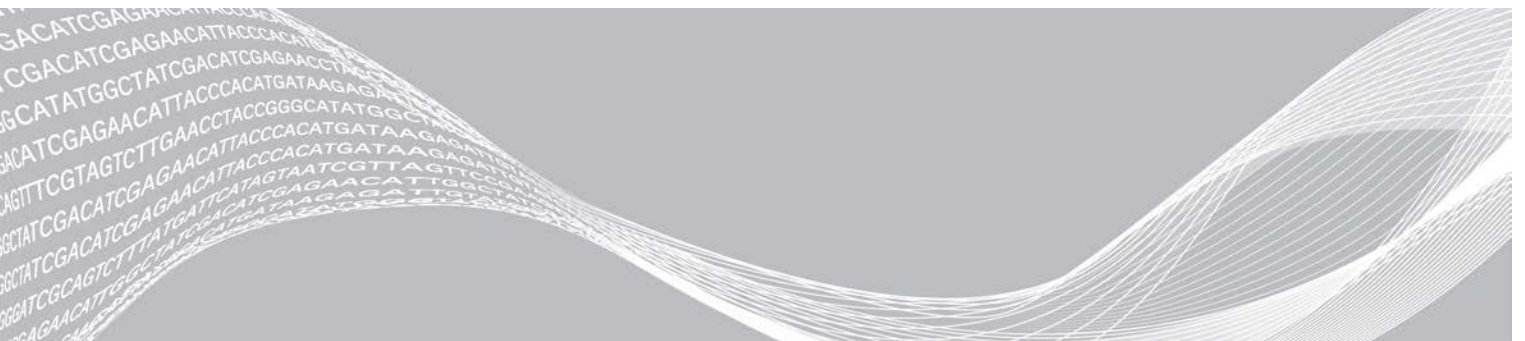


cBot 2

Guida del sistema



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

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

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

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

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

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

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Materiale n. 20015507 Documento n. 15065681 v05	Maggio 2020	Aggiornate le immagini per la piastra dei reagenti.
Materiale n. 20015507 Documento n. 15065681 v04	Aprile 2019	Aggiornate le immagini e le descrizioni per la piastra dei reagenti.
Materiale n. 20015507 Documento n. 15065681 v03	Gennaio 2019	Aggiornato il colore del sigillo da rosso a bianco per la striscia a otto provette HP5. Aggiunte le informazioni sulla denaturazione e diluizione delle librerie Nextera DNA Flex. Rimossi i riferimenti per i kit TruSeq v2 GA in quanto non sono più supportati. Rimosso il numero di materiale in quanto il documento non è più stampato.
Materiale n. 20015507 Documento n. 15065681 v02	Novembre 2016	Rimosso l'orientamento della striscia a otto provette contenente i primer per una cella a flusso HiSeq Rapid. I primer Rapid sono caricati su HiSeq. Corretto il numero di catalogo Illumina per le provette delle strisce cBot 2 dotate di codice a barre a 20005160.
Materiale n. 20004364 Documento n. 15065681 v01	Gennaio 2016	Aggiornate le descrizioni software a cBot v3.0, che supporta HiSeq 3000/4000 SR Cluster Kit. Aggiunte le informazioni seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • Durata della ricetta e generazione di cluster per la cella a flusso HiSeq 3000/4000 SR. • Volumi per la libreria e per il campione di controllo PhiX alle procedure per l'aggiunta del campione di controllo PhiX per le librerie con cluster su una cella a flusso HiSeq 3000/4000. • Raccomandazione di un servizio di manutenzione preventiva annuale. Aggiornate le istruzioni per caricare i componenti della corsa per includere le opzioni di conservazione della cella a flusso. Spostate le informazioni sulla risoluzione dei problemi nell'Appendice A. Semplificate le descrizioni del software all'inizio della guida. Elencata in Risorse aggiuntive <i>cBot System Configuration Guide</i> (documento n. 1000000005301) (Guida alla configurazione del sistema cBot).
N: codice 15065681 Rev. A	Luglio 2015	Versione iniziale.

Sommario

Capitolo 1 Descrizione generale	1
Introduzione	1
Risorse aggiuntive	2
Componenti di cBot 2	2
Materiali di consumo forniti da Illumina	5
Piastre dei reagenti cBot	7
Capitolo 2 Informazioni preliminari	9
Avvio di cBot 2	9
Compatibilità della versione dei componenti della corsa	9
Materiali di consumo forniti dall'utente	10
Capitolo 3 Preparazione dei reagenti	11
Introduzione	11
Cella a flusso HiSeq X	11
Cella a flusso HiSeq 3000/4000	15
Cella a flusso HiSeq High Output	19
Cella a flusso HiSeq Rapid	20
Capitolo 4 Generazione di cluster con monitoraggio dei campioni	22
Introduzione	22
Flusso di lavoro per la generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni	23
Esecuzione di un lavaggio pre-corsa	23
Caricamento dei materiali di consumo	24
Caricamento del collettore	26
Selezione di un protocollo	28
Scansione dei materiali di consumo	28
Esecuzione di una verifica pre-corsa	29
Monitoraggio della corsa	29
Scaricamento dei componenti della corsa	30
Esecuzione di un lavaggio post-corsa	32
Conferma dell'erogazione dei reagenti (opzionale)	32
Capitolo 5 Generazione di cluster senza monitoraggio dei campioni	34
Introduzione	34
Flusso di lavoro per la generazione di cluster senza monitoraggio dei campioni	34
Esecuzione di un lavaggio pre-corsa	35
Selezione di un protocollo	36
Caricamento dei materiali di consumo	36
Esecuzione di una verifica pre-corsa	40
Monitoraggio della corsa	40
Scaricamento dei componenti della corsa	41
Esecuzione di un lavaggio post-corsa	43

Conferma dell'erogazione dei reagenti (opzionale)	43
Capitolo 6 Manutenzione	45
Esecuzione della manutenzione periodica	45
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione mensile	46
Sostituzione dell'adattatore portacelle	47
Aggiornamento del software	48
Aggiornamento delle ricette	49
Spegnimento di cBot 2	50
Appendice A Risoluzione dei problemi	52
Sospensione o interruzione di una corsa	52
Risoluzione dei problemi in caso di mancata verifica del flusso	52
Risoluzione dei problemi di una corsa	54
Reimpostazione dello scanner per codici a barre esterno	55
Modifica dei protocolli	56
Indice	58
Assistenza Tecnica	62

Capitolo 1 Descrizione generale

Introduzione	1
Risorse aggiuntive	2
Componenti di cBot 2	2
Materiali di consumo forniti da Illumina	5
Piastre dei reagenti cBot	7

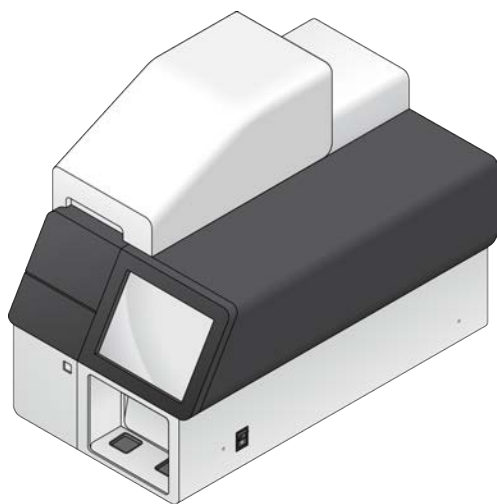
Introduzione

cBot 2 utilizza l'amplificazione per creare contemporaneamente centinaia di milioni di templati di DNA a molecola singola.

Il software cBot eroga i reagenti e controlla i tempi di reazione, le portate e le temperature. L'impostazione e il funzionamento sono eseguiti sullo strumento mediante l'interfaccia software usando il monitor touch screen. Uno scanner per codici a barre integrato sullo strumento registra i reagenti, la cella a flusso e il template usati per ogni esperimento.

Un'opzione di monitoraggio corretto dei campioni fornisce una scansione interna dei codici a barre per migliorare il controllo delle librerie da sequenziare su HiSeq. I materiali di consumo vengono caricati e il coperchio dello strumento viene chiuso. Gli scanner interni registrano l'ID della piastra dei reagenti, della cella a flusso e della striscia a otto provette.

Figura 1 cBot 2



Diversi kit cluster possono essere utilizzati su cBot. Utilizzare un kit compatibile con lo strumento di sequenziamento e il tipo di corsa di sequenziamento da eseguire. Per un elenco dei kit disponibili, vedere *Materiali di consumo forniti da Illumina a pagina 5*.

Differenze nel flusso di lavoro per SeqLab Illumina

Se si utilizza cBot 2 come un componente di SeqLab Illumina, il flusso di lavoro è diverso dal flusso di lavoro contenuto nella presente guida. Le differenze introdotte da Clarity LIMS X Edition incidono su tutte le fasi dalla preparazione delle librerie fino al sequenziamento. Visitare la pagina di supporto di SeqLab Illumina sul sito Web Illumina per generare una guida al flusso di lavoro personalizzata per l'esperimento.

Risorse aggiuntive

Dal sito Web di Illumina è possibile scaricare la seguente documentazione.

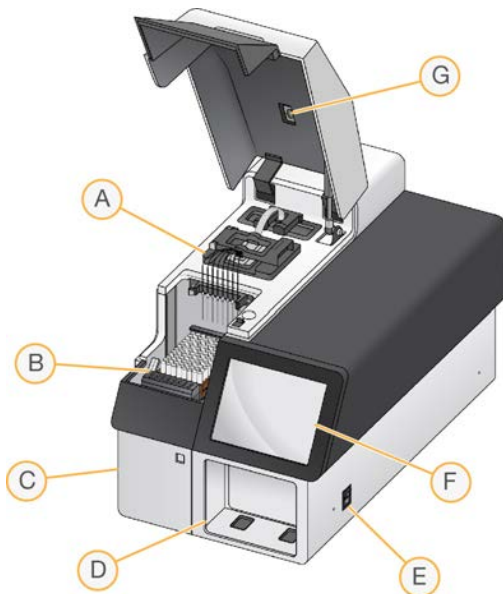
Risorsa	Descrizione
<i>Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema cBot (documento n. 15053710)</i>	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali e istruzioni sulla configurazione dello strumento.
<i>Guida sulla sicurezza e conformità del sistema cBot 2 (documento n. 15065643)</i>	Fornisce informazioni sulla etichettatura dello strumento, le certificazioni di conformità e gli aspetti relativi alla sicurezza.
<i>HiSeq Systems Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 15050107) (Guida alla denaturazione e diluizione delle librerie per i sistemi HiSeq)</i>	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate prima del sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX. Questa procedura si applica alla maggior parte dei tipi di librerie e celle a flusso.

Consultare la pagina di supporto per cBot 2 sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, alla formazione online e alle domande frequenti (FAQ).

Componenti di cBot 2

cBot 2 si serve di sensori per rilevare la presenza dei componenti della corsa e segnala, tramite messaggi, l'eventuale assenza o installazione errata di un componente. Il blocco termico e il piano dei reagenti si trovano sotto al coperchio dello strumento. Un dispositivo magnetico tiene il coperchio chiuso e un sensore rileva se il coperchio è aperto. Per ragioni di sicurezza, il software chiede pertanto all'utente di chiudere il coperchio prima di avviare la corsa.

Figura 2 Componenti di cBot 2



A **Blocco termico:** contiene la cella a flusso e ne controlla la temperatura per tutta la corsa.

- B **Piano dei reagenti:** contiene la piastra dei reagenti cBot, i templati della libreria e i primer specifici per la corsa. Per le corse con monitoraggio dei campioni, uno scanner per codici a barre posizionato dietro il piano dei reagenti registra l'ID della piastra dei reagenti e la striscia a otto provette contenente il template.
- C **Scomparto di raccolta degli scarti:** contiene un flacone degli scarti controllato da sensore che raccoglie i reagenti usati.
- D **Scanner per codici a barre esterno:** registra l'ID univoco della piastra dei reagenti e della cella a flusso usate per ciascuna corsa che non include il monitoraggio dei campioni.
- E **Interruttore di alimentazione:** accende lo strumento. Il pulsante di avvio, situato sulla sinistra dello scomparto di raccolta degli scarti, avvia il software dello strumento.
- F **Monitor touch screen:** permette di impostare la corsa integrata sullo strumento e di visualizzare lo stato del processo di generazione dei cluster.
- G **Scanner per codici a barre della cella a flusso:** registra l'ID univoco della cella a flusso usata per ciascuna corsa con monitoraggio dei campioni.

Blocco termico

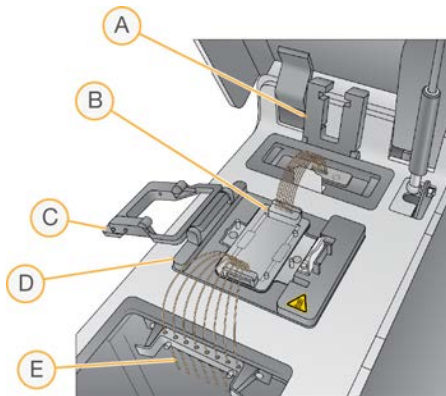
Il blocco termico contiene la cella a flusso e il collettore e si trova sopra la cella a flusso. Il coperchio a scatto blocca in posizione la cella stessa e il collettore.



AVVERTENZA

Non toccare mai il riscaldatore in alluminio del blocco termico. Durante il funzionamento, il riscaldatore può provocare ustioni molto gravi. Per maggiori informazioni sulle misure di sicurezza, vedere la *Guida sulla sicurezza e conformità del sistema cBot 2* (documento n. 15065643).

Figura 3 Blocco termico



- A Morsetto di uscita
- B Adattatore portacelle e collettore
- C Coperchio a scatto
- D Blocco termico
- E Pettine di aspirazione

Il collettore è un componente monouso che eroga i reagenti dalla piastra dei reagenti alla cella a flusso. I pescanti sul pettine di aspirazione forano le provette di reagente sigillate e posizionate nella piastra dei reagenti. L'estremità di uscita del collettore trasferisce gli scarti al contenitore per gli scarti. Il morsetto di uscita blocca in posizione l'estremità di uscita del collettore.

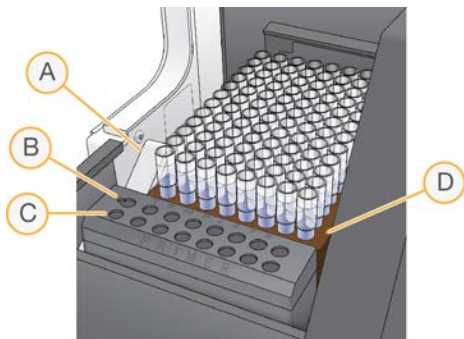
Adattatori portacelle

cBot esegue la generazione di cluster sulle celle a flusso HiSeq. Per passare da un tipo di cella a flusso all'altra, cambiare l'adattatore portacelle sul piano portacelle. Per maggiori informazioni, vedere *Sostituzione dell'adattatore portacelle a pagina 47*.

Piano dei reagenti

Il piano dei reagenti ospita la piastra dei reagenti cBot. La piastra dei reagenti è bloccata in posizione tramite la leva della piastra dei reagenti. Due vani portastrisce a otto provette di fronte alla piastra dei reagenti ospitano il template e i primer aggiuntivi della libreria preparati. Il lato sinistro della riga dei template è sagomato per assicurare il corretto orientamento della striscia a otto provette utilizzata con il flusso di lavoro con monitoraggio dei campioni.

Figura 4 Piano dei reagenti cBot 2



- A Leva della piastra dei reagenti
- B Riga dei template
- C Riga dei primer
- D Piastra dei reagenti cBot

Software cBot













L'interfaccia software cBot fornisce suggerimenti per impostare lo strumento e per monitorare il progresso della generazione di cluster. Durante una corsa di generazione dei cluster, vengono utilizzate le schermate seguenti: Start (Avvio), Run Setup (Impostazione corsa) e Run Status (Stato della corsa).

Utilizzare l'interfaccia software per configurare il monitoraggio corretto dei campioni, i requisiti di input, le preferenze di lavaggio, le notifiche e-mail e il monitoraggio a distanza.

Icone di stato dei sensori

Le icone di stato dei sensori indicano se un componente è installato correttamente e pronto per la corsa e sono visualizzate nella parte inferiore dello schermo.

Icona	Indicazione
	L'adattatore portacelle GAllx è installato.*
	L'adattatore portacelle HiSeq è installato.

Icona	Indicazione
	Il tipo adattatore portacelle è sconosciuto.
	Lo strumento ha il coperchio aperto.
	Lo strumento ha il coperchio chiuso.
	Il flacone degli scarti è presente e pronto per l'utilizzo.
	Il flacone degli scarti è pieno.
	Il flacone degli scarti è mancante.
	Il refrigerante scorre e il livello è buono.
	Avvertenza: il refrigerante scorre ma il livello è basso.
	Errore: il refrigerante non scorre ma il livello è buono.
	Errore: il refrigerante non scorre e il livello è basso.
	Il collettore è caricato e il pettine di aspirazione è in posizione.
	Il collettore è mancante o il pettine di aspirazione non è in posizione.

* Questa opzione è visibile ma non più supportata.

Configurazione

Utilizzare l'interfaccia software per configurare il monitoraggio corretto dei campioni, le impostazioni del sistema, i requisiti di input e le preferenze di lavaggio. Utilizzando una connessione di rete, è possibile attivare il monitoraggio a distanza, gli avvisi via e-mail e il supporto LIMS. Le impostazioni di configurazione possono essere modificate in base alle esigenze prima dell'avvio di ciascuna corsa.

Per istruzioni sulla configurazione, vedere *cBot System Configuration Guide (documento n. 100000005301)* (Guida alla configurazione del sistema cBot).

Materiali di consumo forniti da Illumina

I reagenti cBot sono forniti in una piastra dei reagenti che viene caricata direttamente sullo strumento dopo lo scongelamento. Le piastre dei reagenti cBot sono fornite nei seguenti kit Illumina.

Le descrizioni dei contenuti dei kit e altra documentazione allegata ai kit sono disponibili [nella pagina di supporto di cBot 2](#) sul sito Web Illumina. Per le istruzioni sulla preparazione dei reagenti, vedere *Preparazione dei reagenti* a pagina 11.

Kit cluster per HiSeq

Ciascun kit contiene una cella a flusso HiSeq, un collettore specifico per la cella a flusso e i reagenti richiesti per la generazione di cluster su una cella a flusso su cBot.

Nome del kit	N. di catalogo del kit
HiSeq 3000/4000 SR Cluster Kit	N. di catalogo GD-410-1001
HiSeq 3000/4000 PE Cluster Kit	N. di catalogo PE-410-1001
HiSeq SR Cluster Kit v4	N. di catalogo GD-401-4001
HiSeq PE Cluster Kit v4	N. di catalogo PE-401-4001
TruSeq SR Cluster Kit v3 - HS	N. di catalogo GD-401-3001
TruSeq PE Cluster Kit v3 - HS	N. di catalogo PE-401-3001
HiSeq Rapid Duo cBot Sample Loading Kit	N. di catalogo CT-403-2001

Kit cluster per HiSeq X

Ciascun kit contiene multiple celle a flusso HiSeq X, collettori specifici per le celle a flusso e i reagenti richiesti per la generazione di cluster su ciascuna cella a flusso su cBot. I kit in confezione singola contengono i materiali di consumo necessari per la generazione di cluster su due celle a flusso e i kit in confezione da 10 contengono i materiali di consumo necessari per la generazione di cluster su 20 celle a flusso.

Nome del kit	N. di catalogo del kit
HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5	N. di catalogo FC-501-2501
HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5 (confezione da 10)	N. di catalogo FC-501-2521
HiSeq X Five Reagent Kit v2.5	N. di catalogo FC-502-2501
HiSeq X Five Reagent Kit v2.5 (confezione da 10)	N. di catalogo FC-502-2102

Kit di reibridazione

Usare un kit di reibridazione cBot per eseguire la reibridazione primer Read 1 (Lettura 1) per il recupero di una corsa o dopo che la cella a flusso è stata conservata per un lungo periodo.

Nome del kit	N. di catalogo
HiSeq X cBot Multi-Primer Rehybridization Kit v2	N. di catalogo GD-305-2001
HiSeq 3000/4000 cBot Multi-Primer Rehybridization Kit	N. di catalogo GD-310-1001
TruSeq v2 cBot Multi-Primer Rehybridization Kit	N. di catalogo GD-304-2001
HiSeq® Multi-Primer Rehybridization Kit v4	N. di catalogo GD-403-4001

Per maggiori informazioni, vedere la guida alla reibridazione per la cella a flusso in uso:

- ▶ HiSeq X: *Read 1 Primer Rehybridization on a HiSeq X Flow Cell (documento n. 15053711)* (Reibridazione primer Lettura 1 su una cella a flusso HiSeq X)
- ▶ HiSeq 3000/4000: *Read 1 Primer Rehybridization on a HiSeq 3000/4000 Flow Cell (documento n. 15058794)* (Reibridazione primer Read 1 (Lettura 1) su una cella a flusso HiSeq 3000/4000)
- ▶ TruSeq v3: *Read 1 Primer Rehybridization on a TruSeq v3 or TruSeq v2 Flow Cell (documento n. 15018149)* (Reibridazione primer Read 1 (Lettura 1) su una cella a flusso TruSeq v3)

Primer di sequenziamento Read 1 (Lettura 1) per le librerie Nextera

Il primer di sequenziamento Read 1 (Lettura 1) (HP6) fornito nei kit seguenti non è compatibile con le librerie Nextera:

- ▶ TruSeq Cluster Kit v3 - HS

Se si stanno sequenziando le librerie Nextera, usare il primer di sequenziamento Read 1 (Lettura 1) (HP10), indipendentemente dal tipo di corsa che si sta eseguendo. HP10 è fornito in TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Nome del kit	N. di catalogo
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, Single Read	N. di catalogo FC-121-1003
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, Paired End	N. di catalogo PE-121-1003

Tutti gli altri kit cBot includono HP10, che è compatibile con le librerie TruSeq e Nextera.

Piastre dei reagenti cBot

La configurazione della piastra dei reagenti è diversa in base ai kit, incluso il numero di righe che contengono il reagente.

Ciascuna striscia a otto provette è etichettata con il nome del reagente seguito da un numero. Il numero indica la riga che occupa sulla piastra dei reagenti. Se una striscia a otto provette si sposta, utilizzare il numero di riga sull'etichetta per riportare la striscia nella posizione corretta.

Tipo di cella a flusso	Descrizione della piastra dei reagenti
HiSeq X e HiSeq 3000/4000	Contiene 12 righe e otto pozzetti profondi ciascuna. Ciascun reagente occupa una riga completa di otto pozzetti. Non tutte le righe contengono reagente.
	
HiSeq High Output (HiSeq v4)	Contiene 12 righe e otto pozzetti profondi ciascuna. Ciascun reagente occupa una riga completa di otto pozzetti. Non tutte le righe contengono reagente. Le righe dalla nove alla 12 sono vuote.
	
HiSeq High Output (TruSeq v3)	Contiene 11 righe di strisce a otto provette sigillate con reagenti per la generazione di cluster. La riga 12 è vuota.
	

Tipo di cella a flusso	Descrizione della piastra dei reagenti
HiSeq Rapid	<p>Contiene 12 righe e otto pozzetti profondi ciascuna. Le prime tre righe sono riempite con i reagenti per l'ibridazione dei template e i reagenti prima estensione. Le righe dalla quattro alla 12 sono vuote.</p>
	



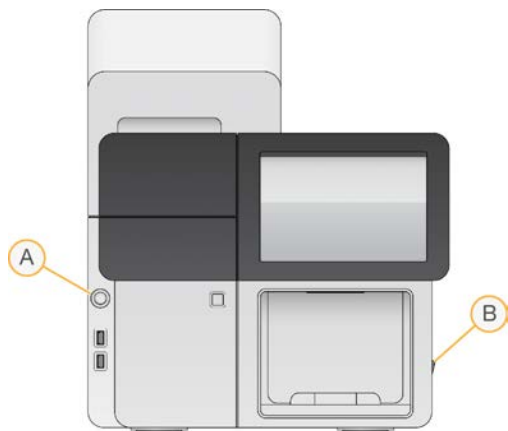
AVVERTENZA

Fatta eccezione per la piastra dei reagenti HiSeq per corsa rapida, questi set di reagenti contengono formammide, una amide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Lo smaltimento dei contenitori e dei contenuti non utilizzati avviene secondo gli standard di sicurezza in vigore nella propria area geografica. Per ulteriori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Capitolo 2 Informazioni preliminari

Avvio di cBot 2	9
Compatibilità della versione dei componenti della corsa	9
Materiali di consumo forniti dall'utente	10

Avvio di cBot 2



- A Pulsante di avvio
- B Interruttore di alimentazione

- 1 Spostare l'interruttore di alimentazione che si trova sul lato destro dello strumento in posizione ON.
- 2 Premere il pulsante di avvio che si trova a sinistra dello scomparto di raccolta degli scarti per avviare il software.
Quando la routine di avvio è stata completata, viene visualizzata la schermata Start (Avvio).

Compatibilità della versione dei componenti della corsa

Per ottenere prestazioni e risultati ottimali, usare sempre versioni compatibili del software e dei kit cBot.

Versione del kit	Versione della ricetta	Versione del software
HiSeq 3000/4000 Cluster Kit	Ricette versione 1.0	cBot v3.0.46, o successiva (kit SR) cBot v2.0.34, o successiva (kit PE)
HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5	Ricette versione 2.0	cBot v2.0.29 o successiva
HiSeq X Five Reagent Kit v2.5	Ricette versione 2.0	cBot v2.0.29 o successiva
HiSeq Cluster Kit v4	Ricette versione 9.0	cBot v2.0.16 o successiva
HiSeq Rapid Duo cBot Sample Loading Kit	Ricette versione R	cBot v1.5 o successiva
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box	Ricette versione 8.0 (HiSeq) Ricette versione 7.0 (GA)	cBot v1.4.36 o successiva
TruSeq Cluster Kit v3 - HS	Ricette versione 8.0	cBot v1.4 o successiva
TruSeq Cluster Kit v2 - GA*	Ricette versione 7.0	cBot v1.3 o successiva

* Questa opzione è visibile ma non più supportata.

Ricette e tipi di celle a flusso di cBot

Cella a flusso	Nome ricetta principale
Cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq 3000/4000	HiSeq_3000_4000_SR_HD_Exclusion_Amp_v1.0 HiSeq_3000_4000_HD_Exclusion_Amp_v1.0
Cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq X Ten v2.5	HiSeq_X_HD_Exclusion_Amp_v2.0
Cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq X Five v2.5	HiSeq_X_HD_Exclusion_Amp_v2.0
Cella a flusso HiSeq v4	SR_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0 PE_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0
Cella a flusso TruSeq v3	SR_Amp_Lin_Block_TubeStripHyb_v8.0 PE_Amp_Lin_Block_TubeStripHyb_v8.0 SR_Amp_Lin_Block_Hyb_v8.0 PE_Amp_Lin_Block_Hyb_v8.0
Cella a flusso HiSeq Rapid v2	RR_TemplateHyb_FirstExt_vR ¹

¹ Utilizzata solo con i kit Rapid Duo.

Materiali di consumo forniti dall'utente

I materiali di consumo seguenti forniti dall'utente sono utilizzati nella preparazione dei reagenti per la generazione di cluster nei kit X[®] e HiSeq[®] 3000/4000. Assicurarsi di utilizzare la striscia a otto provette appropriata per il flusso di lavoro in uso.

I kit HiSeq X e HiSeq 3000/4000 introducono una fase di denaturazione prima della generazione di cluster su cBot 2. Utilizzando questi kit, le librerie vengono denaturate in una provetta a otto campioni prima dell'aggiunta della miscela di reazione ExAmp.

Componente	Fornitore	Scopo
1 N di NaOH	Fornitore di laboratorio generico	Denaturazione della libreria
Strisce a otto cappucci, piatti	Fisher Scientific, n. codice AB-0784	Perappare le strisce a otto provette non etichettate quando non sono caricate su cBot
Striscia a otto provette, 0,2 ml	Fisher Scientific, n. di catalogo AB-0264	Reazione ExAmp e miscela di librerie sul sistema cBot (flusso di lavoro per la generazione di cluster senza monitoraggio dei campioni)
Provette per striscia dotata di codici a barre cBot 2 (8 pozzetti)	Illumina, n. di catalogo 20005160	Reazione ExAmp e miscela di librerie su un sistema cBot (flusso di lavoro per la generazione di cluster con monitoraggio dei campioni)
Acqua da laboratorio	Millipore o fornitore di laboratorio generico	Denaturazione della libreria
Provette per microcentrifuga, 1,5 ml	VWR, n. di catalogo 20170-038*	Preparazione di Master Mix per la reazione ExAmp

* O equivalente

Capitolo 3 Preparazione dei reagenti

Introduzione	11
Cella a flusso HiSeq X	11
Cella a flusso HiSeq 3000/4000	15
Cella a flusso HiSeq High Output	19
Cella a flusso HiSeq Rapid	20

Introduzione

Le istruzioni per la preparazione dei reagenti dipendono dal kit di reagenti in uso. Le istruzioni sono organizzate in base al tipo di cella a flusso e includono HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq ad output elevato e HiSeq per corsa rapida.

Dopo la preparazione, i reagenti per la generazione di cluster sono pronti per essere caricati su cBot, quando indicato dal software.

Migliori pratiche

- ▶ Quando si preparano i reagenti per la generazione di cluster indossare un paio di guanti nuovi.
- ▶ Non rimuovere il coperchio protettivo in plastica trasparente che copre la piastra dei reagenti fino al momento di caricare i reagenti su cBot. Non forare mai le capsule in alluminio.
- ▶ Tenere le piastre dei reagenti che contengono le strisce a otto provette per la base della piastra per evitare di spostare le provette dei reagenti. Prima e dopo aver usato un vortex o aver capovolto le provette, assicurarsi che le provette siano posizionate correttamente nella piastra dei reagenti. Le provette non posizionate correttamente possono danneggiare il collettore di cBot.
- ▶ Per la generazione di cluster su una cella a flusso HiSeq X o HiSeq 3000/4000, preparare **sempre** NaOH diluito fresco per la denaturazione delle librerie. Questa fase è fondamentale per il processo di denaturazione. Per prevenire piccoli errori di pipettamento, preparare almeno 1 ml di 0,1 N di NaOH appena diluito.

Cella a flusso HiSeq X

Preparare la cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq X, quindi preparare i reagenti per la generazione di cluster. Per preparare i reagenti per la generazione di cluster, scongelare la piastra dei reagenti cBot e preparare Master Mix ExAmp.

Se si utilizza un kit in confezione da 10, preparare quattro celle a flusso e scongelare quattro piastre dei reagenti cBot. Assicurarsi di avere a disposizione quattro strumenti cBot. Dopo la preparazione, i reagenti non possono essere conservati.



NOTA

Le istruzioni per la preparazione dei reagenti descritte nella presente guida non si applicano al flusso di lavoro automatizzato utilizzato per SeqLab Illumina. Per le istruzioni sul flusso di lavoro SeqLab Illumina, vedere la pagina Web support.illumina.com/custom-protocol-selector.html.

Informazioni sui reagenti

- ▶ I reagenti ExAmp sono viscosi, specialmente EPX2 e EPX3. Aspirare ed erogare i reagenti lentamente per assicurare un pipettamento accurato.
- ▶ A causa della viscosità, EPX3 non si muove quando capovolto.

- ▶ **Non usare mai il vortex** con i reagenti ExAmp e non ricongelare dopo lo scongelamento.
- ▶ ExAmp Master Mix può essere torbido, il che è normale. Se la soluzione si separa in una porzione torbida e una porzione trasparente, pipettare lentamente per miscelare.

Preparazione della cella a flusso

- 1 Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
- 2 Tenere da parte la confezione della cella a flusso a temperatura ambiente per 30 minuti.



NOTA

Se la confezione in alluminio è intatta, la cella a flusso può rimanere a temperatura ambiente fino a 12 ore. La cella a flusso confezionata può essere rimessa alla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C solo una volta. Evitare il raffreddamento e il riscaldamento ripetuti della cella a flusso.

- 3 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
- 4 Aprire la confezione in alluminio a partire dalla parte inferiore con l'angolo sigillato. Utilizzare la cella a flusso entro quattro ore dall'apertura della confezione in alluminio.

Figura 5 Apertura della confezione della cella a flusso



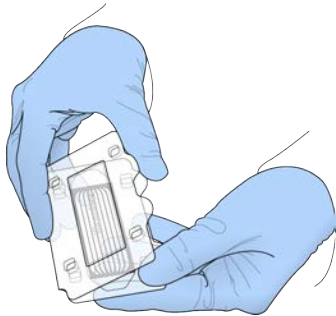
- 5 Rimuovere la confezione in plastica a forma di conchiglia dalla confezione in alluminio.

Figura 6 Rimozione dalla confezione in alluminio



- 6 Aprire la confezione a forma di conchiglia e rimuovere la cella a flusso.

Figura 7 Rimozione della cella a flusso dalla confezione a forma di conchiglia



- 7 Pulire la cella a flusso con una salvietta che non lascia residui inumidita con alcol.
- 8 Asciugare con un panno che non lascia residui.
- 9 Mettere da parte a temperatura ambiente.

Scongelamento della piastra dei reagenti cBot

- 1 Rimuovere la piastra dei reagenti cBot dal luogo di conservazione a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C .
- 2 Scongelare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente (da 19°C a 25°C) per un minimo di 60 minuti. Le piastre dei reagenti devono essere utilizzate il giorno stesso dello scongelamento.

Scongelamento di EPX1, EPX2, EPX3 e RSB

- 1 Rimuovere una provetta di ciascuno dei reagenti seguenti dalla temperatura di conservazione compresa tra -25°C e -15°C .
 - ▶ **Kit in confezione singola:** EPX1, EPX2, EPX3 e RSB. Ciascuna provetta contiene reagente sufficiente per una cella a flusso.
 - ▶ **Kit in confezione da 10:** EPX1M, EPX2M, EPX3M e RSB. Ciascuna provetta contiene reagente sufficiente per quattro celle a flusso.
- 2 Scongelare a temperatura ambiente per 10 minuti.
- 3 Mettere da parte su ghiaccio.

Preparazione di una diluizione fresca di NaOH

- 1 Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga:
 - ▶ Acqua da laboratorio ($900\ \mu\text{l}$)
 - ▶ 1 N di NaOH standard ($100\ \mu\text{l}$)Con questi volumi si ottiene 1 ml di 0,1 N NaOH.
- 2 Capovolgere per miscelare.

Denaturazione delle librerie e aggiunta facoltativa di un campione di controllo PhiX

La concentrazione di caricamento delle librerie dipende dalle librerie da sequenziare. Le istruzioni seguenti si applicano sia alle librerie TruSeq Nano DNA (350 bp) che alle librerie TruSeq DNA PCR-Free (350 bp). Diluire a una concentrazione appropriata per il tipo di libreria.

- ▶ Una concentrazione di caricamento di DNA troppo elevata causa una %PF ridotta.
- ▶ Una concentrazione di caricamento di DNA troppo bassa causa una %PF ridotta e una percentuale elevata di duplicati che incide negativamente sulla profondità di copertura.

Ripetere le istruzioni seguenti per ciascuna cella a flusso da sequenziare.

- 1 Diluire la libreria o il pool di librerie alla concentrazione appropriata:
 - ▶ **Librerie TruSeq Nano DNA:** diluire a 2-3 nM in RSB.
 - ▶ **Librerie TruSeq DNA PCR-Free:** diluire a 1-2 nM in RSB.
- 2 **[Facoltativo]** Aggiungere 1% di campione di controllo PhiX Illumina *non denaturato* alle librerie *non denaturate*:
 - ▶ **Librerie TruSeq Nano DNA:** aggiungere 0,5 µl 2-3 nM di campione di controllo PhiX a 50 µl 2-3 nM di libreria.
 - ▶ **Librerie TruSeq DNA PCR-Free:** aggiungere 0,5 µl 1-2 nM di campione di controllo PhiX a 50 µl 1-2 nM di libreria.
- 3 Numerazione delle provette di una striscia a otto provette:
 - ▶ Per la generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni: dall'estremità sagomata, etichettare le provette dalla n. 8 alla n. 1.



- ▶ Per la generazione di cluster senza il monitoraggio dei campioni: etichettare le provette dalla n. 1 alla n. 8. Quando si preparano quattro celle a flusso, prendere in considerazione l'aggiunta di un altro designatore sulla striscia a otto provette per ottenere il monitoraggio corretto.

- 4 Denaturare la libreria in una striscia a otto provette nel modo seguente.
 - a Aggiungere 5 µl di libreria *non denaturata* sul fondo di ciascun pozzetto.
 - b Aggiungere 5 µl di 0,1 N di NaOH appena diluito. Pipettare lentamente per miscelare.
 - c Incubare a temperatura ambiente per otto minuti.
 - d Aggiungere 5 µl 200 mM Tris-HCl pH 8.0 Pipettare lentamente per miscelare.
- 5 Mettere da parte su ghiaccio fino a quando si è pronti ad aggiungere ExAmp Master Mix.



ATTENZIONE

Preparare e aggiungere ExAmp Master Mix entro **30 minuti**.

Preparazione della piastra dei reagenti cBot

- 1 Capovolgere per miscelare.
- 2 Utilizzare un vortex per spostare le bolle d'aria intrappolate.

- 3 Picchiettare su una superficie rigida per raccogliere le goccioline di reagente. In alternativa, inserire in una centrifuga a impulsi.
- 4 Mettere da parte su ghiaccio.

Preparazione della reazione ExAmp

Preparare la reazione ExAmp Master Mix immediatamente prima dell'uso. Attenersi alle istruzioni appropriate per il numero di celle a flusso che si stanno preparando.

Reazione ExAmp per una cella a flusso (kit in confezione singola)

- 1 Capovolgere EPX1 e EPX2 per miscelare.
- 2 Centrifugare brevemente EPX1, EPX2 e EPX3.
- 3 Preparare ExAmp Master Mix in una provetta da 1,5 ml nel modo seguente.
 - a Aggiungere 210 µl di EPX1.
 - b Aggiungere 30 µl di EPX2. Pipettare lentamente per miscelare.
 - c Aggiungere 110 µl di EPX3. Pipettare lentamente per miscelare.
 - d Assicurarsi che non siano presenti bolle d'aria in fondo alla provetta.
- 4 Aggiungere 35 µl di Master Mix nella parte inferiore di ciascun pozzetto della striscia a otto provette.
 - ▶ Pipettare lentamente per miscelare.
 - ▶ Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.
- 5 Centrifugare brevemente, quindi mettere da parte su ghiaccio per un massimo di 15 minuti fino a quando si è pronti a caricarla su cBot.

Reazione ExAmp per quattro celle a flusso (kit in confezione da 10)

- 1 Capovolgere EPX1M e EPX2M per miscelare.
- 2 Centrifugare brevemente EPX1M, EPX2M e EPX3M.
- 3 Preparare ExAmp Master Mix in una provetta da 1,5 ml nel modo seguente.
 - a Aggiungere 756 µl di EPX1M.
 - b Aggiungere 108 µl di EPX2M. Pipettare lentamente per miscelare.
 - c Aggiungere 396 µl di EPX3M. Pipettare lentamente per miscelare.
 - d Assicurarsi che non siano presenti bolle d'aria in fondo alla provetta.
- 4 Aggiungere 35 µl di Master Mix sul fondo di ciascun pozzetto delle strisce a otto pozzetti.
 - ▶ Pipettare lentamente per miscelare.
 - ▶ Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.
- 5 Centrifugare brevemente la striscia a otto provette, quindi mettere da parte su ghiaccio per un massimo di 15 minuti fino a quando si è pronti a caricarla su cBot.

Cella a flusso HiSeq 3000/4000

Preparare la cella a flusso preconfigurata (patterned) HiSeq 3000/4000, quindi preparare i reagenti per la generazione di cluster. Per preparare i reagenti per la generazione di cluster, scongelare la piastra dei reagenti cBot e preparare Master Mix per la reazione ExAmp.

Informazioni sui reagenti

- ▶ I reagenti ExAmp sono viscosi, specialmente EPX2 e EPX3. Aspirare ed erogare i reagenti lentamente per assicurare un pipettamento accurato.
- ▶ A causa della viscosità, EPX3 non si muove quando capovolto.
- ▶ **Non usare mai il vortex** con i reagenti ExAmp e non ricongelare dopo lo scongelamento.
- ▶ ExAmp Master Mix può essere torbido, il che è normale. Se la soluzione si separa in una porzione torbida e una porzione trasparente, pipettare lentamente per miscelare.

Preparazione della cella a flusso

- 1 Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.
- 2 Tenere da parte la confezione della cella a flusso a temperatura ambiente per 30 minuti.



NOTA

Se la confezione in alluminio è intatta, la cella a flusso può rimanere a temperatura ambiente fino a 12 ore. La cella a flusso confezionata può essere rimessa alla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C solo una volta. Evitare il raffreddamento e il riscaldamento ripetuti della cella a flusso.

- 3 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.
- 4 Aprire la confezione in alluminio a partire dalla parte inferiore con l'angolo sigillato. Utilizzare la cella a flusso entro quattro ore dall'apertura della confezione in alluminio.

Figura 8 Apertura della confezione della cella a flusso



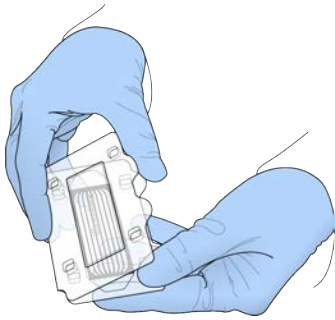
- 5 Rimuovere la confezione in plastica a forma di conchiglia dalla confezione in alluminio.

Figura 9 Rimozione dalla confezione in alluminio



- 6 Aprire la confezione a forma di conchiglia e rimuovere la cella a flusso.

Figura 10 Rimozione della cella a flusso dalla confezione a forma di conchiglia



- 7 Pulire la cella a flusso con una salvietta che non lascia residui inumidita con alcol.
- 8 Asciugare con un panno che non lascia residui.
- 9 Mettere da parte a temperatura ambiente.

Scongelamento della piastra dei reagenti cBot

- 1 Rimuovere la piastra dei reagenti cBot dal luogo di conservazione a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C .
- 2 Scongelare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente (da 19°C a 25°C) per un minimo di 60 minuti. Le piastre dei reagenti devono essere utilizzate il giorno stesso dello scongelamento.

Scongelamento di EPX1, EPX2, EPX3 e RSB

- 1 Rimuovere EPX1, EPX2, EPX3 e RSB dalla temperatura di conservazione compresa tra -25°C e -15°C .
- 2 Scongelare a temperatura ambiente per 10 minuti.
- 3 Mettere da parte su ghiaccio.

Preparazione di una diluizione fresca di NaOH

- 1 Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga:
 - ▶ Acqua da laboratorio (900 µl)
 - ▶ 1 N di NaOH standard (100 µl)
 Con questi volumi si ottiene 1 ml di 0,1 N NaOH.
- 2 Capovolgere per miscelare.

Denaturazione delle librerie e aggiunta facoltativa di un campione di controllo PhiX

La concentrazione di caricamento delle librerie dipende dalle librerie da sequenziare. Le istruzioni seguenti si applicano alle librerie Illumina supportate e hanno come presupposto una dimensione di inserto tipica per il tipo di libreria associata. Assicurarsi di diluire a una concentrazione appropriata per il tipo di libreria.

- ▶ Una concentrazione di caricamento di DNA troppo elevata causa una %PF ridotta.
 - ▶ Una concentrazione di caricamento di DNA troppo bassa causa una %PF ridotta e una percentuale elevata di duplicati che incide negativamente sulla profondità di copertura.
- 1 Diluire la libreria o il pool di librerie alla concentrazione appropriata.

Tipo di libreria	Diluizione
TruSeq DNA PCR-Free	Diluire a 1-2 nM in RSB.
Nextera DNA Flex	Diluire a 2-3 nM in RSB.
TruSeq Nano DNA	Diluire a 2-3 nM in RSB.
Nextera Rapid Capture Exome	
TruSeq Stranded Total RNA	
TruSeq Stranded mRNA	

- 2 **[Facoltativo]** Aggiungere 1% di campione di controllo PhiX Illumina *non denaturato* alle librerie *non denaturate*.

Tipo di libreria	Aggiunta
TruSeq DNA PCR-Free	Aggiungere 5 µl di 100-200 pM di PhiX a 45 µl di 1-2 nM di libreria.
Nextera DNA Flex	Diluire a 2-3 nM in RSB.
TruSeq Nano DNA	Aggiungere 5 µl di 200-300 pM di PhiX a 45 µl di 2-3 nM di libreria.
Nextera Rapid Capture Exome	
TruSeq Stranded Total RNA	
TruSeq Stranded mRNA	

- 3 Numerazione delle provette di una striscia a otto provette:
 - ▶ Per la generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni: dall'estremità sagomata, etichettare le provette dalla n. 8 alla n. 1.



- ▶ Per la generazione di cluster senza il monitoraggio dei campioni: etichettare le provette dalla n. 1 alla n. 8.

- 4 Denaturare la libreria in una striscia a otto provette nel modo seguente.
 - a Aggiungere 5 µl di libreria *non denaturata* sul fondo di ciascun pozzetto.
 - b Aggiungere 5 µl di 0,1 N di NaOH appena diluito. Pipettare lentamente per miscelare.
 - c Incubare a temperatura ambiente per otto minuti.
 - d Aggiungere 5 µl 200 mM Tris-HCl pH 8.0 Pipettare lentamente per miscelare.
- 5 Mettere da parte su ghiaccio per 30 minuti fino a quando si è pronti ad aggiungere ExAmp Master Mix.

Preparazione della piastra dei reagenti cBot

- 1 Capovolgere per miscelare.
- 2 Utilizzare un vortex per spostare le bolle d'aria intrappolate.
- 3 Picchiettare su una superficie rigida per raccogliere le goccioline di reagente. In alternativa, inserire in una centrifuga a impulsi.
- 4 Mettere da parte su ghiaccio.

Preparazione della reazione ExAmp

Preparare la reazione ExAmp Master Mix immediatamente prima dell'uso.

- 1 Capovolgere EPX1 e EPX2 per miscelare.
- 2 Centrifugare brevemente EPX1, EPX2 e EPX3.
- 3 Preparare ExAmp Master Mix in una provetta da 1,5 ml nel modo seguente.
 - a Aggiungere 210 µl di EPX1.
 - b Aggiungere 30 µl di EPX2. Pipettare lentamente per miscelare.
 - c Aggiungere 110 µl di EPX3. Pipettare lentamente per miscelare.
Assicurarsi che non siano presenti bolle d'aria in fondo alla provetta.
- 4 Aggiungere 35 µl di Master Mix nella parte inferiore di ciascun pozzetto della striscia a otto provette.
 - ▶ Pipettare lentamente per miscelare.
 - ▶ Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.
- 5 Tappare le provette e centrifugare brevemente.
- 6 Mettere da parte su ghiaccio per un massimo di 15 minuti fino a quando si è pronti a caricare i reagenti su cBot.

Cella a flusso HiSeq High Output

Per preparare i reagenti, scongelare e ispezionare la piastra dei reagenti. La piastra dei reagenti impiega circa 60 minuti per scongelarsi utilizzando un bagno di acqua a temperatura ambiente. Altrimenti, è possibile scongelare i reagenti durante la notte, senza superare 16 ore, a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.



NOTA

Quando si utilizza un vortex o si inverte la piastra dei reagenti cBot, tenere una mano sulla parte superiore della piastra.

Scongelamento della piastra dei reagenti cBot

- 1 Rimuovere la piastra dei reagenti cBot dal luogo di conservazione a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
- 2 Scongelare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente (da 19 °C a 25 °C) per un minimo di 60 minuti. Le piastre dei reagenti devono essere utilizzate il giorno stesso dello scongelamento.

Preparazione della piastra dei reagenti cBot

- 1 Capovolgere per miscelare.
- 2 Utilizzare un vortex per spostare le bolle d'aria intrappolate.
- 3 Picchiettare su una superficie rigida per raccogliere le goccioline di reagente. In alternativa, inserire in una centrifuga a impulsi.
- 4 **[Per i reagenti TruSeq v3]** Assicurarsi che le provette siano prive di bolle d'aria, posizionate correttamente e ordinate in base al numero.
- 5 Procedere immediatamente all'impostazione di cBot.
- 6 Se si stanno sequenziando le librerie Nextera su una cella a flusso TruSeq v3, andare a *Preparazione di HP10 (TruSeq v3)* prima di impostare cBot.

Preparazione di HP10 (TruSeq v3)

Preparare HP10 da usare su cBot solo quando si utilizzano le librerie Nextera su una cella a flusso TruSeq v3. HP10 è inoltre compatibile con altri tipi di librerie Illumina.

- 1 Rimuovere HP10 dalla temperatura di conservazione tra -25 °C e -15 °C.
- 2 Scongelare per 20 minuti in un becher di acqua deionizzata a temperatura ambiente.
- 3 Aggiungere 150 µl di HP10 a ciascuna provetta di una striscia a otto provette.
- 4 Mettere da parte su ghiaccio.
- 5 Procedere immediatamente all'impostazione di cBot.

Cella a flusso HiSeq Rapid

Per preparare i reagenti, scongelare e ispezionare la piastra dei reagenti. La piastra dei reagenti impiega circa 60 minuti per scongelarsi utilizzando un bagno di acqua a temperatura ambiente. Altrimenti, è possibile scongelare i reagenti durante la notte, senza superare 16 ore, a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.



NOTA

Quando si utilizza un vortex o si inverte la piastra dei reagenti cBot, tenere una mano sulla parte superiore della piastra.

Scongelamento della piastra dei reagenti cBot

- 1 Rimuovere la piastra dei reagenti cBot dal luogo di conservazione a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
- 2 Scongelare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente (da 19 °C a 25 °C) per un minimo di 60 minuti. Le piastre dei reagenti devono essere utilizzate il giorno stesso dello scongelamento.

Preparazione della piastra dei reagenti cBot

- 1 Capovolgere per miscelare.
- 2 Utilizzare un vortex per spostare le bolle d'aria intrappolate.
- 3 Picchiettare su una superficie rigida per raccogliere le goccioline di reagente. In alternativa, inserire in una centrifuga a impulsi.
- 4 Procedere immediatamente all'impostazione di cBot.

Capitolo 4 Generazione di cluster con monitoraggio dei campioni

Introduzione	22
Flusso di lavoro per la generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni	23
Esecuzione di un lavaggio pre-corsa	23
Caricamento dei materiali di consumo	24
Caricamento del collettore	26
Selezione di un protocollo	28
Scansione dei materiali di consumo	28
Esecuzione di una verifica pre-corsa	29
Monitoraggio della corsa	29
Scaricamento dei componenti della corsa	30
Esecuzione di un lavaggio post-corsa	32
Conferma dell'erogazione dei reagenti (opzionale)	32

Introduzione

La generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni è possibile per tutte le celle a flusso HiSeq. Tutte le fasi per la generazione di cluster sono eseguite su cBot fatta eccezione per la preparazione delle librerie per il sequenziamento e la preparazione dei reagenti. La procedura per la generazione di cluster per una cella a flusso HiSeq Rapid v2 consiste solo di ibridazione del template e prima estensione. Il resto della procedura viene eseguita su HiSeq.

L'impostazione di cBot per la generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni include le fasi di caricamento dei materiali di consumo, selezione di un protocollo e scansione dei materiali di consumo. A seguito del caricamento dei materiali di consumo e della chiusura del coperchio dello strumento, gli scanner interni registrano gli input richiesti, come ID reagente e ID cella a flusso. Se necessario, l'input manuale e l'input del sistema sono mostrati sullo schermo.

Per informazioni su come configurare cBot per il monitoraggio dei campioni, vedere *cBot System Configuration Guide* (documento n. 1000000005301) (*Guida alla configurazione del sistema cBot*).

Preparazione delle librerie

Prima di impostare cBot per la generazione di cluster, preparare le librerie per il sequenziamento. Il processo è diverso in base al tipo di libreria e al tipo di cella a flusso.

- ▶ La maggior parte delle librerie sulle celle a flusso TruSeq e HiSeq richiedono una procedura di denaturazione e diluizione. Per maggiori informazioni, vedere *HiSeq Systems Denature and Dilute Libraries Guide* (documento n. 15050107) (*Guida alla denaturazione e diluizione delle librerie per i sistemi HiSeq*).
- ▶ Il protocollo di denaturazione è diverso per le celle a flusso preconfigurate (patterned) HiSeq X e HiSeq 3000/4000. Denaturare le librerie da utilizzare con questi tipi di celle a flusso **solo** in base alle istruzioni per la preparazione dei reagenti specifica per il tipo di cella a flusso in uso. Per maggiori informazioni, vedere *Preparazione dei reagenti a pagina 11*.

Flusso di lavoro per la generazione di cluster con il monitoraggio dei campioni



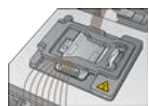
Preparare la piastra dei reagenti e la cella a flusso. Vedere *Preparazione dei reagenti* a pagina 11.



Preparare le librerie per il sequenziamento e caricarle su una striscia a otto provette etichettata con codice a barre.



Eeguire un lavaggio pre-corsa.



Caricare i materiali di consumo e il collettore di cBot, quindi chiudere il coperchio dello strumento.



Selezionare un protocollo ed eseguire la scansione dei materiali di consumo.



Selezionare **Pre-Run Check** (Verifica pre-corsa) per avviare una verifica pre-corsa automatica.



Selezionare **Start** (Avvia). Monitorare il progresso della corsa dalla schermata Run Status (Stato della corsa).



[Facoltativo] Scaricare i componenti della corsa e confermare l'erogazione dei reagenti.



Eeguire un lavaggio post-corsa.

Esecuzione di un lavaggio pre-corsa

Si raccomanda un lavaggio prima della generazione di cluster su cBot.

- 1 Selezionare **User Name** (Nome utente).
- 2 Utilizzando la tastiera sullo schermo, digitare il nome utente e selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Selezionare **Start** (Avvia).

- 4 Se sulla schermata Wash (Lavaggio) non è selezionata la casella di controllo **Manifold removed** (Collettore rimosso), rimuovere il collettore.
- 5 Sollevare il coperchio dello strumento sollevandolo dall'incisione che si trova sulla parte anteriore del coperchio.
- 6 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata.
- 7 Chiudere il coperchio dello strumento.
- 8 Selezionare la casella di controllo **Reservoir filled with water** (Serbatoio riempito con acqua).
- 9 Selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 10 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua in eccesso rimanente nel serbatoio di lavaggio con un panno a bassissimo rilascio di particelle.

Figura 11 Asciugatura del serbatoio di lavaggio



- 11 Selezionare la casella di controllo **Wash reservoir dry** (Serbatoio di lavaggio asciutto).
- 12 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento dei materiali di consumo

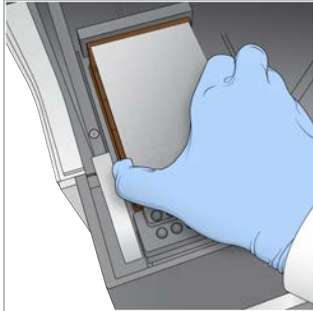
Dalla scheda Load Consumables (Carica materiali di consumo), attenersi alle istruzioni seguenti per caricare la piastra dei reagenti cBot, la cella a flusso e la striscia a otto provette etichettata con codice a barre contenente le librerie preparate. In base al protocollo selezionato, il software suggerisce all'utente quando caricare una striscia a otto provette contenente primer aggiuntivi.

Caricamento della piastra dei reagenti

- 1 Rimuovere il coperchio in plastica trasparente dalla piastra dei reagenti cBot.
- 2 Se la piastra dei reagenti contiene una striscia a otto provette, premere delicatamente verso il basso le provette per assicurarsi che siano alloggiare correttamente.
- 3 Sollevare il coperchio dello strumento.
- 4 **[Per i reagenti TruSeq v3]** Rimuovere il sigillo bianco nel modo seguente.
 - a Tenendo ciascuna estremità della striscia per provette nella riga 10, rimuovere il sigillo bianco dalla striscia a otto provette. Eliminare il sigillo in base alle procedure di smaltimento.
 - b Selezionare la casella di controllo per indicare che il sigillo è stato rimosso.
- 5 Tirare la leva della piastra dei reagenti verso di sé e collocare la piastra dei reagenti sul piano dei reagenti.
 - **HiSeq High Output (TruSeq v3):** posizionare sulla riga 1 direttamente dietro i vani portastrisce. L'angolo smussato della piastra è posizionato nell'angolo anteriore destro.

- ▶ **Tutte le piastre dei reagenti eccetto HiSeq High Output (TruSeq v3):** posizionare con l'etichetta del codice a barre rivolta verso la parte posteriore dello strumento. Gli angoli smussati della piastra sono posizionati direttamente dietro i portastrisce.

Figura 12 Posizionamento della piastra dei reagenti



- 6 Per fissare in sede la piastra dei reagenti, rilasciare la leva.

Caricamento della cella a flusso

- 1 Sollevare il coperchio a scatto.
- 2 Lavare l'adattatore portacelle sul blocco termico con una piccola quantità di acqua deionizzata.
- 3 Asciugare con un panno che non lascia residui.
Evitare l'infiltrazione di liquidi nello strumento.
- 4 Rimuovere la cella a flusso dallo stato di conservazione:
 - ▶ **Tutte le celle a flusso, fatta eccezione per HiSeq X e HiSeq 3000/4000:** rimuovere la cella a flusso dalla provetta di conservazione usando una pinza in plastica. Sciacquare con acqua deionizzata e asciugarla con un panno pulente per lenti con un movimento continuo. Conservare la provetta e il tampone per una conservazione successiva.
 - ▶ **Celle a flusso HiSeq X e HiSeq 3000/4000:** la cella a flusso preconfigurata (patterned), una volta preparata, è pronta per essere utilizzata.
- 5 Posizionare la cella a flusso sul blocco termico con i fori della porta della cella a flusso rivolti verso **l'alto**. La corsia 1 si trova sul lato destro con l'angolo sagomato.

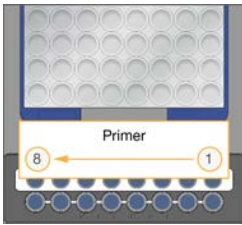
Caricamento dei templati

- 1 Caricare la striscia a otto provette contenente le librerie preparate nella riga dei templati del vano portastrisce.
Assicurarsi che sia posizionata correttamente.
- 2 Procedere nel modo seguente.
 - ▶ Se si utilizzano primer aggiuntivi, procedere con *Caricamento dei primer*.
 - ▶ Se non si stanno utilizzando primer aggiuntivi, selezionare la casella di controllo **Consumables Loaded** (Materiali di consumo caricati) e passare a *Caricamento del collettore a pagina 26*.

Caricamento dei primer

La schermata Load Primers (Carica primer) viene visualizzata per i flussi di lavoro che permettono l'utilizzo di primer personalizzati o richiedono primer aggiuntivi. Le librerie di sequenziamento Nextera su una cella a flusso TruSeq v3 richiedono il caricamento di una striscia a otto provette contenente HP10.

- 1 Caricare la striscia a otto provette contenente i primer nella riga dei primer del vano portastrisce. Le provette sono numerate da destra a sinistra per corrispondere all'orientamento delle corsie della cella a flusso.



HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq v4
e TruSeq v3 (HiSeq)

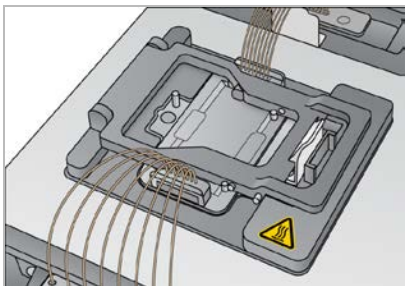
- 2 Selezionare la casella di controllo **Consumables Loaded** (Materiali di consumo caricati).
- 3 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento del collettore

Dalla schermata Manifold (Collettore), caricare il collettore contenuto nello stesso kit cluster della cella a flusso.

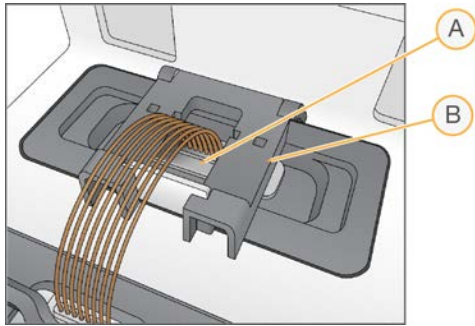
- 1 Ispezionare i pescanti sul pettine di aspirazione per eventuali danni. Accertarsi che le guarnizioni in gomma nera siano alloggiare correttamente.
- 2 Posizionare il collettore sulla cella a flusso con il pettine di aspirazione rivolto verso la parte anteriore di cBot.
- 3 Allineare il collettore con i perni guida del blocco termico e posizionarlo in sede sopra la cella a flusso. Posizionarlo uniformemente per creare una chiusura ermetica.
- 4 Selezionare la casella di controllo **Manifold seated over flow cell** (Collettore posizionato sopra la cella a flusso).
- 5 Chiudere il coperchio a scatto per bloccare il collettore in posizione.

Figura 13 Chiusura del coperchio a scatto



- 6 Selezionare la casella di controllo **Flow cell clamp closed** (Coperchio a scatto chiuso).
- 7 Collegare l'estremità di uscita del collettore alla porta di uscita nel serbatoio di lavaggio. Assicurarsi che l'estremità di uscita sia alloggiata correttamente.

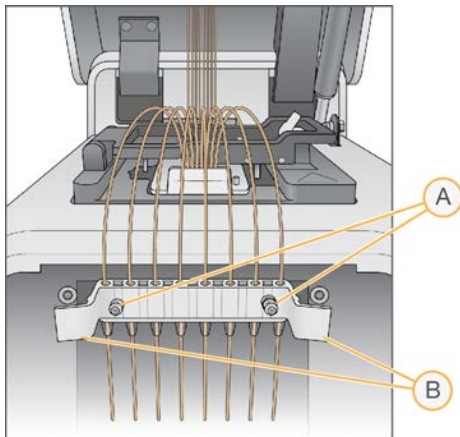
Figura 14 Fissaggio dell'estremità di uscita



- A Porta di uscita
- B Morsetto di uscita

- 8 Chiudere il morsetto di uscita per fissare l'estremità di uscita del collettore.
- 9 Selezionare la casella di controllo **Outlet clamp closed** (Morsetto di uscita chiuso).
- 10 Allineare il pettine di aspirazione ai due perni guida metallici sul lato anteriore del blocco termico.

Figura 15 Fissaggio del pettine di aspirazione



- A Perna guida metallica
- B Linguetta in plastica

- 11 Far scattare in sede il pettine di aspirazione usando le linguette in plastica su entrambi i lati dello stesso.
- 12 Assicurarsi che i pettini di aspirazione siano dritti e perpendicolari alla piastra dei reagenti e che sia selezionata la casella di controllo **Sipper comb in place** (Pettine di aspirazione in posizione).
- 13 Chiudere il coperchio dello strumento e selezionare **Next** (Avanti).



ATTENZIONE

Non riaprire il coperchio a meno che non venga suggerito dal software. Se il coperchio è aperto, ciascun materiale di consumo deve essere nuovamente sottoposto a scansione e convalidato durante la verifica pre-corsa. Una mancata convalida durante la verifica pre-corsa richiede l'annullamento della corsa.

Selezione di un protocollo

- 1 Selezionare **Experiment Name** (Nome esperimento).
- 2 Usando la tastiera sullo schermo, digitare il nome dell'esperimento, quindi selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Selezionare la ricetta appropriata per l'esperimento dall'elenco dei protocolli.
Scorrere per vedere i protocolli disponibili.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).

Scansione dei materiali di consumo

Gli scanner per codici a barre interni eseguono la scansione e la registrazione di tutti gli ID dei materiali di consumo. Il software guida l'utente durante ciascuna scansione mediante una serie di schermate a partire dalla schermata Reagents (Reagenti). Quando una scansione viene eseguita con successo, l'ID del materiale di consumo viene visualizzato sulla schermata.

- 1 Selezionare **Scan** (Scansione), quindi **Next** (Avanti) su ciascuna delle schermate seguenti:
 - ▶ **Reagents** (Reagenti): registra l'ID del kit di reagenti.
 - ▶ **Flow Cell** (Cella a flusso): registra l'ID della cella a flusso.
 - ▶ **Tube Strips** (Strisce provette): registra l'ID del template della libreria.
- 2 Se si utilizzano primer personalizzati o aggiuntivi, registrare il nome primer nel modo seguente.
 - a Selezionare **Enter Primer Name** (Immetti nome primer) sulla schermata Primers (Primer).
 - b Usando la tastiera sullo schermo, digitare il nome primer, quindi selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Selezionare **Pre Check** (Pre-verifica).

Errori di scansione

Se una scansione non riesce, procedere come segue.

- 1 Aprire il coperchio dello strumento e rimuovere il materiale di consumo indicato in errore.
- 2 Asciugare il codice a barre con un panno pulente che non lascia residui.
- 3 Ricaricare il materiale di consumo e chiudere il coperchio.
- 4 Selezionare **Scan** (Esegui scansione) per ripetere la scansione.
- 5 Se la scansione non riesce due o più volte, andare alle fasi 6-8. Oppure, procedere con l'impostazione della corsa.
- 6 Aprire il coperchio dello strumento e rimuovere il materiale di consumo.
- 7 Selezionare **Scan** (Esegui scansione) per attivare lo scanner per codici a barre esterno ed eseguire la scansione del codice a barre del materiale di consumo. In alternativa, selezionare l'icona della tastiera, digitare l'ID e selezionare **Enter** (Invio).
Un segnale acustico indica che una scansione è stata eseguita correttamente e l'ID viene visualizzato sulla schermata.



NOTA

Il monitoraggio corretto dei campioni si verifica solo per i materiali di consumo sottoposti a scansione interna. Quando si utilizza uno scanner per codici a barre esterno o la tastiera sullo schermo per registrare l'ID del materiale di consumo, il monitoraggio dei campioni cessa per quel materiale di consumo.

- 8 Ricaricare il materiale di consumo e chiudere il coperchio per procedere con l'impostazione della corsa.

Esecuzione di una verifica pre-corsa

La verifica pre-corsa legge i sensori dello strumento per accertare la corretta installazione dei componenti della corsa, quindi esegue una verifica del flusso usando i sensori di bolle d'aria per rilevare l'eventuale presenza di aria nei tubi. Se il coperchio è stato aperto dopo la schermata Manifold (Collettore), la verifica pre-corsa effettua anche una nuova scansione dei materiali di consumo e verifica che gli ID dei materiali di consumo corrispondano alla scansione iniziale.

Per la verifica pre-corsa sono necessari circa tre minuti.

- 1 Una volta completata correttamente la verifica pre-corsa, selezionare **Start** (Avvia). Si apre la schermata Run Status (Stato della corsa) e la corsa inizia.

Errori dei componenti della corsa

Se la verifica pre-corsa non va a buon fine a causa di errori relativi ai componenti della corsa o all'apertura del coperchio, procedere come segue:

- 1 Controllare tutti i componenti della corsa indicati in errore per accertarsi che siano presenti e caricati correttamente.
- 2 Selezionare **Rerun Check** (Riesegui verifica) per ripetere la verifica.
- 3 Se la verifica continua a dare esito negativo, selezionare **Cancel Run** (Annulla corsa) per terminare la corsa e impostare una nuova corsa.

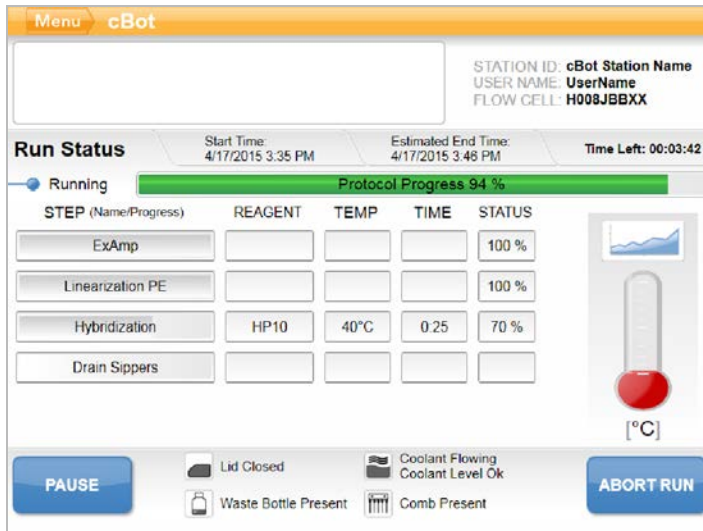
Mancata verifica del flusso

Una mancata verifica del flusso può essere dovuta a una cella a flusso non correttamente caricata, a un collettore difettoso o a un'occlusione nelle linee. Prima di bypassare la verifica del flusso, vedere [Risoluzione dei problemi in caso di mancata verifica del flusso a pagina 52](#).

Monitoraggio della corsa

- 1 Utilizzare la schermata Run Status (Stato della corsa) per monitorare l'avanzamento della corsa. La schermata Run Status (Stato della corsa) fornisce lo stato della corsa e i dettagli seguenti:
 - ▶ La data e l'ora di avvio, la data e l'ora di arresto e il tempo rimanente
 - ▶ Fasi del protocollo di generazione dei cluster con la barra di stato per ciascuna fase
 - ▶ Reagenti attualmente in uso
 - ▶ Temperatura attuale (°C)
 - ▶ Stato del comando nella fase attuale

Figura 16 Schermata Run Status (Stato della corsa)



- 2 Attendere il completamento della corsa:
 - ▶ HiSeq v4, HiSeq 3000/4000 PE o HiSeq X: consentire circa tre ore.
 - ▶ HiSeq 3000/4000 SR: consentire circa quattro ore.
 - ▶ HiSeq Rapid v2: consentire circa un'ora.
 - ▶ TruSeq v3: consentire circa cinque ore.
- 3 Al completamento della corsa, è possibile lasciare la cella a flusso sullo strumento durante la notte. Altrimenti, procedere a *Scaricamento dei componenti della corsa*. cBot 2 mantiene la cella a flusso a una temperatura di 20 °C.

Report dei dati della corsa

Il report dei dati della corsa presenta un riepilogo della corsa corrente, elencando le informazioni seguenti:

- ▶ Nome del protocollo
- ▶ ID cella a flusso
- ▶ ID reagente
- ▶ Nome del template
- ▶ Ora d'inizio e di fine della corsa

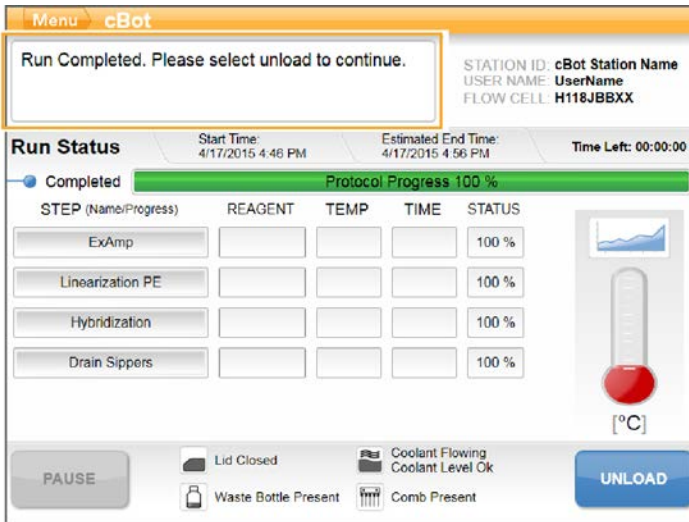
Al termine della corsa, il report dei dati della corsa si apre automaticamente per segnalare che la corsa è stata ultimata.

- 1 Per visualizzare il report durante la corsa, selezionare **Menu | Run Data** (Menu | Dati della corsa).

Scaricamento dei componenti della corsa

- 1 Al termine della corsa, selezionare **Unload** (Scarica) per procedere.

Figura 17 Corsa completa, scaricare i componenti



- 2 Sollevare il coperchio dello strumento.
- 3 Rilasciare il morsetto di uscita che fissa l'estremità di uscita del collettore.
- 4 Scollegare l'estremità di uscita del collettore dalla porta di uscita nel serbatoio di lavaggio.
- 5 Rimuovere il pettine di aspirazione dai perni guida metallici usando le linguette in plastica su entrambi i lati dello stesso.
- 6 Sbloccare il coperchio a scatto.
- 7 Rimuovere il collettore.
Accertarsi che la cella a flusso rimanga all'interno del blocco termico.
- 8 Sollevare la cella a flusso ed estrarla dal blocco termico.
- 9 Conservare la cella a flusso in modo appropriato:
 - ▶ **Celle a flusso TruSeq v3 e HiSeq v4:** conservare nel tampone di conservazione nella provetta della cella a flusso a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. La cella a flusso è stabile dopo l'ibridazione dei primer per un massimo di 10 giorni se conservata correttamente nella provetta della cella a flusso.
 - ▶ **Celle a flusso HiSeq Rapid v2:** eseguire la corsa di sequenziamento nello stesso giorno del caricamento della libreria.
 - ▶ **Cella a flusso HiSeq X e HiSeq 3000/4000:** conservare in un tampone di conservazione fino a 48 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.
- 10 Tirare verso di sé la leva della piastra dei reagenti per rilasciarla.
- 11 Rimuovere la piastra dei reagenti dal piano dei reagenti.



AVVERTENZA

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

- 12 Rimuovere la striscia a otto provette contenente le librerie.
- 13 Ove applicabile, rimuovere la striscia a otto provette contenente i primer aggiuntivi.
- 14 Selezionare la casella di controllo per indicare di aver scaricato i reagenti, i templati e i primer.
- 15 Scegliere un'opzione di lavaggio:
 - ▶ Selezionare **Wash** (Lavaggio) per procedere con il lavaggio post-corsa.
 - ▶ Se è disponibile l'opzione di bypass, selezionare **Exit** (Esci) per bypassare il lavaggio post-corsa.

Esecuzione di un lavaggio post-corsa

- 1 Lavare la piastra del blocco termico con acqua deionizzata per rimuovere eventuali accumuli di sale.
- 2 Asciugare con un panno pulente che non lascia residui.
- 3 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata e chiudere il coperchio dello strumento.
- 4 Selezionare la casella di controllo per indicare che è presente acqua, quindi selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 5 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua in eccesso rimanente nel serbatoio di lavaggio. Evitare le porte di uscita per impedire alle fibre di entrare nei fori.
- 6 Selezionare la casella di controllo per indicare che il serbatoio di lavaggio è asciutto, quindi selezionare **Exit** (Esci).
Si apre la schermata Start (Avvio) e cBot 2 è pronto per un'altra corsa.

Conferma dell'erogazione dei reagenti (opzionale)

È possibile confermare l'erogazione dei singoli reagenti dalla piastra dei reagenti HiSeq High Output (TruSeq v3).

- 1 Ispezionare le estremità sigillate di ciascuna striscia di provette e verificare che tutte le capsule siano state forate.
- 2 Rilasciare ciascuna striscia di provette dalla base della piastra dei reagenti nel modo seguente.
 - a Afferrare saldamente la piastra dei reagenti, con la punta delle dita sotto la base.
 - b Premere delicatamente verso l'alto sulle provette centrali della striscia di provette.
- 3 Ispezionare ciascuna provetta per confermare che in ciascuna provetta rimanga un volume analogo. Leggere differenze sono normali.

Figura 18 Esempio di erogazione dei reagenti (cella a flusso a otto corsie)

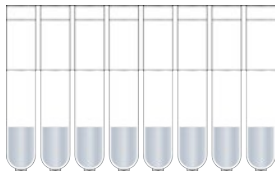
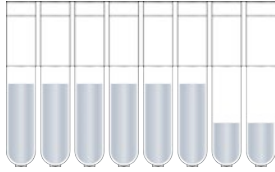


Figura 19 Esempio di erogazione dei reagenti corretta (cella a flusso a due corsie)



- 4 Se l'erogazione dei reagenti non è corretta e i sigilli sulle provette dei reagenti sono perforati, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
- 5 Ispezionare la striscia a otto provette contenente i template della libreria.
- 6 Se con la corsa sono stati usati primer aggiuntivi, ispezionare la striscia a otto provette contenente i primer.

Capitolo 5 Generazione di cluster senza monitoraggio dei campioni

Introduzione	34
Flusso di lavoro per la generazione di cluster senza monitoraggio dei campioni	34
Esecuzione di un lavaggio pre-corsa	35
Selezione di un protocollo	36
Caricamento dei materiali di consumo	36
Esecuzione di una verifica pre-corsa	40
Monitoraggio della corsa	40
Scaricamento dei componenti della corsa	41
Esecuzione di un lavaggio post-corsa	43
Conferma dell'erogazione dei reagenti (opzionale)	43

Introduzione

Tutte le fasi per la generazione di cluster sono eseguite su cBot, a eccezione della preparazione delle librerie per il sequenziamento e della preparazione della piastra dei reagenti cBot. La procedura per la generazione di cluster per una cella a flusso per corsa rapida consiste solo di ibridazione del template e prima estensione. Il resto della procedura viene eseguita sullo strumento di sequenziamento.

L'impostazione di cBot per la generazione di cluster senza il monitoraggio dei campioni include la selezione di un protocollo e il successivo caricamento dei materiali di consumo. Tutti i materiali di consumo sono sottoposti a scansione con scanner per codici a barre esterno o immessi manualmente.

Preparazione delle librerie

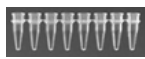
Prima di impostare cBot per la generazione di cluster, preparare le librerie per il sequenziamento. Il processo è diverso in base al tipo di libreria e al tipo di cella a flusso.

- ▶ La maggior parte delle librerie sulle celle a flusso TruSeq e HiSeq richiedono una procedura di denaturazione e diluizione. Per maggiori informazioni, vedere *HiSeq Systems Denature and Dilute Libraries Guide (documento n. 15050107)* (Guida alla denaturazione e diluizione delle librerie per i sistemi HiSeq).
- ▶ Il protocollo di denaturazione è diverso per le celle a flusso preconfigurate (patterned) HiSeq X e HiSeq 3000/4000. Denaturare le librerie da utilizzare con questi tipi di celle a flusso **solo** in base alle istruzioni per la preparazione dei reagenti specifica per il tipo di cella a flusso in uso. Per maggiori informazioni, vedere *Preparazione dei reagenti a pagina 11*.

Flusso di lavoro per la generazione di cluster senza monitoraggio dei campioni



Preparare la piastra dei reagenti e la cella a flusso. Vedere *Preparazione dei reagenti* a pagina 11.



Preparare le librerie per il sequenziamento e caricarle su una striscia a otto provette.



Eseguire un lavaggio pre-corsa.



Selezionare un protocollo, eseguire la scansione dei materiali di consumo e caricarli, quindi caricare le strisce con le provette contenenti le librerie preparate.



Selezionare **Pre-Run Check** (Verifica pre-corsa) per avviare una verifica pre-corsa automatica.



Selezionare **Start** (Avvia). Monitorare il progresso della corsa dalla schermata Run Status (Stato della corsa).



Scaricare i componenti della corsa e confermare l'erogazione dei reagenti.



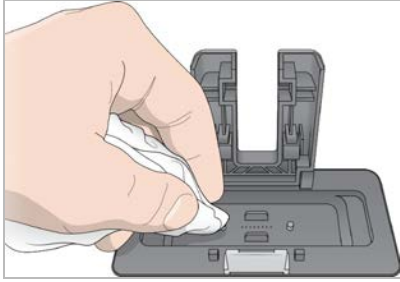
Eseguire un lavaggio post-corsa.

Esecuzione di un lavaggio pre-corsa

Si raccomanda un lavaggio prima della generazione di cluster su cBot.

- 1 Selezionare **User Name** (Nome utente).
- 2 Utilizzando la tastiera sullo schermo, digitare il nome utente e selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Selezionare **Start** (Avvia).
- 4 Se sulla schermata Wash (Lavaggio) non è selezionata la casella di controllo **Manifold removed** (Collettore rimosso), rimuovere il collettore.
- 5 Sollevare il coperchio dello strumento sollevandolo dall'incisione che si trova sulla parte anteriore del coperchio.
- 6 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata.
- 7 Chiudere il coperchio dello strumento.
- 8 Selezionare la casella di controllo **Reservoir filled with water** (Serbatoio riempito con acqua).
- 9 Selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 10 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua in eccesso rimanente nel serbatoio di lavaggio con un panno a bassissimo rilascio di particelle.

Figura 20 Asciugatura del serbatoio di lavaggio



- 11 Selezionare la casella di controllo **Wash reservoir dry** (Serbatoio di lavaggio asciutto).
- 12 Selezionare **Next** (Avanti).

Selezione di un protocollo

- 1 Selezionare **Experiment Name** (Nome esperimento).
- 2 Usando la tastiera sullo schermo, digitare il nome dell'esperimento, quindi selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Selezionare la ricetta appropriata per l'esperimento dall'elenco dei protocolli.
Scorrere per vedere i protocolli disponibili.
- 4 Selezionare **Next** (Avanti).

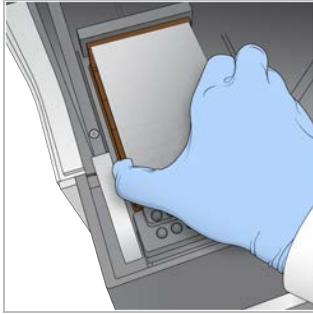
Caricamento dei materiali di consumo

Il software guida l'utente lungo l'intera procedura di caricamento della piastra dei reagenti cBot, della cella a flusso, del collettore cBot e della striscia a otto provette contenente le librerie preparate. In base al protocollo selezionato per la generazione di cluster, il software suggerisce all'utente quando caricare una striscia a otto provette contenete primer aggiuntivi.

Caricamento della piastra dei reagenti

- 1 Rimuovere il coperchio in plastica trasparente dalla piastra dei reagenti cBot.
- 2 Selezionare **Scan Reagent ID** (Scansione ID reagente) per attivare lo scanner per codici a barre esterno.
- 3 Sollevare il coperchio dello strumento sollevandolo dall'incisione che si trova sulla parte anteriore del coperchio.
- 4 **[Per i reagenti TruSeq v3]** Rimuovere il sigillo bianco nel modo seguente.
 - a Tenendo ciascuna estremità della striscia per provette nella riga 10, rimuovere il sigillo bianco dalla striscia a otto provette. Eliminare il sigillo in base alle procedure di smaltimento.
 - b Selezionare la casella di controllo per indicare che il sigillo è stato rimosso.
- 5 Tirare la leva della piastra dei reagenti verso di sé e collocare la piastra dei reagenti sul piano dei reagenti:
 - ▶ **HiSeq High Output (TruSeq v3)**: posizionare sulla riga 1 direttamente dietro i portastrisce. L'angolo smussato della piastra è posizionato nell'angolo anteriore destro.
 - ▶ **Tutte le piastre dei reagenti eccetto HiSeq High Output (TruSeq v3)**: posizionare con l'etichetta del codice a barre rivolta verso la parte posteriore dello strumento. Gli angoli smussati della piastra sono posizionati direttamente dietro i portastrisce.

Figura 21 Posizionamento della piastra dei reagenti



- 6 Per fissare in sede la piastra dei reagenti, rilasciare la leva.
- 7 Selezionare la casella di controllo sullo schermo per indicare che la piastra dei reagenti è caricata, quindi selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cella a flusso

- 1 Sollevare il coperchio a scatto.
- 2 Lavare l'adattatore portacelle sul blocco termico con una piccola quantità di acqua deionizzata.
- 3 Asciugare con un panno pulente che non lascia residui.
- 4 Rimuovere la cella a flusso dallo stato di conservazione:
 - ▶ **Tutte le celle a flusso, fatta eccezione per HiSeq X e HiSeq 3000/4000:** rimuovere la cella a flusso dalla provetta di conservazione usando una pinza in plastica. Sciacquare la cella a flusso con acqua deionizzata e asciugarla delicatamente con un panno pulente per lenti. Conservare la provetta e il tampone per una conservazione successiva.
 - ▶ **Celle a flusso HiSeq X e HiSeq 3000/4000:** la cella a flusso preconfigurata (patterned), una volta preparata, è pronta per essere utilizzata.
- 5 Selezionare **Scan Flow Cell ID** (Scansione ID cella a flusso) per attivare lo scanner per codici a barre esterno.
- 6 Scansionare l'ID della cella a flusso tenendo la confezione o la provetta etichettata della cella a flusso vicino al vassoio dello scanner con il codice a barre rivolto verso lo strumento.
- 7 Posizionare la cella a flusso sul blocco termico con i fori della porta della cella a flusso rivolti verso **l'alto**. La corsia 1 si trova sul lato destro con l'angolo sagomato.
- 8 Selezionare la casella di controllo per indicare che la cella a flusso è caricata, quindi selezionare **Next** (Avanti).

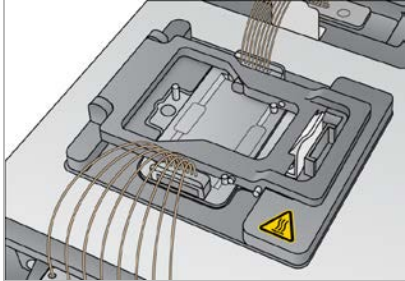
Caricamento del collettore

Usare il collettore contenuto nello stesso kit cluster della cella a flusso.

- 1 Ispezionare i pescanti sul pettine di aspirazione per eventuali danni. Accertarsi che le guarnizioni in gomma nera siano alloggiare correttamente.
- 2 Posizionare il collettore sulla cella a flusso con il pettine di aspirazione rivolto verso la parte anteriore di cBot.
- 3 Allineare il collettore con i perni guida del blocco termico e posizionarlo in sede sopra la cella a flusso. Posizionarlo uniformemente per creare una chiusura ermetica.

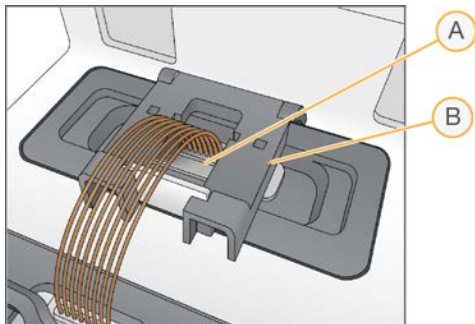
- 4 Selezionare la casella di controllo **Manifold seated over flow cell** (Collettore posizionato sopra la cella a flusso).
- 5 Chiudere il coperchio a scatto per bloccare il collettore in posizione.

Figura 22 Chiusura del coperchio a scatto



- 6 Selezionare la casella di controllo **Flow cell clamp closed** (Coperchio a scatto chiuso).
- 7 Collegare l'estremità di uscita del collettore alla porta di uscita nel serbatoio di lavaggio. Assicurarsi che l'estremità di uscita sia alloggiata correttamente.

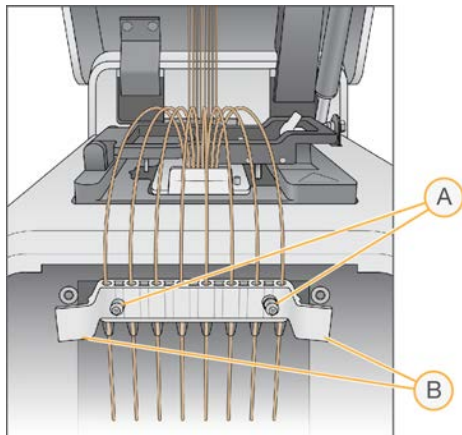
Figura 23 Fissaggio dell'estremità di uscita



- A Porta di uscita
- B Morsetto di uscita

- 8 Chiudere il morsetto di uscita per fissare l'estremità di uscita del collettore.
- 9 Selezionare la casella di controllo **Outlet clamp closed** (Morsetto di uscita chiuso).
- 10 Allineare il pettine di aspirazione ai due perni guida metallici sul lato anteriore del blocco termico.

Figura 24 Fissaggio del pettine di aspirazione



- A Perna guida metallica
- B Linguette in plastica

- 11 Far scattare in sede il pettine di aspirazione usando le linguette in plastica su entrambi i lati dello stesso. Assicurarsi che i pescanti del pettine di aspirazione siano dritti e perpendicolari alla piastra dei reagenti.
- 12 Selezionare la casella di controllo **Sipper comb in place** (Pettine di aspirazione in posizione), quindi selezionare **Next** (Avanti).

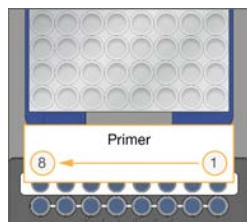
Caricamento dei template

- 1 Selezionare **Enter Template Name** (Immetti nome template).
- 2 Usando la tastiera sullo schermo, digitare l'ID del template, quindi selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Caricare la striscia a otto provette contenente le librerie preparate nella riga dei template.
- 4 Selezionare la casella di controllo per indicare che i template sono stati caricati.
- 5 Se si utilizzano primer aggiuntivi, procedere con *Caricamento dei primer*. Oppure, chiudere il coperchio di cBot e selezionare **Next** (Avanti) per passare a *Esecuzione di una verifica pre-corsa a pagina 40*.

Caricamento dei primer

La schermata Load Primers (Carica primer) viene visualizzata per i flussi di lavoro che permettono l'utilizzo di primer personalizzati o richiedono primer aggiuntivi. Le librerie di sequenziamento Nextera su una cella a flusso TruSeq v3 richiedono il caricamento di una striscia a otto provette contenente HP10.

- 1 Selezionare **Enter Primer Name** (Immetti nome primer).
- 2 Usando la tastiera sullo schermo, digitare il nome primer, quindi selezionare **Enter** (Invio).
- 3 Caricare la striscia a otto provette contenente i primer nella riga dei primer.
Assicurarsi che l'ordine delle provette numerate corrisponda all'orientamento delle corsie della cella a flusso.
Le provette sono numerate da destra a sinistra.



HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq v4 e TruSeq v3 (HiSeq)

- 4 Selezionare la casella di controllo per indicare che i primer sono stati caricati.
- 5 Chiudere il coperchio dello strumento.
- 6 Selezionare **Next** (Avanti).

Esecuzione di una verifica pre-corsa

La verifica pre-corsa legge i sensori dello strumento per accertare la corretta installazione dei componenti della corsa, quindi esegue una verifica del flusso usando i sensori di bolle d'aria per rilevare l'eventuale presenza di aria nei tubi. Per la verifica pre-corsa sono necessari circa tre minuti.

- 1 Una volta completata correttamente la verifica pre-corsa, selezionare **Start** (Avvia).
Si apre la schermata Run Status (Stato della corsa) e la corsa inizia.

Errori dei componenti della corsa

Se la verifica pre-corsa non va a buon fine a causa di errori relativi ai componenti della corsa, procedere come segue:

- 1 Controllare tutti i componenti della corsa indicati in errore per accertarsi che siano presenti e caricati correttamente.
- 2 Selezionare **Rerun Check** (Riesegui verifica) per ripetere la verifica dei sensori.
- 3 Se la verifica continua a dare esito negativo, selezionare **Cancel Run** (Annulla corsa) per terminare la corsa e impostare una nuova corsa.

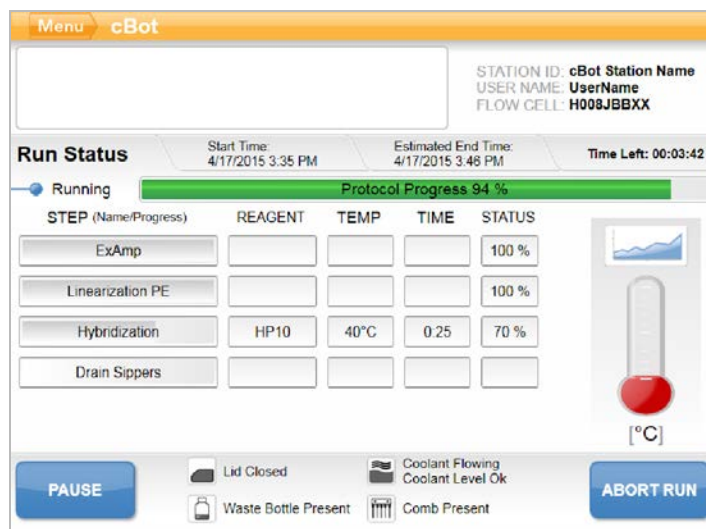
Mancata verifica del flusso

Una mancata verifica del flusso può essere dovuta a una cella a flusso non correttamente caricata, a un collettore difettoso o a un'occlusione nelle linee. Prima di bypassare la verifica del flusso, vedere [Risoluzione dei problemi in caso di mancata verifica del flusso a pagina 52](#).

Monitoraggio della corsa

- 1 Utilizzare la schermata Run Status (Stato della corsa) per monitorare l'avanzamento della corsa. La schermata Run Status (Stato della corsa) fornisce lo stato della corsa e i dettagli seguenti:
 - ▶ La data e l'ora di avvio, la data e l'ora di arresto e il tempo rimanente
 - ▶ Fasi del protocollo di generazione dei cluster con la barra di stato per ciascuna fase
 - ▶ Reagenti attualmente in uso
 - ▶ Temperatura attuale (°C)
 - ▶ Stato del comando nella fase attuale

Figura 25 Schermata Run Status (Stato della corsa)



- 2 Attendere il completamento della corsa:
 - ▶ HiSeq v4, HiSeq 3000/4000 PE o HiSeq X: consentire circa tre ore.
 - ▶ HiSeq 3000/4000 SR: consentire circa quattro ore.
 - ▶ HiSeq Rapid v2: consentire circa un'ora.
 - ▶ TruSeq v3: consentire circa cinque ore.
- 3 Al completamento della corsa, è possibile lasciare la cella a flusso sullo strumento durante la notte. Altrimenti, procedere a *Scaricamento dei componenti della corsa*. Lo strumento mantiene la cella a flusso a una temperatura di 20 °C.

Report dei dati della corsa

Il report dei dati della corsa presenta un riepilogo della corsa corrente, elencando le informazioni seguenti:

- ▶ Nome del protocollo
- ▶ ID cella a flusso
- ▶ ID reagente
- ▶ Nome del template
- ▶ Ora d'inizio e di fine della corsa

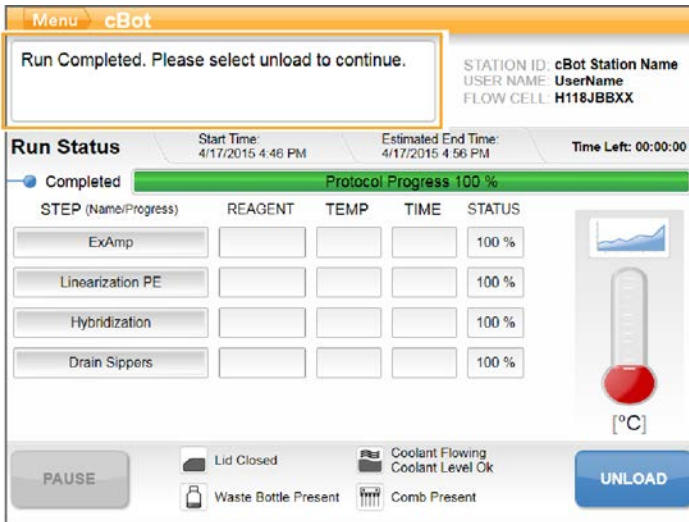
Al termine della corsa, il report dei dati della corsa si apre automaticamente per segnalare che la corsa è stata ultimata.

- 1 Per visualizzare il report durante la corsa, selezionare **Menu | Run Data** (Menu | Dati della corsa).

Scaricamento dei componenti della corsa

- 1 Al termine della corsa, selezionare **Unload** (Scarica) per procedere.

Figura 26 Corsa completa, scaricare i componenti



- 2 Sollevare il coperchio dello strumento.
- 3 Rilasciare il morsetto di uscita che fissa l'estremità di uscita del collettore.
- 4 Scollegare l'estremità di uscita del collettore dalla porta di uscita nel serbatoio di lavaggio.
- 5 Rimuovere il pettine di aspirazione dai perni guida metallici usando le linguette in plastica su entrambi i lati dello stesso.
- 6 Sbloccare il coperchio a scatto.
- 7 Rimuovere il collettore.
Accertarsi che la cella a flusso rimanga all'interno del blocco termico.
- 8 Sollevare la cella a flusso ed estrarla dal blocco termico.
- 9 Conservare la cella a flusso in modo appropriato:
 - ▶ **Celle a flusso TruSeq v3 e HiSeq v4:** conservare nel tampone di conservazione nella provetta della cella a flusso a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. La cella a flusso è stabile dopo l'ibridazione dei primer per un massimo di 10 giorni se conservata correttamente nella provetta della cella a flusso.
 - ▶ **Celle a flusso HiSeq Rapid v2:** eseguire la corsa di sequenziamento nello stesso giorno del caricamento della libreria.
 - ▶ **Cella a flusso HiSeq X e HiSeq 3000/4000:** conservare in un tampone di conservazione fino a 48 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.
- 10 Tirare verso di sé la leva della piastra dei reagenti per rilasciarla.
- 11 Rimuovere la piastra dei reagenti dal piano dei reagenti.



AVVERTENZA

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

- 12 Rimuovere la striscia a otto provette contenente le librerie.
- 13 Ove applicabile, rimuovere la striscia a otto provette contenente i primer aggiuntivi.
- 14 Selezionare la casella di controllo per indicare di aver scaricato i reagenti, i templati e i primer.
- 15 Scegliere un'opzione di lavaggio:
 - ▶ Selezionare **Wash** (Lavaggio) per procedere con il lavaggio post-corsa.
 - ▶ Se è disponibile l'opzione di bypass, selezionare **Exit** (Esci) per bypassare il lavaggio post-corsa.

Esecuzione di un lavaggio post-corsa

- 1 Lavare la piastra del blocco termico con acqua deionizzata per rimuovere eventuali accumuli di sale.
- 2 Asciugare con un panno pulente che non lascia residui.
- 3 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata e chiudere il coperchio dello strumento.
- 4 Selezionare la casella di controllo per indicare che è presente acqua, quindi selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 5 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua in eccesso rimanente nel serbatoio di lavaggio. Evitare le porte di uscita per impedire alle fibre di entrare nei fori.
- 6 Selezionare la casella di controllo per indicare che il serbatoio di lavaggio è asciutto, quindi selezionare **Exit** (Esci).
Si apre la schermata Start (Avvio) e cBot 2 è pronto per un'altra corsa.

Conferma dell'erogazione dei reagenti (opzionale)

È possibile confermare l'erogazione dei singoli reagenti dalla piastra dei reagenti HiSeq High Output (TruSeq v3).

- 1 Ispezionare le estremità sigillate di ciascuna striscia di provette e verificare che tutte le capsule siano state forate.
- 2 Rilasciare ciascuna striscia di provette dalla base della piastra dei reagenti nel modo seguente.
 - a Afferrare saldamente la piastra dei reagenti, con la punta delle dita sotto la base.
 - b Premere delicatamente verso l'alto sulle provette centrali della striscia di provette.
- 3 Ispezionare ciascuna provetta per confermare che in ciascuna provetta rimanga un volume analogo. Leggere differenze sono normali.

Figura 27 Esempio di erogazione dei reagenti (cella a flusso a otto corsie)

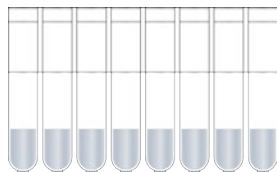
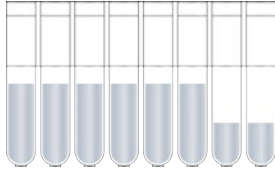


Figura 28 Esempio di erogazione dei reagenti corretta (cella a flusso a due corsie)



- 4 Se l'erogazione dei reagenti non è corretta e i sigilli sulle provette dei reagenti sono perforati, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
- 5 Ispezionare la striscia a otto provette contenente i template della libreria.
- 6 Se con la corsa sono stati usati primer aggiuntivi, ispezionare la striscia a otto provette contenente i primer.

Capitolo 6 Manutenzione

Esecuzione della manutenzione periodica	45
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione mensile	46
Sostituzione dell'adattatore portacelle	47
Aggiornamento del software	48
Aggiornamento delle ricette	49
Spegnimento di cBot 2	50

Esecuzione della manutenzione periodica

Per assicurare prestazioni ottimali, eseguire le fasi di manutenzione di base descritte in questa sezione.

Manutenzione	Frequenza	Descrizione
Lavaggio dello strumento	Tra ciascuna corsa e se lo strumento è inattivo per più di un giorno.	Eseguire sempre un lavaggio dello strumento dopo ogni corsa per eliminare sali ed enzimi dall'hardware dello strumento e per prevenire occlusioni. Se lo strumento è rimasto inattivo per più di 24 ore si raccomanda un lavaggio pre-corsa. Per maggiori informazioni, vedere <i>Esecuzione di un lavaggio pre-corsa a pagina 35</i> .
Svuotamento del flacone degli scarti	Tra ciascuna corsa.	Per assicurarsi che la corsa non venga interrotta, svuotare il flacone degli scarti tra le corse.
Pulizia delle superfici	Una volta alla settimana.	Utilizzare acqua deionizzata e un panno pulente che non lascia residui per pulire la superficie del blocco termico e del piano dei reagenti. Pulire la superficie dei portastrisce dei templati e dei primer.
Pulizia delle finestre dello scanner per codici a barre esterno e della cella a flusso	Una volta alla settimana.	Utilizzare un panno pulente che non lascia residui per pulire le finestre dello scanner per codici a barre esterno e della cella a flusso.
Lavaggio di manutenzione	Una volta al mese.	Utilizzare una soluzione DECON al 5% (o 100 mM di NaOH) per rimuovere tracce di reagenti dai componenti interni di cBot e inibire la crescita di microrganismi. Per maggiori informazioni, vedere <i>Esecuzione di un lavaggio di manutenzione mensile a pagina 46</i> .
Controllo del livello del refrigerante	Ogni tre mesi.	Assicurarsi che il refrigerante verde sia visibile attraverso la finestrella del refrigerante sul pannello posteriore dello strumento. Se necessario, utilizzare uno specchio per vedere la finestrella del liquido refrigerante. Se il livello è basso, utilizzare una moneta grossa o un cacciavite standard per rimuovere il tappo del serbatoio del refrigerante e riempire il serbatoio appena sotto il tappo. Utilizzare solo refrigerante fornito da Illumina (n. codice 1003709). Se è necessario ulteriore refrigerante, contattare un esperto delle applicazioni (FAS) o un tecnico dell'assistenza (FSE) Illumina.

Manutenzione preventiva

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

Esecuzione di un lavaggio di manutenzione mensile

Eseguire un lavaggio di manutenzione mensile utilizzando una soluzione di detergente DECON al 5% per rimuovere ogni traccia di reagente dai componenti interni di cBot e inibire la crescita microbica. Se la soluzione DECON non è disponibile, sostituirla con 100 mM di NaOH.

Il lavaggio di manutenzione è una procedura che richiede circa 10 minuti di interventi manuali ed è suddivisa in quattro fasi: un lavaggio con acqua, un lavaggio con DECON o NaOH e altri due lavaggi con acqua.

Lavaggio con acqua

- 1 Confermare che tutti i componenti della corsa siano stati rimossi.
- 2 Nella schermata Start (Avvio), selezionare **Menu** (Menu), quindi **Manual Commands** (Comandi manuali) per aprire la schermata Manual Commands (Comandi manuali).
- 3 Selezionare **Commands** (Comandi) per aprire la scheda Commands (Comandi).
- 4 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata.
- 5 Selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 6 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua in eccesso rimanente nel serbatoio di lavaggio con un panno a bassissimo rilascio di particelle.
Evitare le porte di uscita per impedire alle fibre di entrare nei fori.

Lavaggio con DECON (o NaOH)

- 1 Riempire il serbatoio di lavaggio con 10 ml di detergente DECON al 5% o 100 mM di NaOH.
- 2 Selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 3 Al termine del lavaggio, indossare un nuovo paio di guanti.
- 4 Asciugare la soluzione di DECON al 5% rimasta nel serbatoio di lavaggio con un panno a bassissimo rilascio di particelle. Evitare le porte di uscita.



ATTENZIONE

DECON è una soluzione altamente alcalina.

- 5 Lavare **immediatamente** con acqua per impedire alla soluzione di detergente DECON di asciugarsi e di intasare i fori del serbatoio di lavaggio.

Lavaggio con acqua (primo risciacquo)

- 1 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata.
- 2 Selezionare **Wash** (Lavaggio).
- 3 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua rimanente nel serbatoio di lavaggio con un panno a bassissimo rilascio di particelle. Evitare le porte di uscita.

Lavaggio con acqua (risciacquo finale)

- 1 Riempire il serbatoio di lavaggio con circa 12 ml di acqua deionizzata.
- 2 Selezionare **Wash** (Lavaggio).

- 3 Al termine del lavaggio, asciugare l'acqua rimanente nel serbatoio di lavaggio con un panno a bassissimo rilascio di particelle. Evitare le porte di uscita.
- 4 Chiudere il coperchio dello strumento.
- 5 Svuotare il flacone degli scarti.
cBot è pronto per la successiva corsa di generazione dei cluster.

Sostituzione dell'adattatore portacelle

Su cBot è possibile utilizzare una cella a flusso HiSeq. Ciascun tipo di cella a flusso richiede l'installazione di un adattatore portacelle specifico. Le icone sulla schermata Start (Avvio) indicano il tipo di adattatore portacelle installato.

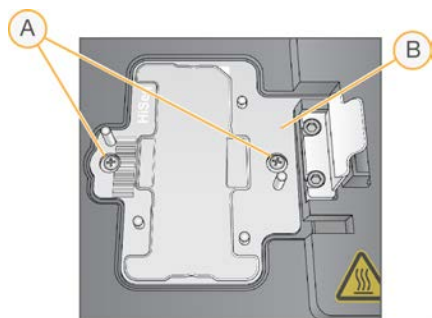


NOTA

cBot è già provvisto di adattatore portacelle HiSeq installato.

- 1 Aprire lo strumento sollevando delicatamente il coperchio dall'incisione che si trova nella parte anteriore del coperchio.
- 2 Sollevare il coperchio a scatto.
- 3 Allentare le due viti imperdibili Phillips che fissano l'adattatore portacelle.

Figura 29 Adattatore portacelle

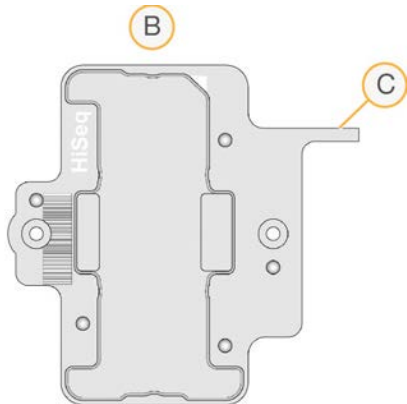


A Viti imperdibili

B Adattatore portacelle

- 4 Estrarre l'adattatore portacelle installato nel blocco termico e metterlo da parte.
- 5 In caso di presenza di sali sul blocco termico, passarvi un panno pulente che non lascia residui leggermente inumidito d'acqua.
- 6 Posizionare il nuovo adattatore portacelle sul blocco termico. Allineare il braccio sensore con la slot corrispondente sul lato destro del blocco termico.

Figura 30 Posizione del braccio sensore



- A Adattatore portacelle HiSeq
- B Braccio sensore dell'adattatore portacelle

- 7 Serrare le due viti per fissare l'adattatore portacelle.
Per un trasferimento termico ottimale, accertarsi che l'adattatore portacelle sia in posizione orizzontale, non inclinato, e che le viti siano serrate in maniera uniforme.
- 8 Pulire l'adattatore portacelle installato con un panno pulente che non lascia residui inumidito con acqua. Asciugare con un panno pulito.

Aggiornamento del software

Utilizzando il software cBot v1.3, o versione successiva, è possibile aggiornare il software dello strumento tramite una chiavetta USB.

- 1 Inserire la chiavetta USB con l'installer della nuova versione del software (ad esempio, cBotSetupX86_1.3.1.0.exe) in una delle porte USB nella parte anteriore dello strumento.
L'installer deve trovarsi in una directory di base della chiavetta USB, non in una cartella.



ATTENZIONE

Lasciare la chiavetta USB nella slot USB durante il processo di aggiornamento. Durante l'aggiornamento, non interagire con lo strumento.

- 2 Selezionare **Menu** (Menu) nell'angolo superiore sinistro della schermata Start (Avvio) e selezionare **Configure** (Configurazione).

Figura 31 Menu della schermata Start (Avvio)



- 3 Utilizzare la tastiera sullo schermo per digitare la password predefinita **admin** (amministratore) e selezionare **Enter** (Invio).
- 4 Selezionare **Menu** (Menu), quindi selezionare **Upgrade** (Aggiorna).
- 5 Si apre una finestra di dialogo con un messaggio relativo alla versione del software:

Messaggio	Intervento
The software installer version is greater than the version currently installed on the cBot (La versione dell'installer del software è successiva alla versione attualmente installata su cBot)	Selezionare OK per procedere con l'installazione della versione più recente.
cBot cannot find a valid software installer (cBot non è in grado di trovare un installer del software valido)	Inserire un aggiornamento di cBot valido e selezionare OK per riprovare o selezionare Cancel (Annulla) per interrompere l'aggiornamento.
The software installer version is equal or lower than the version currently installed on the cBot (La versione dell'installer del software è uguale o precedente alla versione attualmente installata su cBot)	Selezionare Cancel (Annulla) per interrompere l'aggiornamento o OK per procedere con l'installazione di una versione precedente.

- 6 Quando l'aggiornamento è completato e lo strumento viene riavviato, rimuovere la chiavetta USB.
- 7 Se viene visualizzato un errore BOOTMGR, collegare una tastiera e un mouse a cBot e premere **Ctrl+Alt+Del** per riavviare lo strumento.

Aggiornamento delle ricette

È possibile aggiornare le versioni delle ricette indipendentemente dagli aggiornamenti software usando una chiavetta USB contenente l'installer delle ricette.

- 1 Inserire la chiavetta USB con l'installer delle nuove ricette in una delle porte USB nella parte anteriore dello strumento.
L'installer deve trovarsi in una directory di base della chiavetta USB, non in una cartella.
- 2 Selezionare **Menu** (Menu) nell'angolo superiore sinistro della schermata Start (Avvio) e selezionare **Configure** (Configurazione).

Figura 32 Menu della schermata Start (Avvio)



- 3 Utilizzare la tastiera sullo schermo per digitare la password predefinita **admin** (amministratore) e selezionare **Enter** (Invio).
- 4 Selezionare **Menu** (Menu), quindi selezionare **Upgrade Recipes** (Aggiorna ricette). Al termine dell'aggiornamento, cBot si riavvia automaticamente. La procedura di riavvio impiega circa 10 minuti.



ATTENZIONE

Lasciare la chiavetta USB nella slot USB durante il processo di aggiornamento. Durante l'aggiornamento, non interagire con lo strumento.

- 5 Quando il riavvio è completato e si apre la finestra per il login, è possibile rimuovere la chiavetta USB.

Spegnimento di cBot 2

cBot 2 è progettato per continuare a funzionare in uno stato di inattività dalla schermata Start (Avvio), pertanto non è necessario spegnere lo strumento tra le corse.

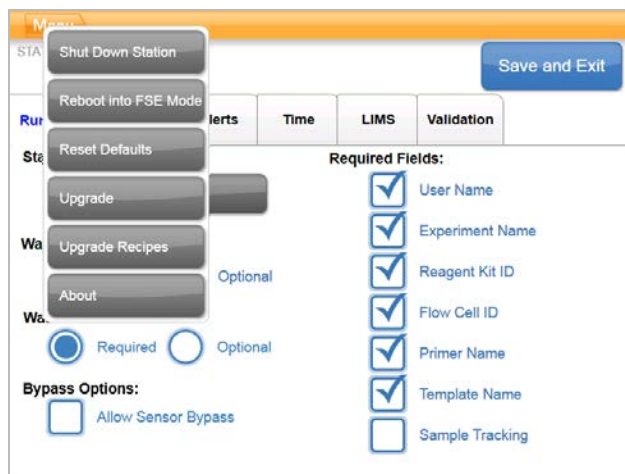
- 1 Selezionare **Menu** (Menu) nell'angolo superiore sinistro della schermata Start (Avvio) e selezionare **Configure** (Configurazione).

Figura 33 Menu della schermata Start (Avvio)



- Utilizzare la tastiera sullo schermo per digitare la password predefinita **admin** (amministratore) e selezionare **Enter** (Invio).
- Dalla schermata Configuration (Configurazione), selezionare **Menu** (Menu), quindi selezionare **Shut Down Station** (Spegnere la stazione).
Il software cBot si spegne.

Figura 34 Spegnimento della stazione



- Quando il software è spento, spostare l'interruttore di alimentazione in posizione OFF.

Riavvio in modalità FSE

L'opzione di riavvio in modalità FSE è destinata all'utilizzo da parte di un esperto delle applicazioni (FAS) o di un tecnico dell'assistenza (FSE) Illumina per aggiornare il software o eseguire la manutenzione sullo strumento.

Appendice A Risoluzione dei problemi

Sospensione o interruzione di una corsa	52
Risoluzione dei problemi in caso di mancata verifica del flusso	52
Risoluzione dei problemi di una corsa	54
Reimpostazione dello scanner per codici a barre esterno	55
Modifica dei protocolli	56

Sospensione o interruzione di una corsa

Usare i comandi della schermata Run Status (Stato della corsa) per sospendere o interrompere una corsa.

- ▶ **Pause** (Pausa): completa il comando corrente nel protocollo, quindi sospende la corsa. Dopo alcuni minuti la corsa viene sospesa. Quando la corsa è sospesa, i pescanti si sollevano dalle provette dei reagenti, il piano dei reagenti torna alla posizione iniziale e il pulsante Pausa (Pausa) passa a Resume (Riprendi).
 - ▶ Quando la corsa è attiva, selezionare **Pause** (Pausa) per sospendere la corsa.
 - ▶ Quando la corsa è sospesa, selezionare **Resume** (Riprendi) per riprendere la corsa.
- ▶ **Abort Run** (Interruzione corsa): termina la corsa senza l'opzione di ripresa della corsa. Selezionare **Unload** (Scarica) per scaricare i componenti della corsa.

Risoluzione dei problemi in caso di mancata verifica del flusso

Attenersi alla procedura seguente per risalire alle cause della mancata verifica del flusso. Non selezionare l'opzione di bypass della verifica del flusso prima di aver completato la presente procedura e aver determinato le condizioni seguenti:

- ▶ La cella a flusso è posizionata correttamente sullo strumento.
- ▶ Il collettore e l'hardware funzionano correttamente.



ATTENZIONE

Il bypassaggio della verifica della cella a flusso può provocare una mancata generazione di cluster in alcune corsie.

Poiché diversi tipi di celle a flusso utilizzano diverse verifiche del flusso, assicurarsi di utilizzare la combinazione corretta di ricetta, collettore e cella a flusso.

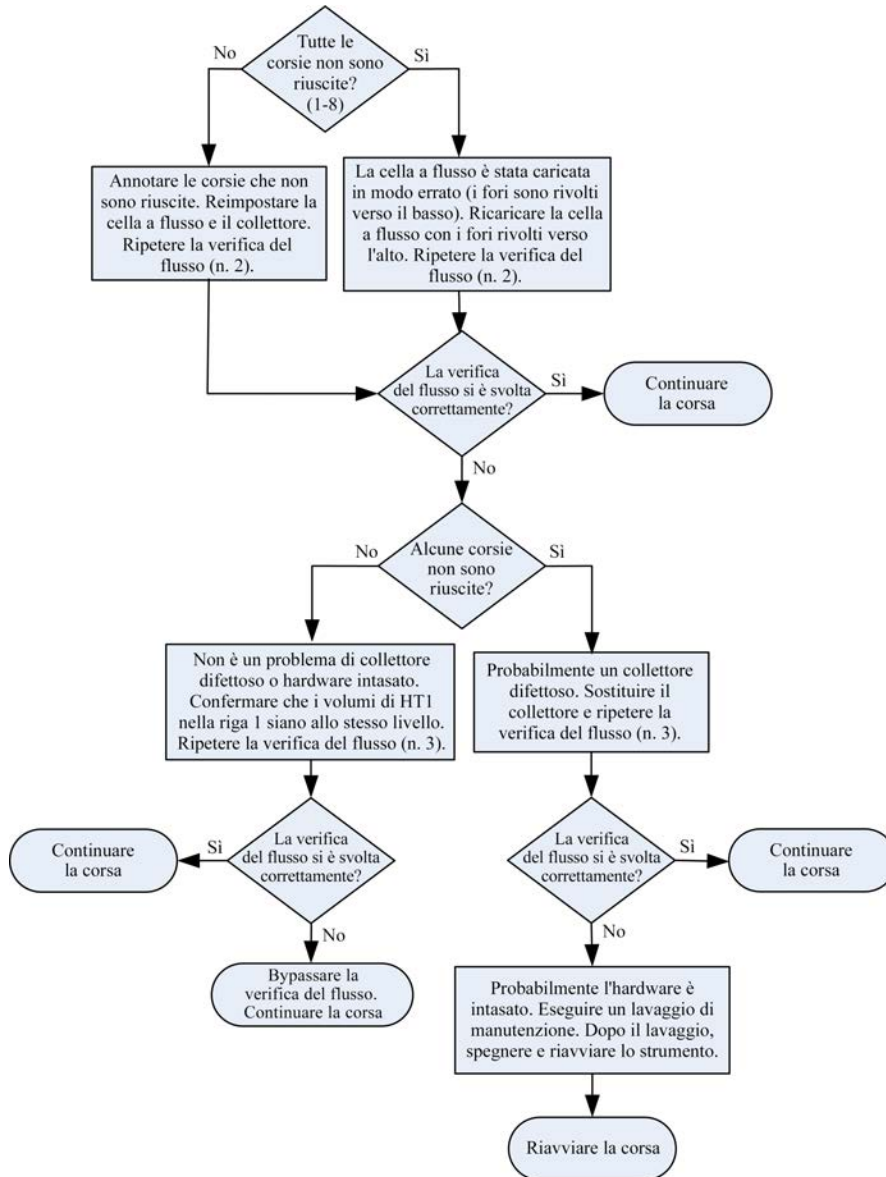
- 1 Assicurarsi di avere a disposizione HT1 sufficiente nella riga 1 della piastra dei reagenti e rabboccare in base a necessità.
- 2 Annotare in quali corsie la verifica del flusso non è riuscita. Queste informazioni sono visualizzate nell'angolo superiore sinistro della schermata dell'interfaccia.
 - ▶ Se la verifica non è riuscita su tutte le otto corsie, è probabile che la cella a flusso non sia stata caricata correttamente. Rimuovere il collettore e confermare che i fori della cella a flusso siano rivolti verso l'alto e che l'orientamento della cella a flusso sia corretto.
 - ▶ Se la verifica non è riuscita solo su alcune corsie, è possibile che la cella a flusso non sia fissata in sede. Rimuovere il collettore, reinserire la cella a flusso e reinstallare il collettore.
- 3 Selezionare **Rerun Check** (Riesegui verifica) per ripetere la verifica del flusso una seconda volta.
- 4 Se la verifica non riesce una seconda volta, annotare le corsie in errore ed eseguire una delle operazioni qui descritte:
 - ▶ Se l'errore interessa tutte le otto corsie, è probabile che il collettore sia difettoso. Sostituirlo con un nuovo collettore.

- ▶ Se l'errore interessa solo alcune corsie, è probabile che il collettore non sia difettoso. Ispezionare i volumi di HT1 nella riga 1 per accertarsi che il livello sia equivalente in tutte le provette.
- 5 Selezionare **Rerun Check** (Riesegui verifica) per ripetere la verifica del flusso una terza volta.
 - ▶ Se la verifica non riesce dopo aver sostituito il collettore, passare al punto 6.
 - ▶ Se la verifica non riesce senza aver sostituito il collettore perché non necessario, passare al punto 7.
- 6 Se la verifica del flusso dà esito negativo una terza volta dopo aver sostituito il collettore, è possibile che si sia creata un'occlusione nell'hardware.
 - a Ispezionare i volumi di HT1 nella riga 1 per accertarsi che il livello sia equivalente in tutte le provette. I volumi più alti nelle provette che corrispondono alle corsie nelle quali si è verificata la ripetuta mancata verifica del flusso indicano un'occlusione dell'hardware.
 - b Scaricare i componenti della corsa ed eseguire un lavaggio di manutenzione.
 - c Dopo il lavaggio, spegnere lo strumento mediante l'interruttore di alimentazione. Attendere alcuni secondi, portare l'interruttore in posizione di accensione e premere il pulsante di avvio per riavviare il software. Lo spegnimento e il riavvio dello strumento reimposta il numero di tentativi consentito per la verifica pre-corsa.
 - d Attenersi alle istruzioni del software per ricaricare i componenti e impostare la corsa.
- 7 Se la verifica del flusso non riesce una terza volta, è possibile bypassare in sicurezza la verifica del flusso:
 - a Selezionare **Bypass Flow Check** (Bypassa verifica flusso) per procedere con la corsa.
 - b Al termine della corsa, verificare l'erogazione dei reagenti da tutte le provette.

Diagramma della procedura di risoluzione dei problemi

Il diagramma seguente illustra la procedura di risoluzione dei problemi. Le fasi di ripetizione della verifica del flusso sono numerate per indicare quanti dei tentativi consentiti sono stati eseguiti nel corso della procedura.

Figura 35 Diagramma della procedura di risoluzione dei problemi



Risoluzione dei problemi di una corsa

Utilizzare la tabella seguente per risolvere eventuali problemi riscontrati durante la corsa di generazione dei cluster.

Problema	Possibile causa	Intervento
Temperatura fuori intervallo	Spesso indica che cBot non ha raggiunto la temperatura richiesta nel tempo previsto. Può indicare anche un potenziale mancato funzionamento della scheda di controllo.	Inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.
Il refrigerante scorre e il livello è basso	Il refrigerante è lentamente evaporato raggiungendo un livello basso.	Aggiungere al serbatoio del refrigerante il refrigerante fornito da Illumina (n. codice 1003709).
Il refrigerante non scorre e il livello è basso	Il livello del refrigerante potrebbe essere troppo basso per fornire un flusso.	Aggiungere al serbatoio del refrigerante il refrigerante fornito da Illumina (n. codice 1003709).
Il refrigerante non scorre e il livello non è basso	Possibile mancato funzionamento della pompa del refrigerante.	Inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.
Lo strumento è in stato di blocco	Possibile errore software.	Inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.

Reimpostazione dello scanner per codici a barre esterno

Alla ricezione di cBot, lo scanner per codici a barre esterno è pronto per l'utilizzo. Tuttavia, nel caso in cui lo scanner venga resettato a una configurazione errata, utilizzare le istruzioni seguenti per ripristinare la configurazione predefinita.

- 1 Stampare il codice a barre.

Figura 36 Ripristino del codice a barre predefinito



- 2 Dalla schermata Start (Avvio), selezionare **Menu** (Menu), quindi selezionare **Manual Commands** (Comandi manuali).
- 3 Selezionare la scheda **General** (Generale) per accedere agli input per il controllo manuale del lettore per codici a barre.

Figura 37 Comandi manuali della scheda General (Generale)



- 4 Selezionare **Turn Off** (Spegni), quindi selezionare **Turn On** (Accendi) per attivare lo scanner per codici a barre.
La linea del laser è visibile sulla piastra dello scanner sotto lo schermo LCD.
- 5 Posizionare il codice a barre sotto lo scanner per codici a barre esterno.
- 6 Selezionare **Turn Off** (Spegni), quindi selezionare **Turn On** (Accendi) per eseguire la scansione del codice a barre.
Un segnale acustico indica una scansione corretta.

Modifica dei protocolli

Utilizzare Protocol Editor (Editor protocolli) per modificare i protocolli in base alle esigenze. È possibile ripetere determinate fasi di un protocollo o cambiare il numero di cicli di amplificazione nella sezione Chemistry (Chimica).

Ciascun protocollo è suddiviso in due sezioni principali:

- ▶ **Sezione Chemistry (Chimica):** contiene le istruzioni relative al pompaggio dei reagenti, alle variazioni della temperatura e agli intervalli di attesa. Questa sezione appare nella parte superiore della schermata Protocol Editor (Editor protocolli).
- ▶ **Sezione Protocol (Protocollo):** contiene una serie di fasi costituite da definizioni della chimica. Questa sezione appare nella parte inferiore della schermata Protocol Editor (Editor protocolli).

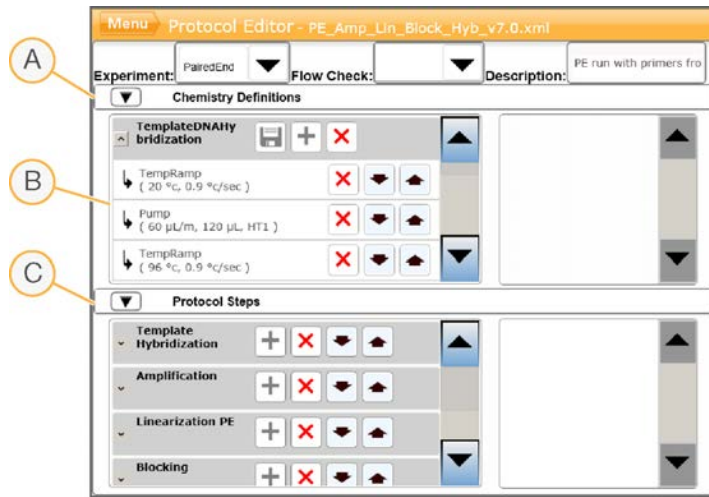
Se si modifica un protocollo esistente, assicurarsi di rinominare il protocollo.

Protocol Editor (Editor protocolli)

- 1 Dalla schermata Start (Avvio), selezionare **Menu** (Menu), quindi selezionare **Protocol Editor** (Editor protocolli).
- 2 Da Protocol Editor (Editor protocolli), selezionare **Menu** (Menu), quindi selezionare il comando appropriato:
 - ▶ **Open** (Apri): apre un protocollo esistente.
 - ▶ Selezionare **Load from Library** (Carica da libreria): carica una definizione chimica esistente o una fase di protocollo memorizzata nella libreria di cBot.
 - ▶ Selezionare **New Chemistry Definition** (Nuova definizione chimica) o **New Protocol Step** (Nuova fase di protocollo): crea una definizione o fase e la memorizza nella libreria di cBot.






- 3 Utilizzare la freccia in giù a sinistra della fase per espandere l'elenco dei comandi. Utilizzare la freccia in su per comprimerlo.
- 4 Per modificare una fase in una definizione chimica, evidenziare la fase desiderata. Nel riquadro di destra appaiono le selezioni disponibili per cambiare la pompa, la rampa di temperatura o i comandi di attesa.
- 5 Per modificare una fase nel protocollo, evidenziare la fase desiderata. Nel riquadro di destra appaiono le opzioni disponibili per modificare il numero di cicli nell'ambito della definizione chimica selezionata.
- 6 Utilizzare le icone di Protocol Editor (Editor protocolli) visualizzate a destra del nome della fase per riordinare, eliminare o copiare fasi e comandi.

Figura 38 Protocol Editor (Editor protocolli), fasi espande



- A Sezione Chemistry (Chimica)
- B Sezione Chemistry (Chimica) espansa
- C Sezione Protocol (Protocollo)

Icone di Protocol Editor (Editor protocolli)

Icona	Descrizione
	Sposta la fase evidenziata sotto la fase successiva nel protocollo.
	Sposta la fase evidenziata sopra la fase precedente nel protocollo.
	Elimina la fase evidenziata.
	Duplica la fase evidenziata.
	Salva le modifiche nella libreria dei protocolli.

Indice

A

- adattatore portacelle 47
- adattatori portacelle
 - lavaggio 25, 37
- aiuto
 - documentazione 2
- alluminio non forato 33, 44
- arresto di una corsa 52
- assistenza 51
- assistenza clienti 62
- assistenza tecnica 62
- attivazione scanner esterno 28

B

- blocco termico 3
 - lavaggio 32, 43
- bypass verifica flusso 52

C

- campione di controllo PhiX
 - aggiunta 14, 18
- caricamento librerie 25
- cella a flusso
 - confezione 12, 16
 - conservazione 30, 41
 - preparazione 12, 16
 - pulizia 12, 16
 - ricette compatibili 10
 - scansione codici a barre 28
- celle a flusso
 - adattatore portacelle 47
 - compatibilità monitoraggio campioni 22
 - posizionamento 25, 37
 - preparazione per il caricamento 25, 37
- chiusura 50
- Clarity LIMS X Edition 1
- collettore
 - morsetto di uscita 27, 38
 - pettine di aspirazione 3, 27, 38
- collettori 26, 37
- Comandi manuali 46
- compatibilità versione
 - materiali di consumo 9
 - software 9
- componenti 2
- configurazione 4-5

- configurazione monitoraggio campioni 22
- configurazione, informazioni 22
- conservazione cella a flusso 25, 37
- conservazione della cella a flusso 31, 42
- conservazione delle celle a flusso 30-31, 41-42
- corsa
 - avvio 40

D

- DECON 46
- DECON al 5% 46
- denaturazione 22, 34
- denaturazione librerie 14, 18
- diluizione 22, 34
- documentazione 2, 62
- documentazione kit 5
- durata generazione di cluster 30, 41
- durata lavaggio manutenzione 46

E

- erogazione reagenti, non riuscita 33, 44
- errore scansione codice a barre 28
- errori componenti corsa 40
- errori scansione 28
- errori software 54
- ExAmp Master Mix 19

F

- fasi di generazione di cluster 29, 40
- flacone degli scarti 45

G

- guida, tecnica 62

H

- HP10, preparazione 20

I

- icone
 - stato sensori 4
- icone stato sensori 4
- intervallo temperatura 54

L

- lavaggi 23, 35
 - frequenza 45
- lavaggio
 - adattatori portacelle 25, 37
- lavaggio dello strumento 32, 43
- lavaggio post-corsa 45
- lavaggio pre-corsa 45
- lavaggio serbatoio 23, 35
- librerie
 - caricamento 25
- librerie
 - caricamento 39
 - concentrazione di caricamento 14, 18
 - denaturazione 14, 18
 - diluizione 14, 18

M

- mancata verifica del flusso
 - risoluzione dei problemi 54
- manutenzione 32, 43, 46
 - periodica 45
- manutenzione preventiva 45
- manutenzione, preventiva 45
- materiali di consumo
 - compatibilità versione 9
 - scaricamento 30, 41
- materiali di consumo forniti dall'utente
 - preparazione dei reagenti 10
- materiali di consumo, forniti dall'utente
 - preparazione reagenti 10
- messaggi di errore 54
- migliori pratiche
 - preparazione dei reagenti 11
- modalità FSE 51
- monitoraggio campioni
 - configurazione 22
- monitoraggio dei campioni
 - compatibilità cella a flusso 22
 - informazioni su 1

N

- NaOH 46
- numeri di codice
 - refrigerante 54
- numero di codice refrigerante 54
- nuove verifiche dei sensori 29

P

- panoramica
 - flusso di lavoro con monitoraggio dei campioni 23
 - flusso di lavoro per generazione di cluster 34
- PhiX
 - aggiunta in % 14, 18
- piano dei reagenti 4
- piastra dei reagenti 4
 - configurazioni 7
 - preparazione 14, 19
 - scongelamento 13, 17, 20
- piastra dei reagenti, corsa rapida
 - preparazione 21
- piastra dei reagenti, output elevato
 - preparazione 20
- piastre dei reagenti
 - posizionamento 24, 36
- piastre dei reagenti cBot 7
- posizionamento celle a flusso 25, 37
- preparazione dei reagenti
 - migliori pratiche 11
- primer
 - caricamento 39
 - inserimento nome 39
 - nome, inserimento 28
 - orientamento striscia provette 39
 - personalizzati 39
- problemi al collettore 54
- problemi al refrigerante 54
- procedure post-corsa 30, 41
- progresso corsa 29, 40
- Protocol Editor (Editor protocolli) 56
 - icone 57
- protocolli chimica 56
- protocolli, modifica 56
- protocollo
 - selezione 28, 36

R

- reagenti
 - scansione codici a barre 28
- reagenti ExAmp
 - informazioni su 11, 15
 - preparazione 19
 - preparazione, quattro celle a flusso 15
 - preparazione, una cella a flusso 15
 - scongelamento 13, 17

- reagenti generazione di cluster
 - preparazione 11
- reagenti, preparazione
 - cella a flusso HiSeq X 11
 - corsa rapida 20
 - HiSeq 3000/4000 15
 - output elevato 19
- reazione ExAmp
 - preparazione, quattro celle a flusso 15
 - preparazione, una cella a flusso 15
- refrigerante
 - livello 45
- report dati corsa 30, 41
- requisiti corsa
 - configurazione 5
- ricette
 - aggiornamento 49
- ricette, elenco delle 10
- riepilogo corsa 30, 41
- riga templati 25
- rimozione striscia a otto provette 32, 43
- ripresa di una corsa 52
- risoluzione dei problemi
 - mancata verifica del flusso 52

S

- sali, rimozione 32, 43
- scanner 2
- scanner codici a barre esterno
 - reimpostazione 55
- scanner codici a barre, esterno
 - reimpostazione 55
- scanner per codici a barre esterno
 - pulizia 45
- scanner per codici a barre, esterno
 - pulizia 45
- schermata Run Status (Stato della corsa) 29, 40
- scongelo piastra dei reagenti 13, 17
- sensori 2
- SeqLab Illumina 1
- sigilli non forati 33, 44
- sigillo bianco 24, 36
- sigillo, bianco 24, 36
- software
 - aggiornamento 48
 - compatibilità versione 9
- sostituzione di DECON 46
- spegnimento 50
- stato inattivo 50
- stato sistema 4

T

- temperatura fuori intervallo 54
- templati
 - caricamento 39
- terminazione di una corsa 52

V

- verifica flusso 40
 - risoluzione dei problemi non riuscita 52
- verifica pre-corsa
 - errori 40
 - esecuzione 40
- verifica pre-corsa non riuscita 29
- verifiche del flusso non riuscite 54
- volumi erogati 32, 43

Assistenza Tecnica

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

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

Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

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

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

Documentazione sul prodotto: disponibile per il download all'indirizzo support.illumina.com.

