquidi, quindi aprire lo sportello del vano refrigerato per i reagenti.
- 2 Rimuovere le cartucce di reagenti con cluster e SBS usate. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.
Per il corretto smaltimento della posizione n. 30 della cartuccia con cluster, vedere *Posizione rimovibile n. 30 a pagina 52*.
- 3 Caricare le cartucce di lavaggio nel cassetto del vano refrigerato per i reagenti in modo che le etichette **Insert** (Inserisci) siano rivolte verso la parte posteriore dello strumento:
 - ▶ Posizionare la cartuccia SBS (etichetta grigia) nella posizione sinistra.
 - ▶ Posizionare la cartuccia con cluster (etichetta arancione) nella posizione destra.
- 4 Fare scorrere il cassetto nel vano refrigerato per i reagenti, quindi chiudere lo sportello del vano refrigerato.
I sensori vengono verificati e i RFID per ciascuna cartuccia vengono scansionati e visualizzati sulla schermata.
- 5 Aprire il cassetto dei tamponi.
- 6 Se non è già presente, caricare una cartuccia di tamponi usata.

Svuotamento dei flaconi di reagenti usati

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



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.

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

Avvio del lavaggio

- 1 Selezionare la casella di controllo per confermare che entrambi i flaconi di reagenti usati sono vuoti, quindi selezionare **Start Wash** (Avvia lavaggio).
Il lavaggio si avvia e viene visualizzato il tempo stimato per il completamento del lavaggio.

**AVVERTENZA**

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

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

Aggiornamenti del software

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

**NOTA**

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

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

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

Tabella 13 Requisiti minimi per il software

Cella a flusso	Versione software minima per v1.0 Reagent Kit	Versione software minima per v1.5 Reagent Kit
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Tutte	1.7
S4	1.2.0	1.7

**NOTA**

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

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

- 1 Dal menu principale, selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
Viene visualizzata la schermata Software Update (Aggiornamento software) che fornisce le note sulla release per l'aggiornamento disponibile. Se la verifica automatica della disponibilità degli aggiornamenti del software non è attivata, è possibile verificarli manualmente oppure attivare la verifica automatica.

- 2 Per scaricare e installare l'aggiornamento, selezionare la casella di controllo per confermare che il download e l'installazione richiede circa 30 minuti.
- 3 Selezionare **Download and Install** (Scarica e installa).
Al termine del download, NVCS si chiude e viene avviato il programma di installazione. Seguire le istruzioni per programma di installazione per completare l'installazione.
Se si verificano errori durante il download o l'installazione, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Appendice A Risoluzione dei problemi

Risorse per la risoluzione dei problemi	60
File di risoluzione dei problemi	60
Errori della verifica pre-corsa	60
Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)	61
Mancata riuscita di una corsa prima della generazione di cluster	62
Terminazione di una corsa	63
Spegnimento dello strumento	63

Risorse per la risoluzione dei problemi

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

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Vedere [Assistenza Tecnica a pagina 80](#). Per semplificare la risoluzione dei problemi, prendere in considerazione la possibilità di condividere un link al riepilogo corsa in BaseSpace Sequence Hub con l'Assistenza Tecnica Illumina.

File di risoluzione dei problemi

File principale	Cartella	Descrizione
File informazioni corsa (RunInfo.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le impostazioni della corsa: <ul style="list-style-type: none">• Numero di cicli per la corsa• Numero di letture per la corsa• Se la lettura è indicizzata• Numero di strisce e tile sulla cella a flusso
File parametri della corsa (RunParameters.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene il nome della corsa e le informazioni sui parametri della corsa e i componenti della corsa, incluse le seguenti informazioni RFID: numeri di serie, numeri di lotto, date di scadenza e numeri di cataloghi.
File InterOp (*.bin)	InterOp	File report binari utilizzati per 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, inclusi i reagenti usati 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.

Errori della verifica pre-corsa

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

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

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

Vassoio delle perdite

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

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

- ▶ Se il vassoio delle perdite contiene liquido ma non è pieno, la corsa può proseguire ma è necessario contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Vedere *Assistenza Tecnica a pagina 80*.
- ▶ Se il vassoio delle perdite è pieno, la corsa non può proseguire ed è necessario contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.



AVVERTENZA

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

Risoluzione dei problemi dalla schermata Process Management (Gestione processo)

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

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

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

Se, dopo aver eseguito l'azione per la risoluzione dei problemi, l'icona N/A (Non applicabile) è ancora visualizzata, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Vedere *Assistenza Tecnica* a pagina 80.

Mancata riuscita di una corsa prima della generazione di cluster

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

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

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



NOTA

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

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



NOTA

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

Impostazione di una nuova corsa da eseguire immediatamente

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

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

Impostazione di una nuova corsa da eseguire più tardi

- 1 Quando una corsa non viene portata a termine, selezionare **Home** (Inizio).
- 2 Impostare una nuova corsa o un lavaggio di manutenzione per rilasciare i materiali di consumo dallo strumento.

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

Terminazione di una corsa

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

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

Spegnimento dello strumento

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

In circostanze normali, non è necessario spegnere lo strumento.

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

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

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



ATTENZIONE

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

Appendice B Real-Time Analysis

Descrizione generale di Real-Time Analysis	65
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	67

Descrizione generale di Real-Time Analysis

Il sistema di sequenziamento NovaSeq 6000 esegue RTA3, un'implementazione del software Real-Time Analysis, su un sistema Compute Engine (CE). RTA3 estrae le intensità dalle immagini ricevute dalla videocamera, esegue l'identificazione delle basi, assegna un punteggio qualitativo alle identificazioni delle basi, allinea in base al campione di controllo PhiX e crea report dei dati in file InterOp per la visualizzazione in Sequencing Analysis Viewer.

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

Input di RTA3

RTA3 richiede le immagini delle tile contenute nella memoria locale del sistema per eseguire l'elaborazione. RTA3 riceve le informazioni relative alla corsa e i comandi da NVCS.

Output di RTA3

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

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

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

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

Gestione degli errori

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

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

- ▶ info_00000.log riepiloga importanti eventi di una corsa.
- ▶ error_00000.log elenca gli errori che si sono verificati durante una corsa.

- ▶ warning_00000.log elenca le avvertenze che si sono verificate durante una corsa.

Tile della cella a flusso

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

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

Tabella 14 Tile della cella a flusso

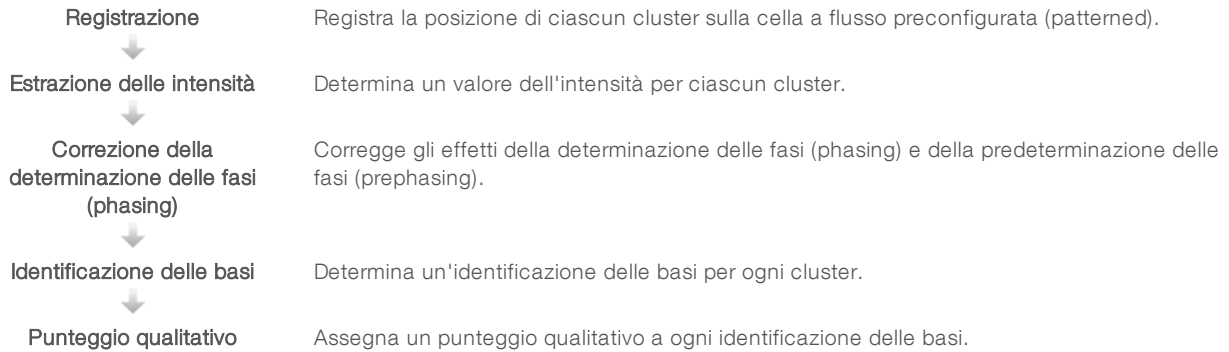
Componente della cella a flusso	SP	S1	S2	S4	Descrizione
Corsie	2	2	2	4	Una corsia è un canale fisico con porte di ingresso e di uscita.
Superfici	1	2	2	2	Le celle a flusso S1, S2 e S4 sono sottoposte a imaging su due superfici: la superficie superiore e la superficie inferiore. La superficie superiore di una tile viene sottoposta a imaging per prima. La cella a flusso SP viene sottoposta a imaging solo sulla superficie inferiore.
Strisce per corsia	2	2	4	6	Una striscia è una colonna in una corsia della cella a flusso che la videocamera cattura come un'immagine.
Tile per striscia	78	78	88	78	Una tile è una porzione di una striscia e rappresenta un'area sottoposta a imaging sulla cella a flusso.
Tile totali generate	312	624	1.408	3.744	Corsie × superfici × strisce × tile per striscia equivalgono al numero totale di tile.

Denominazione delle tile

Il nome della tile è un numero di cinque cifre che rappresenta la posizione sulla cella a flusso. Ad esempio, il nome della tile 1_1205 indica corsia numero 1, superficie superiore, striscia numero 2, tile numero 5.

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

Flusso di lavoro di Real-Time Analysis



Registrazione

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

Se la registrazione non riesce per una qualsiasi immagine in un ciclo, non viene generata alcuna identificazione delle basi per quella tile in quel ciclo. Sequencing Analysis Viewer consente di identificare le immagini che non sono state registrate.

Estrazione delle intensità

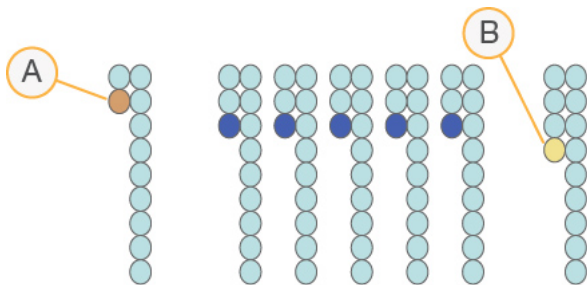
Dopo la registrazione, l'estrazione delle intensità calcola il valore dell'intensità per ciascun nanopozzetto in una data immagine. Se la registrazione non riesce, l'intensità per quella tile non può essere estratta.

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).

RTA3 corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) in modo da massimizzare 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 di sequenziamento NovaSeq 6000 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.

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

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

Figura 32 Visualizzazione delle intensità dei cluster

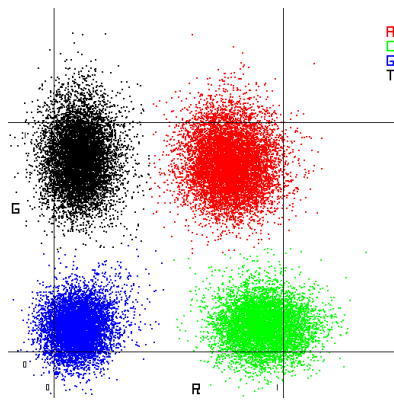


Tabella 15 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

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

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

Punteggi qualitativi

Un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione della probabilità di un'identificazione delle basi errata. Un punteggio qualitativo superiore implica che un'identificazione delle basi presenta una qualità superiore ed è più probabile che sia corretta. Dopo la determinazione del punteggio qualitativo, i risultati sono registrati nei file per l'identificazione delle basi (*.cbcl).

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

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

Punteggio qualitativo e report

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



NOTA

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

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

Per maggiori informazioni sul punteggio qualitativo, vedere *NovaSeq™ 6000 System Quality Scores and RTA3 Software (Pubb. n. 770-2017-010)* (Software RTA3 e punteggi qualitativi per il sistema NovaSeq™ 6000).

Appendice C Cartelle e file di output

Struttura della cartella di output del sequenziamento	70
File di output per il sequenziamento	71

Struttura della cartella di output del sequenziamento

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


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

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

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

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

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

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

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

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

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

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

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

 SequenceComplete.txt

File di output per il sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	Ciascun cluster analizzato viene incluso in un file delle identificazione delle basi, aggregato in un file per ciclo, corsia e superficie. Il file aggregato contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato per ogni cluster. I file delle identificazioni delle basi sono utilizzati da BaseSpace Sequence Hub o da bcl2fastq2. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[corsia]_[superficie].cbcl, ad esempio L001_1.cbcl
File posizione cluster	Per ciascuna cella a flusso, un file binario della posizione dei cluster contiene le coordinate XY per i cluster in una tile. Un layout esagonale che corrisponde al layout dei nanopozzetti della cella a flusso predefinisce le coordinate. Data\Intensities s_[corsia].locs
File filtro	I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. I file filtro sono generati al ciclo 26 utilizzando 25 cicli di dati. Per ogni tile, viene generato un file filtro. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[corsia]_[tile].filter
File InterOp	File report binari utilizzati per Sequencing Analysis Viewer. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa. Cartella InterOp
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
File immagini in miniatura (thumbnail)	Quando abilitato, viene creata un'immagine in miniatura per ogni decima tile in ciascun canale colore (rosso e verde). Thumbnail_Images\L001\C[X.1]: i file sono conservati in una sottocartella per ciascun ciclo. s_[corsia]_[tile]_[canale].jpg: l'immagine in miniatura include il numero della tile.

Appendice D Sicurezza Windows

Configurazioni di sicurezza	72
Requisiti della password	72
Firewall Windows	72
Enhanced Mitigation Experience Toolkit	73
Criteri di restrizione software	73

Configurazioni di sicurezza

Il sistema operativo Windows in esecuzione sul computer di controllo dello strumento include configurazioni di sicurezza che impediscono di eseguire software non desiderati. Le informazioni contenute in questa appendice descrivono le configurazioni e come personalizzarle per soddisfare le specifiche esigenze.

In circostanze normali, non è necessario modificare le configurazioni di sicurezza predefinite. In caso contrario, assicurarsi che un amministratore esperto gestisca le modifiche dopo averle pianificate attentamente.



ATTENZIONE

Poiché queste configurazioni incidono sulle prestazioni del sistema e possono compromettere la sicurezza, rivolgersi all'Assistenza Tecnica Illumina in caso di dubbi sulla necessità di modificare un'impostazione o se non si è a conoscenza delle conseguenze.

Requisiti della password

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

Tabella 16 Criteri password predefiniti

Criterio	Impostazione sicurezza
Enforce password history (Applicare cronologia password)	Ricordate cinque password
Maximum password age (Tempo massimo per la password)	180 giorni
Minimum password age (Tempo minimo per la password)	0 giorni
Minimum password length (Lunghezza minima per la password)	10 caratteri
Password must meet complexity requirements (La password deve corrispondere ai requisiti di complessità)	Disattivato
Store passwords using reversible encryption (Conservare le password utilizzando la crittografia reversibile)	Disattivato

Firewall Windows

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

Enhanced Mitigation Experience Toolkit

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

Criteri di restrizione software

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

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



ATTENZIONE

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

Criteri SRP consentiti

Sul sistema di sequenziamento NovaSeq 6000, SRP consente, per impostazione predefinita, le seguenti regole.

Certificati

DigitalSystems
Illumina, Inc.
NovaSeq

File eseguibili

Portmon.exe
Procmon.exe
Procmon64.exe
Tcpview.exe

Estensioni file

*.bin
*.cbcl
*.cfg
*.config
*.csv
*.dat
*.focus
*.imf1
*.ims
*.jpg
*.json
*.lnk
*.locs
*.log
*.manifest
*.sdf

Estensioni file

*.tif
*.txt
*.xml

Directory

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

Aggiunta e rimozione dei criteri SRP

L'aggiunta o la rimozione dei criteri SRP consente di personalizzare la sicurezza del sistema. La modifica dei criteri richiede lo spegnimento temporaneo di SRP.



ATTENZIONE

Lo spegnimento di SRP sovrascrive le protezioni preimpostate.

- 1 Accedere al sistema operativo.
- 2 Spegnimento di SRP:
 - a Andare alla directory C:\Illumina\Security.
 - b Fare doppio clic su **Disable.reg** (Disattiva.reg).
 - c Selezionare **Yes** (Sì) per confermare la modifica.
- Quando si utilizza l'interfaccia touch screen, toccare e tenere premuto un elemento per circa due secondi equivale all'utilizzo del pulsante destro del mouse.
- 3 Selezionare **Start** (Avvia), quindi selezionare **Run** (Corsa).
- 4 Nel campo Open (Apri), immettere **secpol.msc**.
- 5 Nella finestra di dialogo Local Security Policy (Criteri di sicurezza locale), allargare **Software Restriction Policies** (Criteri di restrizione software), quindi selezionare **Additional Rules** (Ulteriori criteri).
- 6 Per aggiungere un nuovo criterio:
 - a Sul menu Action (Azione), selezionare **New Path Rule** (Criterio nuovo percorso).
 - b Nel campo Path (Percorso), immettere il certificato, il nome del file, l'estensione del file o la directory che si desidera utilizzare.
 - c Nell'elenco contenente il livello Security (Sicurezza), selezionare **Unrestricted** (Senza restrizioni).

- d **[Facoltativo]** Nel campo Description (Descrizione), immettere un motivo per la creazione del criterio.
 - e Selezionare **OK** (Ok) per aggiungere il criterio.
- 7 Per eliminare un criterio:
- a Selezionare il criterio che si desidera eliminare, quindi selezionare **Delete** (Elimina).
 - b Selezionare **Yes** (Sì) per confermare l'eliminazione.
- 8 Chiudere la finestra di dialogo Local Security Policy (Criteri di sicurezza locale).
- 9 Riattivare *immediatamente* SRP:
- a Andare alla directory C:\Illumina\Security.
 - b Fare doppio clic su **Enable.reg** (Attiva.reg).
- 10 Se i criteri SRP sono stati modificati per la prima volta, uscire e accedere di nuovo affinché i criteri siano applicati.

Indice

%

%PF 68

A

accensione 19
account amministratore 74
aiuto 60
 documentazione 2
algoritmo Phred 69
alimentazione 19
allineamento non riuscito 60
amplificazione 2
analisi 25
applicazione 1
assegnazione singole corsie 3, 17
assistenza clienti 80
assistenza tecnica 80
attività post-corsa 53
avvertenze 8

B

bagno d'acqua 29, 35
barra con spie 5, 63
barra di stato 5, 63
BaseSpace Enterprise 25
BaseSpace Sequence Hub 1, 25
 connessione e disconnessione 47
 supporto 2
bcl2fastq2 25, 65
bolle 41
bollettini supporto 60

C

canale rosso 68
canale verde 68
cartella impostazione corsa 20-22
cartella output 20-21
cartucce
 sovrapposte 15
cartucce di lavaggio 54
cartucce di reagente
 preparazione 29, 35
cartucce di reagenti
 scaricamento 45
cartucce lavaggio 57

cartucce reagente
 conservazione 12
 etichettatura 14
cartucce reagenti
 archiviazione 62
 etichettatura 11
cartucce sovrapposte 15
cartuccia con cluster 13
cartuccia tamponi 46, 57
CE 9, 65
cella a flusso di lavaggio 54
celle a flusso
 conservazione 12, 38
 etichettatura 11
 graffi 38, 43
 pulizia 38, 43
 specifiche 11
celle a flusso a due corsie 13
celle a flusso a quattro corsie 13
celle a flusso preconfigurate (patterned) 1, 13
Certificate Trust (Certificato attendibile) 73
cicli sequenziamento 50
ciclo unidirezionale 47
cluster che attraversano il filtro 50
cluster che attraversano il filtro (PF) 68
codice batch 18
collettori NovaSeq Xp 38
 conservazione 16
colori grafico 50
componenti del kit 27
Compute Engine 9, 52, 65
computer di controllo 72
concentrazione di caricamento 2
condizioni conservazione 18
configurazioni del kit 11
connessioni in entrata 72
connessioni in uscita 72
connettività sistema 60
conservazione cartucce reagenti 62
conservazione dei dati 47
conservazione kit reagenti 12, 16
contaminazione incrociata 7, 53
conversione FASTQ 25, 65
corsa
 metriche 65
corse
 eliminazione 9
 messa in pausa 51
 metriche 50
 monitoraggio 25

- ripresa 63
- scaglionate 51
- corse di sequenziamento
 - eliminazione 52
- corsie 13, 66
- criteri password 72

D

- date scadenza 18
- dati integrità 20
- dati prestazioni strumenti 20
- dati prestazioni strumento 21
- dati sull'integrità 21
- determinazione delle fasi (phasing) e predeterminazione delle fasi (prephasing) 67
- diagnostica 5
- disco rigido 9, 20-21, 52
- documentazione 2, 80
- documenti 69
- domain, BaseSpace Sequence Hub 25
- durata corsa 50
- durata generazione di cluster 50
- durate
 - corsa di sequenziamento 50
 - generazione di cluster 50
 - lavaggio di manutenzione 54
 - lavaggio post-corsa automatico 53

E

- EMET 73
- errori 8, 60
 - probabilità 69
- etichette, componenti kit 11

F

- fabbricante 18
- fasi sequenziamento 2
- file
 - specifiche corsa 60
- file CBCL 2, 51, 69
- file filtro 65, 71
- file identificazione basi 65
- file identificazione delle basi 71
- file InterOp 8, 60, 65, 71
- file log 60
- file registro 65

- filtraggio cluster 68
- filtro chastity 68
- firewall 72
- flusso di lavoro 23
- flusso di lavoro NovaSeq Xp 23
- flusso di lavoro Standard 23
- fogli campioni 25, 47
- formato foglio campioni 25
- formazione online 2
- fornitori 26
- fuoriuscita 30, 36, 61

G

- generazione della griglia 67
- GPO 73
- graffi, celle a flusso 38, 43
- griglie 29, 35
- griglie di scongelamento 29, 35
- Group Policy Object 73
- guanti, sostituzione 30, 36, 57
- guarnizioni 13, 38, 43
- guarnizioni, fuoriuscita 41
- guida, tecnica 80

I

- icone 9, 18
- icone lampeggianti 8
- icone, lampeggianti 8
- imaging 2, 13, 65-66
- immagini 65
- immagini in miniatura (thumbnail) 71
- impostazione LIMS 21
- impostazioni analisi 20
- impostazioni corsa 20
- impostazioni predefinite 20, 25
- impostazioni sicurezza 72
- impostazioni, sicurezza 72
- inizializzazione 19
- input pozzetti 17
- intensità cluster 67
- ipoclorito di sodio 53-54

L

- lavaggi
 - durata 53-54
 - frequenza 54

- lavaggi di manutenzione
 - soluzioni di lavaggio 54
- lavaggi manutenzione
 - materiali di consumo 26, 54
- letture indici 47
- letture, numero di 11
- librerie
 - conservazione 62
- LIMS 1, 20
- LIMS di terze parte 22
- linee guida acqua da laboratorio 28
- lista bianca, SRP 73

M

- manutenzione preventiva 54
- manutenzione, preventiva 54
- Master Mix ExAmp 2, 41
- materiali di consumo
 - acqua da laboratorio 28
 - confezione 18
 - lavaggi manutenzione 54
 - scaricamento 52-53, 57
- materiali di consumo sequenziamento 26
- messa in pausa delle corse 51
- metodi di analisi 2
- modalità 11
- modalità corsa 20
- monitoraggio delle corse 47
- morsetti, cella a flusso 5

N

- nanopozzetti 67
- NaOCl 53-54
- nessuna identificazione 67-68
- nome cartella di output 70
- NovaSeq Xp, definito 3
- nucleotidi 68
- numerazione corsie 17, 41
- numerazione delle tile 66
- numerazione pozzetti 41
- numerazione superficie 66
- numerazione, pozzetti 17
- numeri codice 18
- numeri di catalogo 11
 - materiali di consumo forniti dall'utente 26
- numeri lotto 18
- numero di cicli 47, 50

O

- ottica 5

P

- pagine supporto 60
- parametri corsa, LIMS 22
- perdite 61
- Phix
 - n. di catalogo 26
- PhiX
 - allineamento 65
- piano portacelle 5, 43
- pipette 28
- porte USB 5
- posizione host 25
- posizione n. 30 52, 57
- posizioni cluster 65, 71
- posizioni pescanti 53, 57
- pozzetti collettore NovaSeq Xp, numerazione 17
- preparazione della sede 2, 72
- primer personalizzati 2, 15, 47
- privilegi, account amministratore 74
- problemi alla fluidica 61
- Process Management (Gestione processo) 51
- provette libreria 62
 - conservazione 12
 - conservazione nella cartuccia 62
- provette librerie 15
 - conservazione 62
- punteggi qualitativi 69
- punteggio qualitativo 69

Q

- Q-scores (Punteggi qualitativi) 50
- qualificazione dati 68

R

- Read 1 (Lettura 1) 63
- reagente JPX, conservazione 16
- reagenti DPX, conservazione 16
- reagenti DPX/JPX, compatibilità 16
- reagenti ExAmp 13
 - conservazione 16
 - metodi miscelazione 3
 - scongelo 38
- Reagenti ExAmp 40

reagenti usati 7, 30, 36, 45
Real-Time Analysis 1, 8
registrazione non riuscita 67
registro errori 65
reibridazione 22
resa 50
RFID 12, 60
riavvio dopo spegnimento 63
riposizionamento dello strumento 63
ripresa corse 63
RunInfo.xml 60, 71

S

salvataggio di provette delle librerie 62
scannerizzazione 2
scaricamento cartucce di reagenti 45
scheda dati sicurezza 7
schermata Sequencing (Sequenziamento) 50
scompari 5
scomparto dei liquidi 14
scomparto tamponi 46
sensori 5, 57, 60
Sequencing Analysis Viewer 65, 67
sequenziamento a due canali 2, 68
Servizio di monitoraggio proattivo Illumina 21
sicurezza 73
 personalizzazione 74
sistema di fluidica 7
sistema fluidica 54
sistema operativo 19, 72
sito web, supporto 60
smaltimento formammide 15, 52
smaltimento reagenti usati 7
software di controllo 8
Software Suite 8
soluzione lavaggio 14
sostanze chimiche pericolose 7, 18
spazio su disco 9, 60
specifiche 11
specifiche congelatore 28
specifiche frigorifero 28
spegnimento 63
spostamento degli strumenti 63
Standard, definito 3
stazione di attacco 38, 43
 componenti 17
stazione di attacco NovaSeq Xp 38, 43
strisce 2, 13, 66
supporti cappucci 30, 36

T

tabelle qualitative 69
target allineamento ottico 5, 43
tile 2, 13, 65
tracciatura dei campioni 15
trasferimento dati 9, 52
Tween 20 54

U

Universal Copy Service 8-9, 51

V

valori intensità 67
valori predefiniti di SRP 73
vano portacella 43
vano refrigerato 7
vano refrigerato per i reagenti 7
vassoio raccogliocce 61
verifiche automatiche 60
verifiche pre-corsa 60
videocamera 1
videocamere 5, 66
volume di caricamento 2

W

Windows
 sicurezza 73

Assistenza Tecnica

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

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

Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Gratuito	Regionale
Nord America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgio	+32 80077160	+32 34002973
Cina	400.066.5835	
Corea del Sud	+82 80 234 5300	
Danimarca	+45 80820183	+45 89871156
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Germania	+49 8001014940	+49 8938035677
Giappone	0800.111.5011	
Hong Kong, Cina	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Norvegia	+47 800 16836	+47 21939693
Nuova Zelanda	0800.451.650	
Paesi Bassi	+31 8000222493	+31 207132960
Regno Unito	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapore	1.800.579.2745	
Spagna	+34 911899417	+34 800300143
Svezia	+46 850619671	+46 200883979
Svizzera	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, Cina	00806651752	
Altri paesi	+44.1799.534000	

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

Documentazione sul prodotto: disponibile per il download all'indirizzo 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

www.illumina.com

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

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®