

NextSeq 1000 e 2000

Guida del sistema di sequenziamento

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA

Documento n. 1000000109376 v04 ITA

Aprile 2021

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

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 IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

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

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Cronologia revisioni

Documento n.	Data	Descrizione della modifica
1000000109376 v04	Aprile 2021	<p>Aggiunte le istruzioni per importare i file della linea di base.</p> <p>Aggiunto il flusso di lavoro DRAGEN DNA Amplicon.</p> <p>Aggiunte caratteristiche per NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3.</p> <p>Aggiunte informazioni per selezionare un server proxy.</p> <p>Aggiornata la temperatura di spedizione e di conservazione di RSB con Tween 20.</p> <p>Aggiornato il flusso di lavoro DRAGEN RNA per includere l'espressione genica differenziale.</p> <p>Aggiornata la struttura della cartella di output del sequenziamento.</p> <p>Aggiornate le informazioni sulla formattazione del foglio campioni v2.</p>
1000000109376 v03	Novembre 2020	<p>Corretti i numeri di catalogo.</p> <p>Aggiunte informazioni sull'aggiunta di nuovi utenti.</p>

Documento n.	Data	Descrizione della modifica
1000000109376 v02	Ottobre 2020	<p>Aggiunti i kit NextSeq 1000/2000 P3 Reagents.</p> <p>Aggiunto il flusso di lavoro DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Aggiunto il flusso di lavoro DRAGEN Enrichment.</p> <p>Aggiunte le opzioni di compressione dei file FASTQ.</p> <p>Aggiunte le istruzioni per installare gli aggiornamenti delle pipeline e delle licenze DRAGEN.</p> <p>Aggiunte le istruzioni sull'importazione di genomi di riferimento personalizzati.</p> <p>Aggiornati i volumi e le concentrazioni di caricamento per i tipi di librerie.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per la diluizione delle librerie.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per lo spurgo automatico della cartuccia di reagenti.</p> <p>Aggiornate le informazioni sul numero di cicli supportati.</p> <p>Aggiornate le opzioni di personalizzazione dello strumento.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'impostazione della corsa per lo strumento.</p> <p>Aggiornata la struttura degli output del sequenziamento per DRAGEN.</p> <p>Aggiunte informazioni sui report QC DRAGEN.</p> <p>Aggiunte informazioni sulla rimozione dei genomi di riferimento personalizzati dal disco rigido.</p> <p>Aggiunte le informazioni sull'esecuzione delle verifiche di sistema.</p> <p>Aggiornate le impostazioni del foglio campioni in formato v2.</p>

Documento n.	Data	Descrizione della modifica
1000000109376 v01	Giugno 2020	<p>Aggiornate le descrizioni software per NextSeq 1000/2000 Control Software.</p> <p>In tutta la guida, chiarita la differenza tra modalità Cloud (Sul cloud), Hybrid (Ibrida), Local (Locale) e Standalone (Indipendente).</p> <p>Aggiornate le istruzioni per la conservazione e lo scongelamento della cartuccia.</p> <p>Aggiornate le informazioni sul numero di cicli supportati.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per l'impostazione dell'analisi secondaria</p> <p>Aggiornati i numeri di catalogo per i kit di reagenti.</p> <p>Aggiornato il diagramma del protocollo di sequenziamento.</p> <p>Aggiornate le istruzioni per indicare un'unità di rete come cartella di output predefinita.</p> <p>Aggiornata la tabella dei tipi di libreria supportati.</p> <p>Aggiunte le istruzioni sull'importazione di un genoma di riferimento personalizzato.</p> <p>Aggiunte le istruzioni per l'impostazione di una corsa utilizzando un kit indici personalizzato e un kit di preparazione delle librerie personalizzato.</p> <p>Aggiornati i requisiti per l'account utente e la password.</p> <p>Aggiunti i dettagli sulla struttura della cartella di output DRAGEN.</p> <p>Chiarite le istruzioni per spurgare i reagenti usati dalla cartuccia.</p> <p>Aggiunte le informazioni di background sulla tabella Q.</p>

Documento n.	Data	Descrizione della modifica
1000000109376 v01	Giugno 2020	Aggiornate le istruzioni sull'installazione degli aggiornamenti del software di controllo. Aggiunte le istruzioni su come rimettere in coda una corsa. Aggiunte le istruzioni per aggiornare le pipeline e le licenze di DRAGEN. Aggiunte le istruzioni sulla personalizzazione dello strumento. Aggiornate le illustrazioni per riflettere la nuova etichettatura. Cambiato sportello in visore in tutta la guida. Aggiunte le descrizioni delle due porte Ethernet.
1000000109376 v00	Marzo 2020	Versione iniziale.

Sommario

Descrizione generale del sistema	1
Risorse aggiuntive	2
Hardware dello strumento	3
Software integrato	5
Schermata Process Management (Gestione processo)	6
Diagramma del protocollo di sequenziamento	8
Come funziona il sequenziamento	8
Configurazione del sistema	11
Requisiti dell'account utente	11
Configurazione di BaseSpace Sequence Hub e del supporto proattivo	14
Impostazione della posizione della cartella di output predefinita	15
Importazione di genomi di riferimento personalizzati	18
Importazione dei file della linea di base del rumore	19
Configurazione della modalità della corsa	20
Personalizzazione dello strumento	21
Materiali di consumo e apparecchiature	24
Materiali di consumo per il sequenziamento	24
Materiali di consumo ausiliari	28
Strumentazione ausiliaria	30
Protocollo	32
Considerazioni relative al sequenziamento	32
Pianificazione di una corsa di sequenziamento in BaseSpace Sequence Hub	33
Scongelamento della cartuccia nella sua confezione e della cella a flusso	42
Diluizione delle librerie	45
Caricamento dei materiali di consumo nella cartuccia	47
Avvio di una corsa di sequenziamento	49
Output di sequenziamento	58
Descrizione generale di Real-Time Analysis	58
Flusso di lavoro di Real-Time Analysis	60
File di output del sequenziamento	64
File di output dell'analisi secondaria DRAGEN	65
Struttura della cartella di output dell'analisi secondaria DRAGEN	75
Manutenzione	79
Liberazione di spazio su disco rigido	79
Aggiornamenti del software	80
Flusso di lavoro DRAGEN e aggiornamenti della licenza	81

Sostituzione del filtro dell'aria	83
Risoluzione dei problemi	85
Risoluzione dei messaggi di errore	85
Riportare i materiali di consumo nel luogo di conservazione	86
Annullamento di una corsa	86
Rimessa in coda di un corsa	87
Spegnimento e riaccensione dello strumento	87
Esecuzione di una verifica del sistema	89
Ripristino alle impostazioni di fabbrica	89
Cattura immagine installazione	89
Ripristino dell'immagine catturata	90
Risorse e riferimenti	91
Impostazioni del foglio campioni in formato v2	91
Sequenziamento con cicli 'dark'	109
Indice	111
Assistenza Tecnica	114

Descrizione generale del sistema

I sistemi di sequenziamento NextSeq™ 1000 Illumina® e NextSeq™ 2000 Illumina® forniscono un approccio mirato al sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS¹). Questo sistema basato sulle applicazioni offre la tecnologia di sequenziamento Illumina in uno strumento da banco efficace in termini di costi che offre le seguenti funzioni:

- **Accessibilità e affidabilità:** NextSeq 1000/2000 dispone dell'analisi DRAGEN e della denaturazione e diluizione integrate sullo strumento. Un modulo di imaging è integrato nel sistema e i componenti della fluidica sono integrati nel materiale di consumo, semplificando così la manutenzione dello strumento.
- **Un solo passaggio per caricare i materiali di consumo:** una cartuccia monouso è pre-riempita con tutti i reagenti necessari per una corsa. La libreria e la cella a flusso vengono caricate direttamente nella cartuccia, che a sua volta viene caricata sullo strumento. L'identificazione integrata consente il monitoraggio accurato.
- **Software NextSeq 1000/2000:** una serie di software integrati controlla il funzionamento dello strumento, elabora le immagini e genera le identificazioni delle basi.
 - **Modalità Cloud (Sul cloud):** consente di pianificare la corsa con Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) su BaseSpace Sequence Hub. Il flusso di lavoro di analisi selezionato viene avviato automaticamente sul cloud. Anche i dati della corsa e i risultati dell'analisi vengono forniti sul cloud.
 - **Modalità Hybrid (Ibrida):** consente di configurare la corsa con Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) su BaseSpace Sequence Hub. Il flusso di lavoro di analisi selezionato viene avviato mediante l'applicazione DRAGEN integrata sullo strumento.
 - **Modalità Local (Locale):** consente di pianificare la corsa localmente con un foglio in formato file v2. Il flusso di lavoro di analisi selezionato viene avviato automaticamente mediante l'applicazione DRAGEN integrata sullo strumento.
 - **Modalità Standalone (Indipendente):** consente di pianificare una corsa senza un foglio campioni.

Questa sezione fornisce una descrizione generale del sistema, incluse le informazioni su hardware, software e analisi dei dati. Racchiude anche i concetti chiave e la terminologia inclusi nella documentazione. Per specifiche dettagliate, schede tecniche, applicazioni e relativi prodotti, consultare la [pagina dei prodotti dei sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#) sul sito Web Illumina.

¹Sequenziamento di nuova generazione

Risorse aggiuntive

Le [pagine di supporto dei sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#) 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.

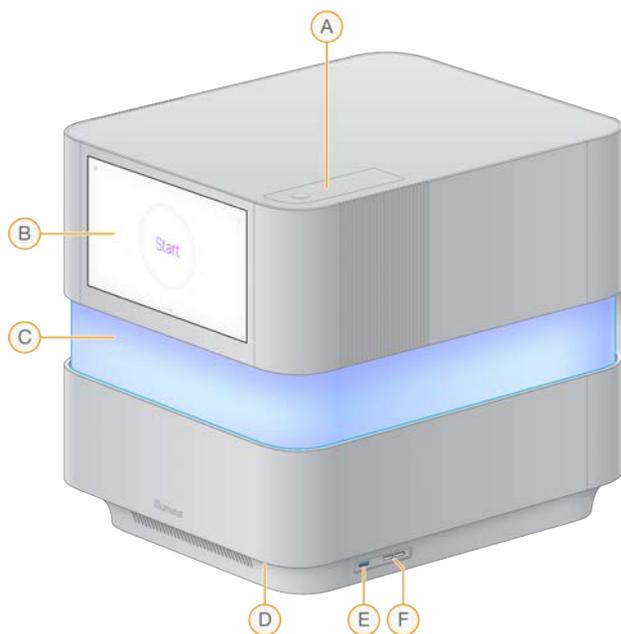
Risorsa	Descrizione
Custom Protocol Selector	Uno strumento per la generazione di istruzioni end-to-end specifiche per il metodo di preparazione delle librerie, i parametri della corsa e il metodo di analisi prescelti, con opzioni per perfezionare il livello dei dettagli.
<i>Guida alla sicurezza e conformità dei sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 (documento n. 1000000111928)</i>	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
<i>Guida alla conformità del modulo del lettore RFID (documento n. 1000000002699)</i>	Fornisce informazioni sul lettore RFID nello strumento, certificazioni di conformità e considerazioni relative alla sicurezza.
<i>NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000139235) (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per NextSeq 1000 e 2000)</i>	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire manualmente le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX facoltativo.
<i>NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (documento n. 1000000139569) (Guida ai primer personalizzati per NextSeq 1000 e 2000)</i>	Fornisce informazioni sulla sostituzione dei primer per il sequenziamento Illumina con primer di sequenziamento personalizzati.
<i>Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema di sequenziamento NextSeq 2000 (documento n. 1000000109378)</i>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici, ambientali e di rete.

Risorsa	Descrizione
<p><i>BaseSpace help</i> (help.basespace.illumina.com) (Guida di BaseSpace - help.basespace.illumina.com)</p>	<p>Fornisce informazioni sull'utilizzo di BaseSpace™ Sequence Hub e sulle opzioni di analisi disponibili.</p>
<p><i>Index Adapters Pooling Guide</i> (documento n. 1000000041074) (Guida al raggruppamento in pool degli adattatori indice)</p>	<p>Fornisce linee guida sul raggruppamento in pool e strategie sull'indicizzazione doppia.</p>
<p><i>Illumina Adapter Sequences</i> (documento n. 1000000002694) (Sequenze adattatori Illumina)</p>	<p>Fornisce un elenco delle sequenze adattatori per i kit di preparazione delle librerie Illumina.</p>

Hardware dello strumento

I sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 comprendono un pulsante di accensione, un monitor, una barra di stato, uno scomparto dei materiali di consumo e porte USB.

Figura 1 Componenti esterni del sistema



- A. **Scomparto del filtro dell'aria:** fornisce l'accesso per la sostituzione del filtro dell'aria.
- B. **Monitor touch screen:** consente la configurazione e l'impostazione della corsa integrate sullo strumento utilizzando l'interfaccia del software di controllo.

- C. **Barra di stato:** la spia colorata avanza mentre il sistema esegue il flusso di lavoro. Blu e viola indicano interattività (ad es., verifiche pre-corsa) e multicolore indica momenti e dati importanti (ad es., completamento del sequenziamento). Gli errori critici sono indicati da una spia rossa.
- D. **Pulsante di accensione:** controlla l'alimentazione dello strumento e indica se il sistema è acceso (luminoso), spento (nero) oppure spento ma in alimentazione c.a. (lampeggia).
- E. **Porta USB 3.0:** per la connessione di unità portatili esterne per il trasferimento dei dati.
- F. **Porta USB 2.0:** per la connessione a un mouse e a una tastiera.

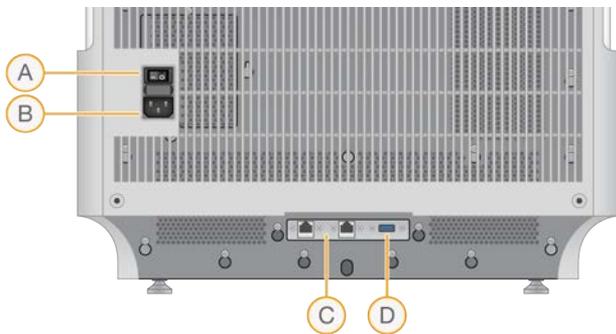
Alimentazione e connessioni ausiliarie

Spostare delicatamente lo strumento per accedere al pulsante di alimentazione, alla porta USB e ad altre connessioni ausiliarie che si trovano nella parte posteriore dello strumento.

La parte posteriore dello strumento dispone di un interruttore e di una presa che controlla l'alimentazione allo strumento e di due porte Ethernet per una connessione Ethernet facoltativa. Una porta USB 3.0 consente di collegare un'unità portatile esterna per il trasferimento dei dati (exFAT non è supportata su questa piattaforma basata su Linux).

I sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 sono dotati di due porte Ethernet per ampliare la capacità e la flessibilità del sistema. Ad esempio, una porta Ethernet può essere dedicata alla comunicazione con un'unità di rete interna e l'altra porta dedicata alla comunicazione esterna come BaseSpace Sequence Hub o il supporto proattivo.

Figura 2 Componenti del pannello posteriore

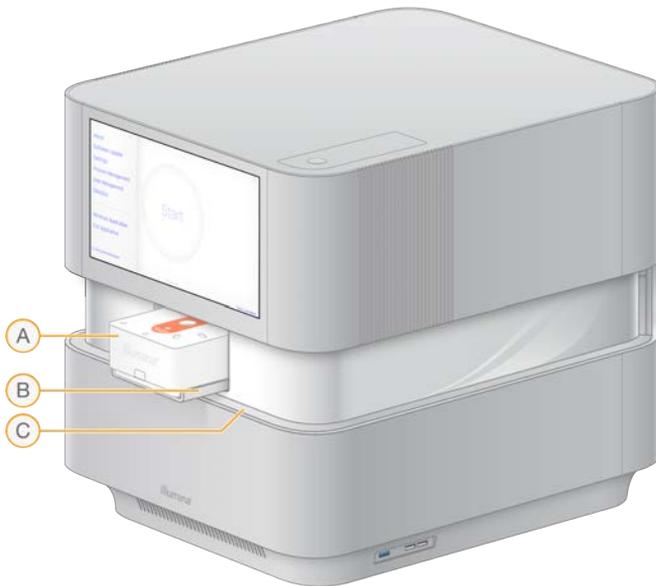


- A. **Pulsante:** accende e spegne lo strumento.
- B. **Presa di alimentazione:** connessione del cavo di alimentazione.
- C. **Porte Ethernet (2):** connessione facoltativa del cavo Ethernet.
- D. **Porta USB 3.0:** consente di connettere un disco rigido esterno per il trasferimento dei dati.

Scomparto dei materiali di consumo

Lo scomparto dei materiali di consumo contiene la cartuccia per una corsa di sequenziamento, incluse la cella a flusso e la libreria diluita.

Figura 3 Scomparto dei materiali di consumo caricato



- A. **Cartuccia:** contiene la cella a flusso, la libreria, i reagenti e raccoglie i reagenti usati durante la corsa.
- B. **Vassoio:** alloggia la cartuccia durante il sequenziamento.
- C. **Visore:** si apre per consentire l'accesso allo scomparto dei materiali di consumo.

Software integrato

Il gruppo di software del sistema comprende applicazioni integrate che eseguono le corse di sequenziamento e l'analisi.

- **NextSeq 1000/2000 Control Software:** controlla il funzionamento dello strumento e fornisce un'interfaccia per la configurazione del sistema, l'impostazione di una corsa di sequenziamento e il monitoraggio delle statistiche della corsa durante il sequenziamento.
- **Real-Time Analysis (RTA3):** esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante la corsa. Per maggiori informazioni, vedere [Output di sequenziamento a pagina 58](#).
- **Universal Copy Service:** copia i file di output del sequenziamento dalla cartella della corsa a BaseSpace Sequence Hub (se necessario) e alla cartella degli output, fruibile dall'utente.

Il software di controllo è interattivo ed esegue i processi automatizzati in background. Real-Time Analysis e Universal Copy Service eseguono solo processi in background.

Informazioni del sistema

Selezionare il menu del software di controllo nell'angolo superiore sinistro per aprire la sezione About (Informazioni su). La sezione About (Informazioni su) contiene le informazioni di contatto di Illumina e le seguenti informazioni del sistema:

- Numero di serie dello strumento
- Nome del computer
- Versione di System Suite
- Versione del sistema operativo di imaging
- Conteggio totale delle corse

Notifiche e allerte

L'icona delle notifiche si trova nell'angolo superiore destro. Nel caso di un'avvertenza o un errore, il pannello destro si apre a scorrimento per indicare le notifiche. Selezionare un'icona alla volta per visualizzare un elenco di notifiche Current (Corrente) o Historic (Storico) di avvertenze ed errori.

- Le avvertenze richiedono attenzione, ma non arrestano una corsa e richiedono solo la presa visione.
- Gli errori richiedono un'azione prima di poter avviare o procedere con una corsa.

Riduzione a icona del software di controllo

Ridurre a icona il software di controllo per accedere ad altre applicazioni. Ad esempio, per cercare la cartella degli output in File Explorer (Esplora file) o trovare un foglio campioni.

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Minimize Application** (Riduci a icona applicazione). Il software di controllo viene ridotto a icona.
2. Per ingrandire il software di controllo, selezionare **NextSeq 1000/2000 Control Software** dalla barra degli strumenti.

Schermata Process Management (Gestione processo)

La schermata Process Management (Gestione processo) visualizza le corse archiviate in `/usr/local/illumina/runs`. Ogni corsa è identificata dalla data, dal nome e dall'ID della corsa. Per ogni corsa sono inoltre mostrate informazioni sullo stato di Run (Corsa), Secondary Analysis (Analisi secondaria), Output Folder (Cartella output) e Cloud (Sul cloud). Selezionare la corsa per visualizzare ulteriori informazioni, inclusi Workflow (Flusso di lavoro), Average % Q30 (% media Q30), Total Reads PF (Lectture totali che attraversano il filtro) e Total Yield (Resa totale). Per eliminare le corse e liberare spazio, vedere [Liberazione di spazio su disco rigido a pagina 79](#). Per rimettere in coda l'analisi integrata sullo strumento, vedere [Rimessa in coda di un corsa a pagina 87](#).

Stato della corsa

Questa sezione visualizza lo stato della corsa di sequenziamento:

- **In Progress** (In corso): la corsa di sequenziamento è in corso.
- **Complete** (Completata): la corsa di sequenziamento è completata.
- **Stopped** (Arrestata): la corsa di sequenziamento è stata arrestata.
- **Errored** (Presente errore): la corsa di sequenziamento presenta un errore.

Stato dell'analisi secondaria

Questa sezione visualizza lo stato dell'analisi secondaria con DRAGEN integrata sullo strumento. N/A verrà visualizzato se l'analisi è in fase di esecuzione in BaseSpace Sequence Hub.

- **Not Started** (Non avviata): l'analisi con DRAGEN non è ancora stata avviata.
- **In Progress** (In corso): l'analisi con DRAGEN è in corso.
- **Stopped** (Arrestata): l'analisi con DRAGEN è stata arrestata.
- **Errored** (Presente errore): l'analisi con DRAGEN presenta un errore.
- **Complete** (Completata): l'analisi con DRAGEN è stata completata.

Stato della cartella di output

Questa sezione visualizza lo stato dei file copiati nella cartella di output:

- **In Progress** (In corso): i file sono in fase di copia nella cartella di output.
- **Complete** (Completata): i file sono stati correttamente copiati nella cartella di output.

Stato del cloud (BaseSpace Sequence Hub)

Questa sezione visualizza lo stato dei file caricati in BaseSpace Sequence Hub mediante il cloud:

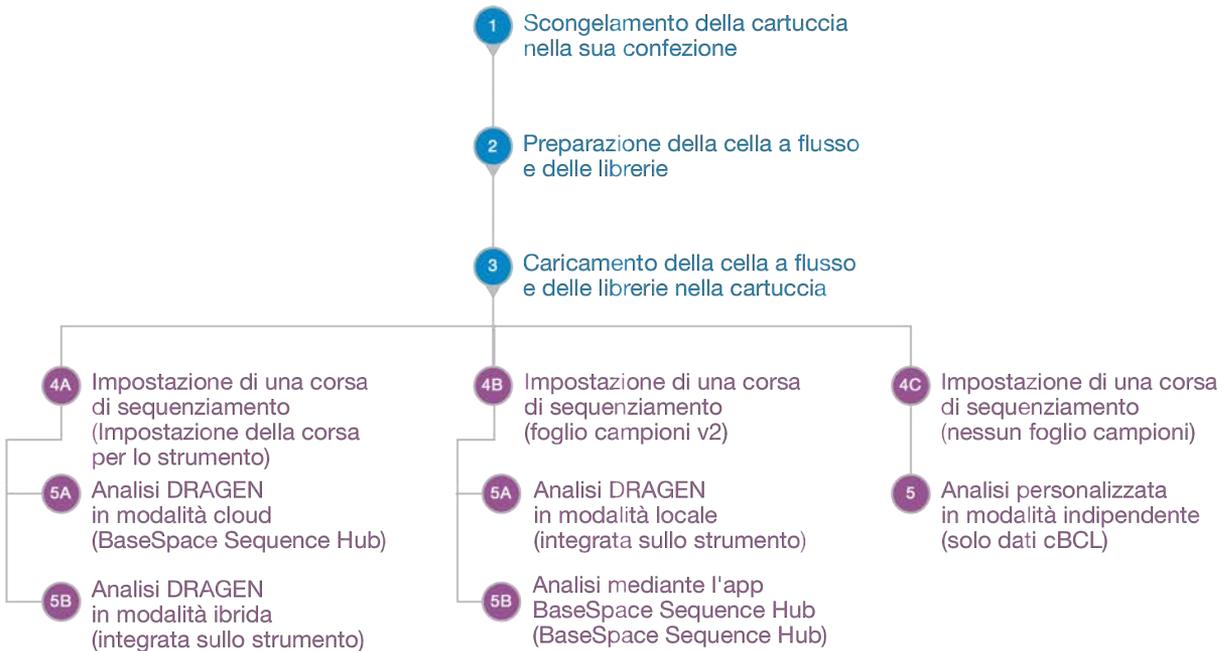
- **In Progress** (In corso): il software di controllo sta caricando i file in BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Completato): i file sono stati caricati correttamente in BaseSpace Sequence Hub.

Risoluzione di un problema di stato

- Se la corsa è in fase di elaborazione, chiudere la schermata Process Management (Gestione processo), attendere cinque minuti, quindi riaprire la schermata.
- Se la corsa non è in fase di elaborazione, spegnere e riaccendere lo strumento, quindi riaprire la schermata Process Management (Gestione processo). Vedere [Spegnimento e riaccensione dello strumento a pagina 87](#).

Diagramma del protocollo di sequenziamento

Il seguente diagramma illustra il protocollo di sequenziamento utilizzando NextSeq 1000/2000.



Come funziona il sequenziamento

La generazione di cluster, il sequenziamento e l'analisi comprendono il sequenziamento sui sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Ogni passaggio si verifica automaticamente durante una corsa di sequenziamento. In base alla configurazione del sistema, ulteriore analisi viene eseguita su un computer indipendente al termine della corsa.

Generazione di cluster

La libreria¹ viene automaticamente denaturata in singoli filamenti e ulteriormente diluita sullo strumento. Durante la generazione di cluster, il DNA a molecole singole si lega alla superficie della cella a flusso e viene sottoposto ad amplificazione per formare i cluster². La generazione di cluster dura circa quattro ore.

¹Un campione di DNA o RNA con adattatori per il sequenziamento. I metodi di preparazione variano.

²Un gruppo clonale di filamenti di DNA su una cella a flusso che genera una lettura di sequenziamento. Ogni filamento di DNA su una cella a flusso cerca un template che è amplificato fino a quando il cluster contiene centinaia o migliaia di copie. Ad esempio, una cella a flusso con 10.000 cluster genera 10.000 letture unidirezionali o 20.000 letture paired-end.

Sequenziamento

I cluster vengono sottoposti a imaging utilizzando la chimica a due canali, un canale verde e un canale blu, per codificare i dati per i quattro nucleotidi. Al termine dell'imaging di una tile sulla cella a flusso, la tile successiva viene sottoposta a imaging. Il processo è ripetuto per ogni ciclo di sequenziamento (circa cinque minuti per ciclo). Dopo l'analisi delle immagini, il software Real-Time Analysis esegue l'identificazione delle basi¹, il filtraggio e il calcolo dei punteggi qualitativi.²

Analisi primaria

Man mano che la corsa procede, il software di controllo trasferisce automaticamente i file delle identificazione delle basi³ (*.cbcl) alla cartella di output specificata per l'analisi dei dati. Durante la corsa di sequenziamento, il software Real-Time Analysis (RTA3) esegue l'analisi delle immagini, l'identificazione delle basi e il demultiplex⁴. Al termine del sequenziamento viene avviata l'analisi secondaria. Il metodo dell'analisi dei dati secondaria dipende dall'applicazione e dalla configurazione del sistema.

Analisi secondaria

BaseSpace Sequence Hub è l'ambiente di calcolo sul cloud Illumina per il monitoraggio della corsa, l'analisi dei dati, l'archiviazione e la collaborazione. Contiene la piattaforma DRAGEN e le applicazioni di BaseSpace Sequence Hub che supportano i comuni metodi di analisi per il sequenziamento.

Al termine dell'analisi iniziale del sequenziamento, la piattaforma DRAGEN esegue un'analisi secondaria utilizzando una delle pipeline di analisi disponibili.

Se si utilizza la modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida), DRAGEN recupera il foglio campioni, il genoma di riferimento e i file di input della corsa da Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub. Per la modalità Cloud (Sul cloud), i dati cBCL vengono caricati automaticamente in BaseSpace Sequence Hub e BaseSpace Sequence Hub avvia l'analisi secondaria con DRAGEN. Per la modalità Hybrid (Ibrida), l'analisi secondaria con DRAGEN è integrata sullo strumento e i file di output possono essere archiviati in una cartella selezionata o sul cloud.

Se si utilizza la modalità Local (Locale), DRAGEN recupera il foglio campioni, il genoma di riferimento e i file di input della corsa dai sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. L'analisi secondaria con DRAGEN è integrata sullo strumento e i file di output vengono archiviati in una cartella

¹Determina una base (A, C, G o T) per ogni cluster in una tile a un determinato ciclo.

²Calcola un set di predittori di qualità per ogni identificazione delle basi, quindi utilizza il valore predittore per cercare il punteggio qualitativo.

³Contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato per ogni cluster di ogni ciclo di sequenziamento.

⁴Un processo di analisi che differenzia le letture per ogni libreria in un pool.

di output selezionata. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), l'analisi può essere avviata anche mediante le applicazioni di BaseSpace Sequence Hub dopo il completamento della corsa.

Se si utilizza la modalità Standalone (Indipendente), impostare una corsa senza un foglio campioni. Questo flusso di lavoro è raccomandato per i flussi di analisi personalizzati che iniziano dai dati cBCL.

- Per maggiori informazioni su BaseSpace Sequence Hub, vedere la [Guida in linea di BaseSpace Sequence Hub](#).
- Per maggiori informazioni su DRAGEN, vedere la [pagina di supporto della piattaforma DRAGEN Bio-IT](#).
- Per una descrizione generale di tutte le applicazioni, vedere [Applicazioni di BaseSpace](#).

Configurazione del sistema

Questa sezione fornisce istruzioni per l'impostazione del sistema, incluse le descrizioni delle impostazioni del software.

Queste istruzioni descrivono principalmente il software, con alcune informazioni sulla configurazione della rete e del sistema operativo.

i | Se si utilizza Google Chrome sullo strumento, all'utente viene richiesto di sbloccare il portachiavi di accesso. Il suggerimento può essere ignorato o cancellato in sicurezza.

Requisiti dell'account utente

Il sistema operativo Linux dispone di tre account:

- root (super administrator) (root - amministratore con privilegi avanzati)
- ilmnadmin (administrator) (ilmnadmin - amministratore)
- ilmnuser (user) (ilmnuser - utente)

L'account di amministratore è previsto solo per applicare gli aggiornamenti di sistema, come l'aggiornamento di NextSeq 1000/2000 Control Software, o per il personale informatico per montare un'unità di rete persistente.

Eseguire tutte le altre funzioni, incluso il sequenziamento, dall'account utente.

Requisiti della password

Dopo il completamento dell'installazione dello strumento, il tecnico dell'assistenza avvia una modifica della password per tutti e tre gli account. Aggiornare ciascuna password ogni 180 giorni, quando suggerito.

Tabella 1 Criteri password predefiniti

Criterio	Impostazione
Enforce password history (Applicare cronologia password)	Cinque password ricordate
Lockout threshold (Soglia blocco)	Dieci tentativi di accesso non validi
Minimum password length (Lunghezza minima per la password)	Dieci caratteri

Critério	Impostazione
Minimum character variety (Diversità minima dei caratteri)	Tre di ciascuno: numero, maiuscola, minuscola e simbolo
Maximum repeating characters (Massimo caratteri ripetuti)	Tre 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

Aggiunta di un nuovo utente

1. Accedere a ilmnadmin.
2. Selezionare il pulsante di alimentazione, quindi aprire l'elenco a discesa ilmnadmin.
3. Selezionare **Account Settings** (Impostazioni account).
4. Selezionare **Unlock** (Sblocca), quindi immettere la password di ilmnadmin.
5. Selezionare **Add User** (Aggiungi utente).
6. Selezionare il tipo di account Standard, quindi immettere un nuovo nome utente.
7. Selezionare **Set password now** (Imposta password ora), quindi immettere una password.
8. Selezionare **Add** (Aggiungi).
Il nuovo utente viene aggiunto all'elenco Users (Utenti).
9. Concedere l'accesso utente a NextSeq 1000/2000 Control Software nel modo seguente.
 - a. Aprire il terminale.
 - b. Immettere i seguenti valori:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <nuovo nome utente>
```
 - c. Se suggerito dal software, immettere la password per ilmnadmin.
10. Per confermare che i permessi utente siano stati impostati correttamente, procedere come segue.
 - a. Accedere al nuovo account utente.
 - b. Andare a NextSeq 1000/2000 Control Software.
 - c. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
 - d. In Default Output Folder (Cartella di output predefinita), assicurarsi di poter selezionare e salvare il percorso della cartella degli output.
Se è possibile selezionare e salvare il percorso della cartella degli output senza errori, i permessi sono stati impostati correttamente.

Reimpostazione della password

Questa sezione indica nei dettagli come reimpostare la password per ilmnuser, ilmnadmin o account 'root'. Non è possibile il recupero delle password. La reimpostazione della password non bypassa il blocco dell'account dopo numerosi tentativi di inserimento di una password errata. È necessario attendere 10 minuti prima di poter reimpostare la password o cercare di accedere.

Reimpostazione della password per ilmnuser

Per reimpostare la password per ilmnuser è necessario conoscere la password per ilmnadmin o per l'account 'root'.

1. Accedere a ilmnadmin.
2. Aprire il terminale.
3. Immettere `sudo passwd ilmnuser`.
4. Quando suggerito dal software, immettere la password per ilmnadmin.
5. Quando suggerito dal software, immettere la password per ilmnuser.
6. Quando suggerito dal software, digitare nuovamente la nuova password per ilmnuser per confermare la nuova password.

Reimpostazione della password per ilmnadmin

Per reimpostare la password per ilmnadmin è necessario conoscere la password per l'account 'root'.

1. Accedere a 'root'.
2. Aprire il terminale.
3. Immettere `passwd ilmnadmin` per cambiare la password per ilmadmin oppure immettere `passwd ilmnuser` per cambiare la password per ilmnuser.
4. Quando suggerito dal software, immettere la nuova password.
5. Quando suggerito dal software, digitare nuovamente la nuova password per ilmnadmin per confermare la nuova password.

Reimpostazione della password per l'account 'root'

Per reimpostare la password per l'account 'root', utilizzare una delle seguenti opzioni:

- Se si conosce la password dall'ultima cattura dell'immagine del sistema operativo, ripristinarla all'immagine salvata.
- Se non si ricorda la password, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Configurazione di BaseSpace Sequence Hub e del supporto proattivo

Utilizzare le seguenti istruzioni per configurare BaseSpace Sequence Hub e il supporto proattivo sul sistema. Per impostare un account BaseSpace Sequence Hub, vedere la [Guida in linea di BaseSpace Sequence Hub](#).

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Per le impostazioni di BaseSpace Sequence Hub e del supporto proattivo, selezionare una delle seguenti opzioni:

Opzione	Descrizione e requisiti
Proactive Support Only (Solo supporto proattivo)*	Invia i dati delle prestazioni dello strumento a Illumina per una più veloce risoluzione dei problemi. Richiede una connessione Internet.
Proactive and Run Monitoring (Supporto proattivo e monitoraggio corsa)	Invia i file InterOp e di registro a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio a distanza della corsa. Questa è l'opzione predefinita. Richiede un account BaseSpace Sequence Hub e una connessione Internet.
Proattivo, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa)	Invia i file InterOp, i file di registro e i dati della corsa a BaseSpace Sequence Hub per il monitoraggio e l'analisi a distanza. Richiede un account BaseSpace Sequence Hub, una connessione Internet e un foglio campioni.
None (Nessuno)	Consente di disconnettersi dagli account BaseSpace Sequence Hub e di non inviare i dati delle prestazioni dello strumento al supporto proattivo Illumina.

* In base alla versione del software di controllo, il nome di questa impostazione sull'interfaccia del software potrebbe essere diverso dal nome presente di questa guida.

Quando viene selezionata una qualsiasi opzione, fatta eccezione per **None** (Nessuno), il supporto proattivo è attivato. Questo è un servizio gratuito che consente di visualizzare i dati delle prestazioni sul pannello degli strumenti MyIllumina del cliente e permette al personale del servizio Illumina di risolvere eventuali problemi più velocemente.

i | **Proactive and Run Monitoring** (Supporto proattivo e monitoraggio corsa) è attivato per impostazione predefinita. Se non si desidera usufruire di questo servizio, selezionare **None** (Nessuno).

3. Se nel passaggio 2 è stato selezionato **None** (Nessuno), selezionare **Save** (Salva) per finire. In caso contrario, proseguire con il passaggio 6.

4. Dall'elenco Hosting Location (Posizione host), selezionare la posizione del server BaseSpace Sequence Hub in cui caricare i dati.
Assicurarsi che Hosting Location (Posizione host) sia nella propria regione o la più vicina alla propria regione.
5. Se si dispone di un abbonamento Enterprise, immettere il nome del dominio (URL) utilizzato per l'account BaseSpace Sequence Hub.
Ad esempio: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
6. Selezionare **Save** (Salva).

Impostazione della posizione della cartella di output predefinita

Utilizzare le istruzioni contenute in questa sezione per selezionare una posizione predefinita della cartella di output. Durante l'impostazione, è possibile modificare la cartella di output per ogni corsa. Il software salva i file cBCL¹ e altri dati della corsa nella cartella di output.

A meno che BaseSpace Sequence Hub non sia configurato per Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), è richiesta una cartella di output. Utilizzare solo un'unità esterna o di rete come cartella di output predefinita. L'utilizzo di una cartella di output sullo strumento incide negativamente sulla corsa di sequenziamento.

Impostazione di una cartella di output su un'unità esterna

Utilizzare le seguenti istruzioni per selezionare un'unità portatile esterna come cartella di output predefinita. Si raccomanda un disco rigido self-powered formattato per NFTS o GPT/EXTA.

1. Collegare un'unità portatile esterna utilizzando la porta USB 3.0 a lato o sulla parte posteriore dello strumento.
Assicurarsi che l'unità portatile esterna consenta i permessi di scrittura. Se è impostata su Read Only (Solo lettura), il software di controllo non sarà in grado di salvare i dati sull'unità.
2. Creare una nuova cartella sull'unità portatile esterna. Questa cartella diventerà la posizione della cartella di output predefinita.
NextSeq 1000/2000 Control Software richiede almeno due livelli di cartelle nidificate per riconoscere la posizione come un'unità portatile esterna.
3. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
4. In Default Output Folder (Cartella output predefinita), selezionare il percorso esistente della cartella e andare alla nuova cartella sull'unità portatile esterna.
5. **[Facoltativo]** Se è stato selezionato **Online Run Setup** (Imposta corsa online) in Run Mode (Modalità corsa), selezionare un'opzione del menu a discesa Hosting Location (Posizione host).

¹Contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato per ogni cluster di ogni ciclo di sequenziamento.

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

Specificare una cartella di output predefinita per l'unità di rete

Utilizzare le seguenti istruzioni per montare un'unità di rete persistente e impostare la posizione della cartella di output predefinita. Server Message Block (SMB)/Common Internet File Systems (CIFS) e Network File System (NFS) sono i soli metodi supportati per il montaggio persistente di un'unità di rete su NextSeq 1000/2000.

Istruzioni di montaggio SMB/CIFS

1. Se NextSeq 1000/2000 Control Software è aperto, selezionare **Minimize Application** (Riduci a icona l'applicazione).
2. Accedere a ilmnadmin.
3. Selezionare **Applications** (Applicazioni).
4. In Favorites (Preferiti), selezionare **Terminal** (Terminale).
5. Immettere `sudo touch /root/.smbcreds`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).
6. Quando suggerito dal software, immettere la password per ilmnadmin.
La password per ilmnadmin è richiesta ogni volta che si utilizza il comando `sudo`.
7. Immettere `sudo gedit /root/.smbcreds`, quindi selezionare **Enter** (Immetti) per aprire il file di test chiamato `smbcreds`.
8. Quando il file di testo `.smbcreds` si apre, immettere le credenziali di accesso nel seguente formato.

```
username=<user name> (nomeutente=<nome utente>)
password=<password>
domain=<domain_name> (dominio=<nome dominio>)
```

Le parentesi non sono necessarie per le credenziali nome utente e password. Le credenziali per il dominio sono richieste solo se l'account a distanza fa parte di un dominio.
9. Selezionare **Save** (Salva) e uscire dal file.
10. Identificare il nome del server e il nome di condivisione per il server SMB/CIFS.
Il nome del server e il nome di condivisione non possono contenere spazi, ad esempio:
Nome server: `192.168.500.100 0 Mioserver-miasede-03`
Nome condivisione: `/share1`
11. Sul terminale, immettere `sudo chmod 400 /root/.smbcreds`, quindi selezionare **Enter** (Immetti) per fornire l'accesso in lettura al file di testo `.smbcreds`.
12. Immettere `sudo mkdir /mnt/<local name>`.
`<local name>` è il nome della nuova directory nell'unità di rete e può contenere spazi. Questa è la directory che verrà visualizzata sullo strumento.
13. Selezionare **Enter** (Immetti).
14. Immettere `sudo gedit /etc/fstab`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).

15. Quando si apre il file `fstab`, immettere quanto segue alla fine del file, quindi selezionare **Enter** (Immetti).

```
//<Server name>/<Share name> /mnt/<local name> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```

16. Selezionare **Save** (Salva) e uscire dal file.
17. Nel terminale, immettere `sudo mount -a -vvv`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).
L'unità di rete è ora montata come `/mnt/<local name>`.
18. Per confermare il corretto montaggio, immettere `<df | grep <local name>>`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).
Dovrebbe apparire il nome del fileshare.
19. Immettere `sudo mkdir /mnt/<nome_locale>/<directory_output>` per creare una sottocartella nella directory locale. `<output directory>` rappresenta la posizione della cartella di output predefinita.
NextSeq 1000/2000 Control Software richiede almeno due livelli di cartelle nidificate per riconoscere la posizione come un'unità di rete montata.
20. Spegner e riaccendere lo strumento. Vedere [Spegnimento e riaccensione dello strumento a pagina 87](#).
21. Impostare l'unità di rete montata come cartella di output predefinita. Vedere [Impostazione di un'unità di rete persistente come cartella di output predefinita a pagina 18](#).

Istruzioni di montaggio NFS

- Se NextSeq 1000/2000 Control Software è aperto, selezionare **Minimize Application** (Riduci a icona l'applicazione).
- Accedere a `ilmnadmin`.
- Identificare il nome del server per il server NFS.
Il nome del server non può contenere spazi, ad esempio:
Nome server: `192.168.500.100 0Mioserver-miasede-03`
- Selezionare **Applications** (Applicazioni).
- In Favorites (Preferiti), selezionare **Terminal** (Terminale).
- Immettere `sudo mkdir /mnt/<local name>`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).
`<local name>` è il nome della nuova directory nell'unità di rete.
- Immettere `sudo gedit /etc/fstab`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).
- Quando si apre il file `fstab`, immettere quanto segue, quindi selezionare **Enter** (Immetti).
Nome server: `/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
- Selezionare **Save** (Salva) e uscire dal file.
- Nel terminale, immettere `sudo mount -a -vvv`, quindi selezionare **Enter** (Immetti).

L'unità di rete è ora montata in `/mnt/directory` nella cartella `<local name>`.

11. Creare una nuova `<sub folder>` nella cartella `<local name>`. La sottocartella rappresenta la posizione della cartella di output predefinita.
NextSeq 1000/2000 Control Software richiede almeno due livelli di cartelle nidificate per riconoscere la posizione come un'unità di rete montata.
12. Spegner e riaccendere lo strumento. Vedere [Spegnimento e riaccensione dello strumento a pagina 87](#).
13. Impostare l'unità di rete montata come cartella di output predefinita. Vedere [Impostazione di un'unità di rete persistente come cartella di output predefinita a pagina 18](#).

Impostazione di un'unità di rete persistente come cartella di output predefinita

1. Accedere a `ilmnuser`.
2. Dal menu di NextSeq 1000/2000 Control Software, selezionare **Settings** (Impostazioni).
3. In Default Output Folder (Cartella di output predefinita), selezionare il montaggio dell'unità di rete persistente che si trova in `/mnt/<nome_locale>/<directory_output>`.
4. **[Facoltativo]** Se è stato selezionato **Online Run Setup** (Imposta corsa online) in Run Mode (Modalità corsa), selezionare un'opzione del menu a discesa Hosting Location (Posizione host).
5. Selezionare **Save** (Salva).

Importazione di genomi di riferimento personalizzati

I nuovi genomi di riferimento personalizzati possono essere importati solo utilizzando l'account di amministratore. Per un elenco di tutti i genomi di riferimento compatibili visitare la pagina sulla compatibilità del prodotto di NextSeq 1000/2000.

1. Creare un genoma di riferimento utilizzando Reference Builder per le applicazioni Instruments BaseSpace Sequence Hub degli strumenti Illumina. Per maggiori informazioni, vedere *Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help* (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
2. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **Process Management** (Gestione processo).
3. Assicurarci che non vi siano corse di sequenziamento o analisi secondaria integrata sullo strumento in esecuzione.
4. Dal menu del software di controllo, selezionare **Minimize Application** (Riduci a icona applicazione).
5. Accedere a `ilmnadmin`.
6. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **DRAGEN**.
7. Nella sezione Genome (Genoma), selezionare **View Installed Genomes** (Visualizzare i genomi installati) per visualizzare un elenco di tutti i genomi Illumina e personalizzati attualmente installati.
8. Scegliere la finestra modale.

9. Selezionare **Choose** (Scegli) in Import New Reference Genomes (Importa nuovi genomi di riferimento), individuare il file del genoma di riferimento (*.tar.gz) sull'unità portatile o sull'unità di rete montata, quindi selezionare **Open** (Apri).
10. Selezionare **Import** (Importa).

Importazione dei file della linea di base del rumore

Quando si utilizza il flusso di lavoro DRAGEN in modalità Somatic, è possibile utilizzare un file della linea di base del rumore per filtrare il rumore del sequenziamento o sistematico. È possibile scaricare file del rumore personalizzati e standard dal [sito di supporto Illumina](#) o creare un file della linea di base del rumore personalizzato.

Generazione di un file della linea di base del rumore personalizzato

Quando si utilizza la modalità Somatic, è possibile generare un file della linea di base del rumore personalizzato. Il file della linea di base del rumore è costruito utilizzando campioni normali che non corrispondono al soggetto a cui appartengono i campioni. Il numero raccomandato di campioni normali è 50.

Per generare un file della linea di base del rumore personalizzato, utilizzare uno dei metodi seguenti:

- Utilizzare il server della piattaforma DRAGEN Bio-IT. Per istruzioni, vedere la *Guida online* della piattaforma DRAGEN Bio-IT.
- Utilizzare DRAGEN Baseline Builder App o BaseSpace Sequence Hub. Utilizzare la pipeline BCL Convert in Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) di BaseSpace Sequence Hub, per generare i file FASTQ. Quando la corsa di sequenziamento è completa e sono disponibili 50 campioni, immettere i file FASTQ in DRAGEN Baseline Builder App.

Importazione dei file della linea di base utilizzando l'interfaccia utente

Dopo aver importato il file della linea di base, è possibile impostare la corsa di sequenziamento utilizzando il flusso di lavoro DRAGEN Enrichment in modalità Somatic.

1. Scaricare un file della linea di base standard dal [sito di supporto Illumina](#) oppure scaricare il file della linea di base personalizzato dal server DRAGEN oppure da DRAGEN Baseline Builder App.
2. Dal menu del software di controllo, selezionare **Minimize Application** (Riduci a icona applicazione).
3. Accedere a ilmnadmin.
4. Selezionare **Applications** (Applicazioni), quindi selezionare **Favorites** (Preferiti).
5. Selezionare **+Other Locations** (+Altre posizioni), quindi selezionare **Computer**.
6. Fare doppio clic su **usr** (utente), quindi su **local** (locale).
7. Fare doppio clic su **illumina**, quindi su **aux_files**.
8. Trascinare il file della linea di base del rumore in aux_files.

Importazione dei file della linea di base utilizzando un terminale

Dopo aver importato il file della linea di base, è possibile impostare la corsa di sequenziamento utilizzando il flusso di lavoro DRAGEN Enrichment in modalità Somatic.

1. Scaricare un file della linea di base standard dal [sito di supporto Illumina](#) oppure scaricare il file della linea di base personalizzato dal server DRAGEN oppure da DRAGEN Baseline Builder App.
2. Dal menu del software di controllo, selezionare **Minimize Application** (Riduci a icona applicazione).
3. Accedere a ilmnadmin.
4. Selezionare **Applications** (Applicazioni).
5. In Favorites (Preferiti), selezionare **Terminal** (Terminale).

6. Immettere i seguenti valori:

```
cp [/path/to/baselinefile] /usr/local/illumina/aux_files
```

Configurazione della modalità della corsa

La modalità della corsa si applica a tutte le corse e determina dove immettere i parametri della corsa e come analizzare i dati.

Modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida)

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Selezionare **Online Run Setup** (Impostazione corsa online) in Services & Proactive Support (Servizi e supporto proattivo) di BaseSpace Sequence Hub.
3. Configurare ulteriori impostazioni selezionando quanto segue:
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Supporto proattivo e monitoraggio corsa) o **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa).
 - b. Menu a discesa per **Hosting Location** (Posizione host).
 - c. **[Facoltativo]** Immettere **Private Domain Name** (Nome dominio privato).
4. Selezionare **Save** (Salva).

Modalità Local (Locale) o Standalone (Indipendente)

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Selezionare **Local Run Setup** (Impostazione corsa locale) in Services & Proactive Support (Servizi e supporto proattivo) di BaseSpace Sequence Hub.
3. Configurare ulteriori impostazioni selezionando quanto segue:
 - a. **Proactive Support Only** (Solo supporto proattivo), **Proactive and Run Monitoring** (Supporto proattivo e monitoraggio corsa), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa) o **None** (Nessuno).



BaseSpace Sequence Hub consente la funzione di rimessa in coda solo se è stato selezionato **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa). Se un foglio campioni non è valido, questa opzione consente di correggerlo e di rimettere in coda l'analisi in demultiplex. Per la funzione di rimessa in coda integrata sullo strumento, vedere [Rimessa in coda di un corsa a pagina 87](#).

- b. Menu a discesa per **Hosting Location** (Posizione host).
 - c. **[Facoltativo]** Immettere **Private Domain Name** (Nome dominio privato).
4. Selezionare **Save** (Salva).

Considerazioni sul foglio campioni per la modalità Local (Locale) o Standalone (Indipendente)

Il foglio campioni deve essere nel formato file v2 per essere analizzato in DRAGEN. Il foglio campioni in formato file v2 è compatibile anche con le applicazioni BaseSpace Sequence Hub che non sono abilitate per DRAGEN. Per informazioni sulla creazione di un foglio campioni in formato file v2, vedere [Impostazioni del foglio campioni in formato v2 a pagina 91](#).

Personalizzazione dello strumento

Questa sezione include le informazioni sulla configurazione delle impostazioni disponibili per la personalizzazione. Per selezionare una cartella di output predefinita, selezionare [Impostazione della posizione della cartella di output predefinita a pagina 15](#) (Imposta posizione predefinita per la cartella output).

Nome dello strumento

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Selezionare Instrument Nickname (Nome personalizzato strumento) e immettere un nome preferito per lo strumento.
Il nome viene visualizzato lungo la parte superiore di ogni schermata.
3. Selezionare **Save** (Salva).

Impostazioni delle preferenze per la denaturazione e la diluizione

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Scegliere se denaturare e diluire le librerie automaticamente sullo strumento. L'impostazione predefinita corrisponde all'opzione selezionata nell'ultima corsa.
 - Per denaturare e diluire le librerie automaticamente sullo strumento, selezionare la casella di controllo **Denature and Dilute On Board** (Denaturazione e diluizione integrate).
 - Per denaturare e diluire le librerie manualmente, deselegionare la casella di controllo **Denature and Dilute On Board** (Denaturazione e diluizione integrate).

Per istruzioni sulla denaturazione e sulla diluizione manuali delle librerie, vedere *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000139235)* (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per NextSeq 1000 e 2000)

Impostazione della preferenza per lo spurgo dei reagenti

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Scegliere se il sistema deve spurgare automaticamente i reagenti non usati nello scomparto reagenti dopo ogni corsa per ottimizzare lo smaltimento dei reagenti di scarto al completamento della corsa:
 - Per spurgare automaticamente, selezionare la casella di controllo **Purge Reagent Cartridge** (Spurga cartuccia di reagente).
 - Per saltare lo spurgo automatico, deselezionare la casella di controllo **Purge Reagent Cartridge** (Spurga cartuccia di reagente) (questa è l'impostazione predefinita).Lo spurgo dei reagenti non usati aggiunge fino a due ore al flusso di lavoro.
3. Selezionare **Save** (Salva).

Configurazione degli aggiornamenti del software

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Scegliere se il sistema deve verificare automaticamente gli aggiornamenti del software:
 - Per la verifica automatica, selezionare la casella di controllo **Autocheck for software updates** (Controllo automatico degli aggiornamenti del software).
 - Per la verifica manuale, deselezionare la casella di controllo **Autocheck for software updates** (Controllo automatico degli aggiornamenti del software).Il controllo automatico degli aggiornamenti del software richiede una connessione Internet. Per maggiori informazioni sull'installazione degli aggiornamenti del software, vedere [Aggiornamenti del software a pagina 80](#).
3. Selezionare **Save** (Salva).

Modifica della luminosità dell'LCD

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Spostare la barra di scorrimento della luminosità dell'LCD alla percentuale desiderata.
3. Selezionare **Save** (Salva).

Impostazione di un server Proxy

Il supporto per il server proxy è disponibile solo in NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3.

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Settings** (Impostazioni).
2. Selezionare le attuali impostazioni proxy per aprire la schermata Proxy Settings (Impostazioni proxy).
3. Selezionare la casella di controllo **Enable Proxy** (Abilita proxy), quindi immettere l'indirizzo della porta IP del server.
4. **[Facoltativo]** Se il server proxy richiede autenticazione, selezionare la casella di controllo **Requires Username and Password** (Richiede nome utente e password), quindi immettere il nome utente e la password.
5. Selezionare **Save** (Salva) per salvare e convalidare le informazioni proxy.
6. Selezionare dalle opzioni seguenti:
 - Selezionare **Yes, I'm Finished** (Sì, ho terminato) per riavviare il sistema e applicare le nuove impostazioni proxy.
 - Selezionare **No, Take Me Back** (No, torna indietro) per tornare alla schermata Settings (Impostazioni). Le nuove impostazioni proxy vengono salvate, ma non sono applicate fino al riavvio del sistema.

Materiali di consumo e apparecchiature

Questa sezione elenca il contenuto del kit di reagenti e le condizioni di conservazione. Sono inoltre elencati i materiali di consumo e le apparecchiature ausiliari che devono essere acquistati per completare il protocollo ed eseguire le procedure di manutenzione e di risoluzione dei problemi.

Materiali di consumo per il sequenziamento

Il sequenziamento su NextSeq 1000/2000 richiede un NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit Illumina monouso o un NextSeq 1000/2000 P3 Reagents Kit Illumina monouso. NextSeq 1000/2000 P2 Reagent Kit è disponibile in tre dimensioni (100 cicli, 200 cicli, 300 cicli) e NextSeq 1000/2000 P3 Reagent Kit è disponibile in quattro dimensioni (50 cicli, 100 cicli, 200 cicli, 300 cicli).

Il sistema di sequenziamento NextSeq 1000 è compatibile solo con NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit Illumina.

Il kit di reagenti fornisce la cartuccia e la cella a flusso per il sequenziamento. Alla ricezione di NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit o Illumina NextSeq 1000/2000 P3 Reagents Kit Illumina:

- Mettere subito i componenti nel luogo di conservazione alle temperature indicate per assicurare prestazioni ottimali.
- Non aprire la busta argentata fino a quando richiesto.
- Conservare le cartucce nella propria scatola per evitare di strappare o forare la busta argentata.
- Conservare le cartucce con le frecce rivolte verso l'alto.

 Se l'etichetta della cartuccia non è rivolta verso l'alto, questo influirà negativamente sui dati del sequenziamento.

Tabella 2 Componenti del kit

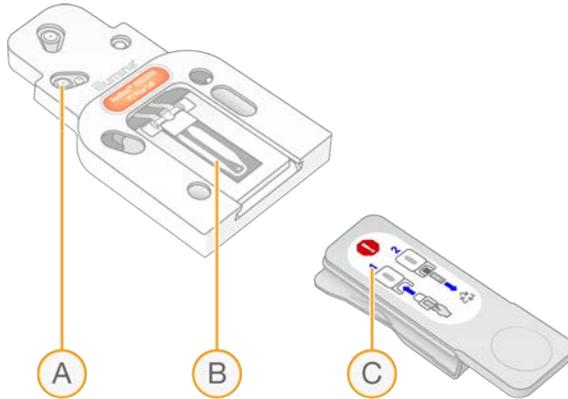
Materiale di consumo	Quantità	Temperatura di conservazione	Dimensioni
Cartuccia	1	tra -25 °C e -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm
Cella a flusso	1	tra 2 °C e 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm
RSB con Tween 20	1	tra -25 °C e -15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm

* Spedito a temperatura ambiente.

Entrambi i materiali di consumo dispongono di identificatori per monitorare e assicurare la compatibilità. La cartuccia e la cella a flusso utilizzano gli identificatori RFID¹.

Cella a flusso

La cella a flusso è di tipo preconfigurato (patterned) a singola corsia. Una cartuccia in plastica racchiude la cella a flusso fabbricata in vetro. Un'impugnatura grigia fuoriesce dalla cella a flusso per assicurarne la manipolazione sicura.



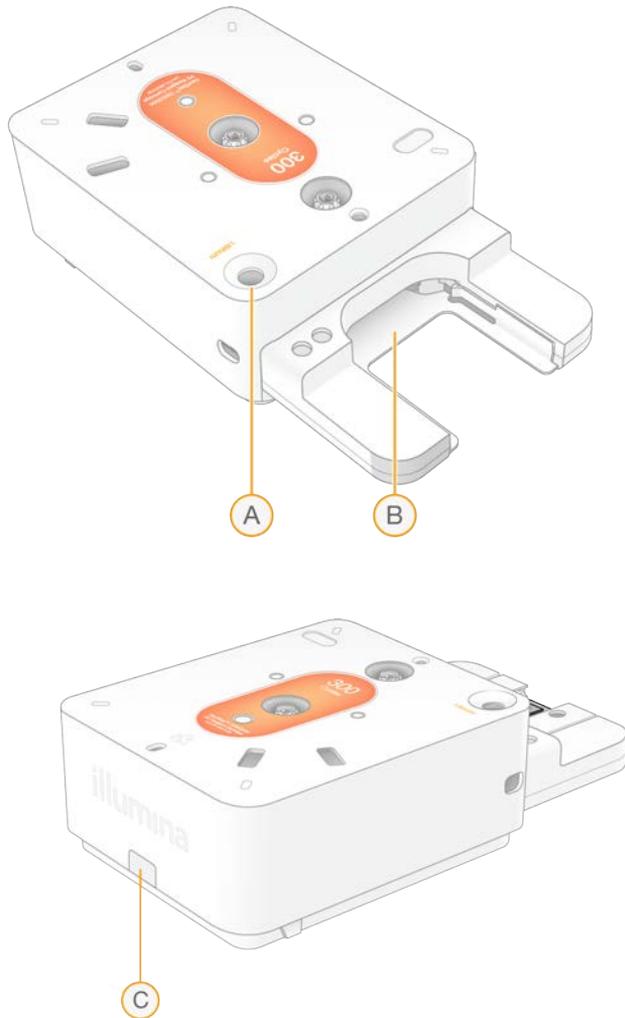
- A. Cartuccia in plastica
- B. Cella a flusso
- C. Impugnatura grigia

La superficie interna della cella a flusso è ricoperta da milioni di nanopozzetti. I cluster sono generati nei nanopozzetti, dai quali viene eseguita la reazione di sequenziamento. La struttura dei nanopozzetti aumenta le letture di output e i dati.

¹Identificazione a radio frequenza

Cartuccia

La cartuccia di reagenti per il sequenziamento è pre-riempita con i reagenti per la generazione dei cluster, i reagenti per il sequenziamento, i reagenti paired-end e i reagenti di indicizzazione. Per le librerie è riservato un serbatoio sigillato e per la cella a flusso è riservato uno slot nella parte anteriore.



- A. Serbatoio della libreria
- B. Slot della cella a flusso
- C. Tappo di scarico

La cartuccia contiene tutti i materiali di consumo necessari per una corsa: reagenti, libreria e cella a flusso. La libreria e la cella a flusso sono caricate nella cartuccia scongelata, che viene quindi caricata sullo strumento. Dopo l'avvio della corsa, i reagenti e la libreria sono automaticamente trasferiti dalla cartuccia alla cella a flusso.

La cartuccia contiene le pompe, le valvole e tutta la fluidica per il sistema, incluso un serbatoio che si trova nella parte inferiore della cartuccia che ha lo scopo di raccogliere i reagenti usati. La cartuccia viene smaltita dopo una corsa, per questo non sono necessari i lavaggi dello strumento.

Numero di cicli supportati

L'etichetta sulla cartuccia indica quanti cicli sono analizzati, non quanti cicli sono eseguiti. La cella a flusso è compatibile con qualsiasi numero di cicli e tipo di lettura.

Tutte le cartucce da 100 cicli e 200 cicli includono 38 cicli in più. La cartuccia da 300 cicli include 27 cicli in più. Ad esempio, la cartuccia da 300 cicli fornisce reagenti sufficiente per un massimo di 327 cicli di sequenziamento. Per maggiori informazioni su quanti cicli è possibile sequenziare, vedere [Numero di cicli di sequenziamento in una lettura a pagina 33](#).

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

Simbolo	Descrizione
	Indica il codice del batch per identificare il batch o il lotto in cui è stato fabbricato il materiale di consumo. ¹
	Indica un pericolo per la salute.
	Intervallo della temperatura di conservazione in gradi Celsius. Conservare i materiali di consumo entro l'intervallo indicato. ²

Materiali di consumo ausiliari

Acquistare i seguenti materiali di consumo per il sequenziamento e la manutenzione.

Materiali di consumo per il sequenziamento

Tabella 3 Materiali di consumo per il sequenziamento

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Guanti monouso, privi di polvere	Fornitore di laboratorio generico	Uso generico.
NextSeq 1000/2000 P2 (v3) Reagents kit	Illumina: n. di catalogo 20046811 (100 cicli) n. di catalogo 20046812 (200 cicli) n. di catalogo 20046813 (300 cicli)	Fornisce la cartuccia di reagenti, la cella a flusso e NextSeq 1000/2000 RSB con Tween 20 per una singola corsa. Compatibile con NextSeq 1000 e NextSeq 2000.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
NextSeq 2000 P3 Reagents Kit	Illumina: N. di catalogo 20046810 (50 cicli) N. di catalogo 20040559 (100 cicli) N. di catalogo 20040560 (200 cicli) N. di catalogo 20040561 (300 cicli)	Fornisce la cartuccia di reagenti, la cella a flusso e NextSeq 1000/2000 RSB con Tween 20 per una singola corsa. Compatibile solo con NextSeq 2000.
Microprovette, 1,5 ml	Fisher Scientific, n. di catalogo 14-222-158, o provette equivalenti a bassa capacità legante	Per la diluizione delle librerie alla concentrazione di caricamento.
Punte per pipette, 10 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per la diluizione delle librerie.
Punte per pipette, 20 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per la diluizione e il caricamento delle librerie.
Punte per pipette, 200 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per la diluizione delle librerie.
Punte per pipette, 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per forare il sigillo del serbatoio della libreria.
[Facoltativo] Campione di controllo PhiX v3	Illumina, n. di catalogo FC-110-3001	Per eseguire una corsa solo con PhiX o aggiungere un campione di controllo PhiX.
[Facoltativo] Carta assorbente	Fornitore di laboratorio generico	Per asciugare la cartuccia dopo averla immersa in un bagno d'acqua.

Materiali di consumo per la manutenzione

Tabella 4 Materiali di consumo per la manutenzione

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Guanti monouso, privi di polvere	Fornitore di laboratorio generico	Uso generico.
Ricambio filtro dell'aria NextSeq 1000/2000*	Illumina, n. di catalogo 20029759	Per la sostituzione del filtro dell'aria ogni sei mesi.

* Lo strumento è spedito con un filtro installato e uno di ricambio. Se non in garanzia, le parti di ricambio sono a carico dell'utente. Mantenere confezionato fino all'utilizzo.

Strumentazione ausiliaria

Acquistare le apparecchiature seguenti per eseguire il sequenziamento.

Apparecchio	Origine	Scopo
Congelatore, tra -25 °C e -15 °C	Fornitore di laboratorio generico	Per la conservazione della cartuccia.
Portaghiaccio	Fornitore di laboratorio generico	Per mettere da parte le librerie fino al sequenziamento.
Pipette, 10 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per la diluizione delle librerie alla concentrazione di caricamento.
Pipette, 20 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per la diluizione delle librerie alla concentrazione di caricamento e per il caricamento delle librerie nella cartuccia.
Pipette, 200 µl	Fornitore di laboratorio generico	Per la diluizione delle librerie alla concentrazione di caricamento.
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico	Per la conservazione della cella a flusso o per lo scongelamento della cartuccia.

Apparecchio	Origine	Scopo
<p>[Facoltativo] Uno dei seguenti bagni d'acqua a temperatura controllata o equivalente in grado di mantenere la temperatura a 25 °C:</p> <ul style="list-style-type: none">• Bagno d'acqua circolante di precisione da 35 l Thermo Scientific (contiene cinque cartucce contemporaneamente)• Bagno d'acqua circolante di precisione da 22 l SHEL LAB (contiene tre cartucce contemporaneamente)	<ul style="list-style-type: none">• Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo TSCIR 35• Shel Lab, n. di catalogo SWBC22	Per lo scongelamento della cartuccia.

Protocollo

Questa sezione fornisce istruzioni passo-passo sulla preparazione delle librerie, sulle librerie diluite e sull'impostazione di una corsa di sequenziamento in una delle quattro modalità [(le modalità Cloud (Sul cloud), Hybrid (Ibrida) e Local (Locale) utilizzano DRAGEN o BaseSpace Sequence Hub, mentre la modalità Standalone (Indipendente) è una corsa indipendente prevista solo per la generazione di dati cBCL per i flussi di lavoro di analisi personalizzati)].

Quando si manipolano i reagenti o altre sostanze chimiche, indossare occhiali di sicurezza, un camice da laboratorio e guanti privi di polvere.

Prima di iniziare un protocollo, assicurarsi di avere a disposizione le apparecchiature e i materiali di consumo necessari. Vedere [Materiali di consumo e apparecchiature a pagina 24](#).

Attenersi ai protocolli nell'ordine indicato, utilizzando i volumi, le temperature e le durate indicate.

Considerazioni relative al sequenziamento

Prima di avviare il protocollo, rivedere le seguenti informazioni su come prepararsi alla diluizione delle librerie e all'impostazione della corsa. È fondamentale ottenere la concentrazione di caricamento ottimale per generare un sequenziamento e un'analisi corretti. L'immissione del numero corretto di cicli in una lettura contribuisce ad assicurare output di dati ottimali.

Volume e concentrazioni di caricamento

Il volume di caricamento è 20 µl. La concentrazione di caricamento dipende dal tipo di libreria:

Tipo di libreria	Concentrazione di caricamento (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1.000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1.000
PhiX al 100%	650
TruSeq DNA Nano 350	1.200
TruSeq DNA Nano 550	1.500
TruSeq Stranded mRNA	1.000

Per altri tipi di libreria, la concentrazione di caricamento iniziale raccomandata è di 650 pM. Ottimizzare questa concentrazione sulle corse successive per identificare una concentrazione di caricamento che consenta di ottenere dati coerenti e che corrisponda alle specifiche.

i | Per ottimizzare la concentrazione di caricamento, utilizzare la metrica % Loading Concentration (% concentrazione di caricamento) nel file di output `PrimaryAnalysisMetrics.csv` disponibile al termine della corsa. Se % Loading Concentration (% concentrazione di caricamento) è inferiore al 95%, aumentare la concentrazione di caricamento in incrementi di 100 pM sulle corse successive.

Numero di cicli di sequenziamento in una lettura

Per ogni lettura, immettere un minimo di 26 cicli e un massimo di 151 cicli per contribuire ad assicurare la qualità dei dati. Il numero esatto di cicli dipende dall'esperimento. NextSeq 1000/2000 Control Software richiede almeno un ciclo per Read 1 (Lettura 1), ma visualizza un avvertenza quando il numero di cicli di Read 1 (Lettura 1) è inferiore a 26.

Il numero totale di cicli per Read 1 (Lettura 1), Index 1 (Indice 1), Index 2 (Indice 2) e Read 2 (Lettura 2) non può essere maggiore rispetto al numero di cicli supportati dal kit più 38 cicli per i kit da 100 cicli e 200 cicli e 27 cicli per i kit P3 da 300 cicli. NextSeq 1000/2000 Control Software visualizzerà un avvertimento quando Index 1 (Indice 1) e Index 2 (Indice 2) sono inferiori a sei cicli. L'avvertimento non verrà mostrato quando Index 1 (Indice 1) e Index 2 (Indice 2) è zero cicli.

Il numero minimo e massimo dei cicli include un ciclo in più. Aggiungere sempre un ciclo alla lunghezza di lettura desiderata per correggere gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing). La lunghezza di lettura rappresenta il numero di cicli di **sequenziamento** in Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2), che esclude i cicli in più e i cicli dell'indice. Per maggiori informazioni, vedere *Correzione della determinazione delle fasi (phasing)* in [Flusso di lavoro di Real-Time Analysis a pagina 60](#).

Esempio di impostazione della corsa:

- Per una lunghezza di lettura di 35 (unidirezionale), immettere **36** nel campo Read 1 (Lettura 1).
- Per una lunghezza di lettura di 150 per lettura (paired-end), immettere **151** nel campo Read 1 (Lettura 1) e **151** nel campo Read 2 (Lettura 2).

Pianificazione di una corsa di sequenziamento in BaseSpace Sequence Hub

Utilizzare Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub per creare e configurare le impostazioni della corsa. Se una corsa viene impostata in modalità Cloud (Sul cloud) o in modalità Hybrid (Ibrida), inviare la configurazione della corsa all'elenco delle corse pianificate nell'account BaseSpace Sequence Hub nella scheda Planned Runs (Corse pianificate). Le corse disponibili per il sequenziamento sui sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000

sono visualizzate nella scheda Planned Runs (Corse pianificate). Se una corsa viene impostata in modalità Local (Locale), utilizzare Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) per esportare il foglio campioni in formato file v2. In alternativa, vedere [Impostazioni del foglio campioni in formato v2 a pagina 91](#) per creare un foglio campioni senza che BaseSpace Sequence Hub utilizzi un modello fornito.

Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) di BaseSpace Sequence Hub non supporta più di 1.536 campioni.

Impostazione di una corsa

1. Andare a BaseSpace Sequence Hub.
2. Immettere l'indirizzo e-mail e la password di BaseSpace Sequence Hub, quindi selezionare **Sign in** (Accedi).
3. Selezionare la scheda **Runs** (Corse), quindi selezionare l'elenco a discesa **New Run** (Nuova corsa).
4. Selezionare **NextSeq 1000/2000**.
5. Nel campo Run Name (Nome corsa), immettere un nome univoco prescelto per identificare la corsa attuale.

Il nome della corsa può contenere un massimo di 225 caratteri alfanumerici, spazi, trattini e trattini bassi.

6. Selezionare una delle seguenti posizioni per l'analisi.
 - **BaseSpace**: analizza i dati del sequenziamento sul cloud.
 - **Local** (Locale): analizza i dati del sequenziamento sullo strumento o genera un foglio campioni in formato v2 per la modalità Local (Locale) o Hybrid (Ibrida).
7. Selezionare un tipo di analisi e la versione.

Per maggiori informazioni sull'analisi secondaria, vedere [File di output dell'analisi secondaria DRAGEN a pagina 65](#) o la documentazione sulle applicazioni di BaseSpace Sequence Hub. Se è stata selezionata l'analisi DRAGEN Single Cell RNA, vedere la pagina NextSeq 1000/2000 Products Files (File prodotti per la piattaforma NextSeq 1000/2000) per informazioni sui kit di preparazione delle librerie di RNA a singola cellula compatibili di terze parti.



Per l'analisi integrata sullo strumento, la versione selezionata deve corrispondere alla versione di DRAGEN installata sullo strumento. Per confermare la versione installata di DRAGEN sullo strumento, vedere [Flusso di lavoro DRAGEN e aggiornamenti della licenza a pagina 81](#).

8. **[Facoltativo]** Impostare un kit indici personalizzato nel modo seguente.

Se si utilizza più di una libreria, le librerie devono avere le stesse lunghezze di lettura indici.

 - a. Selezionare **Add Custom Index Adapter Kit** (Aggiungi kit adattatori indici personalizzato) dal menu a discesa Index Adapter Kit (Kit adattatori indici).
 - b. Selezionare un tipo di modello e immettere il nome del kit, le sequenze adattatore, le strategie per gli indici e le sequenze d'indici.

Assicurarsi che le sequenze adattatore del secondo indice (i5) siano in orientamento forward.

- c. Selezionare **Create New Kit** (Crea nuovo kit).
9. **[Facoltativo]** Impostare un kit di preparazione delle librerie personalizzato nel modo seguente.
 - a. Selezionare **Add Custom Library Prep Kit** (Aggiungi kit di preparazione delle librerie personalizzato) dal menu a discesa Library Prep Kit (Kit di preparazione delle librerie).
 - b. Immettere il nome, i tipi di lettura, i cicli di lettura predefiniti e kit di adattatori indici compatibili per il kit di preparazione delle librerie personalizzato scelto.
 - c. Selezionare **Create New Kit** (Crea nuovo kit).
 10. Selezionare le seguenti impostazioni dello strumento. In base al kit di preparazione delle librerie, le opzioni raccomandate sono selezionate automaticamente. Alcuni kit di preparazione delle librerie sono numeri fissati (hardcoded) di letture indici e tipi di lettura, che non possono essere modificati.
 - Kit di preparazione delle librerie
 - Kit adattatori indici
 - Numero di letture indici
 - Tipo di lettura
 - Numero di cicli di sequenziamento per lettura

i | Se per il kit di preparazione delle librerie viene selezionato Not Specified (Non specificato), il numero di letture indici non viene aggiornato fino a quando le sequenze d'indice non vengono immesse nella sezione Sample Data (Dati campione).
 11. Immettere le informazioni del campione nel foglio di calcolo Sample Data (Dati campione) utilizzando una delle seguenti opzioni. Per raggruppare i campioni per l'aggregazione dei dati durante l'analisi a valle, assegnare un nome per il gruppo nella colonna Project (Progetto).
 - Selezionare **Import Data** (Importa dati), quindi selezionare il foglio campioni. Assicurarsi che le impostazioni del foglio campioni soddisfino i requisiti di formattazione. Vedere [Impostazioni del foglio campioni in formato v2 a pagina 91](#). Se dopo il download iniziale il foglio campioni viene modificato, questo può comportare un fallimento dell'analisi.
 - Copiare gli ID campioni e le posizioni dei pozzetti della piastra indici oppure gli indici i7 e i5 direttamente da un file esterno. Prima di incollare, immettere il numero di righe del campione nel campo Rows (Righe), quindi selezionare **+**. Gli ID dei campioni possono contenere fino a 20 caratteri alfanumerici, trattini e trattini bassi.

i | Le piastre indici a layout fisso richiedono l'immissione delle voci per la posizione del pozzetto. Gli indici che non hanno un layout fisso richiedono l'immissione di voci per gli indici i7 e i5, gli indici i5 devono essere immessi in orientamento forward.
 - Immettere manualmente gli ID campioni corrispondenti alle posizioni dei pozzetti e agli indici. Se per il kit di preparazione delle librerie viene selezionato Not Specified (Non specificato), immettere le sequenze per Index 2 (i5) (Indice 2 - i5) in orientamento forward.
 12. Selezionare **Next** (Avanti).

Impostazione dell'analisi secondaria

Configurare le impostazioni per il tipo di analisi selezionata per la corsa. Per maggiori informazioni sui flussi di lavoro dell'analisi DRAGEN, vedere [File di output dell'analisi secondaria DRAGEN a pagina 65](#).

DRAGEN BCL Convert Illumina

Utilizzare la seguente procedura per configurare l'analisi DRAGEN BCL Convert Illumina.

1. Immettere le seguenti impostazioni facoltative.

Impostazione	Descrizione
AdapterRead1 (AdattatoreLettura1)	La sequenza adattatore per la lettura 1. Se si utilizza un kit di preparazione delle librerie Illumina, lasciare il campo AdapterRead1 (AdattatoreLettura1) vuoto.
AdapterRead2 (AdattatoreLettura2)	La sequenza adattatore per la lettura 2. Se si utilizza un kit di preparazione delle librerie Illumina, lasciare il campo AdapterRead2 (AdattatoreLettura2) vuoto.
BarcodeMismatchesIndex1 (MancatacorrispondezaCodiceabarreIndice1)	Il numero di mancate corrispondenze consentite tra la prima lettura indici e la sequenza d'indice. Il valore predefinito è 1. Se il codice a barre è 6 bp, il valore raccomandato è 0.
BarcodeMismatchesIndex2 (MancataCorrispondenzaCodiceabarreIndice2)	Il numero di mancate corrispondenze consentite tra la seconda lettura indici e la sequenza d'indice. Il valore predefinito è 1. Se il codice a barre è 6 bp, il valore raccomandato è 0.
OverrideCycles (SovrascriviCicli)	Stringa utilizzata per specificare i cicli UMI e nascondere i cicli di una lettura. Sono consentiti i seguenti valori: <ul style="list-style-type: none"> • N: indica i cicli da ignorare. • Y: indica i cicli di sequenziamento. • I: indica i cicli indice. • U: indica i cicli UMI da sottoporre a trimming. Ogni elemento è separato da un punto e virgola. Quanto segue sono esempi di input per OverrideCycles (SovrascriviCicli). U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

2. Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.
3. Selezionare una delle seguenti opzioni di formato FASTQ per gli output:
 - **gzip**: salva i file FASTQ in formato gzip.
 - **DRAGEN**: salva i file FASTQ in formato ora.
4. Completare la configurazione della corsa.
 - Per inviare la configurazione della corsa all'account BaseSpace Sequence Hub, selezionare **Submit Run** (Invia corsa). Le corse inviate a BaseSpace Sequence Hub vengono visualizzate nell'elenco delle corse pianificate e sono disponibili per i sistemi che utilizzano la modalità Cloud (Sul cloud) o la modalità Hybrid (Ibrida).
 - Per salvare la configurazione della corsa come un foglio campioni in formato file v2, selezionare **Export Sample Sheet** (Esporta foglio campioni) dall'elenco a discesa **Submit Run** (Invia corsa). Il foglio campioni è richiesto per avviare le corse sui sistemi che utilizzano la modalità Local (Locale). Questa opzione è disponibile solo se Local (Locale) è stato selezionato per la posizione dell'analisi.

DRAGEN Enrichment Illumina

Utilizzare la seguente procedura per configurare l'analisi DRAGEN Enrichment Illumina.

1. Selezionare un genoma di riferimento.
Se possibile, utilizzare un genoma di riferimento con alt aware.
2. Selezionare un file *.bed contenente le regioni su cui concentrarsi o caricare un nuovo file personalizzato.
Assicurarsi che il genoma di riferimento del file BED corrisponda al genoma di riferimento selezionato nel passaggio 1. Per un nuovo file BED personalizzato, utilizzare il seguente formato per il nome: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.
 - **Modalità Local (Locale)**: selezionare **Select Custom File (Local)** (Seleziona file personalizzato - Locale) da caricare per una singola corsa oppure **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace) per utilizzarlo più volte.
 - **Modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida)**: selezionare **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace). Il file BED personalizzato è disponibile solo nel gruppo di lavoro in cui è stato caricato.
3. Selezionare Germline Variant Caller o Somatic Variant Caller.
4. **[Facoltativo]** Se si utilizza Somatic Variant Caller, selezionare un file della linea di base del rumore. Per maggiori informazioni, vedere [Importazione dei file della linea di base del rumore a pagina 19](#).
5. Selezionare un formato di output mappatura/allineamento.
6. Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.

7. Selezionare una delle seguenti opzioni di formato FASTQ per gli output:
 - **gzip**: salva i file FASTQ in formato gzip.
 - **DRAGEN**: salva i file FASTQ in formato ora.
8. Completare la configurazione della corsa.
 - Per inviare la configurazione della corsa all'account BaseSpace Sequence Hub, selezionare **Submit Run** (Invia corsa). Le corse inviate a BaseSpace Sequence Hub vengono visualizzate nell'elenco delle corse pianificate e sono disponibili per i sistemi che utilizzano la modalità Cloud (Sul cloud) o la modalità Hybrid (Ibrida).
 - Per salvare la configurazione della corsa come un foglio campioni in formato file v2, selezionare **Export Sample Sheet** (Esporta foglio campioni) dall'elenco a discesa **Submit Run** (Invia corsa). Il foglio campioni e i file che supportano l'analisi secondaria vengono scaricati in una cartella in formato *.zip e sono richiesti per avviare le corse sui sistemi che utilizzano la modalità Local (Locale). Questa opzione è disponibile solo se Local (Locale) è stato selezionato per la posizione dell'analisi.

DRAGEN Germline Illumina

Utilizzare la seguente procedura per configurare l'analisi DRAGEN Germline Illumina.

1. Selezionare il genoma di riferimento.

Se possibile, utilizzare un genoma di riferimento con alt aware.
2. Selezionare un formato di output mappatura/allineamento.
3. Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.
4. Selezionare una delle seguenti opzioni di formato FASTQ per gli output:
 - **gzip**: salva i file FASTQ in formato gzip.
 - **DRAGEN**: salva i file FASTQ in formato ora.
5. Completare la configurazione della corsa.
 - Per inviare la configurazione della corsa all'account BaseSpace Sequence Hub, selezionare **Submit Run** (Invia corsa). Le corse inviate a BaseSpace Sequence Hub vengono visualizzate nell'elenco delle corse pianificate e sono disponibili per i sistemi che utilizzano la modalità Cloud (Sul cloud) o la modalità Hybrid (Ibrida).
 - Per salvare la configurazione della corsa come un foglio campioni in formato file v2, selezionare **Export Sample Sheet** (Esporta foglio campioni) dall'elenco a discesa **Submit Run** (Invia corsa). Il foglio campioni e i file che supportano l'analisi secondaria vengono scaricati in una cartella in formato *.zip e sono richiesti per avviare le corse sui sistemi che utilizzano la modalità Local (Locale). Questa opzione è disponibile solo se Local (Locale) è stato selezionato per la posizione dell'analisi.

Illumina DRAGEN RNA

Utilizzare la seguente procedura per configurare l'analisi Illumina DRAGEN RNA.

1. Selezionare il genoma di riferimento.
Se possibile, utilizzare un genoma di riferimento senza alt aware.
2. Selezionare il formato di output mappatura/allineamento.
3. Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.
4. Selezionare una delle seguenti opzioni di formato FASTQ per gli output:
 - **gzip**: salva i file FASTQ in formato gzip.
 - **DRAGEN**: salva i file FASTQ in formato ora.
5. **[Facoltativo]** Caricare un file di annotazione RNA nel formato di trasferimento del gene (Gene Transfer Format, GTF).
 - **Modalità Local (Locale)**: selezionare **Select Custom File (Local)** (Seleziona file personalizzato - Locale) da caricare per una singola corsa oppure **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace) per utilizzarlo più volte.
 - **Modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida)**: selezionare **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace). Il file GTF è disponibile solo nel gruppo di lavoro nel quale è stato caricato.

Una volta caricato un file GTF nel gruppo di lavoro in BaseSpace Sequence Hub, selezionare il file di annotazione dell'RNA dall'elenco a discesa.

6. Scegliere se attivare l'espressione differenziale.
7. Se viene attivata l'espressione differenziale, selezionare un valore di controllo o di confronto per ogni campione.

In ogni gruppo di confronto, ogni campione indicato come controllo viene confrontato con tutti i campioni indicati come valore di confronto. Se il campione non contiene un valore di controllo o di confronto, selezionare **na** come valore.

8. Completare la configurazione della corsa.
 - Per inviare la configurazione della corsa all'account BaseSpace Sequence Hub, selezionare **Submit Run** (Invia corsa). Le corse inviate a BaseSpace Sequence Hub vengono visualizzate nell'elenco delle corse pianificate e sono disponibili per i sistemi che utilizzano la modalità Cloud (Sul cloud) o la modalità Hybrid (Ibrida).
 - Per salvare la configurazione della corsa come un foglio campioni in formato file v2, selezionare **Export Sample Sheet** (Esporta foglio campioni) dall'elenco a discesa **Submit Run** (Invia corsa). Il foglio campioni e i file che supportano l'analisi secondaria vengono scaricati in una cartella in formato *.zip se il file GTF facoltativo è stato fornito e sono richiesti per avviare le corse sui sistemi che utilizzano la modalità Local (Locale). Questa opzione è disponibile solo se Local (Locale) è stato selezionato per la posizione dell'analisi.

DRAGEN Single Cell RNA Illumina

Utilizzare la seguente procedura per configurare l'analisi DRAGEN Single Cell RNA Illumina.

1. Selezionare il genoma di riferimento.
Se possibile, utilizzare un genoma di riferimento senza alt aware.
2. **[Facoltativo]** Caricare un file di annotazione RNA nel formato di trasferimento del gene (Gene Transfer Format, GTF).
 - **Modalità Local (Locale):** selezionare **Select Custom File (Local)** (Seleziona file personalizzato - Locale) da caricare per una singola corsa oppure **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace) per utilizzarlo più volte.
 - **Modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida):** selezionare **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace). Il file GTF è disponibile solo nel gruppo di lavoro nel quale è stato caricato.

Una volta caricato un file GTF nel gruppo di lavoro in BaseSpace Sequence Hub, selezionare il file di annotazione dell'RNA dall'elenco a discesa.
3. Selezionare il formato di output mappatura/allineamento.
4. Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.
5. Selezionare una delle seguenti opzioni di formato FASTQ per gli output:
 - **gzip:** salva i file FASTQ in formato gzip.
 - **DRAGEN:** salva i file FASTQ in formato ora.
6. Selezionare la configurazione identica al tipo di kit di preparazione delle librerie in uso.
Ad esempio, se come kit di preparazione delle librerie è stato selezionato Single Cell RNA Library Kit 1, selezionare Type 1 (Tipo 1) per Configuration Type (Tipo configurazione).
7. Selezionare la lettura barcode.
8. **[Facoltativo]** Modificare il numero di basi nei barcode e l'identificatore UMI. I valori vengono popolati automaticamente in base al kit di preparazione delle librerie e al tipo di configurazione selezionati.
9. Selezionare l'orientamento del filamento.
10. **[Facoltativo]** Selezionare un file contenente le proprie sequenze barcode oppure caricare un nuovo file personalizzato.
11. Se si utilizza un tipo di configurazione Advanced/Custom (Avanzata/Personalizzata), immettere i valori per il numero di cicli di sovrascrizione, la posizione barcode e la posizione UMI.
12. Completare la configurazione della corsa.

- Per inviare la configurazione della corsa all'account BaseSpace Sequence Hub, selezionare **Submit Run** (Invia corsa). Le corse inviate a BaseSpace Sequence Hub vengono visualizzate nell'elenco delle corse pianificate e sono disponibili per i sistemi che utilizzano la modalità Cloud (Sul cloud) o la modalità Hybrid (Ibrida).
- Per salvare la configurazione della corsa come un foglio campioni in formato file v2, selezionare **Export Sample Sheet** (Esporta foglio campioni) dall'elenco a discesa **Submit Run** (Invia corsa). Il foglio campioni e i file che supportano l'analisi secondaria vengono scaricati in una cartella in formato *.zip se il file GTF facoltativo è stato fornito e sono richiesti per avviare le corse sui sistemi che utilizzano la modalità Local (Locale). Questa opzione è disponibile solo se Local (Locale) è stato selezionato per la posizione dell'analisi.

Illumina DRAGEN Amplicon

Utilizzare la seguente procedura per configurare l'analisi Illumina DRAGEN Amplicon.

1. Selezionare il genoma di riferimento.
2. Selezionare un file *.bed contenente le regioni su cui concentrarsi o caricare un nuovo file personalizzato.
Assicurarsi che il genoma di riferimento del file BED corrisponda al genoma di riferimento selezionato nel passaggio 1. Per un nuovo file BED personalizzato, utilizzare il seguente formato per il nome: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.
 - **Modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida):** selezionare **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace). Il file BED personalizzato è disponibile solo nel gruppo di lavoro in cui è stato caricato.
 - **Modalità Local (Locale):** selezionare **Select Custom File (Local)** (Seleziona file personalizzato - Locale) da caricare per una singola corsa oppure **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carica file personalizzato - BaseSpace) per utilizzarlo più volte.
3. Selezionare Germline Variant Caller o Somatic Variant Caller.
4. Selezionare il formato di output mappatura/allineamento.
5. **[Local] [Locale]** Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.
6. Scegliere se salvare una copia dei file FASTQ. I file FASTQ vengono generati solo se è stato scelto di tenere i file FASTQ.
7. Selezionare una delle seguenti opzioni di formato FASTQ per gli output:
 - **gzip:** salva i file FASTQ in formato gzip.
 - **DRAGEN:** salva i file FASTQ in formato ora.
8. Completare la configurazione della corsa.

- Per inviare la configurazione della corsa all'account BaseSpace Sequence Hub, selezionare **Submit Run** (Invia corsa). Le corse inviate a BaseSpace Sequence Hub vengono visualizzate nell'elenco delle corse pianificate e sono disponibili per i sistemi che utilizzano la modalità Cloud (Sul cloud) o la modalità Hybrid (Ibrida).
- **[Local] [Locale]** Per salvare la configurazione della corsa come un foglio campioni in formato file v2, selezionare **Export Sample Sheet** (Esporta foglio campioni) dall'elenco a discesa **Submit Run** (Invia corsa). Il foglio campioni e i file che supportano l'analisi secondaria vengono scaricati in una cartella in formato *.zip e sono richiesti per avviare le corse sui sistemi che utilizzano la modalità Local (Locale). Questa opzione è disponibile solo se Local (Locale) è stato selezionato per la posizione dell'analisi.

Scongelamento della cartuccia nella sua confezione e della cella a flusso

Questa fase consente di scongelare la cartuccia *nella confezione chiusa* e di preparare la cella a flusso. Scongelare la cartuccia nella confezione chiusa utilizzando uno di tre metodi: bagno d'acqua controllata, frigorifero o aria a temperatura ambiente. Utilizzare la cartuccia immediatamente dopo lo scongelamento, senza ricongelare. Se la cartuccia non può essere utilizzata immediatamente dopo lo scongelamento, vedere [Riportare i materiali di consumo nel luogo di conservazione a pagina 86](#).

Figura 4 Cartuccia nella sua confezione



Scongelamento della cartuccia in un bagno d'acqua controllato

1. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere e rimuovere la cartuccia dal luogo di conservazione.
 2. Rimuovere la cartuccia dalla scatola ma ***non aprire il sacchetto sigillato argentato***.
- !** | Lo scongelamento di una busta strappata o forata in un bagno d'acqua può causare un mancato sequenziamento. Scongelare invece a temperatura ambiente o in un frigorifero.
3. Scongelare la cartuccia nella sua confezione in un bagno d'acqua a temperatura controllata a 25 °C per sei ore:
 - L'acqua deve essere mantenuta a una profondità di almeno 9,5-10 cm indipendentemente dal numero di cartucce che si stanno scongelando.
 - Impostare un bagno d'acqua a temperatura controllata a 25 °C.
 - Con l'etichetta della busta rivolta verso l'alto metterla nel bagno d'acqua senza immergerla.
- !** | Non cercare di spingere la cartuccia sotto l'acqua. Se l'etichetta del sacchetto non è rivolta verso l'alto o la cartuccia viene capovolta durante lo scongelamento, questo influirà negativamente sui dati del sequenziamento.
- Non lasciare la cartuccia nel bagno d'acqua per più di otto ore.
 - Non scongelare contemporaneamente un numero superiore di cartucce rispetto a quello supportato dal bagno d'acqua. Per i bagni d'acqua compatibili, vedere [Strumentazione ausiliaria a pagina 30](#).
 - Non impilare le cartucce.
4. Rimuovere la cartuccia dal bagno d'acqua e asciugarla con carta assorbente

Scongelamento della cartuccia in frigorifero

1. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
 2. Un giorno prima della corsa programmata, rimuovere la cartuccia dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
 3. Rimuovere la cartuccia dalla scatola ma ***non aprire il sacchetto sigillato argentato***.
 4. Posizionare la cartuccia a temperatura ambiente in modo che l'etichetta sia rivolta verso l'alto e che l'aria possa circolare sui lati e sulla parte superiore.
- !** | Se l'etichetta del sacchetto non è rivolta verso l'alto, questo influirà negativamente sui dati del sequenziamento.
5. Scongelare a temperatura ambiente per sei ore.

6. Posizionare la cartuccia in un frigorifero a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C in modo che l'etichetta sia rivolta verso l'alto e che l'aria possa circolare su tutti i lati.

 Se l'etichetta del sacchetto non è rivolta verso l'alto, questo influirà negativamente sui dati del sequenziamento.

7. Scongelare in frigorifero per 12 ore. Non superare le 72 ore.

Scongelamento della cartuccia a temperatura ambiente

1. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
2. Rimuovere la cartuccia dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
3. Rimuovere la cartuccia dalla scatola ma *non aprire il sacchetto sigillato argentato*.
4. Posizionare la cartuccia in modo che l'etichetta sia rivolta verso l'alto e che l'aria possa circolare sui lati e sulla parte superiore.

 Se l'etichetta del sacchetto non è rivolta verso l'alto, questo influirà negativamente sui dati del sequenziamento.

5. Scongelare a temperatura ambiente per nove ore. Non superare le 16 ore.

Preparazione della cella a flusso e della cartuccia

1. Preparare la cella a flusso nel modo seguente.
 - a. Rimuovere una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
 - b. Mettere da parte la confezione chiusa a temperatura ambiente per 10-15 minuti per impedire la formazione di condensa al momento della rimozione della cella a flusso dalla confezione. La preparazione della cella a flusso come sopra indicato assicura che questa raggiunga la temperatura ambiente nel tempo previsto.
2. Se si utilizza il metodo di scongelamento in frigorifero:
 - a. Rimuovere la cartuccia scongelata dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
 - b. Mettere da parte la cartuccia chiusa a temperatura ambiente per almeno 15 minuti prima del sequenziamento. Non superare un'ora.

Diluizione delle librerie

Se si utilizza la denaturazione e la diluizione integrate, questa fase diluisce le librerie alla concentrazione di caricamento applicabile. L'aggiunta di 2% di campione di controllo PhiX¹ consente di fornire ulteriori metriche, diversità delle basi o un controllo positivo. La percentuale di aggiunta di PhiX deve essere aumentata per le librerie con una diversità delle basi più bassa.

Se la denaturazione e la diluizione vengono eseguite manualmente, utilizzare *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000139235)* (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per NextSeq 1000 e 2000). Questa fase si applica alla denaturazione e alla diluizione integrate.

Diluizione della libreria a 2 nM

1. [Facoltativo] Rimuovere la soluzione madre di PhiX a 10 nM dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
PhiX è richiesto solo per un'aggiunta facoltativa o per una corsa solo con PhiX.
2. [Facoltativo] Scongela PhiX a temperatura ambiente per cinque minuti, quindi quantificarlo utilizzando un metodo basato sulla fluorescenza, come Qubit, per confermare la concentrazione di PhiX.
Se non è possibile eseguire la quantificazione, procedere con una concentrazione di 10 nM.
3. Utilizzare brevemente un vortex per la libreria o PhiX, quindi centrifugare a 280 × giri per un minuto.
4. Utilizzando RSB con Tween 20 come diluente, preparare almeno 24 µl di libreria a 2 nM in una microprovetta a bassa capacità legante.
Per istruzioni sull'aggiunta di PhiX, vedere [Aggiunta di un campione di controllo PhiX \(facoltativo\) a pagina 47](#).
5. Utilizzare brevemente un vortex, quindi centrifugare a 280 × giri per un minuto.

¹PhiX è una piccola libreria Illumina pronta all'uso con rappresentazione di nucleotidi bilanciata.

Diluizione di una libreria 2 nM alla concentrazione di caricamento

1. Combinare i seguenti volumi in una microprovetta a bassa capacità legante per preparare 24 µl di libreria diluita alla corretta concentrazione di caricamento:

Tipo di libreria*	Concentrazione di caricamento (pM)	Volume libreria a 2 nM (µl)	Volume RSB con Tween 20 (µl)
Library PLUS AmpliSeq for Illumina	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1.000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1.000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1.200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1.500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1.000	12	12
PhiX al 100%	650	7,8	16,2

* Per i tipi di libreria non elencati, iniziare con una concentrazione di caricamento di 650 pM e ottimizzare tale concentrazione sulle corse successive.

Questa tabella illustra esempi di concentrazioni di caricamento. NextSeq 1000/2000 è compatibile con tutti i kit di preparazione delle librerie Illumina, tuttavia la concentrazione di caricamento ottimale può variare.

2. Utilizzare brevemente un vortex, quindi centrifugare a 280 × giri per un minuto.
3. Mettere da parte su ghiaccio la libreria diluita fino a quando si è pronti per il sequenziamento. Sequenziare le librerie diluite alla concentrazione di caricamento lo stesso giorno in cui sono state diluite.
4. Procedere nel modo seguente.
 - Se si sta aggiungendo PhiX, vedere [Aggiunta di un campione di controllo PhiX \(facoltativo\) a pagina 47](#).
 - Se non si sta aggiungendo PhiX o eseguendo una corsa solo con PhiX, vedere [Caricamento dei materiali di consumo nella cartuccia a pagina 47](#).

Aggiunta di un campione di controllo PhiX (facoltativo)

1. Combinare i seguenti volumi in una microprovetta a bassa capacità legante per preparare 20 µl di PhiX a 1 nM:
 - PhiX a 10 nM (2 µl)
 - RSB con Tween 20 (18 µl)
2. Utilizzare brevemente un vortex, quindi centrifugare a 280 × giri per un minuto.
3. Dispensare 1 µl di PhiX a 1 nM in 24 µl di libreria diluita alla concentrazione di caricamento finale. Con questi volumi si ottiene un incremento di circa il 2% di PhiX. La percentuale effettiva varia in base alla qualità e alla quantità della libreria.
4. Mettere da parte su ghiaccio la libreria addizionata con PhiX fino a quando si è pronti per il sequenziamento.
Sequenziare le librerie con l'aggiunta di PhiX nello stesso giorno in cui sono state diluite.

Caricamento dei materiali di consumo nella cartuccia

Questo passaggio prepara la cartuccia per il sequenziamento miscelando i reagenti preimpilati e caricando le librerie diluite e la cella a flusso.

Preparazione della cartuccia

1. Aprire la confezione della cartuccia strappando o tagliando con le forbici a partire dall'estremità superiore su entrambi i lati.
2. Rimuovere la cartuccia dalla confezione. Smaltire la confezione e l'essiccante.
3. Capovolgere la cartuccia 10 volte per miscelare i reagenti.
I componenti interni possono fare rumore durante il capovolgimento, ma questo è normale.



Caricamento della cella a flusso

1. Aprire la confezione argentata strappando o tagliando con le forbici a partire dall'intaglio superiore su entrambi i lati.

Se la cella a flusso non viene utilizzata immediatamente, vedere [Riportare i materiali di consumo nel luogo di conservazione a pagina 86](#).

2. Estrarre la cella a flusso dalla confezione.

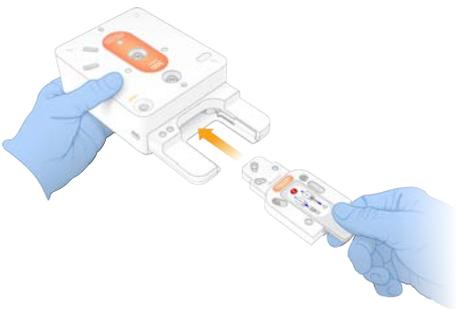
Mettere da parte la confezione argentata e l'essiccante nel caso in cui sia necessario rimettere la cella a flusso nel luogo di conservazione. L'essiccante è contenuto in un sacchetto nella parte inferiore della confezione argentata. Eliminarlo all'avvio del sequenziamento.



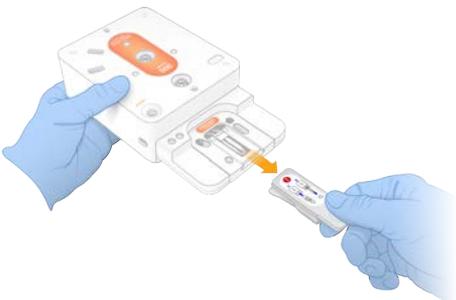
3. Tenere la cella a flusso per l'impugnatura grigia con l'etichetta rivolta verso l'alto.

4. Spingere la cella a flusso nello slot sul lato anteriore della cartuccia.

Quando la cella a flusso è in posizione si avverte un "clic". Una volta caricata correttamente, l'impugnatura grigia sporge dalla cartuccia.



5. Tirare indietro e rimuovere l'impugnatura grigia per esporre la cella a flusso. Riciclare l'impugnatura.



Caricamento delle librerie

1. Con una nuova punta per pipette P1000 forare il serbatoio Library (Libreria) e spingere il sigillo verso i bordi per allargare il foro.
2. Smaltire la punta per pipette per impedire la contaminazione.
3. Dispensare 20 µl di libreria diluita in *fondo* al serbatoio abbassando lentamente la punta per pipette in fondo al serbatoio prima di dispensare. Evitare di toccare il sigillo.



Avvio di una corsa di sequenziamento

Questo passaggio avvia una corsa di sequenziamento in una della quattro modalità:

- **Modalità Cloud** (Sul cloud): la corsa viene selezionata da un elenco di corse pianificate in NextSeq 1000/2000 Control Software. Durante il sequenziamento, i dati cBCL vengono caricati in BaseSpace Sequence Hub. Dopo il sequenziamento, DRAGEN si avvia automaticamente in BaseSpace Sequence Hub.
- **Modalità Hybrid** (Ibrida): la corsa viene selezionata da un elenco di corse pianificate in NextSeq 1000/2000 Control Software. Al termine del sequenziamento, viene avviata automaticamente l'analisi integrata sullo strumento. I file dei dati cBCL e i file di output dell'analisi secondaria DRAGEN vengono archiviati nella cartella di output selezionata.
- **Modalità Local** (Locale): un foglio campioni in formato file v2 viene importato automaticamente in NextSeq 1000/2000 Control Software. Al termine del sequenziamento, viene avviata automaticamente l'analisi integrata sullo strumento. I file dei dati cBCL e i file di output dell'analisi secondaria DRAGEN vengono archiviati nella cartella di output selezionata. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), l'analisi può essere avviata anche mediante le applicazioni di BaseSpace Sequence Hub dopo il completamento della corsa.

- **Modalità Standalone** (Indipendente): impostare una corsa seguendo le istruzioni di NextSeq 1000/2000 Control Software per generale i dati cBCL.

 | L'apertura del visore durante la verifica pre-corsa o durante la corsa può causare una mancata riuscita della corsa.

 | Per evitare lesioni, tenere le mani lontano dallo strumento durante l'apertura o la chiusura del visore.

Avvio di una corsa in modalità Cloud (Sul cloud) o Hybrid (Ibrida)

1. Configurare la modalità della corsa, come descritto in [Configurazione della modalità della corsa a pagina 20](#).
 2. Selezionare **Start** (Avvia).
 3. Accedere a BaseSpace Sequence Hub con le proprie credenziali, quindi selezionare **Sign In** (Accedi).
 4. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), selezionare il gruppo di lavoro creato in Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub.
-  | Per evitare errori è richiesta la selezione di un gruppo di lavoro. Assicurarsi di avere selezionato un gruppo di lavoro prima di procedere.
5. Selezionare **Next** (Avanti).
 6. Selezionare la corsa.
 7. Confermare che Analysis (Analisi), Run Length (Lunghezza corsa) e la versione di Secondary Analysis (Analisi secondaria) corrispondano alla corsa corretta.
L'analisi visualizza Cloud_ (Sul cloud_) per indicare che l'analisi secondaria viene eseguita in BaseSpace Sequence Hub.
 8. Selezionare **Review** (Revisione).
 9. **[Facoltativo]** Immettere le posizioni per i primer lettura personalizzati e i primer indice personalizzati.
Per informazioni sulla preparazione e sull'aggiunta di primer personalizzati, vedere *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (documento n. 1000000139569) (Guida ai primer personalizzati per NextSeq 1000 e 2000)*. Assicurarsi di visitare la pagina Compatible Products (Prodotti compatibili) relativa al kit di preparazione delle librerie in uso per verificare se sono necessari primer personalizzati Illumina.
 10. **[Facoltativo]** Selezionare una ricetta personalizzata. Per maggiori informazioni, vedere [Sequenziamento con cicli 'dark' a pagina 109](#).

Se si utilizza NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 e Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Kit o Illumina Stranded mRNA Prep Kit, la ricetta personalizzata viene selezionata automaticamente.

11. **[Facoltativo]** Per denaturare e diluire manualmente le librerie, deselezionare la casella di controllo **Denature and Dilute On Board** (Denaturazione e diluizione integrate). Vedere *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000139235)* (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per NextSeq 1000 e 2000).
La selezione preimpostata è configurata nelle impostazioni di NextSeq 1000/2000 Control Software.
12. **[Facoltativo]** Per modificare la cartella di output, selezionare il campo Output Folder (Cartella output) e immettere una nuova posizione.
Il campo Output Folder (Cartella output) viene popolato automaticamente in base alle impostazioni predefinite ed è richiesto a meno che non sia stata selezionata l'opzione **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa).
Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), Save to BaseSpace Sequence Hub (Salva in BaseSpace Sequence Hub) è attivato.
Se è stato selezionato Proactive and Run Monitoring (Supporto proattivo e monitoraggio corsa), Save to BaseSpace Sequence Hub (Salva in BaseSpace Sequence Hub) è disattivato.
13. Rivedere le informazioni sulla corsa, quindi selezionare **Prep** (Preparazione).

Avvio di una corsa in modalità Local (Locale)

1. Configurare la modalità della corsa, come descritto in [Configurazione della modalità della corsa a pagina 20](#).
 2. Selezionare **Start** (Avvia).
 3. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa) oppure Proactive and Run Monitoring (Supporto proattivo e monitoraggio corsa), immettere le credenziali di accesso di BaseSpace Sequence Hub, quindi selezionare **Sign In** (Accedi).
 4. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), selezionare il gruppo di lavoro BaseSpace Sequence Hub per salvarvi la corsa, quindi selezionare **Next** (Avanti).
-  Per evitare errori è richiesta la selezione di un gruppo di lavoro. Assicurarsi di avere selezionato un gruppo di lavoro prima di procedere.
5. Selezionare **Choose...** (Scegli...) in Start With Sample Sheet (Avvia con foglio campioni) e individuare il foglio campioni in formato v2 sullo strumento NextSeq 1000/2000, sull'unità portatile o sull'unità di rete montata. I nomi dei file dei fogli campioni non possono contenere caratteri speciali.

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 rileva automaticamente la versione di DRAGEN dal foglio campioni e suggerisce di passare da una versione all'altra, se necessario. La versione di DRAGEN deve essere installata sul sistema. Per maggiori informazioni, vedere [Aggiornamenti del software a pagina 80](#).

- **Instrument Run Setup Used** (Impostazione della corsa per lo strumento utilizzata): selezionare la cartella .zip contenente il foglio campioni in formato v2 e i file di supporto applicabili. Altrimenti, selezionare un foglio campioni in formato v2.
- **Instrument Run Setup Not Used** (Impostazione della corsa per lo strumento non utilizzata): assicurarsi che il file che supporta l'analisi secondaria si trovi nella stessa directory del foglio campioni in formato v2.

i | Il foglio campioni selezionato deve essere in formato v2. Per creare un foglio campioni in formato v2, scaricare il foglio campioni da Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub oppure modificare un modello del foglio campioni in formato v2 sulla pagina di supporto di NextSeq 1000/2000. Per maggiori informazioni sulla formattazione e sui requisiti del foglio campioni v2, vedere [Impostazioni del foglio campioni in formato v2 a pagina 91](#). Assicurarsi che i file a cui si fa riferimento nel foglio campioni siano posizionati nella stessa cartella del foglio campioni.

6. Selezionare **Review** (Revisione).

7. **[Facoltativo]** Immettere le posizioni per i primer lettura personalizzati e i primer indice personalizzati.

Per informazioni sulla preparazione e sull'aggiunta di primer personalizzati, vedere *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (documento n. 1000000139569) (Guida ai primer personalizzati per NextSeq 1000 e 2000)*. Assicurarsi di visitare la pagina Compatible Products (Prodotti compatibili) relativa al kit di preparazione delle librerie in uso per verificare se sono necessari primer personalizzati Illumina.

8. **[Facoltativo]** Selezionare una ricetta personalizzata. Per maggiori informazioni, vedere [Sequenziamento con cicli 'dark' a pagina 109](#).

Se si utilizza NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 e Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Kit o Illumina Stranded mRNA Prep Kit, la ricetta personalizzata viene selezionata automaticamente.

9. **[Facoltativo]** Per denaturare e diluire manualmente le librerie, deselezionare la casella di controllo **Denature and Dilute On Board** (Denaturazione e diluizione integrate). Vedere *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000139235)* (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per NextSeq 1000 e 2000).

La selezione preimpostata è configurata nelle impostazioni di NextSeq 1000/2000 Control Software.

10. **[Facoltativo]** Per modificare la cartella di output, selezionare il campo Output Folder (Cartella output) e immettere una nuova posizione.

Il campo Output Folder (Cartella output) viene popolato automaticamente in base alle impostazioni predefinite ed è richiesto a meno che non sia stata selezionata l'opzione Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa).

Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), Save to BaseSpace Sequence Hub (Salva in BaseSpace Sequence Hub) è attivato.

Se è stato selezionato Proactive and Run Monitoring (Supporto proattivo e monitoraggio corsa), Save to BaseSpace Sequence Hub (Salva in BaseSpace Sequence Hub) è disattivato.

11. Rivedere le informazioni sulla corsa, quindi selezionare **Prep** (Preparazione).

Avvio di una corsa in modalità Standalone (Indipendente)

1. Configurare la modalità della corsa, come descritto in [Configurazione della modalità della corsa a pagina 20](#).
2. Selezionare **Start** (Avvia).
3. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa) oppure Proactive and Run Monitoring (Supporto proattivo e monitoraggio corsa), immettere le credenziali di accesso di BaseSpace Sequence Hub, quindi selezionare **Sign In** (Accedi).
4. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), selezionare il gruppo di lavoro BaseSpace Sequence Hub per salvarvi la corsa, quindi selezionare **Next** (Avanti).
5. Selezionare **Set Up New Run** (Imposta nuova corsa).
6. Nel campo Run Name (Nome corsa), immettere un nome univoco prescelto per identificare la corsa attuale.
Il nome della corsa può contenere caratteri alfanumerici, trattini lunghi, trattini e trattini bassi.
7. Per Read Type (Tipo lettura), selezionare il numero di letture di sequenziamento da eseguire:
 - **Single Read** (Lettura unidirezionale): esegue una lettura, ossia l'opzione più semplice e veloce.
 - **Paired End** (Paired-end): esegue due letture, che generano dati di qualità più elevata e consentono di eseguire un allineamento più accurato.
8. Immettere il numero di cicli da eseguire in ogni lettura:
Non esiste un numero massimo di cicli indici, tuttavia la somma dei cicli di lettura e dei cicli indici deve essere inferiore al numero di cicli indicati sull'etichetta della cartuccia più 27.

Read 1 (Lettura 1): immettere **1-151** cicli.

Index 1 (Indice 1): immettere il numero di cicli per il primer Index 1 (i7) (Indice 1 - i7). Per una corsa solo con PhiX, immettere **0** in entrambi i campi dell'indice.

Index 2 (Indice 2): immettere il numero di cicli per il primer Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).

Read 2 (Lettura 2): immettere **151** cicli. Questo valore è di solito lo stesso del valore per Read 1 (Lettura 1).

9. Se è stato selezionato Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa), selezionare **Choose...** (Scegli...) per importare un foglio campioni. NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 rileva automaticamente la versione di DRAGEN dal foglio campioni e suggerisce di passare da una versione all'altra, se necessario. La versione di DRAGEN deve essere installata sul sistema. Per maggiori informazioni, vedere [Aggiornamenti del software a pagina 80](#).

i | Il foglio campioni selezionato deve essere in formato v2. Per creare un foglio campioni in formato v2, scaricare il foglio campioni da Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub oppure modificare un modello del foglio campioni in formato v2 sulla pagina di supporto di NextSeq 1000/2000. Per maggiori informazioni sulla formattazione e sui requisiti del foglio campioni v2, vedere [Impostazioni del foglio campioni in formato v2 a pagina 91](#). Assicurarsi che i file a cui si fa riferimento nel foglio campioni siano posizionati nella stessa cartella del foglio campioni.

10. **[Facoltativo]** Immettere le posizioni per i primer lettura personalizzati e i primer indice personalizzati.
Per informazioni sulla preparazione e sull'aggiunta di primer personalizzati, vedere *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (documento n. 1000000139569) (Guida ai primer personalizzati per NextSeq 1000 e 2000)*. Assicurarsi di visitare la pagina Compatible Products (Prodotti compatibili) relativa al kit di preparazione delle librerie in uso per verificare se sono necessari primer personalizzati Illumina.
11. **[Facoltativo]** Selezionare una ricetta personalizzata. Per maggiori informazioni, vedere [Sequenziamento con cicli 'dark' a pagina 109](#)
12. **[Facoltativo]** Per denaturare e diluire manualmente le librerie, deselezionare la casella di controllo **Denature and Dilute On Board** (Denaturazione e diluizione integrate). Vedere *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 1000000139235)* (Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie per NextSeq 1000 e 2000).
La selezione preimpostata è configurata nelle impostazioni di NextSeq 1000/2000 Control Software.
13. **[Facoltativo]** Per modificare la cartella di output, selezionare il campo Output Folder (Cartella output) e immettere una nuova posizione.
Il campo Output Folder (Cartella output) viene popolato automaticamente in base alle impostazioni predefinite ed è richiesto a meno che non sia stata selezionata l'opzione Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa).
14. Selezionare **Prep** (Preparazione).

Caricamento dei materiali di consumo sullo strumento

1. Assicurarsi che la cartuccia sia già stata scongelata e capovolta 10 volte per miscelarla prima di caricare la cella a flusso (impugnatura grigia rimossa) e la libreria diluita.
2. Selezionare **Load** (Carica).
NextSeq 1000/2000 Control Software apre il visore ed espelle il vassoio.
3. Posizionare la cartuccia sul vassoio con l'etichetta rivolta verso l'alto e la cella a flusso nello strumento. Spingere la cartuccia finché non scatta in posizione.



4. Selezionare **Close** (Chiudi) per far entrare la cartuccia e chiudere il visore.
Dopo circa tre minuti, NextSeq 1000/2000 Control Software visualizza le informazioni ottenute dalla scansione dei materiali di consumo.
5. [Facoltativo] Selezionare **Eject Cartridge** (Espelli cartuccia) per rimuovere la cartuccia.
Il visore si apre dopo un minuto ed espelle la cartuccia.
6. Selezionare **Sequence** (Sequenziamento).

Verifiche pre-corsa

Le verifiche pre-corsa consistono di una verifica dello strumento seguita da una verifica della fluidica. La verifica della fluidica fora i sigilli della cartuccia, provocando 3-4 suoni di 'schiocco' provenienti dallo strumento. Questo è previsto. Ora il reagente è passato attraverso la cella a flusso.

! Una volta avviata la verifica della fluidica, i materiali di consumo non possono essere riutilizzati.

1. Il completamento delle verifiche pre-corsa impiegano circa 15 minuti.
Dopo il corretto completamento, la corsa viene avviata automaticamente.
2. Se si verifica un errore durante la verifica dello strumento, selezionare **Retry** (Riprova) per ripetere la verifica.
Quando una verifica è in corso, il cerchio per quella verifica è animato.
3. Per risolvere errori ricorrenti, vedere [Risoluzione dei messaggi di errore a pagina 85](#).

Monitoraggio del progresso della corsa

1. Monitorare il progresso della corsa e le metriche mentre vengono visualizzate sulla schermata Sequencing (Sequenziamento).
 - **Estimated run completion** (Completamento della corsa previsto): la data e l'ora previste per il completamento della corsa. Le metriche di completamento della corsa stimate richiedono 10 corse precedenti per calcolare accuratamente il tempo di completamento della corsa.
 - **Average %Q30** (%Q30 media): la percentuale delle identificazioni delle basi con un punteggio qualitativo ≥ 30 .
 - **Projected Yield** (Resa prevista): il numero di identificazioni delle basi previsto per la corsa.
 - **Total Reads PF** (PF totale letture): il numero di cluster che attraversano il filtro (in milioni) di letture paired-end (se applicabile).
 - **Real Time Demux** (Demultiplex in tempo reale): lo stato del demultiplex quando avviato all'inizio di Read 2 (Lettura 2) dopo il completamento dei cicli Read 1 (Lettura 1), Index 1 (Indice 1) e Index 2 (Indice 2). Lo stato visualizzerà Complete (Completo) anche se i cicli indici non sono stati eseguiti. Non disponibile per le corse in modalità Cloud (Sul cloud).
 - **Real Time Alignment** (Allineamento in tempo reale): lo stato dell'allineamento quando avviato all'inizio di Read 2 (Lettura 2) dopo il completamento dei cicli Read 1 (Lettura 1), Index 1 (Indice 1) e Index 2 (Indice 2). Non disponibile per le corse in modalità Cloud (Sul cloud).

Q30 e le metriche della resa sono visualizzate dopo il ciclo 26 (circa sei ore dopo l'avvio della corsa).
2. Per monitorare i processi della corsa, selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **Process Management** (Gestione processo).
3. Per cancellare una corsa, selezionare **End Run** (Termina corsa). Per maggiori informazioni su come cancellare le corse, vedere [Annullamento di una corsa a pagina 86](#).
4. Scaricare i materiali di consumo dallo strumento. Rimuovere la cartuccia dallo strumento entro tre giorni.

Scaricamento dei materiali di consumo

1. Al termine del sequenziamento, selezionare **Eject Cartridge** (Espelli cartuccia). Il software espelle la cartuccia usata dallo strumento.
2. Rimuovere la cartuccia dal vassoio.
3. Rimuovere la cella a flusso dalla cartuccia.
4. Smaltire la cella a flusso, che contiene componenti elettronici, in base agli standard applicabili nella propria regione.
5. [Facoltativo] Rimuovere il tappo di scarico sotto il logo Illumina a lato della cartuccia in un'area appropriata (ossia un lavandino o un contenitore per rifiuti liquidi pericolosi) con il tappo orizzontale

o rivolto verso il basso e lontano dalla faccia. Scaricare i reagenti usati in base agli standard applicabili nella propria regione. Se non è stato attivato lo scarico automatico dei reagenti, il tempo di scarico dipende dalla dimensione della cartuccia.

! **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.

6. Smaltire la cartuccia di reagente.

Un lavaggio post-corsa non è necessario perché la fluidica viene smaltita con la cartuccia.

7. Selezionare **Close Door** (Chiudi sportello) per ricaricare il vassoio e tornare alla schermata Home (Inizio).

Il software ricarica automaticamente il vassoio e i sensori confermano la rimozione della cartuccia.

Pulizia del vassoio della cartuccia

La pulizia del vassoio della cartuccia è necessaria solo se il reagente è fuoriuscito sul vassoio della cartuccia.

1. Rimuovere la cartuccia dallo strumento.

2. Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere e qualsiasi ulteriore indumento protettivo.

3. Spruzzare una soluzione di candeggina al 10% su un panno.

4. Pulire il vassoio della cartuccia con il panno, quindi rimuovere immediatamente la soluzione di candeggina con un panno heavy duty.

Se non viene subito rimossa, la candeggina macchia il vassoio della cartuccia.

5. Spruzzare la soluzione a base di etanolo al 70% sul vassoio della cartuccia e rimuoverla immediatamente con un panno heavy duty.

6. Rimettere il vassoio della cartuccia nella posizione di caricamento.

Output di sequenziamento

Questa sezione descrive il software Real-Time Analysis, che esegue l'identificazione delle basi, l'assegnazione dei punteggi qualitativi e la generazione dei dati. Familiarizzare con i diversi tipi di file di output e la loro posizione dopo una corsa.

Descrizione generale di Real-Time Analysis

I sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 eseguono 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 nel software di controllo dello strumento.

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

Input 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 dal software di controllo.

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

I file di output sono utilizzati per l'analisi a valle in DRAGEN e BaseSpace Sequence Hub.

Gestione degli errori

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

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

`info_00000.log` riepiloga importanti eventi di una corsa.

`error_00000.log` elenca gli errori che si sono verificati durante una corsa.

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

Tile della cella a flusso

Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso. La videocamera cattura un'immagine per tile.

La cella a flusso NextSeq 1000/2000 P2 dispone di 132 tile. La cella a flusso NextSeq 1000/2000 P3 dispone di 264 tile.

Tabella 5 Tile della cella a flusso

Componente della cella a flusso	Cella a flusso NextSeq 1000/2000 P2	Cella a flusso NextSeq 1000/2000 P3	Descrizione
Corsie	1	2	Le corsie sono distinte dal punto di vista ottico ma non sono canali separati dal punto di vista della fluidica.
Superfici	2	2	Le celle a flusso P2 e P3 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.
Strisce per corsia	6	6	Una striscia è una colonna in una corsia della cella a flusso.
Tile per striscia	11	11	Una tile è una porzione di una striscia e rappresenta un'area sottoposta a imaging sulla cella a flusso.

Componente della cella a flusso	Cella a flusso NextSeq 1000/2000 P2	Cella a flusso NextSeq 1000/2000 P3	Descrizione
Tile totali generate	132	264	Corsie × superfici × strisce × tile per striscia equivalgono al numero totale di tile.

Denominazione delle tile

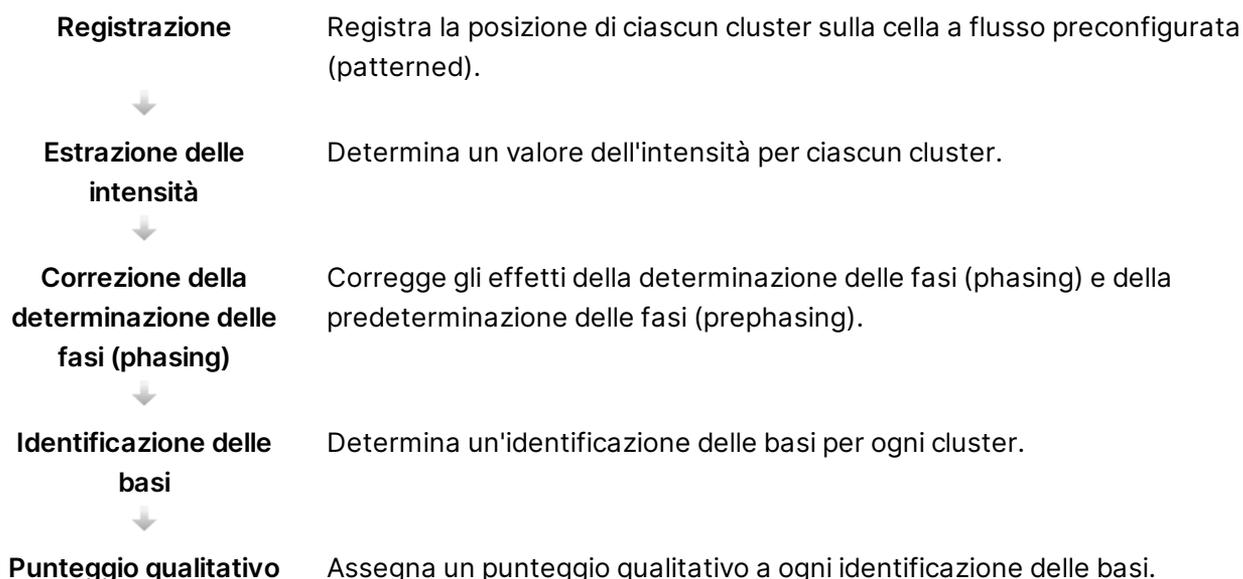
Il nome della tile è un numero di quattro cifre che rappresenta la posizione della tile sulla cella a flusso. Ad esempio, il nome della tile 1205 indica superficie superiore, striscia numero 2, tile numero 05.

La prima cifra rappresenta la superficie: 1 per superficie superiore e 2 per superficie inferiore.

La seconda cifra rappresenta il numero di striscia: 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Le ultime due cifre rappresentano il numero della tile. Per le strisce 1-4, la numerazione inizia da 01 sul lato di uscita della cella a flusso, proseguendo fino a 11 sul lato di entrata. Per le strisce 5-6, la numerazione inizia da 01 sul lato di entrata, proseguendo fino a 11 sul lato di uscita.

Flusso di lavoro di Real-Time Analysis



Registrazione

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

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

Estrazione delle intensità

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

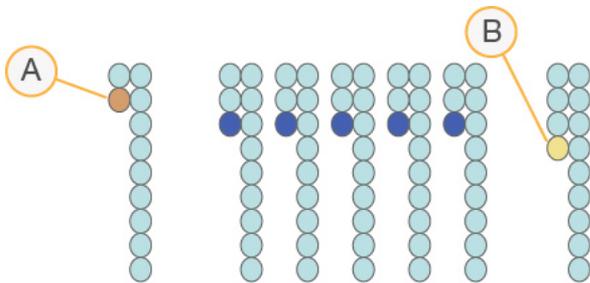
Correzione della determinazione delle fasi (phasing)

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 5 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. I sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 utilizzano il sequenziamento a due canali, che richiede solo due immagini per codificare i dati per quattro basi di DNA, un'immagine dal canale verde e un'immagine dal canale blu.

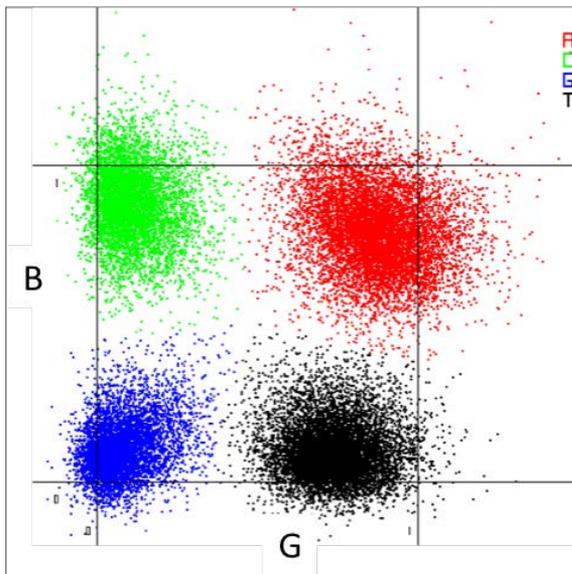
Una mancata identificazione viene indicata con una N. Le mancate identificazioni si verificano quando un cluster non attraversa il filtro, non viene eseguita la registrazione o un cluster si è spostato al di fuori dell'immagine.

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

Tabella 6 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

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

Figura 6 Visualizzazione delle intensità dei cluster



i Il colore di ogni cluster è correlato ai grafici %Base (% base) in Sequence Analysis Viewer (SAV) e ai dati della corsa per ciclo in BaseSpace Sequence Hub e non è previsto per essere correlato al canale verde e al canale blu.

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. Quando incluso, 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.



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

Per generare la tabella Q per i sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000, vengono identificati tre gruppi di identificazioni delle basi, in base ai cluster di queste specifiche caratteristiche predittive. Dopo il raggruppamento delle identificazioni delle basi, la percentuale di errore media è stata calcolata empiricamente per ognuno di questi tre gruppi e i corrispondenti punteggi qualitativi sono stati registrati nella tabella Q assieme alle caratteristiche predittive relative a quel gruppo. In

questo modo, con RTA3 sono possibili solo tre punteggi qualitativi e questi punteggi qualitativi rappresentano la percentuale di errore media del gruppo (*Punteggio qualitativo semplificato con RTA3 a pagina 64*). Nel complesso, questo risultato è semplificato, sebbene il punteggio qualitativo sia altamente accurato. I tre gruppi nella tabella di qualità corrispondono alle identificazioni delle basi marginali (inferiore a Q15), medie (circa Q20) e di elevata qualità (superiore a Q30) e vengono assegnati punteggi specifici di 12, 23 e 37 rispettivamente. Inoltre, un punteggio nullo di 2 viene assegnato a ogni identificazione non riuscita. 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.

Figura 7 Punteggio qualitativo semplificato con RTA3



File di output del sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File delle identificazioni delle basi concatenate	Ciascun cluster analizzato viene incluso in un file delle identificazione delle basi concatenate, aggregato in un file per ciclo, corsia e superficie. Il file aggregato contiene l'identificazione delle basi concatenate e il punteggio qualitativo codificato per ogni cluster. I file delle identificazioni delle basi concatenate sono utilizzati da BaseSpace Sequence Hub o da bcl2fastq2. Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface]cbcl, ad esempio L001_1.cbcl

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
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_[lane].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_[lane]_[tile].filter
File InterOp	File binari per i report che possono essere visualizzati con il software di controllo dello strumento o indipendentemente su SAV o BaseSpace Sequence Hub. 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 di output dell'analisi secondaria DRAGEN

La piattaforma DRAGEN Bio-IT analizza ulteriormente gli output del sequenziamento sullo strumento utilizzando una delle seguenti pipeline di analisi.

- BCL Convert
- Germline
- RNA
- Enrichment
- Single Cell RNA
- DNA Amplicon

Questa sezione fornisce informazioni su ogni pipeline DRAGEN, incluse le informazioni sui file di output. Oltre a generare file specifici per ogni funzione della pipeline, DRAGEN fornisce metriche ottenute dall'analisi in un file `<sample_name>.metrics.json` e il report è descritto in [Pipeline DRAGEN BCL Convert a pagina 71](#). Per maggiori informazioni su DRAGEN, vedere la [pagina di supporto della piattaforma DRAGEN Bio-IT](#).

Tutte le pipeline DRAGEN supportano la decompressione dei file di input BCL e la compressione dei file di output BAM/CRAM.

Considerazioni sui file di output:

- Per le pipeline Germline, RNA, Enrichment e DNA Amplicon che eseguono l'analisi integrata sullo strumento, i file BAM non verranno caricati in BaseSpace Sequence Hub se è stata selezionata l'opzione Proactive, Run Monitoring and Storage (Supporto proattivo, monitoraggio e archiviazione corsa).

Pipeline DRAGEN Enrichment

La pipeline DRAGEN Enrichment supporta le seguenti caratteristiche: Se si utilizza DRAGEN 3.7 o versione successiva, sono supportate entrambe le modalità Germline e Somatic (solo tumore).

- Demultiplex campioni
- Mappatura e allineamento, inclusi l'ordinamento e la marcatura dei duplicati
- Identificazione di varianti piccole
- Identificazione di varianti strutturali

Per eseguire l'identificazione delle varianti, è necessario che un file *.bed sia incluso nel foglio campioni o specificato in Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub. L'identificazione delle varianti strutturali viene generata solo per le letture paired-end e la modalità Germline.

Se si utilizza DRAGEN Enrichment 3.8 o versione successiva, è possibile immettere un file della linea di base del rumore per migliorare le prestazioni in modalità Somatic. Vedere [Importazione dei file della linea di base del rumore a pagina 19](#).

La pipeline genera i seguenti file di output.

Componente	Tipo	Nome del file di output
Mappatura/allineamento	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam oppure • <sample_name>.cram
Identificazione di varianti piccole	VCF e gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Identificazione di varianti strutturali	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz

* I file di output gVCF sono disponibili solo in modalità Germline.

Pipeline DRAGEN Germline

La pipeline DRAGEN Germline supporta le seguenti caratteristiche:

- Demultiplex campioni
- Mappatura e allineamento, inclusi l'ordinamento e la marcatura dei duplicati

- Identificazione di varianti piccole
- Identificazione di varianti strutturali per le letture paired-end
- Identificazione di varianti del numero di copie per i genomi umani
- Espansioni di ripetizioni per i genomi umani
- Regioni di omozigosità per i genomi umani
- **[DRAGEN v3.8 o versione successiva]** Rilevamento di CYP2D6

L'identificazione delle varianti strutturali viene di solito generata per le letture paired-end.

La pipeline genera i seguenti file di output.

Componente	Tipo	Nome del file di output
Mappatura/allineamento	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam oppure • <sample_name>.cram
Identificazione di varianti piccole	VCF e gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Identificazione di varianti strutturali	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz
Varianti del numero di copie	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cnv.vcf.gz
Espansione di ripetizioni	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.repeats.vcf.gz
Regioni di omozigosità	CSV e BED	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.roh_metrics.csv • <sample_name>.roh.bed
Rilevamento di CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cyp2d6.tsv

Pipeline DRAGEN DNA Amplicon

La pipeline DRAGEN supporta le seguenti caratteristiche:

- Demultiplex campioni
- Mappatura e allineamento, inclusi l'ordinamento e la marcatura dei duplicati
- Identificazione delle varianti piccole in modalità Germline o Somatic.

Per eseguire l'identificazione delle varianti, è necessario che un file *.bed sia incluso nel foglio campioni o specificato in Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) in BaseSpace Sequence Hub.

La pipeline genera i seguenti file di output.

Componente	Tipo	Nome del file di output
Mappatura/allineamento	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam oppure • <sample_name>.cram
Identificazione di varianti piccole	VCF e gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz

* I file di output gVCF sono disponibili solo in modalità Germline.

Pipeline DRAGEN RNA

La pipeline DRAGEN RNA supporta le seguenti caratteristiche:

- Demultiplex campioni
- Mappatura e allineamento, inclusi l'ordinamento e la marcatura dei duplicati
- Rilevamento della fusione genica
- Quantificazione del trascritto
- **[DRAGEN v3.8 o versione successiva]** Espressione genica differenziale

Per generare i file di output, specificare un file GTF nel foglio campioni o assicurarsi che sia presente `genes.gtf.gz` predefinito con il genoma di riferimento.

La pipeline genera i seguenti file di output.

Componente	Tipo	Nome del file di output	Descrizione
Mappatura/allineamento	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam oppure • <sample_name>.cram 	Output dell'allineamento assieme alle specifiche SAM.
Rilevamento della fusione genica	Testo	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.fusion_candidates.preliminary • <sample_name>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> • I candidati della fusione prima dell'applicazione dei filtri. • I candidati della fusione dopo l'applicazione dei filtri.

Componente	Tipo	Nome del file di output	Descrizione
Quantificazione del trascritto	Testo	<ul style="list-style-type: none"> sample_name.quant.genes.sf sample_name.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> I risultati della quantificazione dei trascritti a livello del gene. Tutti i risultati della quantificazione dei trascritti.
Espressione differenziale	PNG	Consultare la seguente tabella contenente i file di output dell'espressione differenziale.	Per generare i file di output, deve essere impostato un confronto nel foglio campioni.

I seguenti file vengono generati quando è attivata l'espressione differenziale.

Nome file	Descrizione
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Contiene le metriche per l'analisi dell'espressione differenziale.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Descrive il numero di letture mappate su ogni gene per ogni campione nei gruppi di controllo e confronto.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Una mappa di calore (heat map) dell'espressione dei geni espressi differenzialmente per i campioni nei gruppi di controllo e di confronto. La mappa di calore (heat map) mostra solo i geni espressi differenzialmente con valore P regolato $<-0,05$. Se sono presenti più di 30 geni espressi differenzialmente, solo i primi 30 saranno utilizzati. Se DESeq1 non riesce a convergere o se non vi sono geni espressi differenzialmente, il file non viene generato.

Nome file	Descrizione
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Contiene la variazione dei rapporti dell'espressione genica come funzione dell'intensità media del segnale. Per mostrare le differenze tra le misurazioni ottenute in due campioni, il grafico trasforma i dati nelle scale M (rapporto log) e A (valore medio), quindi traccia i valori. Il grafico MA mostra la variazione log ₂ attribuibile a una data variabile sulla media dei conteggi normalizzati per tutti i campioni. Se il valore P regolato è inferiore a 0,1, i punti sono rossi. I punti al di fuori dalla finestra vengono tracciati come triangoli aperti. I triangoli con la punta rivolta verso l'alto rappresentano una variazione log positiva. I triangoli con la punta rivolta verso il basso rappresentano una variazione log negativa.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Il grafico visualizza i primi due componenti principali che spiegano la variazione maggiore.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Contiene i risultati DESeq2, che descrivono l'espressione media, il log ₂ (variazione), l'errore standard di log ₂ , il valore P, il valore P regolato e lo stato dell'espressione per ogni gene.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Contiene conteggi log trasformati regolarizzati calcolati da DESeq2.

Pipeline DRAGEN Single Cell RNA

DRAGEN supporta le seguenti caratteristiche:

- Demultiplex campioni
- Mappatura e allineamento, inclusi l'ordinamento e la marcatura dei duplicati
- Classificazione di cellula e gene

Per generare i file di output, specificare un file GTF nel foglio campioni o assicurarsi che sia presente `genes.gtf.gz` predefinito con il genoma di riferimento.

La pipeline genera i seguenti file di output.

Componente	Tipo	Nome del file di output
Mappatura/allineamento	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam oppure • <sample_name>.cram

Componente	Tipo	Nome del file di output
Classificazione cellula/gene	TSV, CSV e MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.scRNA.barcodeSummary.tsv • <sample_name>.scRNA.genes.tsv • <sample_name>.scRNA.matrix.mtx
Report dell'analisi	HTML	<sample_name>.dragen.scrna-report.*.html

Pipeline DRAGEN BCL Convert

La pipeline DRAGEN BCL Convert utilizza i dati BCL generati dalla corsa di sequenziamento e le informazioni del foglio campioni per ottenere un file FASTQ per ogni campione. Il nome del file FASTQ è <sample_name>.fastq.gz.

La pipeline genera i seguenti report.

Componente	Tipo	Nome del file di output
Demultiplex	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Metriche adattatore	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Hopping indice	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Principali codici a barre sconosciuti	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

Report sulle statistiche di demultiplex

Il report sulle statistiche di demultiplex contiene informazioni sul numero di letture che attraversano il filtro e che sono assegnate a ogni campione nel foglio campioni. Qualsiasi lettura non chiaramente associata a un campione viene classificata come indeterminata. Il report include anche informazioni sui punteggi qualitativi delle basi nelle letture che hanno attraversato il filtro assegnate a ogni campione.

Vengono incluse le seguenti informazioni.

Metrica	Descrizione
Lane (Corsia)	La corsia della cella a flusso sulla quale il campione è stato sequenziato.
SampleID (ID campione)	L'ID del campione nel foglio campioni. Se una lettura non corrisponde a un campione, il campo visualizza <code>undetermined</code> (indeterminato).
Index (Indice)	La concatenazione di Index Read 1 (Lettura indici 1) e Index Read 2 (Lettura indici 2) da un foglio campioni separata da un trattino. Se una lettura non corrisponde a un campione, il campo visualizza <code>undetermined</code> (indeterminato).

Metrica	Descrizione
# Reads (N. letture)	Il numero di letture che hanno attraversato il filtro e messe in demultiplex per il campione nella corsia specificata.
# Perfect Index Reads (N. di letture indici perfette)	Il numero di letture con una corrispondenza perfetta alle sequenze d'indici combinate e specificate nel foglio campioni.
# One Mismatch Index Reads (N. di letture indici con una mancata corrispondenza)	Il numero di letture con un errore nelle sequenze d'indici combinate e specificate nel foglio campioni.
# of \geq Q30 Bases (PF) (N. di basi con \geq Q30 - PF)	Il numero di basi, inclusi gli adattatori, che corrispondono alle letture che superano la soglia di qualità di Q30.
Mean Quality Score (PF) (Punteggio qualitativo medio - PF)	Il punteggio qualitativo medio per le letture che corrispondono al campione nella corsia specificata. Il valore include le basi adattatore.

Report delle metriche adattatore

Il file delle metriche adattatore contiene il numero di basi adattatore e campione associate con ogni lettura.

Vengono incluse le seguenti informazioni.

Metrica	Descrizione
Lane (Corsia)	La corsia della cella a flusso sulla quale il campione è stato sequenziato.
Sample_ID (ID_ campione)	L'ID del campione nel foglio campioni. Se una lettura non corrisponde a un campione, il campo visualizza <code>undetermined</code> (indeterminato).
index (indice)	La sequenza d'indice1 dal foglio campioni. Il campo è vuoto se l'indice non è stato specificato nel foglio campioni o il valore dell'ID campione è <code>undetermined</code> (indeterminato).
index2 (indice2)	La sequenza d'indice2 dal foglio campioni. Il campo è vuoto se l'indice2 non è stato specificato nel foglio campioni o il valore dell'ID campione è <code>undetermined</code> (indeterminato).

Metrica	Descrizione
R1_ AdapterBases (L1_ BasiAdattatore)	Il numero di basi corrispondenti a AdapterRead1 (AdattatoreLettura1) nel foglio campioni.
R1_ SampleBases (L1_ BasiCampione)	Il numero di basi sottoposte a trimming o nascoste da Read 1 (Lettura 1) per la corsia e il campione corrispondente.
R2_ AdapterBases (L2_ BasiAdattatore)	Il numero di basi corrispondenti a AdapterRead2 (AdattatoreLettura2) nel foglio campioni.
R2_ SampleBases (L2_ BasiCampione)	Il numero di basi sottoposte a trimming o nascoste da Read 2 (Lettura 2) per la corsia e il campione corrispondente.
# Reads (N. lettura)	Il numero di letture per il campione nella corsia specificata.

Report sui conteggi hopping indice

Il report sui conteggi hopping indice contiene il numero di letture per ogni indice previsto e sottoposto a hopping per le corse a doppio indice. Il report include solo i doppi indici univoci per la corsia in cui non viene rilevata alcuna collisione di codice a barre in entrambi gli indici. Per generare le metriche hopping-indice per una corsia, ogni coppia di voci all'interno dell'indice deve presentare una distanza di Hamming di almeno $2N + 1$, dove N rappresenta la tolleranza di mancata corrispondenza del codice a barre specificata per l'indice.

Vengono incluse le seguenti informazioni.

Per le corse non indicizzate, le corse con indicizzazione singola o le corsie che non contengono doppi indici univoci, il file contiene solo l'intestazione.

Metrica	Descrizione
Lane (Corsia)	La corsia della cella a flusso sulla quale il campione è stato sequenziato.
# Reads (N. lettura)	Il numero di letture per il campione nella corsia specificata.

Metrica	Descrizione
SampleID (ID campione)	L'ID del campione nel foglio campioni. Se una lettura non corrisponde a un campione, il campo visualizza <code>undetermined</code> (indeterminato).
index (indice)	La sequenza d'indice1 dal foglio campioni. Il campo è vuoto se una lettura è unidirezionale o se il valore dell'ID campione è <code>undetermined</code> (indeterminato).
index2 (indice2)	La sequenza d'indice2 dal foglio campioni. Il campo è vuoto se una lettura è unidirezionale o se il valore dell'ID campione è <code>undetermined</code> (indeterminato).

Report dei principali codici a barre sconosciuti

Il report dei principali codici a barre sconosciuti contiene i primi 100 indici o coppie di indici per corsia che non sono stati identificati nel foglio campioni in base al numero delle mancate corrispondenze consentite. Se sono presenti valori indici multipli nelle prime 100 voci di conteggio indici, tutti i valori indici con lo stesso conteggio sono forniti come voce numero 100.

Vengono incluse le seguenti informazioni:

Metrica	Descrizione
Lane (Corsia)	La corsia della cella a flusso sulla quale il campione è stato sequenziato.
index (indice)	La sequenza per ogni indice sconosciuto in Index Read 1 (Lettura indici 1). Il campo è vuoto se non sono stati trovati indici sconosciuti.
index2 (indice2)	La sequenza per ogni indice sconosciuto in Index Read 2 (Lettura indici 2). Se la corsa era unidirezionale o se non sono stati trovati indici sconosciuti, il campo è vuoto.
# Reads (N. letture)	Il numero di letture per il campione nella corsia specificata.

Report QC per Illumina DRAGEN

Per tutte le pipeline, DRAGEN FastQC genera grafici QC per impostazione predefinita. I risultati QC aggregati vengono archiviati nella cartella `AggregatedFastqcMetrics` (MetricheFastqcAggregate) e i risultati dei campioni vengono archiviati nella cartella `<sample_name>`.

I report QC non vengono generati se il numero di campioni è superiore a 512.

Sono forniti i seguenti grafici QC.

Grafico QC	Descrizione
adapter_content (contenuto_adattatore)	La percentuale di sequenze per ogni coppia di basi.
positional_mean_quality (qualità_media_posizione)	Punteggio qualitativo delle basi su scala Phred per ogni posizione di lettura.
gc_content (contenuto_gc)	La percentuale di contenuto GC per ogni lettura di sequenziamento.
positional_quality.read_1 (qualità_posizione.lettura_1)	Il valore qualitativo delle basi su scala Phred con un determinato nucleotide e a una data posizione in Read 1 (Lettura 1).
gc_quality (qualità_gc)	
positional_quality.read_2 (qualità_posizione.lettura_2)	Il valore qualitativo medio delle basi su scala Phred con un determinato nucleotide e a una data posizione in Read 2 (Lettura 2).
n_content (contenuto_n)	
read_length (lunghezza_lettura)	La lunghezza della sequenza per ogni lettura.
positional_base_content.read_1 (contenuto_base_posizione.lettura_1)	Il numero di basi di ogni specifico nucleotide a date posizioni in Read 1 (Lettura 1).
read_quality (qualità_lettura)	Il punteggio qualitativo medio delle basi su scala Phred per ogni lettura di sequenziamento.
positional_base_content.read_2 (contenuto_base_posizione.lettura_2)	Il numero di basi di ogni specifico nucleotide a date posizioni in Read 2 (Lettura 2).

Struttura della cartella di output dell'analisi secondaria DRAGEN

Per impostazione predefinita, DRAGEN genera i file di output nella cartella di output selezionata nella scheda Settings (Impostazioni). Per ogni flusso di lavoro, DRAGEN genera un report di riepilogo nel file `report.html`.

Data

 `report.html`

 `report_files`

AggregateFastQCPlots

 `*.png`

- 📄 *stderr_.txt
- 📄 *stdout_.txt
- 📄 dragen_prev_48_hrs.log
- 📄 dlm_prev_48_hrs.log
- 📄 SampleSheet.csv
- 📄 File di input della corsa (ad es., file BED, GTF)

📁 sample_name

📁 enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq o scrna_seq

📁 sample_name

- 📄 *.png
- 📄 dragen_*.log
- 📄 sample_name.*.metrics.csv
- 📄 [DNA] sample_name.*.vcf.gz
- 📄 [DNA] sample_name.*.gvcf.gz: non disponibile per la pipeline Enrichment della piattaforma DRAGEN Bio-IT.
- 📄 sample_name.*.bam oppure sample_name.*.cram
- 📄 Logs
- 📄 [RNA] sample_name.fusion_candidates.filter_info
- 📄 [RNA] sample_name.fusion_candidates.final
- 📄 [RNA] sample_name.quant.genes.sf
- 📄 [RNA] sample_name.quant.sf
- 📄 sample_name.metrics.json
- 📄 [scRNA] sample_dragen-scrna-report.*.html
- 📄 [scRNA] sample_name.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Germline] sample_name.roh_metrics.csv
- 📄 [Germline] sample_name.roh.bed
- 📄 [Germline] sample_name.cyp2d6.tsv
- 📄 sample_name.fastqc_metrics.csv
- 📄 sample_name.trimmer_metrics.csv

📁 [RNA] DifferentialExpression

📁 Comparison1

- Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv
- Control_vs_Comparison.genes.counts.csv
- Control_vs_Comparison.genes.disp.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.heatmap.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.ma.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.pca.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.res.csv
- Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv

ComparisonN

logs

- *.txt
- *.csv

fastq: disponibile solo se KeepFastq (MantieniFastq) è impostato su true (vero).

- *.fastq.gz

ora_fastq: disponibile solo se FastqCompressionFormat (FormatoCompressioneFastq) è impostato su dragen.

- *.fastq.ora

RunInstrumentAnalyticsMetrics

0001

- dataset.json
- fastqc_metrics.csv

0002

- dataset.json
- fastqc_metrics.csv
- Adapter_Metrics.csv
- Demultiplex_Stats.csv
- Index_Hopping_Counts.csv

Reports

- Demultiplex_Stats.csv
- RunInfo.xml
- Trim_Metrics.csv

- 📄 fastq_list.csv
- 📄 SampleSheet.csv
- 📄 Index_Hopping_Counts.csv
- 📄 Top_Unknown_Barcodes.csv

📁 **Read1InstrumentAnalyticsMetrics:** solo per le letture paired-end.

📁 **0001**

- 📄 dataset.json

📁 **0002**

- 📄 dataset.json
- 📄 Adapter_Metrics.csv
- 📄 Demultiplex_Stats.csv
- 📄 Index_Hopping_Counts.csv

📁 **Read1Metrics:** solo per letture paired-end.

- 📄 Adapter_Metrics.csv
- 📄 Index_Hopping_Counts.csv

Manutenzione

Questa sezione descrive le procedure necessarie per la manutenzione di un sistema dalle prestazioni ottimali. Familiarizzare con le procedure per l'installazione degli aggiornamenti del software, per la sostituzione del filtro dell'aria e per l'esecuzione di altre procedure di manutenzione periodica. Un software di controllo aggiornato assicura che il sistema disponga delle più recenti correzioni di bug e caratteristiche installate per ottenere prestazioni ottimali.

Liberazione di spazio su disco rigido

Una corsa di sequenziamento richiede circa 200 GB di spazio su disco rigido locale. Quando lo spazio è ridotto, viene visualizzata una notifica di avvertimento. Utilizzare la seguente procedura per liberare spazio eliminando le corse completate e i genomi di riferimento installati da una cartella temporanea della corsa.

 | Eliminare le corse solo utilizzando NextSeq 1000/2000 Control Software piuttosto che manualmente con il sistema operativo. L'eliminazione manuale delle corse può incidere negativamente sul software di controllo.

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Disk Management** (Gestione disco).
La schermata Disk Management (Gestione disco) viene visualizzata con un elenco delle corse e dei genomi di riferimento salvati sul disco rigido.
2. Selezionare **Delete Run** (Elimina corsa) per le corse che si desidera eliminare.
L'eliminazione di una corsa elimina la cartella locale della corsa. La cartella di output, che è una copia della cartella della corsa, viene mantenuta.
3. Nella finestra di dialogo, selezionare **Yes, Delete Run** (Sì, elimina corsa) per confermare l'eliminazione della corsa.
4. Ripetere i passaggi [2](#) e [3](#) per ogni corsa che si desidera eliminare.
5. Per i genomi che si desidera eliminare, selezionare **Delete Genome** (Elimina genoma).
6. Nella finestra di dialogo, selezionare **Yes, Delete Genome** (Sì, elimina genoma).
7. Ripetere i passaggi [5](#) e [6](#) per ogni genoma che si desidera eliminare.
8. Una volta terminato, chiudere Disk Management (Gestione disco) per tornare alla schermata Home (Inizio).

Aggiornamenti del software

L'aggiornamento del software assicura che il sistema disponga delle ultime caratteristiche e correzioni. Gli aggiornamenti del software sono raggruppati in una System Suite, che include i seguenti software:

- NextSeq 1000/2000 Control Software
- Ricette di NextSeq 1000/2000
- Universal Copy Service
- Real-Time Analysis

i | I moduli DRAGEN non sono inclusi nella System Suite. Installarli separatamente, in base a necessità. Accedere al software del modulo DRAGEN dalle pagine di supporto.

Il sistema è configurato per il download automatico o manuale degli aggiornamenti del software:

- **Automatic updates** (Aggiornamenti automatici): gli aggiornamenti sono scaricati automaticamente da BaseSpace Sequence Hub per l'installazione. Questa opzione richiede una connessione Internet, ma non un account BaseSpace Sequence Hub.
- **Manual updates** (Aggiornamenti manuali): gli aggiornamenti sono scaricati manualmente dal Web, salvati localmente o su un disco portatile, quindi installati dalla posizione in cui sono stati salvati. Questa opzione non richiede una connessione Internet.

Installazione di un aggiornamento automatico del software

1. Assicurarsi che non vi siano corse di sequenziamento o analisi secondaria in esecuzione.
2. Accedere a ilmnadmin.
3. Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software) dal menu del software di controllo.
I sistemi configurati per gli aggiornamenti automatici visualizzano un'allerta quando è disponibile un aggiornamento del software.
4. Per controllare la presenza di un aggiornamento, selezionare **Check Online for Software Update** (Controlla online per aggiornamento software).
5. Selezionare **Update Now** (Aggiorna ora) per scaricare la nuova versione del software.
Al termine del download, il software di controllo si chiude e viene visualizzata la creazione guidata all'installazione.
Il software di controllo viene riavviato automaticamente. Dopo il riavvio, qualsiasi aggiornamento firmware viene eseguito automaticamente.

i | Non è possibile annullare un aggiornamento dopo l'avvio dell'installazione. L'annullamento di un aggiornamento è possibile solo durante il download.

Installazione di un aggiornamento manuale del software

1. Accedere a ilmnadmin.

2. Assicurarsi che non vi siano corse di sequenziamento o analisi secondaria in esecuzione.
3. Quando è disponibile un aggiornamento del software, scaricare l'installer (*.tar.gz) dalla [pagina di supporto dei sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#). Salvare l'installer su una posizione locale o su un'unità portatile.
4. Se l'installer è stato salvato su un'unità portatile, collegare l'unità a una porta USB 3.0 nella parte posteriore dello strumento.
5. Nel software di controllo, selezionare **Software Update** (Aggiornamento software) dal menu del software di controllo.
6. Selezionare **Choose...** (Scegli...) per individuare la posizione dell'installer.
7. Selezionare **Update** (Aggiorna) per avviare l'installazione.
Durante l'installazione, il software di controllo visualizza un indicatore di occupato.
Il software di controllo viene riavviato automaticamente. Dopo il riavvio, qualsiasi aggiornamento firmware viene eseguito automaticamente.



Non è possibile annullare un aggiornamento dopo l'avvio dell'installazione. L'annullamento di un aggiornamento è possibile solo durante il download.

Flusso di lavoro DRAGEN e aggiornamenti della licenza

Solo l'amministratore di sistema può installare i flussi di lavoro DRAGEN e rinnovare la licenza DRAGEN.

Rinnovo online della licenza DRAGEN

Se NextSeq 1000/2000 dispone di una connessione Internet, aggiornare la licenza della piattaforma DRAGEN Bio-IT nel modo seguente.

1. Per ottenere la chiave di licenza, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
2. Attendere 24 ore affinché la licenza venga aggiornata automaticamente oppure scaricare immediatamente la licenza nel modo seguente.
 - a. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **DRAGEN**.
 - b. Selezionare **Check Online** (Controlla online) per verificare se è disponibile una nuova chiave di licenza DRAGEN.
 - c. Se disponibile, selezionare **Update** (Aggiorna).

Rinnovo offline della licenza DRAGEN

Se NextSeq 1000/2000 non dispone di una connessione Internet, aggiornare la licenza della piattaforma DRAGEN Bio-IT nel modo seguente.

1. Per ottenere la chiave di licenza, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina. Salvare il file `license.zip` su una posizione locale o su un'unità portatile.

2. Se il file *.zip è stato salvato su un'unità portatile, collegare l'unità a una porta USB 3.0 nella parte posteriore dello strumento. Spostare delicatamente lo strumento come necessario, per accedere alla parte posteriore.
3. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **DRAGEN**.
4. Selezionare **Choose** (Scegli) per individuare il file *.zip, quindi selezionare **Open** (Apri).

Installazione online dei flussi di lavoro DRAGEN

Se NextSeq 1000/2000 dispone di una connessione Internet, è possibile installare i flussi di lavoro DRAGEN direttamente in NextSeq 1000/2000 Control Software. L'installazione online dei flussi di lavoro DRAGEN è disponibile solo in NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3.

1. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **Process Management** (Gestione processo).
2. Assicurarsi che non vi siano corse di sequenziamento o analisi secondaria in esecuzione.
3. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **DRAGEN**.
In Version (Versione), la sezione Available Workflows (Flussi di lavoro disponibili) elenca i flussi di lavoro attualmente installati sul sistema.
4. Per installare i flussi di lavoro DRAGEN in NextSeq 1000/2000 Control Software, selezionare **Check Online** (Controlla online).
Non tutte le versioni e i flussi di lavoro DRAGEN sono compatibili con l'installazione online. Per ulteriori flussi di lavoro utilizzare l'installazione offline.
5. Selezionare la casella di controllo per i flussi di lavoro che si desidera installare. Se non presente, assicurarsi di installare per prima l'ultima versione di BCL Convert.
Le note di rilascio contengono le informazioni sull'ultima versione di un flusso di lavoro.
6. Selezionare **Install** (Installa) per avviare l'installazione.
7. Immettere ilnadmin per la password del sistema, quindi selezionare **Authenticate** (Autentica).

Installazione offline dei flussi di lavoro DRAGEN

1. Quando è disponibile un aggiornamento del flusso di lavoro DRAGEN, scaricare l'installer (*.tar.gz) dalla [pagina di supporto di DRAGEN](#). Salvare l'installer su una posizione locale o su un'unità portatile.
2. Se l'installer è stato salvato su un'unità portatile, collegare l'unità a una porta USB 3.0 nella parte posteriore dello strumento. Spostare delicatamente lo strumento come necessario, per accedere alla parte posteriore.
3. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **Process Management** (Gestione processo).
4. Assicurarsi che non vi siano corse di sequenziamento o analisi secondaria in esecuzione.
5. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **DRAGEN**.

6. In Version (Versione), selezionare **Browse for New Version** (Cerca nuova versione) per individuare all'installer.
7. Selezionare **Install** (Installa) per avviare l'installazione.
8. Immettere ilmnadmin per la password del sistema, quindi selezionare **Authenticate** (Autentica).

Sostituzione del filtro dell'aria

Utilizzare le seguenti istruzioni per sostituire un filtro dell'aria scaduto ogni sei mesi.

Il filtro dell'aria è una cartuccia rettangolare monouso che copre la ventola sul lato destro dello strumento. Assicura la ventilazione corretta e impedisce l'entrata di detriti nel sistema. Lo strumento è spedito con un filtro dell'aria installato e un filtro di ricambio. Ulteriori ricambi sono inclusi con un valido contratto di servizi Illumina oppure possono essere acquistati separatamente presso Illumina.

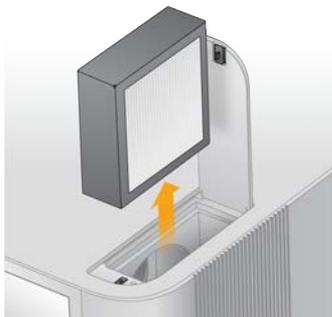
1. Sulla parte superiore dello strumento, premere il lato destro del pannello superiore per sganciarlo come mostrato nell'immagine successiva.



2. Aprire il pannello.



3. Premere per rilasciare la cartuccia del filtro dell'aria rimuovendola dal centro del pannello, quindi smaltirla.



4. Inserire un nuovo filtro dell'aria nel ricettacolo, quindi premere per bloccarlo in posizione.
5. Chiudere il pannello superiore e premerlo in posizione.



6. Rimettere lo strumento nella sua posizione.

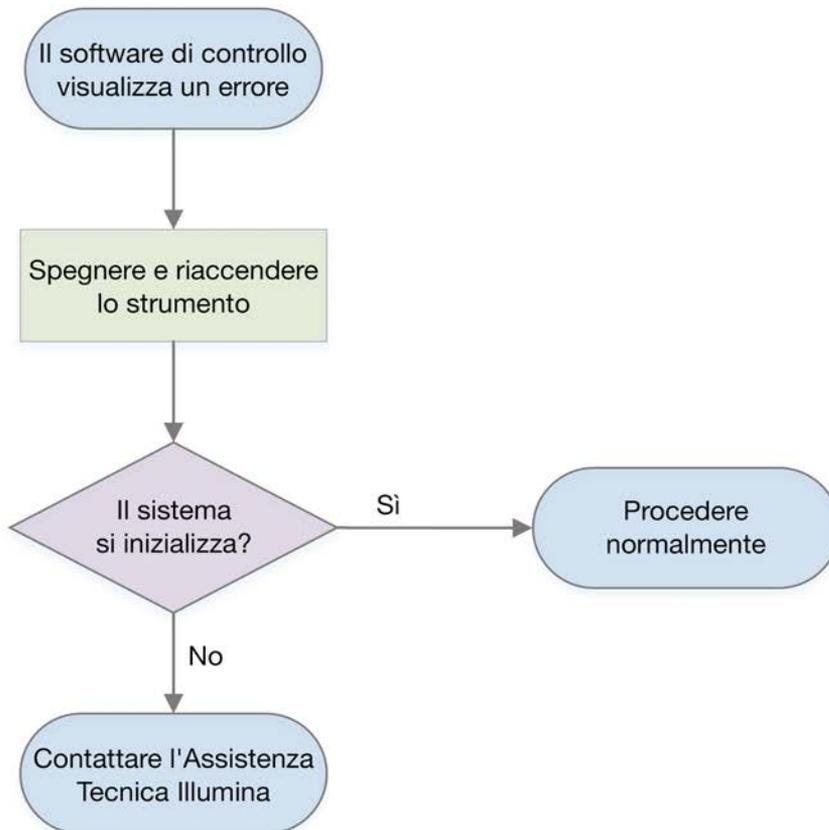
Risoluzione dei problemi

Questa sezione descrive le istruzioni passo-passo per annullare una corsa, spegnere e riaccendere lo strumento e altre procedure per la risoluzione dei problemi.

Risoluzione dei messaggi di errore

Questa appendice fornisce istruzioni dettagliate per i diversi passaggi di risoluzione dei problemi. Il diagramma seguente fornisce una descrizione generale della risoluzione dei messaggi di errore che vengono visualizzati durante l'inizializzazione, l'impostazione della corsa o il sequenziamento e che non sono risolvibili con un nuovo tentativo.

Molti errori possono essere risolti con uno spegnimento e riaccensione: spegnimento dello strumento, quindi riavvio dello strumento. Per maggiori informazioni sullo spegnimento e la riaccensione, vedere [Spegnimento e riaccensione dello strumento a pagina 87](#).



Riportare i materiali di consumo nel luogo di conservazione

Utilizzare le seguenti istruzioni per conservare una cartuccia e una cella a flusso scongelate in caso di un errore dello strumento durante la verifica pre-corsa prima della verifica della fluidica.

1. Separare la cella a flusso dalla cartuccia.
 2. Rimuovere ed eliminare la libreria diluita dal serbatoio (fino a circa 18 μ l).
-  Preparare al momento una diluizione della stessa libreria per la corsa successiva per evitare la contaminazione incrociata con la libreria rimasta nel serbatoio.
3. Posizionare la cartuccia a 2 °C-8 °C in modo che l'etichetta sia rivolta verso l'alto e che l'aria possa circolare su tutti i lati.
Non superare le 72 ore. Se la cartuccia è stata scongelata durante la notte per 12 ore, non superare le 60 ore.
 4. Rimettere la cella flusso nella confezione argentata originaria con l'essiccante.
 5. Chiudere con del nastro adesivo la confezione argentata e posizionarla nel luogo di conservazione a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.
Non superare le 72 ore.

Annullamento di una corsa

1. Selezionare **End Run** (Termina corsa).
2. Per spurgare automaticamente, selezionare la casella di controllo **Purge Reagent Cartridge** (Spurga cartuccia di reagente).
La selezione preimpostata è configurata nelle impostazioni di NextSeq 1000/2000 Control Software.
3. Selezionare **Yes, end the sequencing run** (Sì, termina corsa di sequenziamento).
L'annullamento di una corsa è definitivo. Il software non può riprendere la corsa e i materiali di consumo non possono essere riutilizzati dopo che lo strumento ha controllato parte delle verifiche pre-corsa.
4. Selezionare **Eject Cartridge** (Espelli cartuccia) per aprire il visore ed espellere il vassoio.
5. Rimuovere la cartuccia dal vassoio.
6. Conservare o smaltire la cartuccia, in base a quando si è verificato l'annullamento della corsa:

Circostanza	Istanza
Annullamento eseguito prima o durante la verifica pre-corsa dello strumento e si desidera riutilizzare i materiali di consumo.	Vedere Riportare i materiali di consumo nel luogo di conservazione a pagina 86 .
In tutte le altre circostanze.	Vedere Scaricamento dei materiali di consumo a pagina 56 .

7. Selezionare **Close Door** (Chiudi sportello) per ricaricare il vassoio e tornare alla schermata Home (Inizio).

I sensori confermano la rimozione della cartuccia.

Rimessa in coda di un corsa

Se viene visualizzato un errore in Status of Secondary Analysis (Stato dell'analisi secondaria) in Process Management (Gestione processo), è possibile rimettere in coda la corsa per eseguire di nuovo l'analisi DRAGEN integrata sullo strumento sui file cBCL generati. La cartella della corsa originale deve essere ancora presente sullo strumento per poter utilizzare la funzione di rimessa in coda. L'utilizzo di questa funzione di rimessa in coda non rimette in coda le corse in BaseSpace Sequence Hub. Per rimettere in coda le corse in BaseSpace Sequence Hub, vedere Fix Sample Sheet (Correzione del foglio campioni) in BaseSpace Sequence Hub Help Center.

1. Aggiornare il foglio campioni in formato v2, quindi salvarlo su un'unità di rete portatile o un'unità di rete montata.
2. Se il foglio campioni è stato salvato su un'unità portatile, collegare l'unità a una porta USB 3.0 nella parte posteriore dello strumento. Spostare delicatamente lo strumento come necessario, per accedere alla parte posteriore.
3. Selezionare il menu del software di controllo, quindi selezionare **Process Management** (Gestione processo).
4. Assicurarsi che non vi siano corse di sequenziamento o analisi secondaria integrata sullo strumento in esecuzione.
5. Selezionare **Requeue** (Rimetti in coda) accanto alla corsa completata da rimettere in coda.
6. Selezionare **Choose** (Scegli) per individuare il foglio campioni, quindi selezionare **Open** (Apri).
7. Selezionare **Start Requeue** (Avvia rimetti in coda).

Spegnimento e riaccensione dello strumento

Lo spegnimento e la riaccensione dello strumento consentono di spegnere e riaccendere il sistema per ripristinare una connessione persa, allineare una specifica o risolvere un'eventuale inizializzazione non riuscita. I messaggi del software indicano quando eseguire lo spegnimento e la riaccensione per risolvere un errore o un avvertimento.

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **Shut Down Instrument** (Spegni strumento).

2. Se il sistema non si spegne, tenere premuto il pulsante di accensione che si trova sulla destra dello strumento fino a quando si dissolve la luce.
3. Quando il pulsante di accensione lampeggia, premere il lato di spegnimento (O) del pulsante che si trova sul pannello posteriore.
Dopo lo spegnimento, il pulsante di accensione potrebbe continuare a lampeggiare.

Figura 8 Posizione del pulsante di accensione/spegnimento



4. Attendere 30 secondi.
5. Premere il lato di accensione (I) del pulsante di accensione/spegnimento.
6. Quando il pulsante di accensione lampeggia, attendere 30 secondi, quindi premerlo.

Figura 9 Posizione del pulsante di accensione



7. Attendere circa cinque minuti per il caricamento del sistema operativo. Quando il sistema operativo è caricato, accedere al sistema.
Il software di controllo si avvia e inizializza il sistema. Attendere circa cinque minuti per l'inizializzazione del sistema. Al termine dell'inizializzazione viene visualizzata la schermata Home (Inizio).

Esecuzione di una verifica del sistema

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

Quattro verifiche dei sotto sistemi impiegano 58 minuti per risolvere gli errori della verifica pre-corsa e altri problemi. I test dei confermano il corretto allineamento e funzionamento dei componenti.

I risultati del test si trovano nella cartella `system-check` (verifica-sistema) che si trova in `/usr/local/illumina/system-check`.

Assicurarsi di scaricare la cartuccia prima di eseguire le verifiche di sistema.

Esecuzione di una verifica di sistema

1. Dal menu del software di controllo, selezionare **System Checks** (Verifiche del sistema).
2. Selezionare la casella di controllo per ogni verifica di sistema seguente che si desidera eseguire.
 - **Network Connectivity** (Connettività rete): verifica lo stato di connessione della rete e le prestazioni.
 - **Enclosure** (Telaio): verifica le prestazioni del sistema termico e del meccanismo di sollevamento dei visori.
 - **Motion** (Movimento): verifica i limiti di spostamento e le prestazioni del piano Z e del piano XY.
 - **Optics** (Ottica): verifica le prestazioni del modulo di imaging.
3. Selezionare **Start** (Avvia).

Ripristino alle impostazioni di fabbrica

Ripristinare il sistema alle impostazioni di fabbrica per declassare il software o recuperare da una configurazione indesiderata. Questa funzione deve essere utilizzata solo da un rappresentante Illumina.

Cattura immagine installazione

Catturare un'immagine del sistema da utilizzare come backup per un'installazione del software correttamente funzionante. Questa immagine del sistema può essere ripristinata in un secondo momento. Si raccomanda di catturare l'immagine del sistema subito dopo aver completato l'installazione iniziale e aver modificato la password con un rappresentante Illumina.

1. Riavviare Linux.
2. Quando viene suggerito di scegliere un sistema operativo, selezionare **Capture Installed Image** (Cattura immagine sistema installato).

Vengono visualizzate brevemente le opzioni dei sistemi operativi prima di procedere automaticamente con NextSeq 1000/2000 Control Software.

i | Poiché in memoria viene archiviata solo un'immagine, questa sovrascriverà la precedente immagine catturata.

3. Attendere circa 30 minuti per far sì che il sistema catturi l'attuale immagine del sistema installato. La cattura può includere diversi riavvii. Una volta completato, il sistema si riavvia con l'attuale immagine del sistema installato archiviata in memoria.

Ripristino dell'immagine catturata

Ripristinare il sistema all'immagine catturata in precedenza per evitare una configurazione indesiderata.

1. Riavviare Linux.
2. Quando suggerito dal sistema operativo, selezionare **Restore Installed Image** (Ripristina immagine installata).

Vengono visualizzate brevemente le opzioni dei sistemi operativi prima di procedere automaticamente con NextSeq 1000/2000 Control Software.

i | Le password sono legate all'immagine del sistema. Dopo il ripristino, utilizzare la password dell'immagine ripristinata per accedere al sistema.

3. Il completamento del ripristino impiega circa 30 minuti. Il ripristino può includere diversi riavvii. Una volta completato, il sistema si riavvia con l'immagine ripristinata.

Risorse e riferimenti

Impostazioni del foglio campioni in formato v2

Se ci si attiene alla modalità Local (Locale), è possibile utilizzare il foglio campioni in formato file v2 per configurare le impostazioni della corsa. Creare un foglio campioni in Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) o modificare il *modello del foglio campioni v2 per i sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000*. Quando si modifica il foglio campioni assicurarsi che i seguenti campi e sezioni siano inclusi nell'ordine elencato e che soddisfino i requisiti. Al termine della modifica, utilizzare un'unità portatile o un'unità di rete montata per trasferire il foglio campioni ai sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Quando si cerca il foglio campioni nel software di controllo, questo viene copiato in una cartella di pre-corsa sullo strumento, in questo modo l'unità portatile può essere rimossa.

Assicurarsi che le impostazioni del foglio campioni v2 soddisfino i requisiti seguenti:

- Le sequenze d'indice specificate nella sezione del foglio campioni BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati) devono corrispondere al kit indici selezionati in NextSeq 1000/2000.
- Se si utilizza NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2, la versione di DRAGEN specificata nel foglio campioni deve essere installata e attiva sul sistema. Per maggiori informazioni, vedere [Aggiornamenti del software a pagina 80](#).
- Se si utilizza NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3, la versione di DRAGEN specificata nel foglio campioni deve essere installata sul sistema. Il software di controllo rileva automaticamente la versione di DRAGEN dal foglio campioni e suggerisce di passare alle versioni attive, se necessario. Per maggiori informazioni, vedere [Aggiornamenti del software a pagina 80](#).

Se si utilizza DRAGEN, è necessario configurare ulteriori impostazioni. Per maggiori informazioni, vedere [Impostazioni del foglio campioni DRAGEN a pagina 96](#).

Scaricare il modello del foglio campioni v2 da Product Files (File prodotto) nella pagina di supporto dei sistemi di sequenziamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Se è stato creato un foglio campioni utilizzando Instrument Run Setup (Impostazione della corsa per lo strumento) modificando il foglio campioni scaricato inizialmente, questo potrebbe causare il fallimento dell'analisi.

I nomi dei file non possono contenere caratteri speciali.

Requisiti di [Header] [Intestazione]

La sezione [Header] [Intestazione] include le informazioni complessive sulla corsa. Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili per [Header][Intestazione].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
FileFormatVersion (VersioneFormatoFile)	Sì	La versione del foglio campioni. Per il valore immettere 2.
RunName (NomeCorsa)	No	Il nome univoco della corsa scelto dall'utente. Il nome della corsa può contenere caratteri alfanumerici, trattini bassi, trattini e punti. Se RunName (NomeCorsa) contiene spazi o caratteri speciali, l'analisi fallisce.
RunDescription (DescrizioneCorsa)	No	Descrizione della corsa.
InstrumentPlatform (PiattaformaStrumento)	No	NextSeq 1000/2000
InstrumentType (TipoStrumento)	No	NextSeq 1000/2000

Requisiti di [Reads] [Letture]

La sezione [Reads] [Letture] descrive il numero di cicli di sequenziamento utilizzato per la genomica e per lettura indici 1 e 2. Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni per [Reads] [Letture].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Read1Cycles (CicliLettura1)	Sì	Numero di cicli nella prima lettura. Il valore deve essere un numero intero maggiore di zero.
Read2Cycles (CicliLettura2)	No	Numero di cicli nella seconda lettura.
Index1Cycles (CicliIndice1)	No	Il numero di cicli nella prima lettura indici. Richiesto quando viene sequenziato più di un campione. Il numero massimo è di 10 cicli.
Index2Cycles (CicliIndice2)	No	Il numero di cicli nella seconda lettura indici. Il numero massimo è di 10 cicli.

Requisiti della sezione [Sequencing_Settings] [Impostazioni_Sequenziamento]

Utilizzare la sezione [Sequencing_Settings] [Impostazioni_Sequenziamento] per indicare il kit di preparazione delle librerie in uso.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
LibraryPrepKits (KitPreparazioneLibrerie)	No	<p>Il kit di preparazione delle librerie in uso. È consentito solo un kit di preparazione delle librerie.</p> <p>In NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 la ricetta personalizzata richiesta è selezionata automaticamente se Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Kit o Illumina Stranded mRNA Prep Kit è indicato come kit di preparazione delle librerie.</p> <p>Immettere uno dei valori seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Kit— ILMNStrandedTotalRNA Illumina Stranded mRNA Prep Kit— ILMNStrandedmRNA

Requisiti di BCL Convert

Le sezioni di BCL Convert forniscono informazioni sulla conversione dei dati da BCL a FASTQ. Le opzioni di BCL Convert includono due sezioni separate: [BCLConvert_Settings] [BCLConvert_Impostazioni] e [BCLConvert_Data] [BCLConvert_Dati]. Le sezioni di BCL Convert richiedono informazioni sulle sequenze degli adattatori indici. Per identificare la sequenza adattatore indice compatibile per ogni lettura e indice, vedere *Illumina Adapter Sequences (documento n. 1000000002694)* (Sequenze adattatori Illumina).

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [BCLConvert_Settings][BCLConvert_Impostazioni]

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
BarcodeMismatchesIndex1 (MancataCorrispondenzaCodiceabarreIndice1)	No	Il numero di mancate corrispondenze consentite tra la prima lettura indici e la sequenza d'indice. I valori possono essere 0,1 o 2. Il valore predefinito è 1.
BarcodeMismatchesIndex2 (MancataCorrispondenzaCodiceabarreIndice2)	No	Il numero di mancate corrispondenze consentite tra la seconda lettura indici e la sequenza d'indice. I valori possono essere 0,1 o 2. Il valore predefinito è 1.
FastqCompressionFormat (FormatoCompressioneFastq)	No	Per ottenere i file FASTQ in formato *.gz, immettere <code>gzip</code> . Per salvare i file FASTQ in formato *.ora e utilizzare DRAGEN Decompression, immettere <code>dragen</code> .
AdapterRead1 (AdattatoreLettura1)	No	La sequenza da sottoporre a trimming o da nascondere dalla fine della lettura 1. La sequenza adattatore indice per Read 1 (Lettura 1) contenente A, C, G o T. Per impostazione predefinita, AdapterRead1 (AdattatoreLettura1) sottopone a trimming i cicli.
AdapterRead2 (AdattatoreLettura2)	No	La sequenza da sottoporre a trimming o da nascondere dalla fine della lettura 2. La sequenza adattatore indice per Read 2 (Lettura 2) contenente A, C, G o T. Per impostazione predefinita, AdapterRead2 (AdattatoreLettura2) sottopone a trimming i cicli.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
OverrideCycles (SovrascriviCicli)	No	Stringa utilizzata per specificare i cicli UMI e nascondere i cicli di una lettura. Sono consentiti i seguenti valori: <ul style="list-style-type: none"> • N: indica i cicli da ignorare. • Y: indica i cicli di sequenziamento. • I: indica i cicli indice. • U: indica i cicli UMI da sottoporre a trimming. Ogni elemento è separato da un punto e virgola. Quanto segue sono esempi di input per OverrideCycles (SovrascriviCicli). U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [BCLConvert_Data][BCLConvert_Dati]

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici, trattini e trattini bassi. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino o un trattino basso. Ad esempio, Campione1-DQB1-022515.
Index (Indice)	No	La sequenza d'indice associata al campione. Sono consentiti solo A, C, T, G. Richiesto quando viene sequenziato più di un campione.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Index2 (Indice2)	No	La seconda sequenza d'indice associata al campione. Sono consentiti solo A, C, T, G. Assicurarsi che le sequenze adattatore del secondo indice (i5) siano in orientamento forward. Durante l'analisi secondaria, DRAGEN trasforma automaticamente gli indici i5 in complementi reverse.
Lane (Corsia)	No	La corsia della cella a flusso. Le corsie sono rappresentate da un valore intero.

Impostazioni del foglio campioni DRAGEN

Questa sezione descrive i requisiti del foglio campioni per ogni pipeline DRAGEN. Aggiungere le impostazioni della pipeline DRAGEN nell'ultima sezione del foglio campioni. È possibile utilizzare solo una pipeline DRAGEN.

Ogni pipeline DRAGEN include sezioni separate per l'impostazione e per i dati.

Requisiti della pipeline DRAGEN Germline

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenGermline_Impostazioni].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7. La versione del software deve corrispondere alla versione indicata nella sezione BCLConvert_Settings (Impostazioni_BLCCConvert).

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
ReferenceGenomeDir (DirectoryGenomaRiferimento)	Sì	Il nome del genoma di riferimento. Ad esempio, hg19_alt_aware. Utilizzare il nome del genoma di riferimento che si trova in <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Per utilizzare un genoma di riferimento personalizzato, vedere <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
MapAlignOutFormat (FormatoOutputAllineamentoMappa)	No	Il formato del file di output. I valori consentiti sono bam o cram. Se non viene specificato alcun valore, il valore predefinito è nessun valore.
KeepFastq (MantieniFastq)	No	Per salvare i file di output FASTQ, immettere <code>true</code> (vero). Per rimuovere i file di output FASTQ, immettere <code>false</code> (falso).

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenGermline_Data] [DragenGermline_Dati].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino. Ad esempio, Campione1-DQB1-022515. Gli ID devono corrispondere agli ID specificati nella sezione BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati).

Requisiti della pipeline DRAGEN RNA

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenRNA_Settings] [DragenRNA_Impostazioni].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7. La versione del software deve corrispondere alla versione indicata nella sezione BCLConvert_Settings (Impostazioni_BLCCConvert).
ReferenceGenomeDir (DirectoryGenomaRiferimento)	Sì	Il nome del genoma di riferimento. Ad esempio, hg38_noalt_with_decoy. Utilizzare il nome del genoma di riferimento che si trova in <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Per utilizzare un genoma di riferimento personalizzato, vedere <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
RnaGeneAnnotationFile (FileAnnotazioneGeneRna)	No	Il file contenente le annotazioni sull'RNA del gene. Sono consentiti solo caratteri alfanumerici. Se non viene fornito, viene utilizzato il file delle annotazioni predefinito incluso nel genoma di riferimento specificato.
MapAlignOutFormat (FormatoOutputAllineamentoMappa)	No	Il formato del file di output. I valori consentiti sono bam o cram. Se non viene specificato alcun valore, il valore predefinito è nessun valore.
KeepFastq (MantieniFastq)	No	Per salvare i file di output FASTQ, immettere <code>true</code> (vero). Per rimuovere i file di output FASTQ, immettere <code>false</code> (falso).

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
DifferentialExpressionEnable (AttivaEspressioneDifferenziale)	No	Per attivare l'espressione genica differenziale, immettere <code>true</code> (vero). Immettere <code>false</code> (falso) per escludere l'espressione genica differenziale dall'analisi.

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenRna_Data] [DragenRNA_Dati].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino. Ad esempio, Campione1-DQB1-022515. Gli ID devono corrispondere agli ID specificati nella sezione BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati).
Comparison<N> (Confronto<N>)	No	Il valore di controllo o di confronto per ogni campione. Se non si dispone di un valore di controllo o di confronto per il campione, al campione viene assegnato <code>na</code> . Tutti i campioni indicati con un valore di controllo vengono confrontati con tutti i campioni indicati con un confronto. Il valore <code>N</code> riflette il gruppo di confronto per i campioni.

Requisiti della pipeline DRAGEN Enrichment

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenEnrichment_Settings] [DragenEnrichment_Impostazioni].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7. La versione del software deve corrispondere alla versione indicata nella sezione BCLConvert_Settings (Impostazioni_BLCCConvert).
ReferenceGenomeDir (DirectoryGenomaRiferimento)	Sì	Il nome del genoma di riferimento. Ad esempio, hg38_alt_aware. I genomi di riferimento si trovano in <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Per utilizzare un genoma di riferimento personalizzato, vedere <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
BedFile (FileBed)	Sì	Il file bed contenente le regioni da analizzare.
GermlineOrSomatic (GermlineoSomatic)	Sì	Per eseguire l'analisi dell'arricchimento della linea germinale, immettere <code>germline</code> (linea germinale). Per eseguire l'analisi dell'arricchimento somatico, immettere <code>somatic</code> (somatico).
KeepFastq (MantieniFastq)	No	Per salvare i file di output FASTQ, immettere <code>true</code> (vero). Per rimuovere i file di output FASTQ, immettere <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat (FormatoOutputAllineamentoMappa)	No	Il formato del file di output. I valori consentiti sono <code>bam</code> o <code>cram</code> . Se non viene specificato alcun valore, il valore predefinito è nessun valore.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
AuxNoiseBaselineFile (FileLineadibaseRumoreAux)	No	Il nome del file della linea di base del rumore. Il formato file consentito è *.txt o *.gz. I file della linea di base del rumore sono disponibili solo quando si utilizza la modalità Somatic. Per maggiori informazioni, vedere Importazione dei file della linea di base del rumore a pagina 19 .

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenEnrichment_Data]
[DragenEnrichment_Dati].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino. Ad esempio, gli ID Campione1-DQB1-022515.Sample devono corrispondere agli ID specificati nella sezione BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati).

Requisiti della pipeline DRAGEN DNA Amplicon

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenAmplicon_Settings]
[DragenAmplicon_Impostazioni].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7. La versione del software deve corrispondere alla versione indicata nella sezione BCLConvert_Settings (Impostazioni_BLCCConvert).

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
ReferenceGenomeDir (DirectoryGenomaRiferimento)	Sì	Il nome del genoma di riferimento. Ad esempio, hg38_alt_aware. I genomi di riferimento si trovano in <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Per utilizzare un genoma di riferimento personalizzato, vedere <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
DnaBedFile (FileBedDna)	Sì	Il file bed contenente le regioni da analizzare. Il file bed può essere immesso nel formato file <code>*.txt</code> o <code>*.gz</code> .
DnaGermlineOrSomatic (GermlineOSomaticDna)	Sì	Per eseguire l'analisi DNA Amplicon della linea germinale, immettere <code>germline</code> (linea germinale). Per eseguire l'analisi DNA Amplicon somatica, immettere <code>somatic</code> (somatico).
KeepFastq (MantieniFastq)	No	Per salvare i file di output FASTQ, immettere <code>true</code> (vero). Per rimuovere i file di output FASTQ, immettere <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat (FormatoOutputAllineamentoMappa)	No	Il formato del file di output. I valori consentiti sono <code>bam</code> o <code>cram</code> . Se non viene specificato alcun valore, il valore predefinito è nessun valore.

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenAmplicon_Data] [DragenAmplicon_Dati].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino. Ad esempio, gli ID Campione1-DQB1-022515.Sample devono corrispondere agli ID specificati nella sezione BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati).
DnaOrRna (DnaORna)	Sì	Il tipo di analisi Amplicon da eseguire. DRAGEN v3.8 supporta solo l'analisi del DNA. Immettere dna.

Requisiti della pipeline DRAGEN Single Cell RNA

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenSingleCellRNA_Settings] [DragenSingleCellRNA_Impostazioni]. Per informazioni sulla compatibilità dei kit di terze parti, vedere la pagina di supporto per la compatibilità dei prodotti per la piattaforma DRAGEN Bio-IT.

Single Cell Library Kit 1—5

Le seguenti impostazioni per il foglio campioni si applicano ai kit di preparazione delle librerie con la stessa struttura genetica di DRAGEN Single Cell Library Kits 1—5. Utilizzare la pagina di supporto per la compatibilità dei prodotti per la piattaforma DRAGEN Bio-IT per confermare la struttura genetica per il kit in uso.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7. La versione del software deve corrispondere alla versione indicata nella sezione BCLConvert_Settings (Impostazioni_BLCCConvert).

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
ReferenceGenomeDir (DirectoryGenomaRiferimento)	Sì	Il nome del genoma di riferimento. Ad esempio, hg38_alt_aware. I genomi di riferimento si trovano in <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Per utilizzare un genoma di riferimento personalizzato, vedere <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
RnaLibraryType (TipoLibreriaRNA)	No	Immettere uno dei seguenti valori: <ul style="list-style-type: none"> • SF: filamento forward. SF è il valore predefinito. • SR: filamento reverse. • U: senza filamento.
RnaGeneAnnotationFile (FileAnnotazioneGeneRna)	No	Il file contenente le annotazioni sull'RNA del gene. Sono consentiti solo caratteri alfanumerici. Se non viene fornito, viene utilizzato il file delle annotazioni predefinito incluso nel genoma di riferimento specificato.
BarcodeRead (LetturaBarcode)	No	La posizione nella corsa di sequenziamento della lettura barcode, che contiene sia il barcode che l'identificatore UMI. I valori possono contenere Read1 (Lettura1) o Read2 (Lettura2). Il valore predefinito è Read1 (Lettura1).

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
BarcodePosition (PosizioneBarcode)	Sì	<p>La posizione delle basi corrispondenti al barcode che rientra nel valore immesso per BarcodeRead (LetturaBarcode). Le posizioni delle basi sono indicizzate a partire dalla posizione zero. Immettere il valore BarcodePosition (PosizioneBarcode) nel seguente formato:</p> <pre>0_<posizione finale barcode></pre> <p>Ad esempio, se un barcode contiene 16 basi, il valore è 0_15.</p>
UmiPosition (PosizioneUMI)	Sì	<p>La posizione delle basi corrispondenti all'identificatore UMI che rientra nel valore immesso per BarcodeRead (LetturaBarcode). Immettere il valore UmiPosition (PosizioneUMI) nel seguente formato:</p> <pre><Posizione avvio UMI>_<Posizione fine UMI></pre> <p>Ad esempio, se l'identificatore UMI contiene 10 basi e il barcode ne contiene 16, il valore è 16_25.</p>
BarcodeSequenceWhitelist (WhitelistSequenzaBarcode)	No	<p>Il nome del file contenente le sequenze dei codici a barre da includere. Il nome del file può contenere solo caratteri alfanumerici, trattini lunghi, trattini bassi e punti.</p>
KeepFastq (MantieniFastq)	No	<p>Per salvare i file di output FASTQ, immettere <code>true</code> (vero). Per rimuovere i file di output FASTQ, immettere <code>false</code> (falso).</p>
MapAlignOutFormat (FormatoOutputAllineamentoMappa)	No	<p>Il formato del file di output. I valori consentiti sono <code>bam</code> o <code>cram</code>. Se non viene specificato alcun valore, il valore predefinito è nessun valore.</p>

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DrogenSingleCellRNA_Data] [DrogenSingleCellRNA_Dati].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino. Ad esempio, gli ID Campione1-DQB1-022515.Sample devono corrispondere agli ID specificati nella sezione BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati).

Single Cell Library Kit 6

Le seguenti impostazioni per il foglio campioni si applicano ai kit di preparazione delle librerie con la stessa struttura genetica di DRAGEN Single Cell Library Kits 6. Utilizzare la pagina di supporto per la compatibilità dei prodotti per la piattaforma DRAGEN Bio-IT per confermare la struttura genetica per il kit in uso.

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
SoftwareVersion (VersioneSoftware)	Sì	La versione del software DRAGEN attualmente installata sul sistema. Utilizzare tutti e tre i numeri interi inclusi nel nome della versione. Ad esempio, 3.5.7. La versione del software deve corrispondere alla versione indicata nella sezione BCLConvert_Settings (Impostazioni_BLCCConvert).

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
ReferenceGenomeDir (DirectoryGenomaRiferimento)	Sì	Il nome del genoma di riferimento. Ad esempio, hg38_alt_aware. I genomi di riferimento si trovano in <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Per utilizzare un genoma di riferimento personalizzato, vedere <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Builder di riferimento per la Guida online delle applicazioni v1.0.0 degli strumenti Illumina).
RnaLibraryType (TipoLibreriaRNA)	No	Immettere uno dei seguenti valori: <ul style="list-style-type: none"> • SF: filamento forward. • SR: filamento reverse. • U: senza filamento.
RnaGeneAnnotationFile (FileAnnotazioneGeneRna)	No	Il file contenente le annotazioni sull'RNA del gene. Sono consentiti solo caratteri alfanumerici. Se non viene fornito, viene utilizzato il file delle annotazioni predefinito incluso nel genoma di riferimento specificato.
BarcodeRead (LetturaBarcode)	No	La posizione nella corsa di sequenziamento della lettura barcode, che contiene sia il barcode che l'identificatore UMI. I valori possono contenere <code>Read1 (Lettura1)</code> o <code>Read2 (Lettura2)</code> . Il valore predefinito è <code>Read1 (Lettura1)</code> .

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
BarcodePosition (PosizioneBarcode)	Sì	<p>La posizione delle basi corrispondenti ai barcode che rientrano nel valore immesso per BarcodeRead (LetturaBarcode). Le posizioni delle basi sono indicizzate a partire dalla posizione zero. Immettere il valore BarcodePosition (PosizioneBarcode) nel seguente formato:</p> <pre>0_<first barcode end position>+<second barcode start position>_<second barcode end position>+<third barcode start position>_<third barcode end position></pre> <p>Ad esempio, con la seguente struttura si otterrebbe il valore <code>0_8+21_29+43_51</code>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 basi nel primo barcode (<code>0_8</code>). • 12 basi tra i primi e i secondi barcode. • 9 basi nel secondo barcode (<code>21_29</code>). • 13 basi tra i secondi e i terzi barcode. • 9 basi nel terzo barcode (<code>43_51</code>).
UmiPosition (PosizioneUMI)	Sì	<p>La posizione delle basi corrispondenti all'identificatore UMI che rientra nel valore specificato per BarcodeRead (LetturaBarcode). Immettere la stringa nel seguente formato:</p> <pre><UMI start position>_<UMI end position></pre> <p>Ad esempio, se l'identificatore UMI contiene 8 basi e il numero delle basi prima del totale è 51 UMI, il valore è <code>52_59</code>.</p>
BarcodeSequenceWhitelist (WhitelistSequenzaBarcode)	No	<p>Il nome del file contenente la sequenza barcode alla whitelist. Il nome del file può contenere solo caratteri alfanumerici, trattini lunghi, trattini bassi e punti.</p>
KeepFastq (MantieniFastq)	No	<p>Per salvare i file di output FASTQ, immettere <code>true</code> (vero). Per rimuovere i file di output FASTQ, immettere <code>false</code> (falso).</p>

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
MapAlignOutFormat (FormatoOutputAllineamentoMappa)	No	Il formato del file di output. I valori consentiti sono bam o cram. Se non viene specificato alcun valore, il valore predefinito è nessun valore.

Di seguito sono descritti i campi e le descrizioni disponibili [DragenSingleCellRNA_Data] [DragenSingleCellRNA_Dati].

Campo	Campo obbligatorio	Descrizione
Sample_ID (ID_campione)	Sì	L'ID del campione. L'ID del campione può contenere fino a 20 caratteri alfanumerici. L'ID è sensibile alle maiuscole e minuscole. Separare ogni identificatore con un trattino. Ad esempio, gli ID Campione1-DQB1-022515. Sample devono corrispondere agli ID specificati nella sezione BCLConvert_Data (BCLConvert_Dati).

Sequenziamento con cicli 'dark'

Questa sezione descrive l'utilizzo del sequenziamento con cicli 'dark' nella ricetta.

Il sequenziamento con cicli 'dark' viene utilizzato per completare solo le fasi della chimica di un ciclo di sequenziamento. Controllare la pagina Compatible Products (Prodotti compatibili) per il kit di preparazione delle librerie in uso sul [sito di supporto Illumina](#) per vedere se è richiesto il sequenziamento con cicli 'dark'.

Utilizzare le seguenti fasi per il sequenziamento con cicli 'dark'.

Modifica del file delle ricette

1. Scaricare il file delle ricette in formato XML dal [sito di supporto Illumina](#).
2. Modificare il file delle ricette in formato XML.
 - a. Identificare la sezione contenente il protocollo appropriato in base alla configurazione della lettura e dell'indice di sequenziamento. Sono disponibili sei diversi protocolli per ricetta personalizzati da modificare.

Ad esempio, il protocollo per una singola Read 1 (Lettura 1) senza configurazione del sequenziamento indice sarebbe <Protocol Name="1 Read 0 Index"

ProtocolType="1Read0Index" >.

- b. Prima di `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` e `<ReadRef ReadName="Read 2"/>`, immettere la fase con ciclo 'dark' su una nuova linea.

```
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />.
```

- c. Immettere la fase con il ciclo 'dark' su una nuova linea per ogni ciclo 'dark' richiesto.

3. Salvare il file delle ricette in formato XML.

Quanto segue è un esempio di ricetta del campione con ciclo 'dark':

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Transfer" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obdd ChemistryName="Library Denaturation and Dilution" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obcg ChemistryName="Cluster Generation" />
  <ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Read Prep" />
  <DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
  <ReadRef ReadName="Read 1" />
  <SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
</Protocol>
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="2min 60C Vacuum Hold" />
  ...
```

Allegare la ricetta alla corsa

- 1 In Run Setup (Impostazione corsa) nel software di controllo, selezionare **Choose** (Scegli) sotto Custom Recipe (Ricetta personalizzata).
- 2 Individuare il file ricetta in formato XML aggiornato.
- 3 Selezionare **Open** (Apri).
- 4 Tornare ad [Avvio di una corsa di sequenziamento a pagina 49](#).

Indice

%

%PF 63

A

aggiornamenti automatici 80
aggiornamenti manuali software 80
algoritmo Phred 63
alimentazione c.a.
 presa 4
allerte 80
allineamento specifica 87
amplificazione 8
analisi
 metodi 5, 9
analisi basata sul cloud 1
analisi immagini 5
analisi in laboratorio 1
assistenza clienti 114
assistenza tecnica 114
avvertenze 6, 87

B

barra di stato 3
barra luminosa 3
BaseSpace Sequence Hub 1
 documentazione 14
 impostazioni 14
bcl2fastq2 58

C

campione di controllo PhiX v3 28
canale rosso 61
canale verde 61
cartella corsa 79
cartella output 53, 79
cartella output predefinita 53
cartuccia
 orientamento caricamento 55

cavo di alimentazione 4
cavo Ethernet 4
CE 58
cicli in più 33
cicli lettura 33
cluster che attraversano il filtro (PF) 63
Compute Engine 58
connessione Internet 14
connessioni perse 87
conteggio corse 6
conversione FASTQ 58
corsa
 metriche 58
corsie 59

D

date di scadenza 83
dati delle prestazioni dello strumento 14
dati prestazioni 14
declassamento del software 89-90
denaturazione 8
denominazione
 nome computer 6
 nome strumento 21
determinazione delle fasi (phasing) e
 predeterminazione delle fasi
 (prephasing) 61
diluizione librerie 8
dimensione corsa 79
disco D 79
disco rigido 6, 79
documentazione 114
documenti 63
domini 14
dominio privato 14

E

eliminazione corse 6, 79
errori 6, 87
 messaggi 85

probabilità 63

F

file BCL 6
file CBCL 63
file filtro 58, 64
file identificazione basi 58
file identificazione delle basi 9, 64
file InterOp 58, 64
file registro 59
filtraggio cluster 63
filtri dell'aria
 posizione 83
 ricambio 30
filtro chastity 63
frammenti ricetta 6

G

garanzia 30
generazione della griglia 60
gruppo di software 1
guida, tecnica 114

I

icone 6
identificazione delle basi 5
imaging 58-59
immagini 58
immagini in miniatura (thumbnail) 64
impostazione corsa
 esempi 33
impostazione iniziale 83, 89-90
impostazioni audio 21
impostazioni di fabbrica 89-90
impostazioni spie 21
indice
 cicli 33
indirizzo IP 6
inizializzazione 88
 non riuscita 87

installazione software 80
installer System Suite 80
intensità cluster 61

K

kit 28
 numeri di catalogo 30
kit per il test 30

L

librerie
 denaturazione 8
Local Run Manager 5
lunghezze lettura 33

M

materiali di consumo
 monitoraggio 1
 scansione 55
modifica parametri corsa 53
monitor 3
monitoraggio materiali di consumo 1
mouse 4

N

nanopozzetti 61
nessuna identificazione 60-61
nome computer 6
nome personalizzato 21
nucleotidi 61
numerazione delle tile 60
numerazione superficie 60
numeri cicli 33
numeri di catalogo 28
numero di serie 6

P

pagine supporto 80
paired-end 53

- parametri corsa
 - modifica 53
- percorsi UNC 53
- PhiX 30
 - allineamento 58
- porta Ethernet 4
- porte USB 4
- posizione host 14
- posizione server 14
- posizioni cluster 58, 64
- Process Management (Gestione processo) 79
- pulsante 4
- pulsante accensione 3, 87
- pulsante accensione/spengimento 87
- punteggi qualitativi 63
- punteggio qualitativo 63

Q

- qualificazione dati 63

R

- reagenti NextSeq 1000/2000 28
- registrazione non riuscita 60
- registro errori 59
- riavvio 89-90
- ricambi 83
- ricette 80
- RunInfo.xml 64

S

- salviettine imbevute di alcol 30
- salviettine imbevute di candeggina 30
- scomparto materiali di consumo 3
- Sequencing Analysis Viewer 58, 60
- sequenziamento a due canali 61
- sistema operativo 88
- software
 - allerte aggiornamenti 22
 - declassamento 89-90
 - installazione 80

- Software Suite 5
- sostituto RSB 28
- sottoscrizione Enterprise 14
- spazio su disco 6, 79
- specifiche congelatore 30
- specifiche frigorifero 30
- spegnimento 87
- spegnimento e accensione 85
- sportelli
 - chiusura 55
- spostamento 4
- stato corsa 6
- strisce 59-60
- Supporto proattivo Illumina 14

T

- tabelle qualitative 63
- tampone di risospensione 28
- tappetini 30
- tastiere 4
- tile 58

U

- unidirezionale 53
- unità mappate 53
- Universal Copy Service 5, 80

V

- valori intensità 61
- vassoio raccogliocce
 - tappetini 30
- ventole 83
- verifiche sistema 85
- videocamere 59

W

- Windows
 - accesso 88

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 Tecnica Illumina

Area geografica	Gratuito	Internazionale
Australia	+61 1800 775 688	
Austria	+43 800 006249	+43 1 9286540
Belgio	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Canada	+1 800 809 4566	
Cina		+86 400 066 5835
Corea del Sud	+82 802345300	
Danimarca	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Filippine	+63 180016510798	
Finlandia	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Francia	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Germania	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Giappone	+81 0800 111 5011	
Hong Kong, Cina	+852 800 960 230	
India	+91 8006500375	
Indonesia		0078036510048
Irlanda	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italia	+39 800 985513	+39 236003759
Malesia	+60 1800 80 6789	
Norvegia	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nuova Zelanda	+64 800 451 650	
Paesi Bassi	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Regno Unito	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197

Area geografica	Gratuito	Internazionale
Singapore	1 800 5792 745	
Spagna	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Stati Uniti	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Svezia	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Svizzera	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Taiwan, Cina	+886 8 06651752	
Thailandia	+66 1800 011 304	
Vietnam	+84 1206 5263	

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.

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

illumina®