

Este documento e seu conteúdo são de propriedade da Illumina, Inc. e de suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se exclusivamente ao uso contratual de seu cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e para nenhuma outra finalidade. Este documento e seu conteúdo não devem ser usados ou distribuídos para nenhuma outra finalidade nem comunicados, divulgados e/ou reproduzidos de nenhuma forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não concede nenhuma licença sob seus direitos de patente, marca comercial, direitos autorais ou lei comum, nem direitos semelhantes de terceiros por meio deste documento.

As instruções neste documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo deste documento deve ser lido e compreendido por completo antes da utilização de tais produtos.

NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AO(S) PRODUTO(S), FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUSIVE USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS, ANULANDO TODA GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).

A ILLUMINA NÃO SE RESPONSABILIZA POR QUALQUER PROBLEMA CAUSADO PELO USO INDEVIDO DO(S) PRODUTO(S) MENCIONADO(S) ACIMA (INCLUINDO PARTES SEPARADAS OU O SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v07	Outubro de 2021	Três filtros de ar sobressalentes incluídos na seção Substituir filtro de ar. Cartuchos novos e de legado incluídos no manual.
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v06	Junho de 2019	Adicionadas informações de grupo de trabalho para o BaseSpace Sequence Hub durante a definição da execução. Adicionadas informações do caminho de UNC para a pasta de saída. Adicionadas soluções de problemas para erros de armazenamento de rede. Esclarecido que as instruções do filtro de ar são para instrumentos com filtro acessível pelo painel traseiro. Atualizado o local dos arquivos que estavam na pasta raiz para executar pastas específicas para a pasta de saída.

Documento	Data	Descrição da alteração
<p>Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v05</p>	<p>Dezembro de 2018</p>	<p>Atualizadas as descrições do software, as telas e o fluxo de trabalho para o NextSeq Control Software (NCS) 4.0. Atualizadas as seguintes informações adicionais para o NCS 4.0:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionadas informações sobre o software Local Run Manager. • Atualizadas informações do BaseSpace para o BaseSpace Sequence Hub. A guia BaseSpace Prep e o BaseSpace Onsite não estão mais disponíveis. • Adicionadas instruções sobre a seleção do modo de execução Local Run Manager ou manual. O modo manual substitui o modo independente, com algumas modificações. • Adicionada a opção de verificar atualizações do software do instrumento no BaseSpace Sequence Hub. • Adicionados o Local Run Manager, o Serviço de cópia universal e o driver do Acesso direto à memória à descrição do pacote do System Suite. Removidos o BaseSpace Broker e o SAV. • O Serviço de cópia de execução agora é Serviço de cópia universal. • Adicionada a opção de habilitar receitas personalizadas ao carregar o cartucho de reagente. • Removida a descrição da imagem da lâmina de fluxo ao monitorar o progresso da execução. • Removida a opção de selecionar inicialização para modo quiosque e Windows. • Adicionadas instruções de manutenção para instrumentos com uma atualização do filtro de ar. • Adicionados novos ícones para atenção, informações e minimizar o NCS. • Atualizadas as instruções para personalizar as configurações da execução e as configurações do sistema. • Atualizada a opção de enviar dados de desempenho do instrumento. • Atualizados os ícones de transferência de dados. • Esclarecido que, para varredura, os arquivos na fila para transferência não têm limite de tempo. • Corrigidas as referências de BSM para Buffer Straw Mechanism nas informações de verificações de movimento. <p>Adicionado metanol ou álcool isopropílico reagente ou de grau espectrofotométrico (99%) para a manutenção do instrumento.</p>
<p>Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v04</p>	<p>Mai de 2018</p>	<p>Adicionado suporte para reagentes NextSeq v2.5. Atualizadas as informações de armazenamento/envio para kits de reagentes NextSeq v2.5 que enviam lâminas de fluxo a temperaturas ambientes. As lâminas de fluxo NextSeq v2.5 continuam requerendo condições prévias de armazenamento. Acrescentadas informações sobre kits de reagentes NextSeq v2.5 que exigem atualizações de software para a versão 2.2. Adicionada observação referente à concentração de carregamento do kit de média produção. Adicionada observação referente a salvar as lâminas de fluxo. Adicionada observação recomendando que sejam usadas lâminas de fluxo de alta produção para verificações do sistema.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20006818 Documento n.º 15046563 v03	Março de 2018	Removido o nome de usuário padrão e senha requeridos para fazer login no sistema operacional. A Illumina recomenda usar credenciais específicas do site. Adicionadas informações sobre o serviço de monitoramento do Illumina Proactive na seção Selecionar configuração do BaseSpace. Referências de software RTA v2 atualizadas para RTA2.
Material n.º 20006818 N.º do documento 15046563 v02	Março de 2016	Foi adicionada uma seção intitulada Considerações de indexação. Foram removidas as etapas para inspecionar a lâmina de fluxo. Foram especificados o volume e a concentração de carregamento na etapa para carregar bibliotecas no cartucho de reagente.
Material n.º 20001879 N.º do documento 15046563 v01	Outubro de 2015	Foi especificado que um equivalente para o fornecedor recomendado de NaOCl é um equivalente aprovado para uso em laboratório. Foi adicionada a recomendação para o serviço de manutenção preventiva anual. Foram reorganizadas as informações dos capítulos Visão geral e Noções básicas. Foram adicionadas instruções para personalizar as configurações do sistema. Foram removidas as instruções sobre Live Help do capítulo de solução de problemas. Esse recurso foi removido do software de controle.
Peça n.º 15046563 Rev. I	Maio de 2015	Foi corrigida a descrição dos reservatórios reservados sobre o cartucho de reagente.
Peça n.º 15046563 Rev. A	Maio de 2015	Foi corrigido o volume de Tween 20 na solução de limpeza usada para limpezas manuais. As informações sobre opções de configuração do sistema foram reestruturadas. As informações sobre o software Real-Time Analysis foram movidas para o Apêndice A.

Documento	Data	Descrição da alteração
Peça n.º 15046563 Rev. G	Fevereiro de 2015	<p>As descrições sobre o NextSeq Control Software v1.4. foram atualizadas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foram adicionadas opções de limpeza manual: Quick Wash (Limpeza rápida) e Manual Post-Run Wash (Limpeza manual após a execução). • Foram adicionadas descrições de recursos de personalização para descartar materiais de consumo ao final da execução e pular a confirmação da verificação antes da execução. • Foi adicionada a opção de cancelar e reiniciar uma verificação antes da execução. • Foi adicionada a opção de habilitar o monitoramento de execução no modo independente. • Foi removida a descrição de arquivos de offset e phasing, que não são mais gravados na pasta da execução. • A imagem do gráfico de dispersão foi atualizada para mostrar identificações de bases distribuídas mais uniformemente ao usar a versão 1.4 do software do sistema. • Foi adicionada a descrição do serviço de cópia de execução. • Foi adicionada a opção de usar um primer personalizado de índice 2, possível com o Kit NextSeq 500 v2. Para obter mais informações, consulte o <i>Guia de primers personalizados NextSeq (documento n.º 15057456)</i>. <p>Foram atualizadas as instruções de preparação de reagentes para utilizar o Kit NextSeq 500 v2: foram removidas as etapas manuais para carregar hipoclorito de sódio e os primers de indexação dupla no cartucho de reagente. Esses reagentes são pré-carregados no cartucho de reagente da versão 2. Para obter mais informações, consulte o <i>Guia de referência do Kit NextSeq 500/550 v2 (documento n.º 15058065)</i>.</p> <p>Foi adicionada a seção Materiais de consumo para sequenciamento, que enumera as versões dos kits, as versões do NCS compatíveis e o nome e número de peça do respectivo guia de referência do kit.</p> <p>Foram atualizados os materiais de consumo fornecidos pelo usuário para especificar os usos de NaOCl para as opções de limpeza manual apresentadas no NCS v1.4.</p> <p>Foram corrigidos os requisitos para o filtro de passagem de clusters para não mais que uma identificação de base abaixo da pureza nos primeiros 25 ciclos.</p> <p>Foi adicionado o volume de 120 ml de água aprovada para uso em laboratório às instruções de verificação do sistema.</p>
Peça n.º 15046563 Rev. F	Setembro de 2014	<p>Foram corrigidas as descrições de recursos do NextSeq Control Software v1.3.</p> <p>Foi atualizado o URL das planilhas de dados de segurança (SDS, Safety Data Sheets) para support.illumina.com/sds.html.</p> <p>As marcações dos produtos NextSeq foram atualizadas de "™" para "®".</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Peça n.º 15046563 Rev. E	Agosto de 2014	<p>As descrições sobre o NextSeq Control Software v1.3. foram atualizadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foram atualizadas as descrições dos comandos System Customization (Personalização do sistema) e Software Updates (Atualizações de software) na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento). • Foi atualizada a descrição da tela Pre-Run Check (Verificação antes da execução), que agrupa os itens verificados em quatro categorias expansíveis. • Foram atualizadas as instruções da Ajuda ao vivo para acessar o recurso usando o URL. O ícone na tela Home (Página inicial) não está disponível no NCS v1.3. • Foi adicionado o procedimento de nova hibridização do instrumento para fazer uma nova hibridização no primer da Leitura 1. A opção de fazer uma nova hibridização na lâmina de fluxo é compatível com o NCS v1.3 ou posterior e requer cartuchos de reagente e de tampão novos. <p>Foi adicionado o <i>Guia de primers personalizados do NextSeq</i> (documento n.º 15057456) à lista de recursos adicionais.</p>
Peça n.º 15046563 Rev. D	Junho de 2014	<p>Foram adicionadas instruções para carregar o BP13 na posição n.º 18 do cartucho de reagente ao realizar execuções de indexação dupla. Foi corrigido o ciclo em que as métricas de densidade de cluster são exibidas, que é o ciclo 25.</p> <p>Foram corrigidas as posições do cartucho de reagente para primers personalizados como posição n.º 7 (Leitura 1), n.º 8 (Leitura 2) e n.º 9 (Índice 1).</p> <p>Foi adicionada uma nota sobre danos possíveis ao mudar o instrumento de lugar após a instalação. Sempre entre em contato com o representante da Illumina antes de mudar o instrumento de lugar.</p> <p>Foi atualizado o URL das planilhas de dados de segurança (SDS, Safety Data Sheets) para support.illumina.com/sds.ilmn.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Peça n.º 15046563 Rev. C	Abril de 2014	<p>Foram atualizadas as descrições do NextSeq Control Software v1.2 e do RTA v2.1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foi adicionado o nome da receita do NextSeq Mid para uso com o kit de média produção NextSeq 500. • Foram removidas as instruções para adicionar NaOCl ao cartucho de limpeza de tampão para uma limpeza manual. • Foi corrigido o volume de NaOCl para 3 ml para a posição 28 do cartucho de reagente, que é necessário para a limpeza automática após a execução. • Foi adicionada uma observação de que nomes longos de execuções são exibidos em um campo de rolagem na tela Run Setup (Configuração da execução). • Foi adicionada uma observação de que o RTA v2 não aplica correções de phasing e prephasing a leituras de indexação. • Foi adicionada a descrição de arquivos de registro para enumerar os arquivos usados para solução de problemas. • Foram adicionadas instruções para esvaziar o receptáculo de reagentes gastos durante uma execução. • Foi adicionada a descrição das pastas de receitas, incluindo a localização de receitas personalizadas. • Foi adicionada a descrição de verificações térmicas para ventoinhas e sondas térmicas.

Documento	Data	Descrição da alteração
Peça n.º 15046563 Rev. B	Fevereiro de 2014	<p>As descrições sobre o NextSeq Control Software v1.1. foram atualizadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foi adicionado o recurso de busca na tela Run Setup (Configuração da execução) para filtrar a lista de execuções disponíveis. • Foi adicionado que as receitas disponíveis incluem NextSeq High ou NextSeq Mid, dependendo do tipo de lâmina de fluxo. • Foi adicionada a observação de que as atualizações de software incluem o contrato de licença, as notas da versão e uma lista dos softwares a serem atualizados. • Foi adicionada a descrição da mensagem de erro RAID. • Foi adicionada a observação de que o botão Exit (Sair) fecha o NSS e reinicia o NCS automaticamente ao final de uma verificação do sistema. <p>Foi adicionada a duração do armazenamento de reagentes de até uma semana a 4 °C.</p> <p>Foi atualizado o rótulo do reservatório n.º 10 no cartucho de reagente para Load Library Here (Carregar biblioteca aqui).</p> <p>A lista de materiais de consumo fornecidos pelo usuário foi atualizada para especificar o hipoclorito de sódio de 3% a 6% e um número no catálogo de fornecedores.</p> <p>Foram atualizadas as instruções para preparar uma diluição de 0,06% de NaOCl para limpezas do instrumento, que inclui uma redução do volume para 2 ml e uma concentração inicial entre 3% e 6%.</p> <p>Foram adicionadas ilustrações para mostrar as posições correta e incorreta de clipe na lâmina de fluxo.</p> <p>Foi atualizado o capítulo Real-Time Analysis para incluir uma visão geral do RTA v2, a estrutura da pasta de saída e o processo de identificação de bases.</p> <p>Foi atualizado o capítulo de solução de problemas para incluir erros do RTA v2 e incluir o arquivo RunParameters.xml na lista de arquivos de solução de problemas.</p>
Peça n.º 15046563 Rev. A	Janeiro de 2014	Versão inicial.

Índice

Capítulo 1 Visão geral	1
Introdução	1
Recursos adicionais	1
Componentes do instrumento	2
Visão geral dos materiais de consumo de sequenciamento	5
Capítulo 2 Noções básicas	10
Inicialização do instrumento	10
Personalizar configurações do sistema	10
Personalizar configurações da execução	12
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	13
Capítulo 3 Sequenciamento	15
Introdução	15
Criar execução com o software Local Run Manager	16
Criar a execução com o NCS	16
Preparar o cartucho de reagente	16
Preparar a lâmina de fluxo	17
Preparar bibliotecas para sequenciamento	18
Configurar uma Execução do sequenciamento	18
Monitorar o progresso da execução	25
Limpeza automática após a execução	27
Capítulo 4 Manutenção	28
Introdução	28
Realizar uma limpeza manual	28
Trocar o filtro de ar	31
Atualizações de software	32
Desligar o instrumento	34
Apêndice A Solução de problemas	35
Introdução	35
Arquivos de solução de problemas	35
Resolver erros da verificação automática	36
O receptáculo de reagentes gastos está cheio	37
Fluxo de trabalho de nova hibridização	38
Receitas personalizadas e pastas de receitas	40
Verificação do sistema	40
Mensagem de erro RAID	42
Erro de armazenamento de rede	43
Definir as configurações do sistema	43
Apêndice B Real-Time Analysis	46

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	46
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	47
Arquivos de saída de sequenciamento	51
Blocos da lâmina de fluxo	51
Estrutura da pasta de saída	55
Índice	56
Assistência técnica	59

Capítulo 1 Visão geral

Introdução	1
Recursos adicionais	1
Componentes do instrumento	2
Visão geral dos materiais de consumo de sequenciamento	5

Introdução

O sistema Illumina® NextSeq™ 500 combina o poder do sequenciamento de alto rendimento com a simplicidade de um instrumento de sequenciamento para desktop.

Recursos

- ▶ **Sequenciamento de alto rendimento** — O NextSeq 500 permite o sequenciamento de exomas, genomas inteiros e transcriptomas e oferece suporte às bibliotecas TruSeq™, TruSight™ e Nextera™.
- ▶ **Tipos da lâmina de fluxo** — As lâminas de fluxo estão disponíveis em configurações de alta e de média produção. Cada tipo da lâmina de fluxo é equipado com um cartucho de reagente compatível pré-carregado.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** — O software de análise integrada realiza a análise de dados do instrumento, o que inclui análise de imagens e identificação de bases. O NextSeq usa uma implementação de RTA chamada RTA v2, que inclui diferenças significativas de arquitetura e recursos. Para obter mais informações, consulte *Real-Time Analysis* na página 46.
- ▶ **Análise na nuvem com o BaseSpace™ Sequence Hub** — O fluxo de trabalho de sequenciamento é integrado com o BaseSpace Sequence Hub, o ambiente de computação genômica na nuvem da Illumina para monitoramento da execução, análise de dados, armazenamento e colaboração. Conforme a execução continua, os arquivos de saída são transmitidos em tempo real para o BaseSpace Sequence Hub para análise.
- ▶ **Análise de dados do instrumento** — O software Local Run Manager analisa os dados da execução de acordo com o módulo de análise especificado para a execução.

Recursos adicionais

A documentação a seguir está disponível para download no site da Illumina.

Recurso	Descrição
<i>Guia de preparação do local do sistema NextSeq (documento n.º 15045113)</i>	Fornecer especificações para a área do laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais.
<i>Guia de conformidade e segurança do sistema NextSeq (documento n.º 15046564)</i>	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e rotulagem de instrumentos.
<i>Guia do usuário do Leitor RFID – Modelo n.º TR-001-44 (documento n.º 15041950)</i>	Fornecer informações sobre o leitor RFID no instrumento, certificações de conformidade e considerações de segurança.
<i>Desnaturação e diluição de bibliotecas para o sistema NextSeq (documento n.º 15048776)</i>	Fornecer instruções de desnaturação e diluição de bibliotecas preparadas para uma execução de sequenciamento e para a preparação de um controle de PhiX opcional. Essa etapa se aplica à maioria dos tipos de bibliotecas.

Recurso	Descrição
<i>Guia de primers personalizados NextSeq (documento n.º 15057456)</i>	Fornecer informações sobre o uso de primers de sequenciamento personalizados em vez de primers de sequenciamento da Illumina.
<i>Ajuda do BaseSpace</i>	Fornecer informações sobre o uso do BaseSpace™ Sequence Hub e de opções de análise disponíveis.
<i>Guia do software Local Run Manager (documento n.º 100000002702)</i>	Fornecer uma visão geral do software Local Run Manager e instruções para o uso dos recursos do software.

Visite a [página de suporte do NextSeq 500](#) no site da Illumina para acessar a documentação, downloads de software, treinamentos online e perguntas frequentes.

Componentes do instrumento

O sistema NextSeq 500 inclui um monitor com tela de toque, uma barra de status e quatro compartimentos.

Figura 1 Componentes do instrumento



- A **Monitor com tela de toque** — Permite a configuração e instalação do instrumento usando a interface do software de controle.
- B **Barra de status** — Indica o status do instrumento como processando (azul), requer atenção (laranja), pronto para sequenciamento (verde) ou quando uma limpeza é necessária nas próximas 24 horas (amarelo).
- C **Compartimento de solução tampão** — Abriga o cartucho de solução tampão e o receptáculo de reagentes gastos.
- D **Compartimento do reagente** — Abriga o cartucho de reagente.
- E **Botão de alimentação** — Liga ou desliga o instrumento e o computador do instrumento.
- F **Compartimento de imagem** — Abriga a lâmina de fluxo durante uma execução de sequenciamento.
- G **Compartimento do filtro de ar** — Aloja o filtro de ar em instrumentos com filtro acessível pelo painel traseiro.

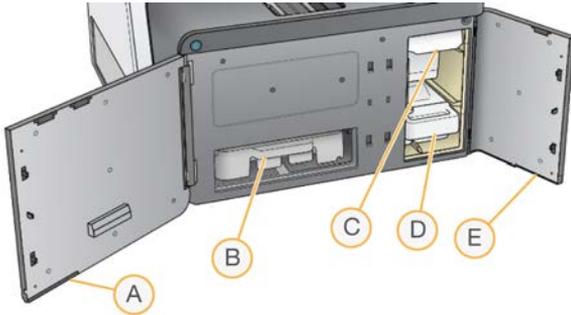
Compartimento de imagem

O compartimento de imagem abriga a plataforma, que inclui três pinos de alinhamento para posicionar a lâmina de fluxo. Depois de carregar a lâmina de fluxo, a porta do compartimento de imagem fecha automaticamente e coloca os componentes em posição.

Compartimentos do reagente e de solução tampão

Configurar uma execução de sequenciamento no NextSeq 500 requer acesso ao compartimento do reagente e ao compartimento de tampão para carregar os materiais de consumo da execução e esvaziar o receptáculo de reagentes gastos.

Figura 2 Compartimentos do reagente e de solução tampão



- A **Porta do compartimento do reagente** — Protege o compartimento do reagente com uma trava sob o canto inferior direito da porta. O compartimento do reagente contém o cartucho de reagente. Os reagentes são bombeados pelo aspirador de líquidos e pelo sistema de fluxo e, em seguida, para a lâmina de fluxo.
- B **Cartucho de reagente** — O cartucho de reagente é um material de consumo pré-carregado descartável.
- C **Cartucho de solução tampão** — O cartucho de solução tampão é um material de consumo pré-carregado descartável.
- D **Receptáculo de reagentes gastos** — Os reagentes gastos são coletados para descarte após cada execução.
- E **Porta do compartimento de solução tampão** — Protege o compartimento de solução tampão com uma trava sob o canto inferior esquerdo da porta.

Compartimento do filtro de ar

O compartimento do filtro de ar aloja o filtro de ar em instrumentos com filtro acessível pelo painel traseiro. Troque o filtro de ar a cada 90 dias. Para obter informações sobre a substituição do filtro, consulte [Trocar o filtro de ar na página 31](#).

Software NextSeq

O software do instrumento inclui aplicativos integrados que realizam execuções de sequenciamento.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** — Controla a operação do instrumento e guia você ao longo das etapas de configuração de uma execução de sequenciamento.
 - ▶ O software está pré-instalado no NextSeq, sendo executado no instrumento. O NCS efetua a execução de acordo com os parâmetros especificados no módulo do software Local Run Manager ou no NCS.
 - ▶ Antes de iniciar a execução de sequenciamento, você seleciona uma execução que criou com o módulo do Local Run Manager ou no NCS. A interface do software NCS orienta você nos passos para carregar a lâmina de fluxo e os reagentes.
 - ▶ Durante a execução, o software opera o estágio da lâmina de fluxo, distribui os reagentes, controla o fluxo de reagentes, ajusta as temperaturas, captura imagens de clusters na lâmina de fluxo e fornece um resumo visual das estatísticas de qualidade. Você pode monitorar a execução no NCS ou no Local Run Manager.

- ▶ Durante a execução, que você pode monitorar no NCS ou no Local Run Manager, o NCS executa as funções a seguir.
 - ▶ Opera o estágio da lâmina de fluxo
 - ▶ Distribui os reagentes
 - ▶ Controla o fluxo
 - ▶ Ajusta as temperaturas
 - ▶ Captura imagens de clusters na lâmina de fluxo
 - ▶ Fornece um resumo visual das estatísticas de qualidade
- ▶ **Software Local Run Manager** — Solução integrada de software para criar uma execução e analisar os resultados (análise secundária). O software também fornece controle de amostras e pode controlar permissões de usuários.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA)** — O RTA realiza análise de imagens e identificação de bases ao longo da execução. O NextSeq 500 usa o RTA v2, que inclui diferenças significativas de arquitetura e de recursos em relação às versões anteriores. Para obter mais informações, consulte *Real-Time Analysis* na página 46.
- ▶ **Serviço de cópia universal** — Copia os arquivos de saída do sequenciamento da pasta de execuções para a pasta de saída e para o BaseSpace Sequence Hub (se aplicável), onde é possível acessá-los.

O Real-Time Analysis (RTA) e o Serviço de cópia universal executam processos apenas em segundo plano.

Ícones de status

Um ícone de status no canto superior direito da tela da interface do software de controle sinaliza qualquer alteração nas condições durante a configuração ou durante a execução.

Ícone de status	Nome do status	Descrição
	Status OK	O sistema está normal.
	Processando	O sistema está em processamento.
	Advertência	Ocorreu uma advertência. Advertências não interrompem uma execução nem requerem uma ação antes de continuar.
	Erro	Ocorreu um erro. Erros requerem uma ação antes de continuar a execução.
	Atenção	Ocorreu uma notificação que requer atenção. Consulte a mensagem para obter outras informações.
	Informações	Apenas uma mensagem informativa. Nenhuma ação adicional é requerida.

Quando uma alteração de condição ocorre, o ícone pisca para alertá-lo. Selecione o ícone para visualizar uma descrição da condição. Selecione **Acknowledge** (Confirmar) para aceitar a mensagem e **Close** (Fechar) para fechar a caixa de diálogo.

Ícone da barra de navegação

O ícone para minimizar o NCS está situado no canto superior direito da interface do software de controle.

Ícone de acesso	Nome do ícone	Descrição
	Minimizar NCS	Selecione para minimizar o NCS e acessar os aplicativos e pastas do Windows.

Botão de alimentação

O botão de alimentação na parte frontal do NextSeq liga a energia para o instrumento e para o computador do instrumento. O botão de alimentação realiza as ações a seguir, dependendo do estado da energia do instrumento.

Estado de energia	Ação
A energia do instrumento está desligada	Pressione brevemente o botão para ligar a energia.
A energia do instrumento está ligada	Pressione brevemente o botão para desligar a energia. Uma caixa de diálogo aparece na tela para confirmar um desligamento normal do instrumento.
A energia do instrumento está ligada	Mantenha pressionado o botão de alimentação por 10 segundos para realizar um desligamento forçado do instrumento e do computador do instrumento. Utilize esse método para desligar o instrumento somente se ele não estiver respondendo.



OBSERVAÇÃO

Desligar o instrumento durante uma execução de sequenciamento encerra a execução imediatamente. Encerrar uma execução é uma ação definitiva. Os materiais de consumo de execução não podem ser reutilizados e os dados de sequenciamento da execução não são salvos.

Requisitos de senha do Windows

O sistema operacional requer a alteração da senha do Windows a cada 180 dias. Quando solicitado, atualize sua senha do Windows. Se você usar o Local Run Manager para análise, atualize também a senha para a conta do Windows no Local Run Manager. Consulte a seção Especificar configurações da conta de serviço no *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 100000002702)*.

Visão geral dos materiais de consumo de sequenciamento

Conteúdo e armazenamento

Os materiais de consumo de sequenciamento requeridos para executar o NextSeq são fornecidos separadamente em um kit de uso único. Cada kit contém uma lâmina de fluxo, um cartucho de reagente, um cartucho de solução tampão e um tampão de diluição da biblioteca. Quando você receber um kit NextSeq 500:

- ▶ Não abra a embalagem metálica da lâmina de fluxo até receber instruções para fazê-lo.
- ▶ Armazene imediatamente os componentes nas temperaturas indicadas para garantir o desempenho adequado.
- ▶ Armazene os cartuchos de modo que as etiquetas da embalagem fiquem voltadas para cima.

Material de consumo	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Descrição
cartucho de reagente	1	-25 °C a -15 °C	Contém reagentes de cluster e sequenciamento
cartucho de solução tampão	1	15 °C a 30 °C	Contém solução tampão e solução de limpeza
HT1	1	-25 °C a -15 °C	Solução tampão de hibridização
lâmina de fluxo	1	2 °C a 8 °C*	Lâmina de fluxo de uso único

*Transportado à temperatura ambiente para kits de reagentes NextSeq v2.5

Os reagentes são sensíveis à luz. Armazene o cartucho de reagente e o cartucho de solução tampão em local escuro, afastados da luz.

A lâmina de fluxo, o cartucho de reagente e o cartucho de solução tampão usam identificação por radiofrequência (RFID) para o rastreamento preciso de materiais de consumo e para compatibilidade com eles.

Todos os outros kits incluem primers de sequenciamento de índice duplo e NaOCl no cartucho pré-carregado. Nenhuma etapa adicional é requerida.



CUIDADO

Os kits de reagentes do NextSeq v2.5 requerem NCS v2.2 ou posterior. Certifique-se de que as atualizações do software estejam concluídas antes de preparar as amostras e materiais de consumo.

Identificação e compatibilidade do kit

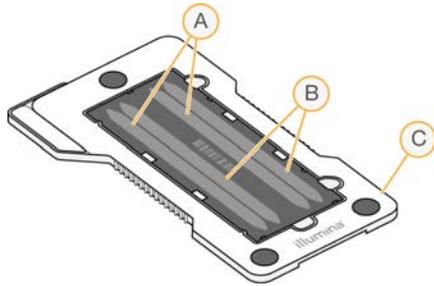
Os componentes do kit são rotulados com indicadores codificados por cores para mostrar a compatibilidade entre as lâminas de fluxo e os cartuchos de reagente. Sempre use um cartucho de reagente e uma lâmina de fluxo compatíveis. O cartucho de solução tampão é universal.

Cada lâmina de fluxo e cada cartucho de reagente é rotulado como **High** (Alto) ou **Mid** (Médio). Sempre verifique o rótulo ao preparar materiais de consumo para uma execução.

Tipo do kit	Marcação no rótulo
Componentes do kit de alta produção	
Componentes do kit de média produção	

Visão geral da lâmina de fluxo

Figura 3 Cartucho da lâmina de fluxo



- A Par de cavidades A — Cavidades um e três
- B Par de cavidades B — Cavidades dois e quatro
- C Armação do cartucho da lâmina de fluxo

A lâmina de fluxo é um substrato com base em vidro no qual clusters são gerados e a reação de sequenciamento é realizada. A lâmina de fluxo é revestida por um cartucho de lâmina de fluxo.

A lâmina de fluxo contém quatro cavidades que têm imagem em pares.

- ▶ As cavidades um e três (par de cavidades A) têm a imagem capturada ao mesmo tempo.
- ▶ As cavidades dois e quatro (par de cavidades B) têm sua imagem capturada quando a imagem do par A é concluída.

Embora a lâmina de fluxo tenha quatro cavidades, apenas uma biblioteca ou um conjunto de bibliotecas agrupadas é sequenciado na lâmina de fluxo. As bibliotecas são carregadas no cartucho de reagente de um único reservatório e transferidas automaticamente para a lâmina de fluxo em todas as quatro cavidades.

A imagem de cada cavidade é capturada em pequenas áreas de imagem chamadas de blocos. Para obter mais informações, consulte [Blocos da lâmina de fluxo na página 51](#).

Visão geral do cartucho de reagente

O cartucho de reagente é um material de consumo descartável com rastreamento de RFID e reservatórios com selo de alumínio pré-carregados com reagentes de clusterização e sequenciamento.

Figura 4 Cartucho de reagente



O cartucho de reagente inclui um reservatório designado para o carregamento de bibliotecas preparadas. Após o início da execução, as bibliotecas são transferidas automaticamente do reservatório para a lâmina de fluxo.

Vários reservatórios são reservados para a limpeza automática após a execução. A solução de limpeza é bombeada do cartucho de solução tampão para os reservatórios reservados, passa pelo sistema e, em seguida, até o receptáculo de reagentes gastos.

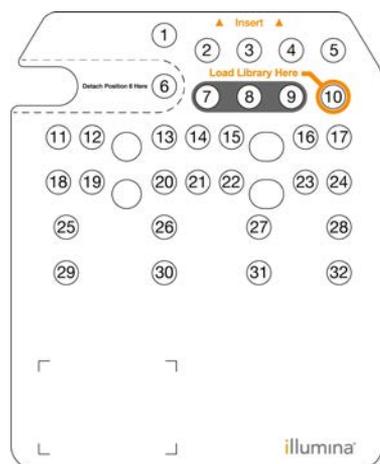


ADVERTÊNCIA

Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

Reservatórios reservados

Figura 5 Reservatórios numerados



Posição	Descrição
7, 8 e 9	Reservados para primers personalizados opcionais
10	Carregar bibliotecas

Para obter informações sobre primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados NextSeq* (documento n.º 15057456).

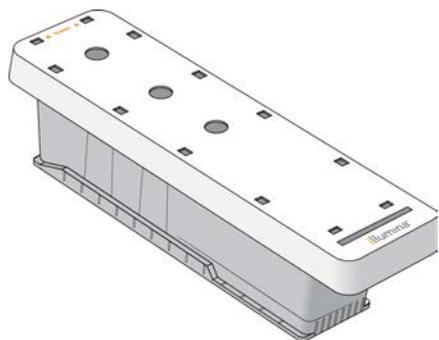
Reservatório removível na posição n.º 6

O cartucho de reagente pré-carregado inclui um reagente de desnaturação na posição 6 que contém formamida. Para facilitar a eliminação segura de qualquer reagente não utilizado após a execução de sequenciamento, o reservatório da posição seis é removível. Para obter mais informações, consulte *Remover o reservatório usado na posição n.º 6* na página 24.

Visão geral do cartucho de solução tampão

O cartucho de solução tampão é um material de consumo descartável que contém três reservatórios pré-carregados com soluções tampão e solução de limpeza. O conteúdo do cartucho de solução tampão é suficiente para o sequenciamento de uma lâmina de fluxo.

Figura 6 Cartucho de solução tampão



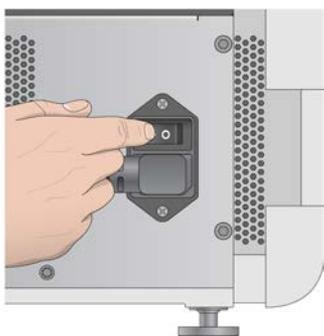
Capítulo 2 Noções básicas

Inicialização do instrumento	10
Personalizar configurações do sistema	10
Personalizar configurações da execução	12
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	13

Inicialização do instrumento

Coloque o interruptor de alimentação de alternância na posição I (ligado).

Figura 7 Interruptor de alimentação localizado na parte traseira do instrumento



- 1 Pressione o botão de alimentação acima do compartimento do reagente. O botão de alimentação liga a energia do instrumento e inicia o computador e software integrado do instrumento.

Figura 8 Botão de alimentação localizado na parte dianteira do instrumento



- 2 Espere até que o sistema operacional termine de carregar. O NextSeq Control Software (NCS) é ativado e inicializa o sistema automaticamente. Quando a etapa de inicialização estiver concluída, a tela Home (Página inicial) será aberta.
- 3 Se o seu sistema foi configurado para requerer credenciais de login, aguarde o carregamento do sistema e, em seguida, faça login no sistema operacional. Se necessário, consulte o administrador das instalações quanto ao nome de usuário e senha.

Personalizar configurações do sistema

O software de controle contém configurações personalizáveis do sistema para os itens a seguir. Para alterar as configurações de rede, consulte *Definir as configurações do sistema na página 43*.

- ▶ Personalizar a identificação do instrumento (avatar e apelido)
- ▶ Definir a opção de teclado e o indicador de áudio
- ▶ Definir a opção de receitas personalizadas
- ▶ Definir a verificação de atualizações do software do instrumento do BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Definir a opção de enviar os dados de desempenho do instrumento

Personalizar o avatar e apelido do instrumento

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Para atribuir uma imagem de avatar preferida para seu instrumento, selecione **Browse** (Procurar) e procure a imagem.
- 4 No campo Nickname (Apelido), insira o nome escolhido para o instrumento.
- 5 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e avançar para a próxima tela.
A imagem e o nome são exibidos no canto superior esquerdo de cada tela.

Definir a opção de teclado e o indicador de áudio

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Marque a caixa de seleção **Use on-screen keyboard** (Usar teclado na tela) para ativar o teclado na tela para entrada de dados no instrumento.
- 4 Marque a caixa de seleção **Play audio** (Reproduzir áudio) para ativar indicadores de áudio para os eventos a seguir.
 - ▶ Ao inicializar o instrumento
 - ▶ Quando uma execução é iniciada
 - ▶ Quando erros específicos ocorrerem
 - ▶ Quando a interação do usuário é requerida
 - ▶ Quando uma execução for concluída
- 5 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e avançar para a próxima tela.

Definir a opção de receitas personalizadas

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Marque a caixa de seleção **Enable Custom Recipes** (Habilitar receitas personalizadas) para habilitar a seleção de uma receita personalizada ao carregar um cartucho de reagente. Para obter mais informações, consulte *Receitas personalizadas e pastas de receitas na página 40*.
- 4 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e avançar para a próxima tela.

Definir verificação de atualizações do software do instrumento do BaseSpace

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).

- 3 Marque a caixa de seleção **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Verificar automaticamente novas atualizações do software no BaseSpace) para ativar as verificações automáticas de atualizações do BaseSpace Sequence Hub.
A verificação automática de atualizações é realizada a cada 24 horas. Quando uma atualização está disponível, é exibida uma notificação nos seguintes locais.
 - ▶ Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) no ícone Software Update (Atualização de software).
 - ▶ No botão Manage Instrument (Gerenciar instrumento) na tela Home (Página inicial).
- 4 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e avançar para a próxima tela.

Definir a opção de enviar os dados de desempenho do instrumento

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina) para habilitar o serviço de monitoramento Illumina Proactive. O nome da configuração na interface do software pode ser diferente do nome deste guia, dependendo da versão do NCS em uso. Com esta configuração ativada, os dados de desempenho do instrumento são enviados à Illumina. Esses dados ajudam a Illumina a resolver problemas com mais facilidade e detectar possíveis falhas, possibilitando a manutenção proativa e maximizando o tempo de atividade do instrumento. Para obter mais informações sobre os benefícios desse serviço, consulte a *Nota técnica do Illumina Proactive (documento N.º 1000000052503)*.
Esse serviço:
 - ▶ Não envia dados de sequenciamento.
 - ▶ Requer que o instrumento esteja conectado a uma rede com acesso à Internet.
 - ▶ É ativado por padrão. Para cancelar esse serviço, desabilite a configuração **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina).
- 4 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e avançar para a próxima tela.

Personalizar configurações da execução

O software de controle inclui configurações que podem ser personalizadas para as preferências de configuração da execução e o descarte de reagentes não utilizados.

Definir opções de configuração da execução

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Marque a caixa de seleção **Use Advanced Load Consumables** (Usar materiais de consumo de carregamento avançado) para habilitar a opção de carregar todos os materiais de consumo de execução em uma única tela.
- 4 Marque a caixa de seleção **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Pular confirmação da verificação antes da execução) para iniciar o sequenciamento automaticamente após uma verificação automática bem-sucedida.
- 5 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e sair da tela.

Definir a opção de descarte automático

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 3 Marque a caixa de seleção **Purge Consumables at End of Run** (Descartar materiais de consumo no final da execução) para descartar os reagentes não utilizados do cartucho de reagente para o receptáculo de reagentes gastos automaticamente após cada execução.



OBSERVAÇÃO

Descartar os materiais de consumo automaticamente adiciona mais tempo ao fluxo de trabalho.

- 4 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e sair da tela.

Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário

Os seguintes materiais de consumo e equipamentos são utilizados no NextSeq 500.

Materiais de consumo para sequenciamento

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
1 N NaOH (hidróxido de sódio)	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Desnaturação de biblioteca, diluída a 0,2 N
Compressa com álcool isopropílico 70% ou etílico 70%	WWR, n.º do catálogo 95041-714 (ou equivalente) Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza da lâmina de fluxo e uso geral
Lenço para laboratório com poucos fiapos	WWR, n.º do catálogo 21905-026 (ou equivalente)	Limpeza da lâmina de fluxo

Materiais de consumo para manutenção e resolução de problemas

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
NaOCl, 5% (hipoclorito de sódio)	Sigma-Aldrich, n.º do catálogo 239305 (ou equivalente aprovado para uso em laboratório)	Limpar o instrumento usando o material de limpeza manual após a execução; diluído a 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, catálogo n.º P7949	Limpar o instrumento usando opções de limpeza manual; diluído a 0,05%
Água, aprovada para uso em laboratório	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpar o instrumento (limpeza manual)
Metanol ou álcool isopropílico reagente ou de grau espectrofotométrico (99%), frasco de 100 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza dos componentes ópticos periodicamente e apoio ao cartucho de limpeza da objetiva
Filtro de ar	llumina, n.º do catálogo 2002240	Para instrumentos com filtro de ar acessível pelo painel traseiro. Limpar o ar que o instrumento recebe para o resfriamento.

Orientações para água aprovada para uso em laboratório

Utilize sempre água aprovada para uso em laboratório ou água deionizada para realizar procedimentos com instrumentos. Nunca use água da torneira. Utilize apenas os seguintes tipos de água ou equivalentes:

- ▶ Água deionizada
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Água de 18 Megohm (MΩ)
- ▶ Água Milli-Q
- ▶ Água Super-Q
- ▶ Água para biologia molecular

Equipamento

Item	Origem	Finalidade
Congelador, -25 °C a -15 °C, frost-free	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Armazenamento do cartucho
Balde de gelo	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Reserva de bibliotecas
Refrigerador, 2 °C a 8 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Armazenamento da lâmina de fluxo

Capítulo 3 Sequenciamento

Introdução	15
Criar execução com o software Local Run Manager	16
Criar a execução com o NCS	16
Preparar o cartucho de reagente	16
Preparar a lâmina de fluxo	17
Preparar bibliotecas para sequenciamento	18
Configurar uma Execução do sequenciamento	18
Monitorar o progresso da execução	25
Limpeza automática após a execução	27

Introdução

Para realizar um sequenciamento no NextSeq 500, prepare um cartucho de reagente e uma lâmina de fluxo. Em seguida, siga os comandos do software para configurar e iniciar a execução. A clusterização e o sequenciamento são realizados no instrumento. Após a execução, uma limpeza do instrumento começa automaticamente usando componentes já carregados no instrumento.

Clusterização

Durante a clusterização, moléculas de DNA em fita simples são ligadas à superfície da lâmina de fluxo e, em seguida, amplificadas para formar clusters.

Sequenciamento

A imagem dos clusters é capturada usando química de sequenciamento em dois canais e combinações de filtros específicos para cada uma das terminações de cadeias identificadas por fluorescência. Depois que a obtenção da imagem de um bloco na lâmina de fluxo é concluída, a imagem do próximo bloco é obtida. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento. Após a análise das imagens, o software realiza uma identificação de bases, uma filtragem e uma pontuação de qualidade.

Monitore o progresso e a estatística da execução nos locais a seguir.

- ▶ A interface do NCS
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Local Run Manager
- ▶ Um computador de rede usando o software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Consulte [Sequencing Analysis Viewer](#) na página 27.

Análise

Conforme a execução continua, o software de controle transfere automaticamente os arquivos de identificação de bases (BCL) para o BaseSpace Sequence Hub, o Local Run Manager ou para outro local de saída especificado para análise secundária.

Vários métodos de análise estão disponíveis, dependendo do aplicativo. Para obter mais informações, consulte a [ajuda do BaseSpace](#) ou o [Guia do software Local Run Manager \(documento n.º 1000000002702\)](#).

Duração da execução de sequenciamento

A duração da execução de sequenciamento depende do número de ciclos realizados. A duração máxima da execução é uma execução tipo paired-end de 150 ciclos a cada leitura (2 x 150), mais até dez ciclos para cada uma das duas leituras de índice.

Para ver as durações esperadas e outras especificações do sistema, acesse a [página de especificações do NextSeq 500](#) no site da Illumina.

Número de ciclos em uma leitura

Em uma execução de sequenciamento, o número de ciclos realizados em uma leitura é um ciclo a mais que o número de ciclos analisados. Por exemplo, uma execução de 150 ciclos do tipo paired-end realiza leituras de 151 ciclos (2×151) para um total de 302 ciclos. No final da execução, 2×150 ciclos são analisados. O ciclo extra é requerido para os cálculos de phasing e prephasing.

Criar execução com o software Local Run Manager

O processo para configurar os parâmetros de execução e análise no Local Run Manager varia dependendo do módulo de fluxo de trabalho de análise específico que você usar. Consulte o guia do módulo do Local Run Manager quanto a instruções específicas sobre a criação de uma execução.

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Edit Runs** (Editar execuções).
- 2 Selecione **Create Run** (Criar execução) no painel do Local Run Manager e, em seguida, selecione um módulo de análise.
- 3 Insira um nome de execução, insira as amostras para a execução e, se aplicável, importe manifestos.
- 4 Salve a execução e feche a janela do painel do Local Run Manager.

Para criar uma execução no NCS sem o software Local Run Manager, use o modo de execução manual. Consulte [Criar a execução com o NCS na página 16](#) e [Modos de execução na página 19](#).

Criar a execução com o NCS

Se você criar uma execução com o NCS (modo de execução manual), os parâmetros de execução e análise serão imediatamente inseridos antes de carregar a lâmina de fluxo.

- 1 Revise os parâmetros de execução e análise requeridos em [Insira os parâmetros de execução e análise no NCS \(Modo de execução manual\) na página 20](#).
- 2 Determine os parâmetros de execução e análise agora para que não haja atraso quando for iniciada a execução de sequenciamento.

Preparar o cartucho de reagente

- 1 Remova o cartucho de reagente do armazenamento de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Descongele em um banho-maria com água na temperatura ambiente até descongelar completamente (cerca de 60 minutos). Não mergulhe o cartucho.
- 3 Bata levemente na bancada para remover a água da base e seque a base.

[Método alternativo] Descongele os reagentes durante a noite a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os reagentes requerem um mínimo de 18 horas para descongelar. A essa temperatura, os reagentes se mantêm estáveis por até uma semana.

- 4 Inverta o cartucho cinco vezes para misturar os reagentes.
- 5 Inspeccione as posições 29, 30, 31 e 32 para se certificar de que os reagentes estão descongelados.
- 6 Bata levemente na bancada para reduzir as bolhas de ar.



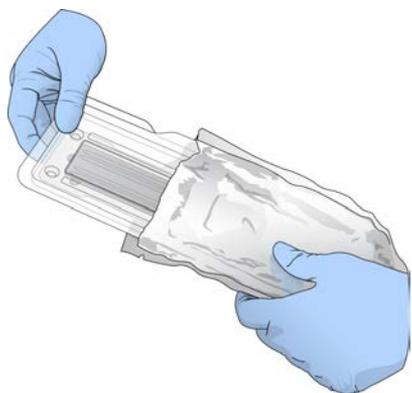
ADVERTÊNCIA

Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

Preparar a lâmina de fluxo

- 1 Retire um novo pacote da lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- 2 Remova a lâmina de fluxo da embalagem metálica.

Figura 9 Remover da embalagem metálica



- 3 Reserve em temperatura ambiente, por 30 minutos, o pacote da lâmina de fluxo desembalado.



OBSERVAÇÃO

Se a embalagem metálica estiver intacta, a lâmina de fluxo poderá permanecer na temperatura ambiente por até 12 horas. Evite o resfriamento e aquecimento contínuo da lâmina de fluxo.

- 4 Abra o pacote plástico transparente e remova a lâmina de fluxo.

Figura 10 Remover do pacote transparente



- 5 Limpe a superfície de vidro da lâmina de fluxo com um pano sem fiapos com álcool. Seque o vidro com um lenço para laboratório com poucos fiapos.

Preparar bibliotecas para sequenciamento

O volume da biblioteca e a concentração de carregamento diferem, dependendo da versão do NCS em execução.

Versão do software de controle	Volume da biblioteca	Concentração da biblioteca
NCS v1.3 ou superior	1,3 ml	1,8 pM
NCS v1.2 ou versões anteriores	3 ml	3 pM

Desnaturar e diluir bibliotecas

Desnature e dilua suas bibliotecas no seguinte volume e concentração de carga.

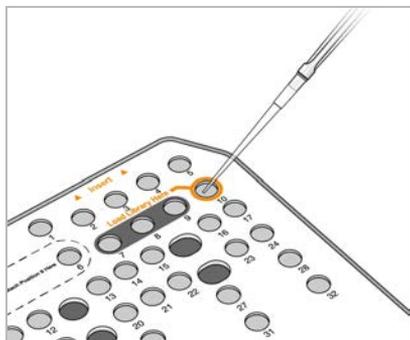
Tipo do kit	Volume de carga	Concentração de carga
Alta produção	1,3 ml	1,8 pM
Média produção	1,3 ml	1,5 pM

Na prática, a concentração de carga pode variar, dependendo dos métodos de preparação e de quantificação da biblioteca. Para obter instruções, consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do sistema NextSeq (documento n.º 15048776)*.

Carregar bibliotecas no cartucho de reagente

- 1 Limpe o selo de alumínio que cobre o reservatório n.º 10 rotulado **Load Library Here** (Carregar biblioteca aqui) usando um lenço com poucos fiapos.
- 2 Perfure o selo com a ponta de uma pipeta limpa de 1 ml.
- 3 Carregue 1,3 ml de bibliotecas de 1,8 pM preparadas no reservatório n.º 10 rotulado **Load Library Here** (Carregar biblioteca aqui). Evite tocar no selo de alumínio enquanto as bibliotecas são colocadas.

Figura 11 Carregar bibliotecas



Configurar uma Execução do sequenciamento

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Experiment** (Experimento).
- 2 Na tela Select Assay (Selecionar ensaio), selecione **Sequence** (Sequenciar).
O comando Sequence (Sequenciar) abre a porta do compartimento de imagem, libera materiais de consumo de uma execução anterior e abre a série de telas de configuração da execução. Um pequeno atraso é normal.

Modos de execução

Ao configurar uma execução de sequenciamento, você seleciona um dos seguintes modos de execução para determinar onde inserir as informações da execução e como analisar os dados.

Modo de execução	Informações da execução	Análise de dados*
Local Run Manager	Insira no Local Run Manager.	O software salva os dados na pasta de saída especificada para análise automática no Local Run Manager.
Manual	Insira no NCS.	O software salva os dados em uma pasta de saída especificada para análise posterior fora do instrumento.

* Para fins de análise, o BaseSpace Sequence Hub pode parear com qualquer modo de execução. Quando o modo de execução for o Local Run Manager e o BaseSpace Sequence Hub estiver configurado, ambos os aplicativos analisam os dados.

O Local Run Manager é o modo de execução padrão e fornece o fluxo de trabalho mais eficiente. Você cria e salva execuções no Local Run Manager. Em seguida, as informações são enviadas para o software de controle, onde você seleciona uma execução e continua a configuração da execução. Após o sequenciamento, o Local Run Manager realiza automaticamente a análise de dados. Não são necessários planilha de amostras e aplicativos de análises separados.



OBSERVAÇÃO

O Local Run Manager não é um recurso do software de controle. Ele é um software integrado para registrar amostras de sequenciamento, especificar parâmetros de execução e analisar dados.

BaseSpace Sequence Hub (Opcional)

Ao configurar uma execução de sequenciamento, você pode selecionar uma das seguintes opções do BaseSpace Sequence Hub.

Opção	Descrição e requisitos
Run Monitoring and Storage (Monitoramento e armazenamento de execuções)	Envia arquivos InterOp, arquivos de registro e dados de execução ao BaseSpace Sequence Hub para monitoramento e análise remotos. Requer uma conta do BaseSpace Sequence Hub, uma conexão à Internet e uma planilha de amostras.
Run Monitoring Only (Apenas monitoramento de execuções)	Envia arquivos InterOp e de registro ao BaseSpace Sequence Hub para monitoramento remoto de execuções. Esta opção é padrão. Requer uma conta do BaseSpace Sequence Hub e uma conexão à Internet.

Selecione o Run Mode (Modo de execução) e o BaseSpace Sequence Hub

- Na tela Run Setup (Configuração da execução), selecione um dos modos de execução a seguir.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Manual

- [Opcional]** Selecione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usar configuração do BaseSpace Sequence Hub) e selecione uma das opções a seguir.

- ▶ Run Monitoring and Storage (Monitoramento e armazenamento de execuções)
- ▶ Run Monitoring Only (Apenas monitoramento de execuções)

Digite seu nome de usuário e senha do BaseSpace Sequence Hub.

Se for solicitado, selecione um grupo de trabalho para o qual carregar dados de execução. Isso só será solicitado se você pertencer a vários grupos de trabalho.

- 3 Selecione **Next** (Avançar).

Selecione Run (Execução) (Modo de execução Local Run Manager)

- 1 Selecione um nome de execução na lista de execuções disponíveis.
Use as setas para cima e para baixo para percorrer a lista ou insira um nome de execução no campo Search (Pesquisar).
- 2 Confirme os parâmetros de execução.
 - ▶ **Run Name** (Nome da execução) — Nome da execução conforme atribuído no Local Run Manager.
 - ▶ **Library ID** (ID da biblioteca) — Nome das bibliotecas agrupadas conforme atribuído no Local Run Manager.
 - ▶ **Recipe** (Receita) — Nome da receita, podendo ser **NextSeq High** (Alto) ou **NextSeq Mid** (Médio), dependendo do cartucho de reagente usado para a execução.
 - ▶ **Read Type** (Tipo de leitura) — Leitura simples ou do tipo paired-end.
 - ▶ **Read Length** (Comprimento da leitura) — Número de ciclos de cada leitura.
 - ▶ **[Opcional]** Custom Primers (Primers personalizados), se for o caso.
- 3 **[Opcional]** Selecione o ícone **Edit** (Editar) para alterar os parâmetros de execução. Quando terminar, selecione **Save** (Salvar).
 - ▶ **Run parameters** (Parâmetros de execução) — Altere o número de leituras ou o número de ciclos por leitura.
 - ▶ **Custom primers** (Primers personalizados) — Altere as configurações para primers personalizados. Para obter mais informações, consulte o *Guia de primers personalizados NextSeq (documento n.º 15057456)*.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Descartar materiais de consumo para esta execução) — Altere a configuração para descartar os materiais de consumo automaticamente após a execução atual.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).

Insira os parâmetros de execução e análise no NCS (Modo de execução manual)

- 1 Digite um nome de sua preferência para a execução.
- 2 **[Opcional]** Insira um ID de biblioteca de sua preferência.
- 3 Na lista suspensa Recipe (Receita), selecione uma receita. Somente as receitas compatíveis são listadas.
- 4 Selecione um tipo de leitura, **Single-Read** (Leitura simples) ou **Paired-End**.
- 5 Insira o número de ciclos para cada leitura da execução de sequenciamento.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Insira um valor até 151 ciclos.
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Insira um valor até 151 ciclos. Esse valor normalmente é o mesmo número de ciclos da Leitura 1.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1) — Insira o número de ciclos requeridos para o primer do Índice 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Índice 2) — Insira o número de ciclos requeridos para o primer do Índice 2 (i5).

O software de controle confirma as entradas usando os seguintes critérios:

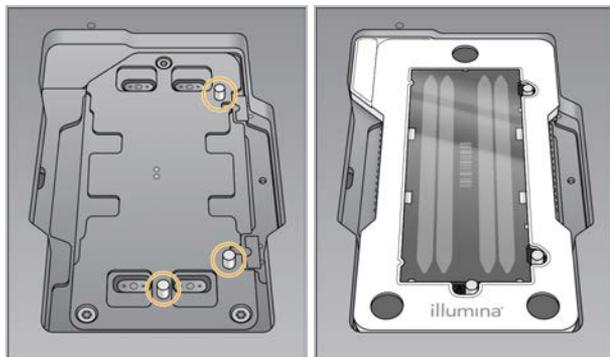
 - ▶ O total de ciclos não excede o número máximo de ciclos permitidos.
 - ▶ O número de ciclos da Leitura 1 excede os cinco ciclos usados para a geração do modelo.
 - ▶ O número de ciclos da Leitura de índice não excede o número de ciclos das Leituras 1 e 2.

- 6 **[Opcional]** Se você estiver usando primers personalizados, marque a caixa de seleção para os primers utilizados. Para obter mais informações, consulte o *Guia de primers personalizados NextSeq (documento n.º 15057456)*.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Primer personalizado para a Leitura 1.
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Primer personalizado para a Leitura 2.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1) — Primer personalizado para o Índice 1.
 - ▶ **Index 2** (Índice 2) — Primer personalizado para o Índice 2.
- 7 Defina o local da pasta de saída para a execução atual. Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até um local de rede.
Para obter informações sobre os requisitos da pasta de saída, consulte *Definir local da pasta de saída na página 45*.
- 8 Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até uma planilha de amostras.
Os sistemas configurados para o modo manual com Executar monitoramento e Armazenamento no BaseSpace Sequence Hub requerem uma planilha de amostras.
- 9 Selecione **Purge consumables for this run** (Descartar materiais de consumo para esta execução).
A definição descarta os materiais de consumo automaticamente após a execução atual.
- 10 Selecione **Next** (Avançar).
- 11 **[Opcional]** Selecione o ícone Edit (Editar) para alterar os parâmetros de execução.
- 12 Selecione **Next** (Avançar).

Carregar a lâmina de fluxo

- 1 Remova a lâmina de fluxo utilizada em uma execução anterior.
- 2 Alinhe a lâmina de fluxo sobre os pinos de alinhamento e posicione-a na plataforma.

Figura 12 Carregar a lâmina de fluxo



- 3 Selecione **Load** (Carregar).
A porta se fecha automaticamente, a identificação da lâmina de fluxo é exibida na tela e os sensores são verificados.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).

Esvaziar o receptáculo de reagentes gastos

- 1 Remova o receptáculo de reagentes gastos e descarte o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.

Figura 13 Remover o receptáculo de reagentes gastos



OBSERVAÇÃO

Enquanto remove o receptáculo com uma das mãos, coloque a outra mão embaixo dele para apoiá-lo.

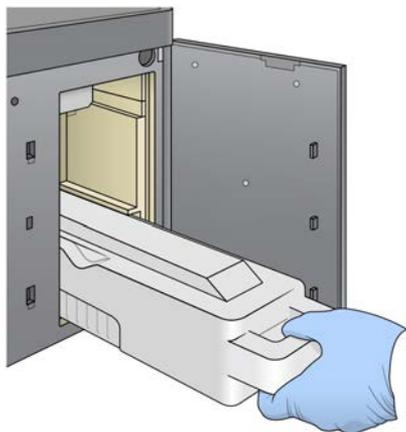


ADVERTÊNCIA

Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

- 2 Deslize o receptáculo de reagentes gastos vazio no compartimento de solução tampão até ele parar de deslizar. Um clique audível indica que o receptáculo está na posição.

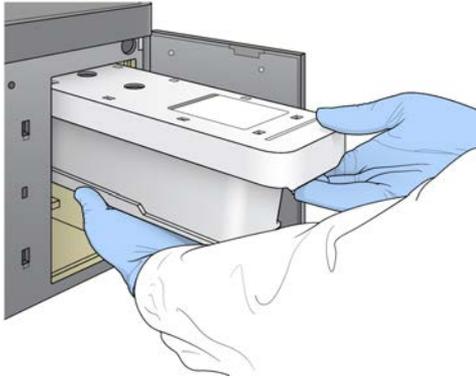
Figura 14 Carregar o receptáculo de reagentes gastos vazio



Carregar o cartucho de solução tampão

- 1 Remova o cartucho de solução tampão usado do compartimento superior.
- 2 Deslize um novo cartucho de solução tampão no compartimento de solução tampão até ele parar de deslizar.
Um clique audível indica que o cartucho está na posição, o ID do cartucho de solução tampão aparece na tela e o sensor é verificado.

Figura 15 Carregar o cartucho de solução tampão



- 3 Feche a porta do compartimento de solução tampão e selecione **Next** (Avançar).

Carregar o cartucho de reagente

- 1 Remova o cartucho de reagente utilizado do compartimento do reagente. Descarte o conteúdo não utilizado de acordo com as normas aplicáveis.



ADVERTÊNCIA

Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

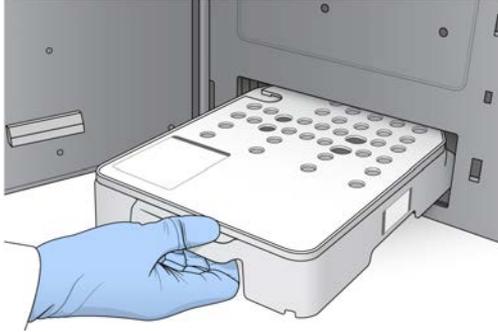


OBSERVAÇÃO

Para facilitar o descarte seguro de reagentes não utilizados, o reservatório na posição 6 é removível. Para obter mais informações, consulte *Remover o reservatório usado na posição n.º 6 na página 24*.

- 2 Deslize o cartucho de reagente no compartimento do reagente até o cartucho parar de deslizar e, em seguida, feche a porta do compartimento do reagente.

Figura 16 Carregar cartucho de reagente

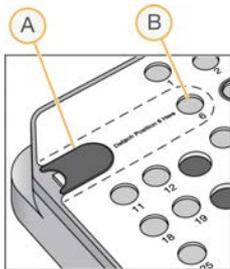


- 3 Selecione **Load** (Carregar).
O software move o cartucho para a posição automaticamente (cerca de 30 segundos), o ID do cartucho de reagente é exibido na tela e os sensores são verificados.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).

Remover o reservatório usado na posição n.º 6

- 1 Depois de ter removido o cartucho de reagente **usado** do instrumento, remova a capa protetora de borracha sobre a abertura ao lado da posição n.º 6.

Figura 17 Posição removível n.º 6



- A Capa protetora de borracha
- B Posição n.º 6

- 2 Pressione para baixo a aba de plástico transparente e empurre-a para a esquerda para ejetar o reservatório.
- 3 Descarte o reservatório segundo as normas aplicáveis.

Revisar a verificação automática

O software realiza uma verificação automática do sistema. Durante a verificação, os seguintes indicadores são exibidos na tela:

- ▶ **Marca de verificação** 🚫 **cinza** — A verificação ainda não foi realizada.
- ▶ **Ícone de progresso** 🔄 — A verificação está em andamento.
- ▶ **Marca de verificação** ✅ **verde** — A verificação foi bem-sucedida.
- ▶ **❌ vermelho** — A verificação não foi bem-sucedida. Para os itens com falha, é requerida uma ação antes de continuar. Consulte *Resolver erros da verificação automática* na página 36.

Para interromper uma verificação automática em andamento, selecione o ícone  no canto inferior direito. Para reiniciar a verificação, selecione o ícone . A verificação é retomada a partir da primeira verificação incompleta ou com falha.

Para visualizar os resultados de cada verificação individual dentro de uma categoria, selecione o ícone  para expandir a categoria.



OBSERVAÇÃO

Quando você realiza a primeira execução do sequenciamento com o NCS v4.0 ou posterior, é normal que o registro da lâmina de fluxo demore mais de 15 minutos durante a verificação automatizada do sistema.

Iniciar a execução

Quando a verificação automática for concluída, selecione **Start** (Iniciar). A execução de sequenciamento inicia.

Para configurar o sistema para iniciar a execução automaticamente após uma verificação bem-sucedida, consulte *Definir opções de configuração da execução na página 12*.

Monitorar o progresso da execução

- 1 Monitore o progresso, as intensidades e as pontuações de qualidade da execução conforme as medidas são exibidas na tela.

Figura 18 Progresso e medidas de execução de sequenciamento



- A **Run progress** (Progresso da execução) — Exibe a etapa atual e o número de ciclos concluídos para cada leitura. A barra de progresso não é proporcional à taxa de execução de cada etapa. Use o tempo restante no canto superior direito para determinar a duração real.
- B **Q-Score** — Exibe a distribuição de pontuações de qualidade (Q-scores). Consulte *Pontuação de qualidade na página 50*.
- C **Intensity** (Intensidade) — Mostra o valor das intensidades de clusters do 90^o percentil para cada bloco. As cores do gráfico indicam cada base: vermelho é A, verde é C, azul é G e preto é T. As cores correspondem aos indicadores de base usados no Sequencing Analysis Software (SAV).
- D **Cluster Density** (Densidade de cluster) (K/mm²) — Mostra o número de clusters detectados para a execução.
- E **Clusters Passing Filter** (Filtro de passagem de clusters) (%) — Mostra a porcentagem de clusters que passam pelo filtro. Consulte *Filtro de passagem de clusters na página 49*.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Rendimento estimado [Gb]) — Mostra o número de bases projetadas para a execução.



OBSERVAÇÃO

Após selecionar Home (Página inicial), não será possível retornar à visualização de métricas de execução. No entanto, as medidas de execução podem ser acessadas no BaseSpace Sequence Hub ou visualizadas em um computador independente usando o Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Ciclos para métricas de execução

As métricas de execução aparecem em pontos diferentes de uma execução.

- ▶ Durante as etapas de clusterização, nenhuma métrica é exibida.
- ▶ Os primeiros cinco ciclos são reservados para a geração do modelo.
- ▶ As métricas da execução são exibidas após o ciclo 25, incluindo densidade de cluster, filtro de passagem de clusters, rendimento e pontuações de qualidade.

Transferência de dados

Dependendo da configuração de análise selecionada, um ícone aparece na tela durante a execução para indicar o status de transferência de dados.

Status	Local Run Manager	Pasta de saída	Illumina BaseSpace
Conectado			
Conectado e transferindo dados			
Desconectado			
Desativado			

Se a transferência de dados for interrompida durante a execução, os dados serão armazenados temporariamente no computador do instrumento. Quando a conexão for restabelecida, a transferência de dados será retomada automaticamente. Se a conexão não for restabelecida antes do fim da execução, remova manualmente os dados do computador do instrumento antes de iniciar outra execução.

Serviço de cópia universal

O NextSeq System Software Suite contém um serviço de cópia universal. O RTA v2 solicita que o serviço copie arquivos de um local de origem para um local de destino, e o serviço processa as solicitações de cópia na ordem de recebimento. Se ocorrer uma exceção, o arquivo será recolocado na fila para cópia com base no número de arquivos na fila de cópia.

Sequencing Analysis Viewer

O software Sequencing Analysis Viewer mostra as métricas de sequenciamento geradas durante a execução. As métricas são exibidas em forma de gráficos, gráficos de pontos e tabelas com base nos dados gerados pelo RTA e gravados nos arquivos InterOp. As métricas são atualizadas conforme a execução continua. Selecione **Refresh** (Atualizar) a qualquer momento durante a execução para visualizar as métricas atualizadas. Para obter mais informações, consulte o *Guia do usuário do Sequencing Analysis Viewer (n.º de peça 15020619)*.

O Sequencing Analysis Viewer está incluído no software instalado no computador do instrumento. Também é possível instalar o Sequencing Analysis Viewer em outro computador conectado à mesma rede que o instrumento para monitorar as métricas da execução remotamente.

Limpeza automática após a execução

Quando a execução de sequenciamento é concluída, o software inicia uma limpeza automática após a execução. A limpeza após a execução usa uma solução de limpeza fornecida no cartucho de solução tampão e o NaOCl fornecido no cartucho de reagente.

A limpeza automática após a execução demora aproximadamente 90 minutos. Quando a limpeza é concluída, o **botão Home** (Início) torna-se ativo. Os resultados do sequenciamento permanecem visíveis na tela durante a limpeza.

Após a limpeza

Após a limpeza, os aspiradores permanecem virados para baixo para impedir a entrada de ar no sistema. Deixe os cartuchos no lugar até a próxima execução.

Capítulo 4 Manutenção

Introdução	28
Realizar uma limpeza manual	28
Trocar o filtro de ar	31
Atualizações de software	32
Desligar o instrumento	34

Introdução

Os procedimentos de manutenção incluem limpezas manuais do instrumento, substituição do filtro de ar e atualizações do software do sistema, quando disponíveis.

- ▶ **Limpezas do instrumento** — Uma limpeza automática após cada execução de sequenciamento mantém o desempenho do instrumento. No entanto, uma limpeza manual é requerida periodicamente sob condições específicas. Consulte *Realizar uma limpeza manual na página 28*.
- ▶ **Atualizações do software** — Quando uma versão atualizada do software do sistema está disponível, é possível instalá-la automaticamente usando um dos dois métodos a seguir.
 - ▶ Por meio de uma conexão ao BaseSpace Sequence Hub.
 - ▶ Manualmente, depois que você fizer o download do instalador no site da Illumina. Consulte *Atualizações de software na página 32*.
- ▶ **Substituição do filtro de ar** — Para instrumentos com filtro de ar acessível pelo painel traseiro, a substituição regular do filtro de ar garante o fluxo de ar adequado pelo instrumento.

Manutenção preventiva

A Illumina recomenda que você agende um serviço de manutenção preventiva todo ano. Se você não estiver vinculado a um contrato de serviço, entre em contato com seu gerente de conta territorial ou suporte técnico da Illumina para contratar um serviço de manutenção preventiva faturável.

Realizar uma limpeza manual

As limpezas manuais são iniciadas na tela Home (Página inicial). As opções de limpeza incluem a limpeza rápida e a limpeza manual após a execução.

Tipos de limpeza	Descrição
Limpeza rápida Duração: 20 minutos	Lava o sistema com uma solução de limpeza fornecida pelo usuário contendo água aprovada para uso em laboratório e Tween 20 (cartucho de limpeza de solução tampão). Necessária a cada 14 dias que o instrumento estiver ocioso ou depois de um desligamento.
Limpeza manual após a execução Duração: 90 minutos	Lava o sistema com uma solução de limpeza fornecida pelo usuário contendo água aprovada para uso em laboratório e Tween 20 (cartucho de limpeza de solução tampão) e 0,12% de hipoclorito de sódio (cartucho de limpeza de reagente). Requerida se a limpeza automática após a execução não tiver sido realizada.

A limpeza manual requer o cartucho de limpeza de reagente e o cartucho de limpeza de solução tampão fornecidos com o instrumento e uma lâmina de fluxo usada. Uma lâmina de fluxo usada pode ser utilizada até 20 vezes para limpezas de instrumentos.

Figura 19 Cartucho de limpeza de reagente original em estilo da solução tampão e cartucho de limpeza da solução tampão.

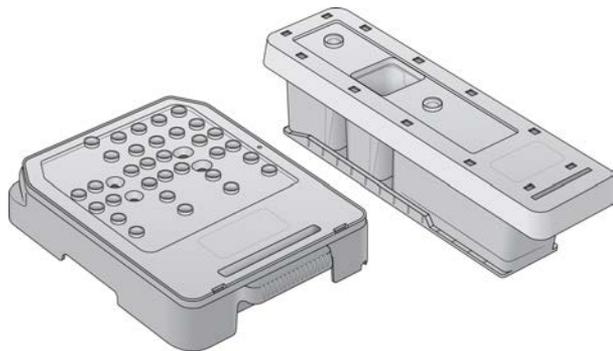
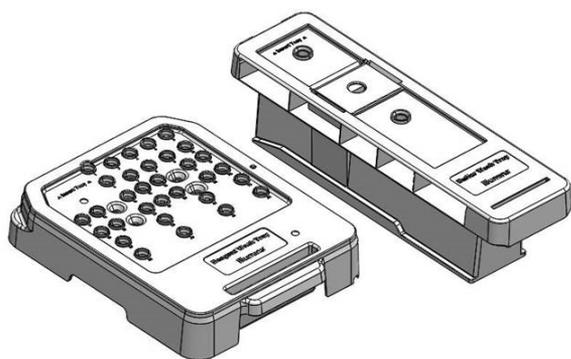


Figura 20 Novo cartucho de limpeza de reagente em estilo da solução tampão e cartucho de limpeza da solução tampão.



Preparar uma limpeza manual após a execução

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	Volume e descrição
<ul style="list-style-type: none"> • NaOCl 	1 ml, diluído a 0,12% Carregado no cartucho de limpeza de reagente (posição n.º 28)
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 a 100% • Água aprovada para uso em laboratório 	Usado para fazer a solução de limpeza de 125 ml e 0,05% de Tween 20 Carregado no cartucho de limpeza de solução tampão (reservatório central)



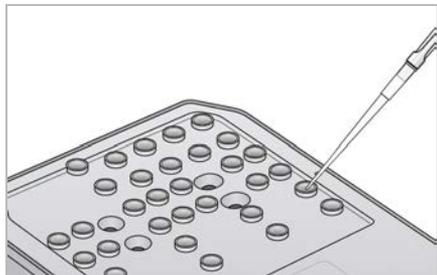
OBSERVAÇÃO

Sempre use uma nova diluição de NaOCl preparada nas últimas **24 horas**. Se fizer um volume superior a 1 ml, armazene o restante da diluição a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C para uso nas próximas 24 horas. Caso contrário, descarte o restante da diluição de NaOCl.

- 1 Combine os volumes a seguir em um tubo de microcentrífuga para fazer 1 ml de NaOCl a 0,12%:
 - ▶ NaOCl a 5% (24 µL)
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (976 µL)
- 2 Inverta o tubo para misturar.

- Adicione 1 ml de NaOCl a 0,12% ao cartucho de limpeza de reagente. O reservatório correto é equivalente à posição n.º 28 do cartucho pré-carregado.

Figura 21 Carregar o NaOCl



- Combine os seguintes volumes para fazer uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,05%:
 Cartucho de limpeza original em estilo da solução tampão
 - ▶ Tween 20 a 100% (62 µL)
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (125 ml)
 - ▶ Adicione 125 ml de solução de limpeza ao reservatório central do cartucho de limpeza de solução tampão.
 Novo cartucho de limpeza em estilo da solução tampão
 - ▶ Tween 20 a 100% (75 µL)
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (150 ml)
 - ▶ Adicione 150 ml de solução de limpeza ao reservatório central do cartucho de limpeza de solução tampão.
- Selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza) e, em seguida, **Manual Post-Run Wash** (Limpeza manual após a execução).

Preparar uma limpeza rápida

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	Volume e descrição
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 a 100% • Água aprovada para uso em laboratório 	Usado para fazer a solução de limpeza de 40 ml e 0,05% de Tween 20 Carregado no cartucho de limpeza de solução tampão (reservatório central)

- Combine os seguintes volumes para fazer uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,05%:
 - ▶ Tween 20 a 100% (20 µL)
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (40 ml)
- Adicione 40 ml de solução de limpeza ao reservatório central do cartucho de limpeza de solução tampão.
- Selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza) e, em seguida, **Quick Wash** (Limpeza rápida).

Carregar uma lâmina de fluxo usada e cartuchos de limpeza

- Se uma lâmina de fluxo usada não estiver presente, carregue uma lâmina de fluxo usada. Selecione **Load** (Carregar) e, em seguida, **Next** (Avançar).

- 2 Remova o receptáculo de reagentes gastos e descarte o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.



ADVERTÊNCIA

Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis. Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em support.illumina.com/sds.html.

- 3 Deslize o receptáculo de reagentes gastos vazio no compartimento de solução tampão até ele parar de deslizar.
- 4 Remova o cartucho de solução tampão usado na execução anterior, se houver.
- 5 Carregue o cartucho de limpeza de solução tampão contendo solução de limpeza.
- 6 Remova o cartucho de reagente usado na execução anterior, se houver.
- 7 Carregue o cartucho de limpeza de reagente.
- 8 Selecione **Next** (Avançar). A verificação antes da limpeza começa automaticamente.

Iniciar a limpeza

- 1 Selecione **Start** (Iniciar).
- 2 Quando a limpeza for concluída, selecione **Home** (Início).

Após a limpeza

Após a limpeza, os aspiradores permanecem virados para baixo para impedir a entrada de ar no sistema. Deixe os cartuchos no lugar até a próxima execução.

Trocar o filtro de ar

Os novos sistemas são fornecidos com três filtros de ar sobressalentes. Eles devem ser armazenados e usados quando for recebido um comando do instrumento para trocar o filtro.

Para instrumentos com filtro de ar acessível pela parte traseira, o filtro de ar garante o fluxo de ar através do instrumento. O software exibe uma notificação para trocar o filtro de ar a cada 90 dias. Quando for solicitado, selecione **Remind in 1 day** (Lembrar em 1 dia) ou siga o procedimento abaixo e selecione **Filter Changed** (Filtro trocado). A contagem regressiva de 90 dias é redefinida depois da seleção de **Filter Changed** (Filtro trocado).

- 1 Remova o novo filtro de ar da embalagem e escreva a data em que você o instalar na estrutura do filtro.
- 2 Na parte traseira do instrumento, pressione na parte superior da bandeja do filtro para liberá-la.
- 3 Segure a parte superior da bandeja do filtro e puxe-a para retirá-la totalmente do instrumento.
- 4 Remova e descarte o filtro de ar antigo.
- 5 Insira o novo filtro de ar na bandeja.

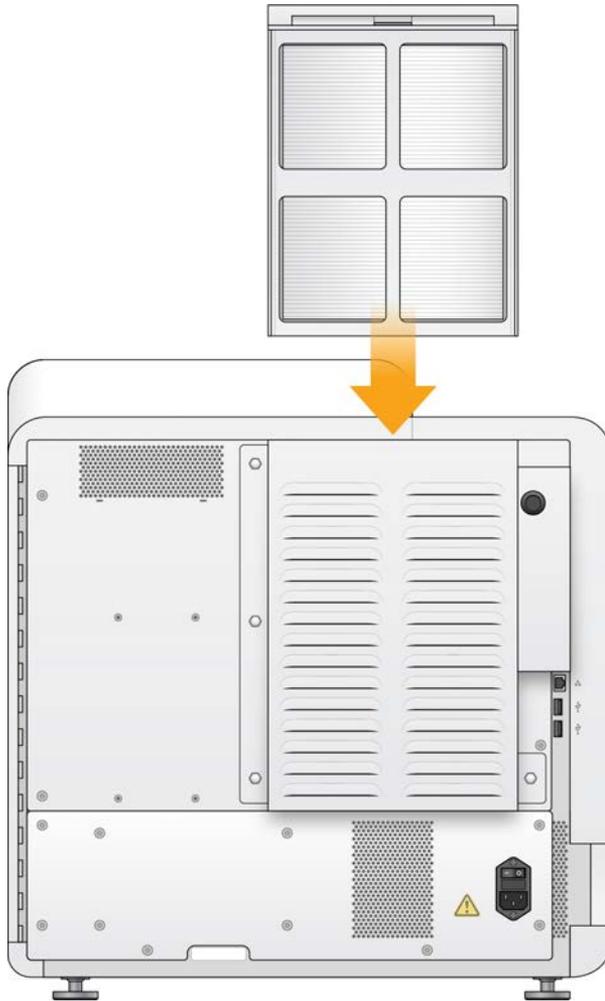


OBSERVAÇÃO

O filtro de ar não funcionará corretamente se estiver ao contrário. Certifique-se de inserir o filtro de ar na bandeja de modo que você possa ver a seta verde "Up" (Para cima) e o rótulo de alerta esteja oculto. A seta deve apontar para a alça da bandeja do filtro.

- Deslize a bandeja do filtro para dentro do instrumento. Pressione a parte superior da bandeja do filtro até que ela se encaixe no lugar com um clique.

Figura 22 Inserção do filtro de ar



Atualizações de software

As atualizações de software são incluídas em um pacote de software chamado pacote do sistema, que contém os seguintes softwares:

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Receitas do NextSeq
- ▶ Software Local Run Manager
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Universal Copy Service (Serviço de cópia universal)
- ▶ Driver do Acesso direto à memória (DMA, Direct Memory Access)

Você pode instalar atualizações de software automaticamente por meio de uma conexão com a internet ou manualmente de um local de rede ou USB.

- ▶ **Atualizações automáticas** — Para instrumentos conectados a uma rede com acesso à internet, um ícone de alerta  é exibido no botão **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento) na tela Home (Página inicial) quando uma atualização está disponível.
- ▶ **Atualizações manuais** — Faça download do instalador do pacote do sistema na [página de suporte do NextSeq 500](#) no site da Illumina. Se você planeja fazer uma atualização manual, certifique-se de concluí-la antes de preparar amostras e materiais de consumo para uma execução de sequenciamento.

Atualização automática de software

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 3 Selecione **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Instalar a atualização já baixada do BaseSpace).
- 4 Selecione **Update** (Atualizar) para iniciar a atualização. Uma caixa de diálogo será exibida para confirmar o comando.
- 5 Siga os comandos do assistente de instalação:
 - a Aceite o contrato de licença.
 - b Revise as notas da versão.
 - c Revise a lista de softwares incluídos na atualização.

Quando a atualização for concluída, o software de controle reiniciará automaticamente.



OBSERVAÇÃO

Se estiver incluída uma atualização de firmware, será requerida uma reinicialização automática do sistema após essa atualização.

Atualização manual de software

- 1 Faça download do instalador do pacote do sistema no site da Illumina e salve-o em um local da rede. Outra opção é copiar o arquivo de instalação do software para uma unidade portátil USB.
- 2 Selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 3 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 4 Selecione **Manually install the update from the following location** (Instalar manualmente a atualização do seguinte local).
- 5 Selecione **Browse** (Procurar) para acessar o local do arquivo de instalação do software e, em seguida, selecione **Update** (Atualizar).
- 6 Siga os comandos do assistente de instalação:
 - a Aceite o contrato de licença.
 - b Revise as notas da versão.
 - c Revise a lista de softwares incluídos na atualização.

Quando a atualização for concluída, o software de controle reiniciará automaticamente.



OBSERVAÇÃO

Se estiver incluída uma atualização de firmware, será requerida uma reinicialização automática do sistema após essa atualização.

Desligar o instrumento

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **Shutdown Options** (Opções de desligamento).
- 3 Selecione **Shutdown** (Desligar).

O comando Shut Down (Desligar) encerra o software e desliga a energia do instrumento com segurança. Aguarde pelo menos 60 segundos antes de religar o instrumento.



CUIDADO

Não mude o instrumento de lugar. Mover o instrumento de maneira inadequada pode afetar o alinhamento óptico e comprometer a integridade dos dados. Se for necessário mudar o instrumento de lugar, entre em contato com um representante da Illumina.

Apêndice A Solução de problemas

Introdução	35
Arquivos de solução de problemas	35
Resolver erros da verificação automática	36
O receptáculo de reagentes gastos está cheio	37
Fluxo de trabalho de nova hibridização	38
Receitas personalizadas e pastas de receitas	40
Verificação do sistema	40
Mensagem de erro RAID	42
Erro de armazenamento de rede	43
Definir as configurações do sistema	43

Introdução

Para perguntas técnicas, visite as páginas de suporte do NextSeq 500 no site da Illumina. As páginas de suporte permitem acessar a documentação, downloads e perguntas frequentes.

Faça login em sua conta do MyIllumina para acessar os boletins de suporte.

Para problemas de qualidade ou de desempenho de execução, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte *Assistência técnica na página 59*.

Considere compartilhar um link para o resumo da execução no BaseSpace Sequence Hub com o suporte técnico da Illumina para facilitar a solução de problemas. Você também pode ajudar a solução de problemas quando o serviço de monitoramento do Illumina Proactive estiver ativo. Para obter mais informações sobre o serviço, consulte *Definir a opção de enviar os dados de desempenho do instrumento na página 12*.

Arquivos de solução de problemas

Um representante do suporte técnico da Illumina pode solicitar cópias de arquivos específicos para a execução ou leitura para solucionar problemas. Normalmente, os arquivos a seguir são usados para a solução de problemas. Os arquivos estão localizados em pastas específicas para a execução da pasta de saída.

Arquivo principal	Subpasta	Descrição
Arquivo de informações da execução (RunInfo.xml)	<Nome da pasta de execuções>	Contém as seguintes informações: <ul style="list-style-type: none">• Nome da execução• Número de ciclos da execução• Número de ciclos em cada leitura• Se a leitura é uma leitura indexada• Número de feixes e blocos na lâmina de fluxo
Arquivo de parâmetros de execução (RunParameters.xml)	<Nome da pasta de execuções>	Contém informações sobre parâmetros e componentes de execução. Entre essas informações estão o RFID, o número de série, o número da peça e a data de validade.
Arquivo de configuração do RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities (Dados\Intensidades)	Contém as definições de configuração do RTA para a execução. O arquivo RTAConfiguration.xml é criado no início da execução.
Arquivos InterOp (*.bin)	InterOp	Arquivos binários de relatórios utilizados para o Sequencing Analysis Viewer. Os arquivos InterOp são atualizados ao longo da execução.

Arquivo principal	Subpasta	Descrição
Arquivos de registro	Logs (Registros)	Os arquivos de registro descrevem cada etapa realizada pelo instrumento para cada ciclo e exibem as versões de softwares e firmwares usadas na execução. O arquivo denominado [InstrumentName]_CurrentHardware.csv exibe os números de série dos componentes do instrumento.
Arquivos de registro de erros (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de erros de RTA. Os arquivos de registro de erros são atualizados sempre que um erro ocorre.
Arquivos de registro global (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de todos os eventos de RTA. Os arquivos de registro global são atualizados ao longo da execução.
Arquivos de registro de cavidades (*LaneLog*.txt)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de eventos de processamento de RTA. Os arquivos de registro de cavidades são atualizados ao longo da execução.

Erros de RTA

Para solucionar erros de RTA, verifique primeiro o registro de erros de RTA, que é armazenado na pasta RTALogs. Esse arquivo não está presente para as execuções bem-sucedidas. Os arquivos estão localizados em pastas específicas para a execução da pasta de saída. Inclua o registro de erros ao relatar problemas para o suporte técnico da Illumina.

Resolver erros da verificação automática

Se ocorrerem erros durante a verificação automática, use as seguintes ações recomendadas para resolvê-los.

No entanto, as RFIDs da lâmina de fluxo, do cartucho de reagente e do cartucho de solução tampão serão bloqueadas durante a inicialização do software de controle, o que pode ser requerido para resolver um erro. O usuário deve remover a lâmina de fluxo, o cartucho de reagente e o cartucho de solução tampão do instrumento antes de reiniciar o sistema. Além disso, as RFIDs de material de consumo são bloqueadas depois que os selos de alumínio são perfurados.

Verificações do sistema	Ação recomendada
Doors Closed (Portas fechadas)	Certifique-se de que as portas dos compartimentos estejam fechadas.
Consumables Loaded (Materiais de consumo carregados)	Os sensores de material de consumo não conseguem fazer registros. Certifique-se de que cada material de consumo esteja carregado corretamente. Nas telas de configuração de execução, selecione Back (Voltar) para retornar à etapa de carregamento e repetir a configuração da execução.
Required Software (Software exigido)	Componentes críticos do software estão ausentes. Execute uma atualização manual do software para restaurar todos os componentes do software.
Instrument Disk Space (Espaço em disco do instrumento)	O disco rígido do instrumento não tem espaço suficiente para uma execução. É possível que dados de uma execução anterior não tenham sido transferidos. Limpe os dados de execução do disco rígido do instrumento.
Network Connection (Conexão de rede)	A conexão de rede foi interrompida. Verifique o status da rede e a conexão física da rede.
Network Disk Space (Espaço em disco de rede)	A conta do BaseSpace está cheia ou o servidor de rede está cheio.

Temperatura	Ação recomendada
Temperature (Temperatura)	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Temperature Sensors (Sensores de temperatura)	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Fans (Ventiladores)	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Sistema de imagem	Ação recomendada
Imaging Limits (Limites de imagem)	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Z Steps-and-Settle	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Bit Error Rate (Taxa de erros por bit)	Entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.
Flow Cell Registration (Registro da lâmina de fluxo)	<p>É possível que a lâmina de fluxo não esteja encaixada corretamente.</p> <ul style="list-style-type: none"> Nas telas de configuração da execução, selecione Back (Voltar) para retornar à etapa da lâmina de fluxo. A porta do compartimento de imagem é aberta. Descarregue e carregue novamente a lâmina de fluxo para se certificar de que ela esteja encaixada corretamente.
Distribuição de reagente	Ação recomendada
Valve Response (Resposta da válvula)	Entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.
Pump (Bomba)	Entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.
Buffer Mechanism (Mecanismo de solução tampão)	Entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.
Spent Reagents Empty (Reagentes gastos vazios)	Esvazie o receptáculo de reagentes gastos e recarregue o receptáculo vazio.

O receptáculo de reagentes gastos está cheio

Sempre comece uma execução com o receptáculo de reagentes gastos vazio.

Se você iniciar uma execução sem esvaziar o receptáculo de reagentes gastos, os sensores do sistema acionarão o software para interromper a execução quando o recipiente estiver cheio. Os sensores do sistema não poderão pausar uma execução durante a clusterização, a ressíntese do tipo paired-end nem durante a limpeza automática após a execução.

Quando a execução é pausada, uma caixa de diálogo é exibida com opções para elevar o aspirador de líquidos e esvaziar o receptáculo cheio.

Esvaziar o receptáculo de reagentes gastos

- 1 Selecione **Raise Sippers** (Elevar aspiradores).
- 2 Remova o receptáculo de reagentes gastos e descarte o conteúdo de forma adequada.
- 3 Recoloque o receptáculo vazio no compartimento de solução tampão.
- 4 Selecione **Continue** (Continuar). A execução continuará automaticamente.

Fluxo de trabalho de nova hibridização

Talvez seja necessário fazer uma nova hibridização se as métricas geradas durante os primeiros ciclos mostrarem intensidades abaixo de 2500. Algumas bibliotecas com diversidade baixa podem mostrar intensidades abaixo de 1000, que é prevista e não pode ser resolvida com nova hibridização.



OBSERVAÇÃO

O comando End Run (Encerrar execução) é uma ação definitiva. A execução não pode ser retomada, os materiais de consumo da execução não podem ser reutilizados e os dados de sequenciamento da execução não são salvos.

Quando você encerra uma execução, o software realiza as seguintes etapas antes do fim da execução:

- ▶ Coloca a lâmina de fluxo em um estado seguro.
- ▶ Desbloqueia o RFID da lâmina de fluxo para uma execução posterior.
- ▶ Atribui uma data de expiração de nova hibridização à lâmina de fluxo.
- ▶ Grava os registros de execução dos ciclos concluídos. Um atraso é normal.
- ▶ Ignora a limpeza automática após a execução.

Quando você inicia uma execução de nova hibridização, o software realiza as seguintes etapas para realizar a execução:

- ▶ Cria uma pasta de execução com base no nome exclusivo de uma execução.
- ▶ Verifica se a data de expiração da nova hibridização da lâmina de fluxo foi atingida.
- ▶ Prepara os reagentes. Um atraso é normal.
- ▶ Pula a etapa de clusterização.
- ▶ Remove o primer da Leitura 1 anterior.
- ▶ Realiza hibridização em um novo primer da Leitura 1.
- ▶ Continua a Leitura 1 e o restante da execução com base em parâmetros de execução especificados.

Pontos onde é possível encerrar uma execução de nova hibridização

Uma nova hibridização posterior só será possível se a execução for encerrada nos pontos a seguir:

- ▶ **Após o ciclo 5** — As intensidades são exibidas após o registro do modelo, o que requer os primeiros cinco ciclos do sequenciamento. Embora seja seguro encerrar uma execução depois do ciclo 1, é recomendado encerrá-la após o ciclo 5. Não encerre uma execução durante a clusterização.
- ▶ **Leitura 1 ou leitura do índice 1** — Encerre a execução *antes* que a ressíntese do tipo paired-end seja iniciada. A lâmina de fluxo não pode ser guardada para uma nova hibridização posterior após o início da ressíntese do tipo paired-end.

Materiais de consumo requeridos

Uma execução de nova hibridização requer um cartucho de reagente e um cartucho de solução tampão do NextSeq novos, independentemente do momento em que a execução foi interrompida.

Encerrar a execução atual

- 1 Selecione **End Run** (Encerrar execução). Quando for solicitado que você confirme o comando, selecione **Yes** (Sim).

- Quando for solicitado que você salve a lâmina de fluxo, selecione **Yes** (Sim). Salvar a lâmina de fluxo não garante que seja possível salvar a execução atual. Observe a data de expiração para nova hibridização.
- Remova a lâmina de fluxo guardada e reserve-a em uma temperatura entre 2 °C e 8 °C até que você possa configurar a execução de nova hibridização.



OBSERVAÇÃO

É possível armazenar a lâmina de fluxo por até sete dias a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C no estojo plástico articulado **sem** o pacote dessecante. Para obter os melhores resultados, realize a nova hibridização da lâmina de fluxo guardada em até três dias.

Realizar uma limpeza manual

- Na tela Home (Página inicial), selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza).
- Na tela Wash Selection (Seleção de limpeza), selecione **Manual Post-Run Wash** (Limpeza manual após a execução). Consulte *Realizar uma limpeza manual na página 28*.



OBSERVAÇÃO

Se você não tiver removido o cartucho de reagente e o cartucho de solução tampão da execução interrompida, poderá usá-los na limpeza manual. Caso contrário, faça a limpeza manual com o cartucho de limpeza de reagente e com o cartucho de limpeza de solução tampão.

Configure uma nova execução no BaseSpace Sequence Hub

- Se o BaseSpace Sequence Hub estiver em uso, configure uma nova execução usando os mesmos parâmetros da execução original.



DICA

Clique na guia Pools, selecione o ID do pool adequado para manter as configurações anteriores de execução e, em seguida, atribua um nome exclusivo para a nova execução.

Configurar uma execução no instrumento

- Prepare um novo cartucho de reagente.
- Se a lâmina de fluxo guardada foi armazenada, deixe que ela atinja a temperatura ambiente (em torno de 15 a 30 minutos).
- Limpe e carregue a lâmina de fluxo guardada.
- Remova o receptáculo de reagentes gastos, descarte o conteúdo de forma adequada e, em seguida, recarregue o receptáculo vazio.
- Na tela Run Setup (Configuração da execução), selecione um dos modos de execução a seguir.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Manual
- [Opcional]** Selecione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usar configuração do BaseSpace Sequence Hub) e selecione uma das opções a seguir.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Monitoramento e armazenamento de execuções)
 - ▶ Run Monitoring Only (Apenas monitoramento de execuções)Digite seu nome de usuário e senha do BaseSpace Sequence Hub.
- Carregue o novo cartucho de solução tampão e o novo cartucho de reagente.

8 Selecione **Next** (Avançar) para avançar para a verificação antes da execução e iniciar a execução.

Receitas personalizadas e pastas de receitas

Não modifique as receitas originais. Sempre faça uma cópia da receita original com um novo nome. Se uma receita original for modificada, o atualizador de software não mais conseguirá reconhecer a receita para atualizações posteriores, e versões mais recentes não serão instaladas.

Armazene receitas personalizadas na pasta de receitas adequada. As pastas de receitas são organizadas da seguinte forma.

- 📁 **Custom** (Personalizadas)
 - 📁 **High** (Altas) — Receitas personalizadas usadas com um kit de alta produção.
 - 📁 **Mid** (Médias) — Receitas personalizadas usadas com um kit de média produção.
- 📁 **High** (Altas) — Receitas originais usadas com um kit de alta produção.
- 📁 **Mid** (Médias) — Receitas originais usadas com um kit de média produção.
- 📁 **Wash** (Limpeza) — Contém a receita da limpeza manual.

Verificação do sistema

Uma verificação do sistema não é requerida para a operação normal ou a manutenção do instrumento. No entanto, um representante do suporte técnico da Illumina pode pedir que você realize uma verificação do sistema para fins de solução de problemas.



OBSERVAÇÃO

Se estiver no prazo de realização de uma limpeza do instrumento, realize-a antes de iniciar uma verificação do sistema.

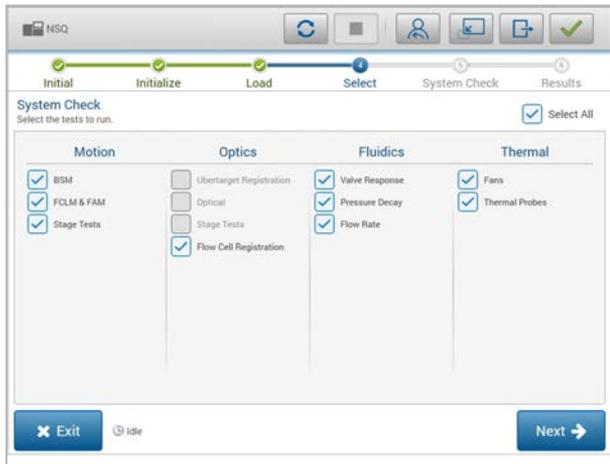
Iniciar uma verificação do sistema encerra automaticamente o software de controle e inicializa o NextSeq Service Software (NSS). O software de serviço é iniciado e abre uma página de login. Use qualquer nome de usuário e senha do Local Run Manager (nível de Administrador ou de Usuário) para acessar o NSS. Depois de autenticado, o NSS é aberto na tela Load (Carregar), a qual é configurada para usar a opção de carregamento avançado.



OBSERVAÇÃO

As credenciais do usuário administrador do Local Run Manager precisam ser usadas para fazer o login no Service Software antes que a tela de carregamento apareça.

Figura 23 Verificações do sistema disponíveis



Caixas de seleção inativas na tela Select (Selecionar) indicam testes que requerem a ajuda de um representante de campo da Illumina.

Executar uma verificação do sistema

- 1 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Check** (Verificação do sistema). Quando for solicitado que você feche o software de controle, selecione **Yes** (Sim).
 - 2 Carregue os materiais de consumo da seguinte forma:
 - a Se não houver uma lâmina de fluxo usada no instrumento, carregue uma lâmina de fluxo usada.
-  **OBSERVAÇÃO**
- A Illumina recomenda usar uma lâmina de fluxo de alto rendimento para fins de verificação do sistema.
- b Esvazie o receptáculo de reagentes gastos e recoloque-o no instrumento.
 - c Carregue o cartucho de limpeza de solução tampão contendo 120 ml de água aprovada para uso em laboratório no reservatório central.
 - d Carregue o cartucho de limpeza de reagente. Certifique-se de que o cartucho de limpeza de reagente esteja vazio e limpo.
- 3 Selecione **Load** (Carregar). O software move a lâmina de fluxo e o cartucho de limpeza de reagente para a posição. Selecione **Next** (Avançar).
 - 4 Selecione **Next** (Avançar). A verificação do sistema começa.
 - 5 **[Opcional]** Quando a verificação do sistema for concluída, selecione **View** (Visualizar) ao lado do nome da verificação para visualizar os valores associados a cada verificação.
 - 6 Selecione **Next** (Avançar). O relatório de verificação do sistema é aberto.
 - 7 Selecione **Save** (Salvar) para salvar o relatório em um arquivo compactado. Navegue até um local de rede para salvar o arquivo.
 - 8 Quando terminar, selecione **Exit** (Sair).
 - 9 Quando for solicitado que você feche o software de serviço e reinicialize o software de controle, selecione **Yes** (Sim). O software de controle reinicia automaticamente.

Verificações de movimento

Verificação do sistema	Descrição
BSM	Verifica o ganho e a distância do Buffer Straw Mechanism (BSM) para confirmar se o módulo está funcionando adequadamente.
FCLM e FAM	Verifica o ganho e a distância do mecanismo de carregamento da lâmina de fluxo (FCLM, Flow Cell Load Mechanism) e do módulo de automação fluidica (FAM, Fluid Automation Module) para confirmar se os módulos estão funcionando adequadamente.
Stage Tests (Testes de plataforma)	Verifica os limites de percurso e desempenho das plataformas XY e 6 Z, uma para cada câmera.

Verificação óptica

Verificação do sistema	Descrição
Flow Cell Registration (Registro da lâmina de fluxo)	Mede a inclinação da lâmina de fluxo em um plano óptico, testa a funcionalidade da câmera, testa o módulo de imagem e verifica o registro da lâmina de fluxo na posição de imagem correta.

Verificações fluidicas

Verificação do sistema	Descrição
Valve Response (Resposta da válvula)	Verifica a precisão dos movimentos de válvulas e bombas e testa o intervalo de movimento da seringa da bomba.
Pressure Decay (Queda de pressão)	Verifica a taxa de vazamento de um sistema de fluxo lacrado, o que confirma se a lâmina de fluxo está devidamente montada na posição de sequenciamento.
Flow Rate (Taxa de fluxo)	Verifica a funcionalidade dos sensores de bolha, utilizados para detectar a presença de ar nas linhas de reagentes. Mede as taxas de fluxo para verificar se há obstruções ou vazamentos.

Verificações térmicas

Verificação do sistema	Descrição
Fans (Ventiladores)	Verifica a velocidade dos ventiladores do sistema em pulsos por minuto (PPM) para confirmar se estão funcionando. Quando os ventiladores não estão funcionando, eles retornam um valor negativo.
Thermal Probes (Sondas térmicas)	Verifica a temperatura média de cada sensor térmico. Quando os sensores térmicos não estão funcionando, eles retornam um valor negativo.

Mensagem de erro RAID

O computador do NextSeq é equipado com dois discos rígidos. Se um disco rígido começar a falhar, o sistema gerará uma mensagem de erro RAID e sugerirá que você entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Normalmente, uma substituição de disco rígido é requerida.

Você pode prosseguir com as etapas de configuração da execução e com a operação normal. A finalidade da mensagem é agendar serviço com antecedência para evitar interrupções na operação normal do instrumento. Para continuar, selecione **Acknowledge** (Confirmar) e, em seguida, **Close** (Fechar).

Erro de armazenamento de rede

Erros de armazenamento de rede são resultantes de um dos seguintes motivos:

- ▶ **Insufficient storage space for the output folder** (Espaço de armazenamento insuficiente para a pasta de saída) — Aumente a quantidade de espaço no dispositivo de armazenamento ou mova a pasta de saída para um local com espaço de armazenagem suficiente.
- ▶ **Cannot connect to network storage** (Não é possível fazer a conexão ao armazenamento de rede) — Verifique o caminho para a pasta de saída. Consulte *Definir local da pasta de saída na página 45*.
- ▶ **The system cannot write to network storage** (O sistema não consegue gravar no armazenamento de rede) — Consulte seu administrador de TI para verificar as permissões. A conta do Windows no sistema operacional do instrumento requer permissão para leitura e gravação na pasta de saída.

A conta do Windows no Local Run Manager também requer permissão para leitura e gravação na pasta de saída. Consulte Especificar configurações da conta de serviço no *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)*.

Definir as configurações do sistema

O sistema é configurado durante a instalação. No entanto, se uma alteração for requerida ou se o sistema tiver de ser reconfigurado, utilize as opções de configuração do sistema.

- ▶ **Network Configuration** (Configuração de rede) — Fornece opções de configuração de endereço IP, endereço de Domain Name Server (DNS), nome do computador e nome do domínio.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub** — Se o BaseSpace Sequence Hub estiver em uso, ele fornece opções de local para onde os dados serão transferidos para armazenamento e análise.
- ▶ **Output Folder Location** (Localização da pasta de saída) — Fornece opções de caminho para a pasta de saída.

Definir configuração de rede

- 1 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Selecione **Network Configuration** (Configuração de rede).
- 3 Selecione **Obtain an IP address automatically** (Obter um endereço IP automaticamente) para obter o endereço IP usando o servidor DHCP.



OBSERVAÇÃO

O Dynamic Host Configuration Protocol (DHCP) é um protocolo de rede padrão usado em redes IP para distribuir dinamicamente os parâmetros de configuração de rede.

Também é possível selecionar **Use the following IP address** (Usar o seguinte endereço IP) para conectar o instrumento a outro servidor manualmente da maneira a seguir. Entre em contato com o administrador da rede para obter os endereços específicos da sua instalação.

- ▶ Insira o endereço IP. O endereço IP é uma série de quatro números separados por um ponto. Por exemplo, 168.62.20.37.
- ▶ Insira a máscara de sub-rede, que é uma subdivisão da rede IP.

- ▶ Insira o gateway padrão, que é o roteador da rede que se conecta à internet.
- 4 Selecione **Obtain a DNS server address automatically** (Obter um endereço de servidor DNS automaticamente) para conectar o instrumento ao servidor de nome de domínio associado ao endereço IP.
Também é possível selecionar **Use the following DNS server addresses** (Usar os seguintes endereços de servidor DNS) para conectar o instrumento ao servidor de nome de domínio manualmente, da seguinte maneira:
 - ▶ Insira o endereço DNS desejado. O endereço DNS é o nome do servidor usado para traduzir nomes de domínio para endereços IP.
 - ▶ Insira o endereço DNS alternativo. O servidor alternativo será usado se o DNS preferencial não conseguir traduzir um nome de domínio específico para um endereço IP.
- 5 Selecione **Save** (Salvar) para avançar para a tela Computer (Computador).



OBSERVAÇÃO

O nome do computador do instrumento é atribuído ao computador do instrumento no momento da fabricação. Quaisquer alterações ao nome do computador podem afetar a conectividade e requerer a ajuda de um administrador de rede.

- 6 Conecte o computador do instrumento a um domínio ou a um grupo de trabalho da seguinte forma:
 - ▶ **Para instrumentos conectados à internet** — Selecione **Member of domain** (Membro de domínio) e, em seguida, insira o nome do domínio associado à conexão à Internet de sua instalação. Alterações de domínio requerem um nome de usuário e senha de administrador.
 - ▶ **Para instrumentos não conectados à internet** — Selecione **Member of work group** (Membro de grupo de trabalho) e, em seguida, insira um nome de grupo de trabalho. O nome do grupo de trabalho é exclusivo da sua instalação.
- 7 Selecione **Save** (Salvar).

Definir configuração do BaseSpace

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 3 Selecione **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Configuração do BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Selecione uma das seguintes opções para especificar um local para onde os dados serão transferidos para análise.
 - ▶ Na lista Hosting Location (Local da hospedagem), selecione o local do servidor em que os dados são carregados.
 - ▶ Se você tiver uma assinatura do Enterprise, marque a caixa de seleção **Private Domain** (Domínio privado) e digite o nome do domínio (URL) usado para fazer login único no BaseSpace Sequence Hub.
Por exemplo: <https://seulaboratorio.basespace.illumina.com>.
- 5 Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina) para habilitar o serviço de monitoramento Illumina Proactive. O nome da configuração na interface do software pode ser diferente do nome deste guia, dependendo da versão do NCS em uso. Com esta configuração ativada, os dados de desempenho do instrumento são enviados à Illumina. Esses dados ajudam a Illumina a resolver problemas com mais facilidade e detectar possíveis falhas,

possibilitando a manutenção proativa e maximizando o tempo de atividade do instrumento. Para obter mais informações sobre os benefícios desse serviço, consulte a *Nota técnica do Illumina Proactive (documento N.º 1000000052503)*.

Esse serviço:

- ▶ Não envia dados de sequenciamento.
- ▶ Requer que o instrumento esteja conectado a uma rede com acesso à Internet.
- ▶ É ativado por padrão. Para cancelar esse serviço, desabilite a configuração **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina).

6 Selecione **Save** (Salvar).

Definir local da pasta de saída

O NextSeq requer uma pasta de saída para todas as execuções. Use o caminho de convenção universal de nomenclatura (UNC, Universal Naming Convention) completo para a pasta de saída. O caminho de UNC inclui duas barras invertidas, o nome do servidor e o nome do diretório, mas **não** uma letra para uma unidade de rede mapeada.

- ▶ Os caminhos para a pasta de saída que têm apenas um nível requerem uma barra invertida à direita.
 - ▶ Exemplo de caminho de UNC: \\servername\directory1\
- ▶ Os caminhos para a pasta de saída que têm dois ou mais níveis não requerem uma barra invertida à direita.
 - ▶ Exemplo de caminho de UNC: \\servername\directory1\directory2
- ▶ Caminhos para uma unidade de rede mapeada causam erros. **Não use.**
 - ▶ Exemplo de um caminho de unidade de rede mapeada: T:\sbsfiles

Para o modo de execução Local Run Manager, defina o local da pasta de saída no software Local Run Manager. Para obter mais informações, consulte o *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 100000002702)*.

Apêndice B Real-Time Analysis

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	46
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	47
Arquivos de saída de sequenciamento	51
Blocos da lâmina de fluxo	51
Estrutura da pasta de saída	55

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)

O NextSeq 500 utiliza uma implementação do software Real-Time Analysis (RTA) chamada RTA2. O RTA2 é executado no computador do instrumento e extrai intensidades de imagens, realiza identificação de bases e atribui uma pontuação de qualidade à identificação de bases. O RTA2 e o software de controle se comunicam por meio de uma interface HTTP da Web e de arquivos de memória compartilhada. Se o RTA2 for encerrado, o processamento não será retomado, e os dados da execução não serão salvos.



OBSERVAÇÃO

O desempenho de demultiplexação não é calculado. Portanto, a guia Index (Índice) do Sequencing Analysis Viewer (SAV) não é preenchida.

Entradas do RTA2

O RTA2 requer a seguinte entrada para o processamento:

- ▶ As imagens de blocos contidas na memória do sistema local.
- ▶ **RunInfo.xml**, que é gerado automaticamente no início da execução. O arquivo fornece as seguintes informações.
 - ▶ Nome da execução
 - ▶ Número de ciclos
 - ▶ Se uma leitura é indexada
 - ▶ Número de blocos na lâmina de fluxo
- ▶ **RTA.exe.config**, que é um arquivo de configuração de software em formato XML.

O RTA2 recebe comandos do software de controle sobre a localização do arquivo **RunInfo.xml** e se foi especificada uma pasta de saída opcional.

Arquivos de saída do RTA v2

As imagens de cada canal são passadas na memória como blocos. Os blocos são pequenas áreas de imagem na lâmina de fluxo definidas como o campo de visão pela câmera. A partir dessas imagens, o software produz a saída como um conjunto de arquivos de identificação de bases com pontuações de qualidade e arquivos de filtro. Todos os outros arquivos são arquivos de saída de apoio.

Tipo de arquivo	Descrição
Arquivos de identificação de bases (*.bcl)	Cada bloco analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases agregado para cada cavidade e para cada ciclo. O arquivo de identificação de bases agregado contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade associada para cada cluster na cavidade.
Arquivos de filtro (*.filter)	Cada bloco produz informações de filtro que são agregadas em um arquivo de filtro para cada cavidade. O arquivo de filtro especifica se um cluster passa pelos filtros.

Tipo de arquivo	Descrição
Arquivos de localização do cluster (*.locs)	Os arquivos de localização do cluster contêm as coordenadas X, Y para cada cluster em um bloco. Um arquivo de localização de cluster é gerado para cada cavidade durante a geração de um modelo.
Arquivos de índice de identificação de bases (*.bci)	Um arquivo de índice de identificação de bases é produzido para cada cavidade a fim de preservar as informações do bloco original. O arquivo de índice contém um par de valores para cada bloco: o número do bloco e o número de clusters do bloco.

Os arquivos de saída são usados para análise posterior no BaseSpace. Você também pode usar o software de conversão bcl2fastq para a conversão de FASTQ e de soluções de análise de terceiros. Os arquivos do NextSeq requerem o bcl2fastq v2.0 ou versões posteriores. Para obter a versão mais recente do bcl2fastq, visite a [página de downloads do NextSeq](#) no site da Illumina.

O RTA v2 fornece métricas de qualidade de execução em tempo real armazenadas como arquivos InterOp. Arquivos InterOp são uma saída binária que contém métricas de bloco, ciclo e de nível de leitura e são requeridos para visualizar métricas em tempo real usando o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para obter a versão mais recente do SAV, visite a [página de downloads do SAV](#) no site da Illumina.

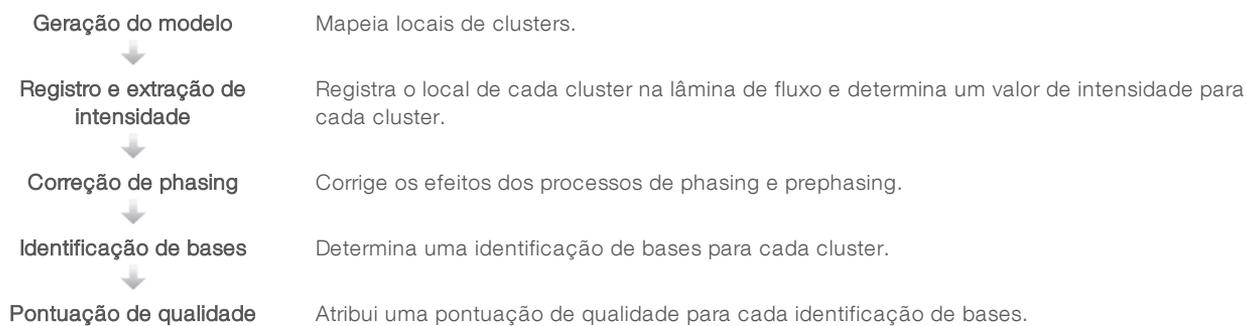
Tratamento de erros

O RTA2 cria arquivos de registro e os grava na pasta RTALogs (Registros de RTA). Os erros são registrados em um arquivo de erros no formato *.tsv.

Os arquivos de registro e de erros a seguir são transferidos para o destino de saída final ao fim do processamento:

- ▶ *GlobalLog*.tsv resume eventos importantes da execução.
- ▶ *LaneNLog*.tsv lista os eventos de processamento para cada cavidade.
- ▶ *Error*.tsv lista os erros que ocorreram durante uma execução.
- ▶ *WarningLog*.tsv lista os avisos que ocorreram durante uma execução.

Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis



Geração do modelo

A primeira etapa do fluxo de trabalho do RTA é a geração do modelo, que define a posição de cada cluster em um bloco usando as coordenadas X e Y.

A geração do modelo requer dados de imagem dos primeiros cinco ciclos da execução. Após a captura da imagem do último ciclo do modelo de um bloco, o modelo é gerado.



OBSERVAÇÃO

Para detectar um cluster durante a geração do modelo, deve haver pelo menos uma base diferente de G nos primeiros **cinco** ciclos. Para quaisquer sequências de índice, o RTA v2 requer pelo menos uma base diferente de G nos primeiros **dois** ciclos.

O modelo é usado como uma referência para a etapa posterior de registro e extração de intensidade. As posições de cluster para toda a lâmina de fluxo são gravadas nos arquivos de local de cluster (*.locs), um arquivo para cada cavidade.

Registro e extração de intensidade

O registro e a extração de intensidade começam após a geração do modelo.

- ▶ O registro alinha as imagens produzidas ao longo de cada ciclo subsequente de imagem em relação ao modelo.
- ▶ A extração de intensidade determina um valor de intensidade de cada cluster no modelo para uma dada imagem.

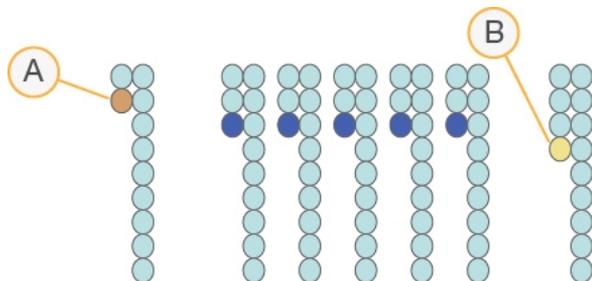
Se o registro falhar para qualquer imagem em um ciclo, não serão geradas identificações de bases para o bloco no ciclo. Use o software Sequencing Analysis Viewer (SAV) para examinar as imagens em miniatura e identificar as imagens que tiveram falha no registro.

Correção de phasing

Durante a reação de sequenciamento, cada fita de DNA em um cluster se estende por uma base por ciclo. Os processos de phasing e prephasing ocorrem quando uma fita fica fora de fase com o ciclo de incorporação atual.

- ▶ O phasing ocorre quando uma base fica para trás.
- ▶ O prephasing ocorre quando uma base fica adiantada.

Figura 24 Phasing e prephasing



- A Leitura com uma base em phasing
- B Leitura com uma base em prephasing

O RTA2 corrige os efeitos do phasing e do prephasing, o que maximiza a qualidade dos dados em cada ciclo ao longo da execução.

Identificação de bases

A identificação de bases determina uma base (A, C, G ou T) para cada cluster de um determinado bloco em um ciclo específico. O NextSeq 500 usa o sequenciamento de dois canais, que requer apenas duas imagens para codificar os dados de quatro bases de DNA, uma do canal vermelho e outra do canal verde.

Intensidades extraídas de uma imagem comparada com outra imagem resultam em quatro populações distintas, cada uma correspondendo a um nucleotídeo. O processo de identificação de bases determina a que população cada cluster pertence.

Figura 25 Visualização de intensidades de clusters

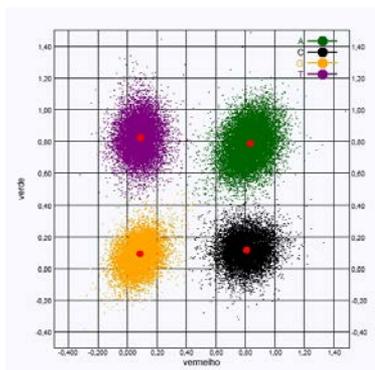


Tabela 1 Identificações de bases em sequenciamento de dois canais

Base	Canal vermelho	Canal verde	Resultado
A	1 (ligado)	1 (ligado)	Clusters que mostram intensidade nos canais vermelho e verde.
C	1 (ligado)	0 (desligado)	Clusters que mostram intensidade apenas no canal vermelho.
G	0 (desligado)	0 (desligado)	Clusters que não mostram qualquer intensidade em locais de cluster conhecidos.
T	0 (desligado)	1 (ligado)	Clusters que mostram intensidade apenas no canal verde.

Filtro de passagem de clusters

Durante a execução, o RTA2 filtra os dados brutos para remover leituras que não estão de acordo com o limite de qualidade dos dados. Clusters de sobreposição e de baixa qualidade são removidos.

Para a análise em dois canais, o RTA2 usa um sistema de base populacional para determinar a pureza de uma identificação de bases. Os clusters passam pelo filtro (PF) quando não mais que uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos tem pureza < 0,63. Os clusters que não passam pelo filtro não passam pelo processo de identificação de bases.

Considerações de indexação

O processo para leituras de índice de identificação de bases difere da identificação de bases durante outras leituras.

As leituras de índice devem começar com pelo menos uma base diferente de G em qualquer um dos primeiros dois ciclos. Se uma leitura de índice inicia com duas identificações de bases de G, nenhuma intensidade de sinal é gerada. O sinal deve estar presente em um dos dois primeiros ciclos para garantir o desempenho da demultiplexação.

Para aumentar a robustez da demultiplexação, selecione sequências de índices que forneçam sinal em pelo menos um canal, de preferência em ambos os canais, para cada ciclo. Ao seguir essa orientação, evita-se que combinações de índice resultem em apenas bases G em qualquer ciclo.

- ▶ Canal vermelho — A ou C
- ▶ Canal verde — A ou T

Esse processo de identificação de bases garante a precisão na análise de amostras de baixo plex.

Pontuação de qualidade

Uma pontuação de qualidade, ou Q-score, é uma previsão da probabilidade de uma identificação de bases incorreta. Um Q-score mais alto indica que uma identificação de bases tem mais qualidade e probabilidade de estar correta.

O Q-score é uma maneira compacta de comunicar baixas probabilidades de erro. Q(X) representa pontuações de qualidade, em que X é a pontuação. A tabela a seguir mostra a relação entre a pontuação de qualidade e a probabilidade de erro.

Q-Score Q(X)	Probabilidade de erro
Q40	0,0001 (1 em 10.000)
Q30	0,001 (1 em 1.000)
Q20	0,01 (1 em 100)
Q10	0,1 (1 em 10)



OBSERVAÇÃO

A pontuação de qualidade se baseia em uma versão modificada do algoritmo Phred.

A pontuação de qualidade calcula um conjunto de prognosticadores para cada identificação de bases e usa esses valores para consultar o Q-score em uma tabela de qualidade. Tabelas de qualidade são criadas para fornecer previsões de qualidade com precisão ideal para execuções geradas por uma configuração específica de plataforma de sequenciamento e versão de química.

Após a determinação do Q-Score, os resultados são registrados em arquivos de identificação de bases.

Arquivos de saída de sequenciamento

Tipo de arquivo	Descrição, local e nome do arquivo
Arquivos de identificação de bases	Cada bloco analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases, agregado em um arquivo para cada cavidade e para cada ciclo. O arquivo agregado contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade codificada para cada cluster da cavidade. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Os arquivos são armazenados em uma pasta para cada cavidade. [Ciclo].bcl.bgzf, em que [Ciclo] representa o número do ciclo com quatro algarismos. Os arquivos de identificação de bases são compactados com a compactação de blocos gzip.
Arquivo de índice de identificação de bases	Para cada cavidade, um arquivo de índice binário lista as informações originais do bloco em um par de valores para cada bloco, que são número do bloco e número de clusters para o bloco. Os arquivos de índice de identificação de bases são criados na primeira vez em que um arquivo de identificação de bases é criado para a cavidade. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Os arquivos são armazenados em uma pasta para cada cavidade. s_[Cavidade].bci
Arquivos de localização de cluster	Para cada bloco, as coordenadas XY para cada cluster são agregadas em um arquivo de localização de cluster para cada cavidade. Os arquivos de localização de cluster são o resultado da geração do modelo. Data\Intensities\L00[X] — Os arquivos são armazenados em uma pasta para cada cavidade. s_[cavidade].locs
Arquivos de filtro	O arquivo de filtro especifica se um cluster passou pelos filtros. As informações de filtro são agregadas em um arquivo de filtro para cada cavidade e leitura. Os arquivos de filtro são gerados no ciclo 26 usando 25 ciclos de dados. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — Os arquivos são armazenados em uma pasta para cada cavidade. s_[cavidade].filter
Arquivos InterOp	Arquivos binários de relatórios utilizados para o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Os arquivos InterOp são atualizados ao longo da execução. Pasta InterOp
Arquivo de configuração do RTA	Criado no início da execução, o arquivo de configuração do RTA lista as configurações da execução. <Nome da pasta de execuções>, RTAConfiguration.xml
Arquivo de informações da execução	Lista o nome da execução, o número de ciclos em cada leitura, se a leitura é uma leitura indexada e o número de feixes e blocos da lâmina de fluxo. O arquivo de informações da execução é criado no início da execução. <Nome da pasta de execuções>, RunInfo.xml
Arquivos de miniaturas	Uma imagem em miniatura para cada canal de cor (vermelho e verde) para os blocos 1, 6 e 12 de todas as câmeras, das superfícies superior e inferior, em cada ciclo durante o processo de obtenção de imagem. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] — Os arquivos são armazenados em uma pasta para cada cavidade e em uma subpasta para cada ciclo. s_[cavidade]_[bloco]_[canal].jpg — No nome do arquivo, o bloco é representado com um número de cinco algarismos que indica a superfície, o feixe, a câmera e o bloco. Para obter mais informações, consulte <i>Numeração dos blocos</i> na página 54 e <i>Nomenclatura de imagens em miniatura</i> na página 54.

Blocos da lâmina de fluxo

Os blocos são pequenas áreas de imagem na lâmina de fluxo definidas como o campo de visão pela câmera. O número total de blocos depende do número de cavidades, faixas e superfícies que têm sua imagem capturada na lâmina de fluxo e de como as câmeras trabalham juntas para coletar as imagens.

- ▶ Lâminas de fluxo de alta produção têm um total de 864 blocos.

► Lâminas de fluxo de média produção têm um total de 288 blocos.

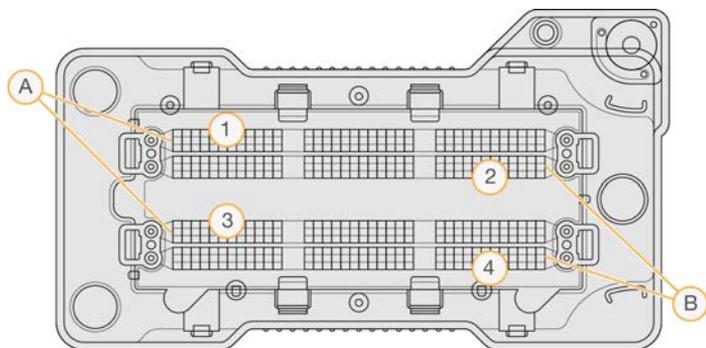
Tabela 2 Blocos da lâmina de fluxo

Componente da lâmina de fluxo	Alta produção	Média produção	Descrição
Cavidades	4	4	Uma cavidade é um canal físico com portas de entrada e de saída dedicadas.
Superfícies	2	2	A imagem da lâmina de fluxo é capturada em duas superfícies, a superior e a inferior. A imagem da superfície superior de um bloco é capturada, depois a imagem da superfície inferior do mesmo bloco é capturada antes de avançar para o próximo bloco.
Feixes por cavidade	3	1	Um feixe é uma coluna de blocos em uma cavidade.
Segmentos de câmara	3	3	O instrumento usa seis câmeras para capturar a imagem da lâmina de fluxo em três segmentos para cada cavidade.
Blocos por feixe por segmento de câmara	12	12	Um bloco é a área da lâmina de fluxo que a câmara vê como uma imagem.
Total de blocos com imagem gerada	864	288	O número total de blocos é igual a cavidades × superfícies × faixas × segmentos de câmara × blocos por faixa por segmento.

Numeração das cavidades

As cavidades 1 e 3, chamadas de par de cavidades A, têm a imagem capturada ao mesmo tempo. As cavidades 2 e 4, chamadas de par de cavidades B, têm sua imagem capturada quando a imagem do par A é concluída.

Figura 26 Numeração das cavidades

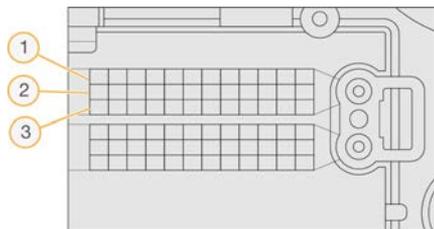


- A Par de cavidades A — Cavidades 1 e 3
- B Par de cavidades B — Cavidades 2 e 4

Numeração dos feixes

A imagem de cada cavidade é capturada em três feixes. Os feixes são numerados de 1 a 3 para lâminas de fluxo de alta produção.

Figura 27 Numeração dos feixes

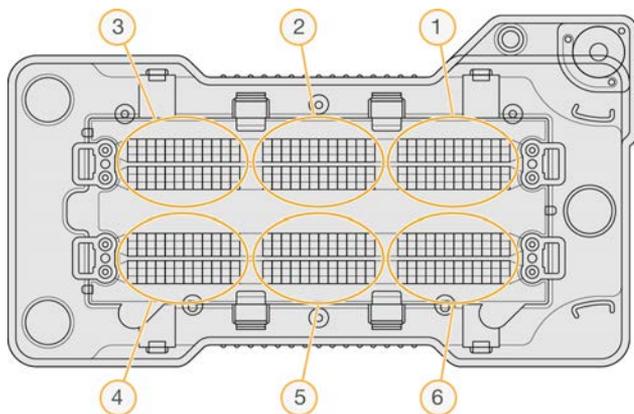


Numeração das câmeras

O NextSeq 500 usa seis câmeras para criar a imagem da lâmina de fluxo.

As câmeras são numeradas de 1 a 6. As câmeras 1 a 3 capturam a imagem da cavidade um. As câmeras 4 a 6 capturam a imagem da cavidade três. Após capturar a imagem das cavidades 1 e 3, o módulo de imagem se move para o eixo X para capturar a imagem das cavidades 2 e 4.

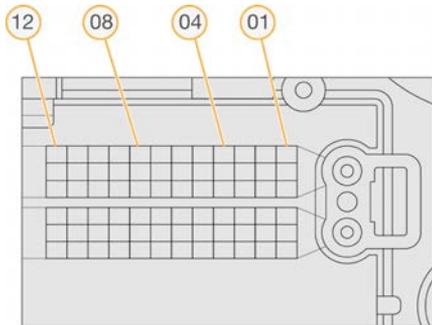
Figura 28 Numeração das câmeras e segmentos (lâmina de fluxo de alta produção exibida)



Numeração dos blocos

Há 12 blocos em cada feixe de cada segmento de câmera. Os blocos são numerados de 01 a 12, independentemente do número do feixe ou do segmento da câmera, e representados em dois dígitos.

Figura 29 Numeração dos blocos



O número completo do bloco tem cinco dígitos para representar a localização, como a seguir:

- ▶ **Superfície** — 1 representa a superfície superior; 2 representa a superfície inferior
- ▶ **Feixe** — 1, 2 ou 3
- ▶ **Câmera** — 1, 2, 3, 4, 5 ou 6
- ▶ **Bloco** — 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 ou 12

Exemplo: o número de bloco 12508 indica superfície superior, feixe 2, câmera 5 e bloco 8.

O número completo de cinco dígitos do bloco é usado no nome de arquivo de imagens em miniatura e arquivos de phasing empírico. Para obter mais informações, consulte [Arquivos de saída de sequenciamento na página 51](#).

Nomenclatura de imagens em miniatura

Para cada canal de cor (vermelho e verde) para os blocos 1, 6 e 12, uma imagem em miniatura é gerada de todas as câmeras, das superfícies superior e inferior, em cada ciclo durante o processo de obtenção de imagem. Os arquivos de miniatura são gerados no formato de arquivo JPG.

Cada imagem é nomeada com o número do bloco conforme indicado pela convenção de nomenclatura a seguir, que sempre começa com **s_**:

- ▶ **Cavidade** — 1, 2, 3 ou 4
- ▶ **Bloco** — Um número de cinco dígitos, que indica a superfície, a faixa, a câmera e o bloco
- ▶ **Canal** — Vermelho ou verde

Exemplo: `s_3_12512_green.jpg`, que indica cavidade 3, superfície superior, faixa 2, câmera 5, bloco 12 e canal verde.

Estrutura da pasta de saída

O software de controle gera o nome da pasta de saída automaticamente.

Data (Dados)

Intensities (Intensidades)

BaseCalls (Identificações de bases)

 **L001** — Arquivos de identificação de bases da cavidade 1 agregados em um arquivo por ciclo.

 **L002** — Arquivos de identificação de bases da cavidade 2 agregados em um arquivo por ciclo.

 **L003** — Arquivos de identificação de bases da cavidade 3 agregados em um arquivo por ciclo.

 **L004** — Arquivos de identificação de bases da cavidade 4 agregados em um arquivo por ciclo.

 **L001** — Um arquivo *.locs agregado da cavidade 1.

 **L002** — Um arquivo *.locs agregado da cavidade 2.

 **L003** — Um arquivo *.locs agregado da cavidade 3.

 **L004** — Um arquivo *.locs agregado da cavidade 4.

Images (Imagens)

Focus (Foco)

 **L001** — Imagens de foco da cavidade 1.

 **L002** — Imagens de foco da cavidade 2.

 **L003** — Imagens de foco da cavidade 3.

 **L004** — Imagens de foco da cavidade 4.

 **InterOp** — Arquivos binários usados pelo Sequencing Analysis Viewer (SAV).

 **Logs** (Registros) — Arquivos de registro descrevendo etapas operacionais.

 **Recipe** (Receita) — Arquivo de receita específico para a execução com o ID do cartucho de reagente.

 **RTALogs** (Registros de RTA) — Arquivos de registro descrevendo etapas de análise.

 **Thumbnail_Images** (Imagens em miniatura) — Imagens em miniatura dos blocos 1, 6 e 12 em cada faixa e em cada ciclo.

 RTAComplete.xml

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

Índice

A

- ajuda
 - documentação 1
- alertas de status 4
- algoritmo Phred 50
- análise
 - arquivos de saída 51
 - opções 19
- análise, primário
 - pureza de sinal 49
- arquivos de filtro 51
- arquivos de identificação de bases 51
- arquivos de saída 51
- arquivos de saída, sequenciamento 51
- arquivos InterOp 35, 51
- arquivos locs 51
- assistência técnica 59
- atualização do software 32

B

- barra de status 2
- BaseSpace Sequence Hub 1, 19
 - configuração 44
 - ícones de transferência 26
 - login 19, 39
- botão de alimentação 5, 10

C

- cartucho de reagente
 - preparação 16
 - reservatório n.º 28 29
 - visão geral 7
- cartucho de solução tampão 9, 23
- ciclos em uma leitura 16
- compartimento de imagem 2
- compartimento de solução tampão 2
- compartimento do filtro de ar 2-3
- compartimento do reagente 2
- compatibilidade
 - rastreamento RFID 7
- componentes
 - barra de status 2
 - compartimento da solução tampão 2
 - compartimento de imagem 2
 - compartimento do filtro de ar 2
 - compartimento do reagente 2

- configuração de execução, opção avançada 12
- considerações de indexação 50
- criar uma execução 16

D

- definições de configuração 43
- descartar materiais de consumo 13
- desligamento do instrumento 34
- documentação 1, 59
- duração da execução 15

E

- erro de armazenamento de rede 43
- erros
 - probabilidade 50
- erros de verificação antes da execução 36
- erros e advertências 4
- execuções
 - criar 16

F

- filtro de ar 31
- filtro de passagem (PF) 49
- filtro de passagem de clusters 49
- filtro de pureza 49
- fluxo de trabalho
 - cartucho de reagente 16, 23
 - cartucho de solução tampão 23
 - considerações de indexação 50
 - duração da execução 15
 - hipoclorito de sódio 29
 - lâmina de fluxo 21
 - login no BaseSpace Sequence Hub 19, 39
 - métricas de execução 25
 - modo Local Run Manager 20
 - modo manual 20
 - NCS 19
 - opção de carregamento avançado 12
 - porta do compartimento da lâmina de fluxo 18
 - preparação da lâmina de fluxo 17
 - reagentes gastos 22
 - Run Manager 19
 - sequenciamento 47
 - verificação antes da execução 24
- fluxo de trabalho de sequenciamento 47

formamida, posição 6 24

G

geração do modelo 48
gerenciar instrumento
desligar 34

H

hipoclorito de sódio, limpeza 29

I

ícones
erros e advertências 4
minimizar NCS 5
status 4
identificação de bases 49
considerações de indexação 50
imagem, sequenciamento de dois canais 49
imagens em miniatura 51
instrumento
botão de alimentação 5
definições de configuração 43
inicialização 10
intensidades 49
interruptor de alimentação 10

L

lâmina de fluxo
blocos 51
embalagens 17
imagens 53
limpeza 17
nomenclatura do arquivo de imagem 54
nova hibridização 38
numeração de cavidades 52
numeração dos blocos 54
número do feixe 53
pares de cavidades 7
pinos de alinhamento 21
tipos 1
visão geral 7
limpeza
automática 27
componentes de limpeza 28
limpeza manual 28

materiais de consumo fornecidos pelo
usuário 28

limpeza após a execução 27
limpeza do instrumento 28
local da pasta 20
Local Run Manager 20
criar uma execução 16
módulos 19
localização de cluster
arquivos 51
geração do modelo 48

M

manutenção do instrumento
materiais de consumo 13
manutenção preventiva 28
manutenção, preventiva 28
materiais de consumo
água aprovada para uso em laboratório 14
execuções de sequenciamento 13
lâmina de fluxo 7
manutenção do instrumento 13
materiais de consumo de limpeza 28-29
materiais de consumo fornecidos pelo usuário 13
material de consumo
cartucho de reagente 7
cartucho de solução tampão 9
Mensagem de erro RAID 42
métricas
ciclos de densidade de cluster 26
ciclos de intensidade 26
identificação de bases 49
métricas de execução 25
modo de execução
Local Run Manager 19
manual 19-20
modo manual
criar uma execução 16
módulos, Local Run Manager 19

N

nome de usuário do sistema e senha 10
nome de usuário e senha 10
nova hibridização de primer 38
nova hibridização, Leitura 1 38
numeração das câmeras 53
numeração de cavidades 52
numeração do feixe 53
numeração dos blocos 54

O

- opção de carregamento avançado 12
- orientações para água aprovada para uso em laboratório 14

P

- parâmetros de execução
 - editar parâmetros 20
 - modo Local Run Manager 20
 - modo manual 20
- pares de cavidades 52
- pasta de saída 19
- phasing 48
- porta do compartimento da lâmina de fluxo 18
- prephasing 48

Q

- Q-scores 50

R

- reagentes
 - descarte adequado 23
- reagentes gastos
 - descarte 22, 30
 - receptáculo cheio 37
- RTA v2
 - encerramento 46
- RTAv2
 - visão geral 46
- RunInfo.xml 35, 51

S

- sequenciamento
 - materiais de consumo fornecidos pelo usuário 13
- Sequencing Analysis Viewer 15
- serviço de cópia universal 27
- Serviço de monitoramento Illumina Proactive 12, 44
- software
 - análise de imagem, identificação de bases 3
 - atualização automática 33
 - atualização manual 33
 - criar uma execução 16

- definições de configuração 43
 - do instrumento 3
 - duração da execução 15
 - inicialização 10
- software de controle 3
- software Real-Time Analysis 1, 3
- Software Real-Time Analysis
 - resultados 51
- solução de problemas
 - arquivos específicos para a execução 35
 - métricas de baixa qualidade 38
 - opções de contato 35
 - receptáculo de reagentes gastos 37
 - verificação antes da execução 36
 - verificação do sistema 40
- suporte ao cliente 59

T

- tabelas de qualidade 50
- tamanho da leitura 15-16
- técnica, ajuda 59
- transferência de dados
 - ícones de atividade 26
 - serviço de cópia universal 27
- treinamento on-line 1

V

- verificação antes da execução 24
- verificação do sistema 40

W

- Windows
 - acesso 5
 - senha 5

Assistência técnica

Para obter assistência técnica, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Site: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Telefones do suporte ao cliente da Illumina

Região	Ligação gratuita	Regional
América do Norte	+1.800.809.4566	
Alemanha	+49 8001014940	+49 8938035677
Austrália	+1.800.775.688	
Áustria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Coreia do Sul	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
Espanha	+34 911899417	+34 800300143
Finlândia	+358 800918363	+358 974790110
França	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong, China	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Itália	+39 800985513	+39 236003759
Japão	0800.111.5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nova Zelândia	0800.451.650	
Países Baixos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapura	+1.800.579.2745	
Suécia	+46 850619671	+46 200883979
Suíça	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, China	00806651752	
Outros países	+44.1799.534000	

Fichas de dados de segurança (SDSs) – Disponíveis no site da Illumina em support.illumina.com/sds.html.

Documentação do produto – Disponível para download em support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122, EUA.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

**Somente para uso em pesquisa.
Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico.**

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]