

Modo de pesquisa do NextSeq 550Dx

Guia de referência do instrumento



Este documento e seu conteúdo são 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 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 registrada, 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 inteiramente lido e entendido 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 SOFTWARE).

© 2018 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
Documento n.º 1000000041922 v01	Março de 2018	Acrescentadas informações sobre o serviço de monitoramento Illumina Proactive na seção Personalizar configurações do sistema.
Documento n.º 1000000041922 v00	Novembro de 2017	Versão inicial.

Índice

Capítulo 1 Visão geral	1
Sobre este guia	1
Introdução	1
Recursos adicionais	2
Componentes do instrumento	2
Visão geral dos materiais de consumo de sequenciamento	6
Capítulo 2 Introdução	11
Iniciar o instrumento	11
Personalizar configurações do sistema	12
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	13
Capítulo 3 Sequenciamento	15
Introdução	15
Fluxo de trabalho de sequenciamento	16
Preparar o cartucho de reagente	16
Preparar a lâmina de fluxo	17
Preparar bibliotecas para sequenciamento	17
Configurar uma execução de sequenciamento	18
Monitorar o andamento da execução	25
Limpeza automática após a execução	27
Capítulo 4 Leitura	29
Introdução	29
Fluxo de trabalho de leitura	30
Fazer download da pasta DMAP	30
Carregar o BeadChip no adaptador	31
Configurar uma leitura	32
Monitorar o progresso de leitura	34
Capítulo 5 Manutenção	37
Introdução	37
Realizar uma limpeza manual	37
Trocar o filtro de ar	40
Atualizações de software	41
Opções de reinicialização e desligamento	43
Apêndice A Solução de problemas	45
Introdução	45
Arquivos de solução de problemas	45
Resolver erros da verificação automática	46
O receptáculo de reagentes gastos está cheio	48
Fluxo de trabalho de nova hibridização	49

Erros do BeadChip e da leitura	51
Receitas personalizadas e pastas de receitas	52
Mensagem de erro RAID	52
Definir as configurações do sistema	53
Apêndice B Real-Time Analysis	57
Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	57
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	58
Apêndice C Pastas e arquivos de saída	63
Arquivos de saída de sequenciamento	63
Estrutura da pasta de saída de sequenciamento	66
Leitura dos arquivos de saída	67
Estrutura da pasta de saída da leitura	67
Índice	69
Assistência técnica	73

Capítulo 1 Visão geral

Sobre este guia	1
Introdução	1
Recursos adicionais	2
Componentes do instrumento	2
Visão geral dos materiais de consumo de sequenciamento	6

Sobre este guia

Este guia de referência do instrumento fornece instruções sobre o uso do instrumento NextSeq 550Dx no modo de pesquisa (URP).

Introdução

O instrumento Illumina® NextSeq™ 550Dx é uma solução única que fornece uma transição perfeita entre sequenciamento de alto rendimento e leitura de matrizes.

Recursos de sequenciamento

- ▶ **Sequenciamento de alto rendimento** — O instrumento NextSeq™ 550 habilita o sequenciamento de exomas, genomas completos e transcritomas e é compatível com as bibliotecas do TruSeq™ e do 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 550Dx usa uma implementação de RTA chamada RTA v2, que contém diferenças significativas de arquitetura e recursos. Para obter mais informações, consulte *Real-Time Analysis* na página 57.
- ▶ **Integração com o BaseSpace®** — O fluxo de trabalho de sequenciamento é integrado com o BaseSpace, o ambiente de computação genômica da Illumina para análise de dados, o armazenamento e a colaboração. Para instrumentos configurados para o BaseSpace, são especificadas informações de biblioteca e parâmetros de execução na guia BaseSpace Prep (Preparação do BaseSpace). Execuções definidas no BaseSpace são exibidas na interface do instrumento durante a configuração da execução. Conforme a execução continua, os arquivos de saída são transmitidos em tempo real para o BaseSpace ou BaseSpace Onsite.

Recursos de leitura de matrizes

- ▶ **Leitura de matrizes integrada no software de controle** — O instrumento do NextSeq 550Dx permite fazer a transição entre a leitura de matrizes e o sequenciamento de alto rendimento no mesmo instrumento usando o mesmo software de controle.
- ▶ **Capacidade de imagem ampliada** — O sistema de imagem do instrumento NextSeq 550Dx contém modificações de software e de plataforma que permitem gerar imagens de superfícies maiores para acomodar a leitura de BeadChip.
- ▶ **Tipos de BeadChip** — Entre os tipos de BeadChip compatíveis estão o CytoSNP-12, o CytoSNP-850K e o Karyomap-12.

- ▶ **Adaptador BeadChip** — Um adaptador BeadChip reutilizável permite carregar com facilidade um BeadChip no instrumento.
- ▶ **Análise de dados** — Use o software BlueFuse® Multi para analisar os dados de matriz.

Recursos adicionais

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

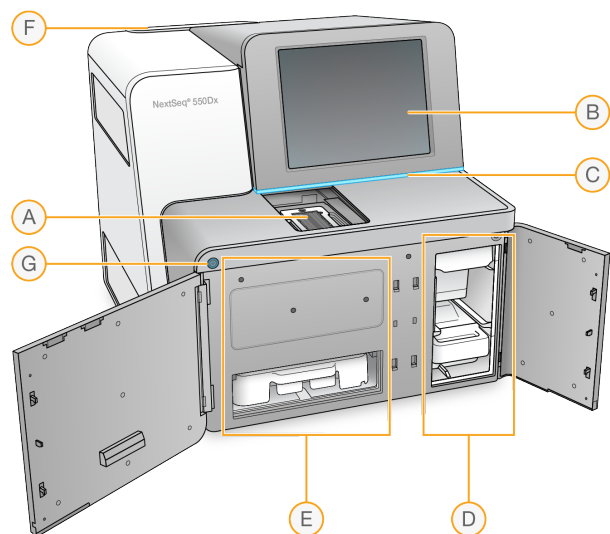
Recurso	Descrição
<i>Guia de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 100000009513)</i>	Quando estiver no modo de diagnóstico, fornece instruções de operação do instrumento e procedimentos de solução de problemas.
<i>Guia de preparação do local do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 100000009869)</i>	Fornecer especificações para área do laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais.
<i>Guia de conformidade e segurança do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 100000009868)</i>	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e rotulagem de instrumentos.
<i>Guia de conformidade do Leitor RFID (documento n.º 100000030332)</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.
<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 (help.basespace.illumina.com)</i>	Fornecer informações sobre o uso do BaseSpace® e de opções de análise disponíveis.

Visite as [páginas de suporte do instrumento NextSeq 550Dx](#) no site da Illumina para acessar documentação, downloads de software, treinamentos on-line e perguntas frequentes.

Componentes do instrumento

O instrumento NextSeq 550Dx tem um monitor com tela de toque, uma barra de status e 4 compartimentos.

Figura 1 Componentes do instrumento



- A **Compartimento de imagem** — Abriga a lâmina de fluxo para o sequenciamento ou o adaptador BeadChip para a leitura.
- B **Monitor com tela de toque** — Permite a configuração e instalação do instrumento usando a interface do software de controle.
- C **Barra de status** — Indica o status do instrumento como: processando (azul), requer atenção (laranja) ou pronto para sequenciamento (verde).
- D **Compartimento de tampão** — Abriga o cartucho de tampão e o receptáculo de reagentes gastos.
- E **Compartimento do reagente** — Abriga o cartucho de reagente.
- F **Compartimento do filtro de ar** — Contém o filtro de ar. Acesse o filtro a partir da parte posterior do instrumento.
- G **Botão de alimentação** — Liga ou desliga o instrumento e o computador do instrumento.

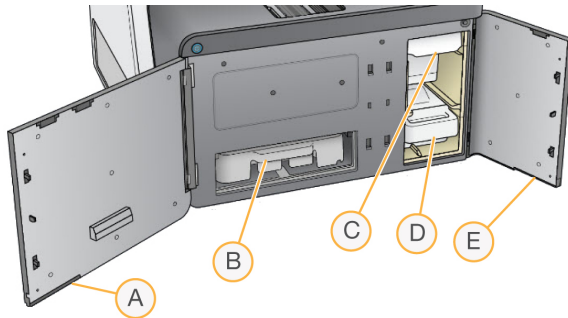
Compartimento de imagem

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

Compartimentos do reagente e de tampão

A configuração de uma execução de sequenciamento no instrumento NextSeq 550Dx 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 tampão



- A **Porta do compartimento do reagente** — Protege o compartimento do reagente com uma trava sob a área inferior direita da porta. O compartimento do reagente contém o cartucho de reagente.
- B **Cartucho de reagente** — O cartucho de reagente é um material de consumo pré-carregado descartável.
- C **Cartucho de tampão** — O cartucho de 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 tampão** — Protege o compartimento de tampão com uma trava sob o canto inferior esquerdo da porta.

Compartimento do filtro de ar

O compartimento do filtro de ar acomoda o filtro de ar e está localizado na parte posterior do instrumento. 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 40](#).

Software NextSeq 550Dx

O software do instrumento contém aplicativos integrados que realizam execuções de sequenciamento ou leituras de matrizes.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** — O software de controle guia você ao longo das etapas de configuração de uma execução de sequenciamento ou de uma leitura de matriz.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA)** — Para execuções de sequenciamento, o RTA realiza análise de imagens e identificação de bases ao longo da execução. O instrumento NextSeq 550Dx 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 57](#).

Ícones de status

Um ícone de status, no canto superior direito do controle, sinaliza se há alterações nas condições durante a configuração da execução 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 um aviso. Avisos não interrompem uma execução nem exigem uma ação antes de continuar.
	Erro	Ocorreu um erro. Erros exigem uma ação antes de continuar com a execução.
	Serviço necessário	Ocorreu uma notificação que exige atenção. Consulte a mensagem para obter outras informações.

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.

OBSERVAÇÃO

A confirmação de uma mensagem redefine o ícone e a mensagem é esmaecida. A mensagem ainda é visível ao usuário se ele selecionar o ícone, mas desaparece quando o NCS é reiniciado.

Botão de energia

O botão de energia, na parte dianteira do NextSeq, liga a energia do NextSeq 550Dx para o instrumento e para o computador do instrumento. O botão de energia realiza as ações a seguir dependendo do estado da energia do instrumento. Por padrão, o NextSeq 550Dx inicia no modo de diagnóstico.

Para obter informações sobre o desligamento do instrumento, consulte [Desligar o instrumento na página 43](#).

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 energia 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.

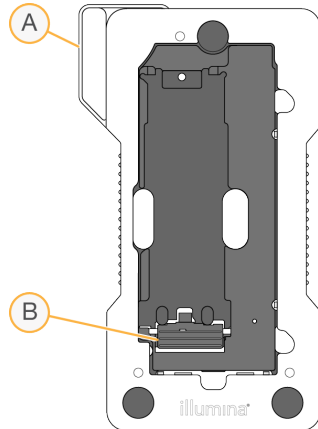
OBSERVAÇÃO

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.

Visão geral do adaptador BeadChip reutilizável

O adaptador BeadChip reutilizável abriga o BeadChip durante a leitura. O BeadChip é fixado na plataforma rebaixada do adaptador com o clipe de retenção. A seguir, o adaptador BeadChip é carregado na plataforma do compartimento de imagens.

Figura 3 Adaptador BeadChip reutilizável



- A Adaptador BeadChip
- B Clipe de retenção

Visão geral dos materiais de consumo de sequenciamento

A realização de uma execução de sequenciamento no instrumento NextSeq 550Dx no modo de pesquisa exige um kit NextSeq 500/550 de uso único ou de um kit de reagentes NextSeq 550Dx de alta produção. Cada kit contém uma lâmina de fluxo e os reagentes necessários para uma execução de sequenciamento. A lâmina de fluxo, o cartucho de reagente e o cartucho de tampão usam identificação por radiofrequência (RFID) para o rastreamento preciso de materiais de consumo e para compatibilidade.

OBSERVAÇÃO



Mantenha os materiais de consumo de sequenciamento armazenados nas caixas até que estejam prontos para o uso.

Se você usar um kit de reagentes NextSeq 550Dx de alta produção para uma execução no modo de pesquisa, todos os componentes devem ser do mesmo lote do kit. Um kit NextSeq 500/550 não pode ser usado para uma execução no modo de diagnóstico.

Identificação de compatibilidade do kit

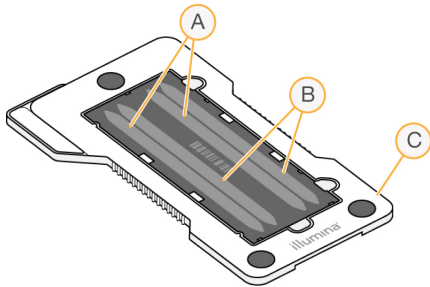
Os componentes do kit são rotulados com indicadores codificados por cores para mostrar a compatibilidade entre as lâminas de fluxo e os cartuchos de reagente. Sempre use um cartucho de reagente e uma lâmina de fluxo compatíveis. O cartucho de tampão é universal.

Cada lâmina de fluxo e cada cartucho de reagente são rotulados 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 4 Cartucho da lâmina de fluxo



- A Par de cavidades A — Cavidades 1 e 3
- B Par de cavidades B — Cavidades 2 e 4
- 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 1 e 3 (par de cavidades A) têm a imagem capturada ao mesmo tempo.
- ▶ As cavidades 2 e 4 (par de cavidades B) têm sua imagem capturada quando a imagem do par A é concluída.

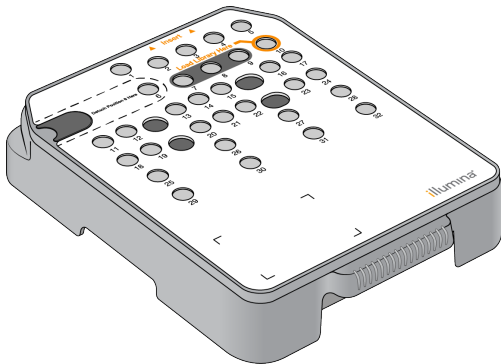
Embora a lâmina de fluxo tenha quatro cavidades, apenas uma biblioteca ou um conjunto de bibliotecas agrupadas é sequenciado na lâmina de fluxo. As bibliotecas são carregadas no cartucho de reagente a partir de um único reservatório e transferidas automaticamente para a lâmina de fluxo em todas as quatro 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 63](#).

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 5 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 tampão para os reservatórios reservados, passa pelo sistema e chega até o receptáculo de reagentes gastos.

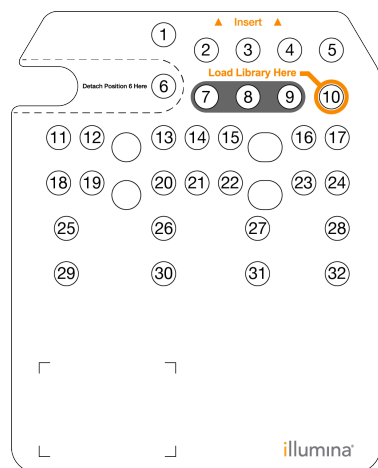


ADVERTÊNCIA

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, apropriados 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 6 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).

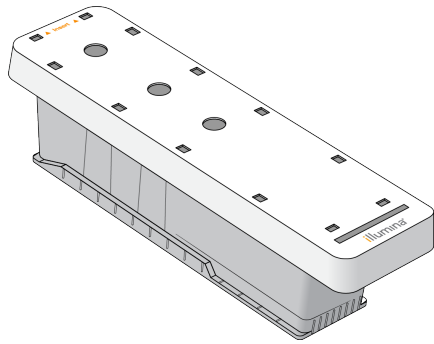
Reservatório removível na posição n.º 6

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 na posição 6 é removível. Para obter mais informações, consulte *Remover o reservatório usado na posição n.º 6* na página 22.

Visão geral do cartucho de tampão

O cartucho de 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 tampão é suficiente para o sequenciamento de uma lâmina de fluxo.

Figura 7 Cartucho de tampão



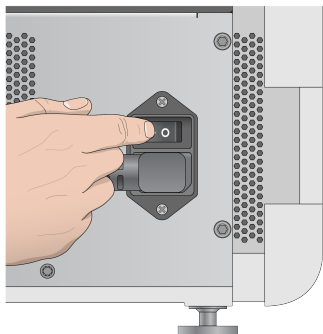
Capítulo 2 Introdução

Iniciar o instrumento	11
Personalizar configurações do sistema	12
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	13

Iniciar o instrumento

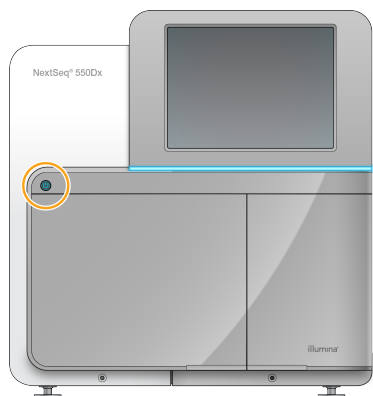
Ligue o interruptor de alimentação de alternância na posição I (ligado).

Figura 8 Interruptor localizado na parte traseira do instrumento



- 1 Pressione o botão de energia acima do compartimento do reagente. O botão de energia liga a energia do instrumento e inicia o computador e software integrado do instrumento. Por padrão, o instrumento inicia no modo de diagnóstico.

Figura 9 Botão de energia localizado na parte dianteira do instrumento



- 2 Espere até que o sistema operacional termine de carregar. O NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) é ativado e inicializa o sistema automaticamente. Quando a etapa de inicialização estiver concluída, a tela Home (Página inicial) será aberta.
- 3 Informe seu nome de usuário e senha do Local Run Manager. Para obter informações sobre as senhas do Local Run Manager, consulte o *Guia de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 100000009513)*.
- 4 Selecione **Login**. É aberta a tela Home (Página inicial) com os ícones de sequenciamento, Local Run Manager, gerenciamento do instrumento e realizar limpeza.

- 5 Use o comando Reboot to RUO (Reiniciar em URP) no NOS para desligar o instrumento com segurança e reiniciar no modo de pesquisa.
 - ▶ Selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
 - ▶ Selecione **Reboot / Shut Down** (Reiniciar/Desligar).
 - ▶ Selecione **Reboot to RUO** (Reiniciar em URP [Uso restrito em pesquisa]).
- 6 Espere até que o sistema operacional termine de carregar.
O NCS é ativado e inicializa o sistema automaticamente. Quando a etapa de inicialização estiver concluída, a tela Home (Página inicial) será aberta.
- 7 Se o seu sistema foi configurado para exigir credenciais de login, faça login no Windows com o nome de usuário e senha de seu local.



OBSERVAÇÃO

Se você não tem certeza sobre o modo em que está o instrumento, consulte *Indicadores de modo do instrumento*.

Indicadores de modo do instrumento

A tabela a seguir relaciona os indicadores de modo do instrumento na tela do NCS ou do NOS. Para obter informações sobre a troca do modo de pesquisa para o modo de diagnóstico, consulte *Opções de reinicialização e desligamento na página 43*.

Modo	Tela Home (Página inicial)	Barra de cores	Orientação do ícone de status
Modo de diagnóstico	Bem-vindo ao NextSeqDx	Azul	Horizontal
Modo de pesquisa	Bem-vindo ao NextSeq	Laranja	Vertical

Personalizar configurações do sistema

O software de controle contém configurações personalizáveis do sistema para os seguintes itens:

- ▶ Preferências de entrada
- ▶ Configurações de áudio
- ▶ Nome do instrumento
- ▶ Preferências de configuração de execuções
- ▶ Descarte de reagentes não utilizados

Personalizar o avatar e apelido do instrumento

- 1 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 2 Para atribuir uma imagem de avatar preferida para seu instrumento, selecione **Browse** (Procurar) e procure a imagem.
- 3 No campo Nick Name (Apelido), insira o nome escolhido para o instrumento.
- 4 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e sair da 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 Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Customization** (Personalização do sistema).
- 2 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.
- 3 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 é necessária a interação do usuário
 - ▶ Quando uma execução for concluída
- 4 Selecione **Save** (Salvar) para salvar as definições e sair da tela.

Definir opções de configuração da execução

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

Definir a opção de descarte automático

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

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

Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário

Os materiais de consumo e equipamentos a seguir são usados para preparação dos materiais de consumo, sequenciamento e manutenção do instrumento.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário para execuções de 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
200 mM de Tris-HCl, pH7	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Desnaturação de biblioteca
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 e uso geral

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário para manutenção do instrumento

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, n.º do catálogo 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)
Filtro de ar	Illumina, n.º do catálogo 20022240	Limpar o ar que o instrumento usa para resfriamento

Orientações para água aprovada para uso em laboratório

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

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

Equipamentos fornecidos pelo usuário

Item	Origem
Congelador, -25 °C a -15 °C, frost-free	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Refrigerador, 2 °C a 8 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório

Capítulo 3 Sequenciamento

Introdução	15
Fluxo de trabalho de sequenciamento	16
Preparar o cartucho de reagente	16
Preparar a lâmina de fluxo	17
Preparar bibliotecas para sequenciamento	17
Configurar uma execução de sequenciamento	18
Monitorar o andamento da execução	25
Limpeza automática após a execução	27

Introdução

Para realizar uma execução de sequenciamento no instrumento NextSeq 550Dx, prepare um cartucho de reagente e uma lâmina de fluxo e siga as solicitações 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 um dos nucleotídeos etiquetados 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 andamento e as estatísticas da execução a partir da interface do software de controle, da guia Run (Execução) no BaseSpace ou de um computador em 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 ou para o 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 \(help.basespace.illumina.com\)](#).

Duração da execução de sequenciamento

A duração da execução de sequenciamento depende do número de ciclos realizados. O comprimento máximo de execução é uma execução do tipo paired-end de 150 ciclos para cada leitura (2 x 150), além de até oito ciclos para cada leitura de dois índices.

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 necessário para os cálculos de phasing e prephasing.

Fluxo de trabalho de sequenciamento



Preparar o cartucho de reagente

Siga sempre as orientações do cartucho de reagente com cuidado para fazer um sequenciamento bem-sucedido.

- 1 Remova o cartucho de reagente do armazenamento de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Escolha um dos seguintes métodos para descongelar os reagentes. Não mergulhe o cartucho. Depois que o cartucho for descongelado, seque-o antes de continuar com a próxima etapa.

Temperatura	Tempo de descongelamento	Limite de estabilidade
Banho-maria de 15 °C a 30 °C	60 minutos	Não ultrapassar 6 horas
2 °C a 8 °C	7 horas	Não ultrapassar 5 dias

OBSERVAÇÃO

Se mais de um cartucho for descongelado no mesmo banho-maria, deixe mais tempo para descongelar.

- Inverta o cartucho cinco vezes para misturar os reagentes.
- Inspeccione a parte inferior do cartucho para garantir que os reagentes estejam descongelados e livres de precipitados. Confirme se as posições 29, 30, 31 e 32 estão descongeladas porque elas são as maiores e levarão mais tempo para descongelar.
- Bata levemente na bancada para reduzir as bolhas de ar.
Para obter melhores resultados, prossiga diretamente para o carregamento da amostra e a configuração da execução.

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, apropriados 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

- Retire um novo pacote da lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- Reserve o pacote da lâmina de fluxo desembulhado em temperatura ambiente durante 30 minutos.

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.

Preparar bibliotecas para sequenciamento

Desnaturar e diluir bibliotecas

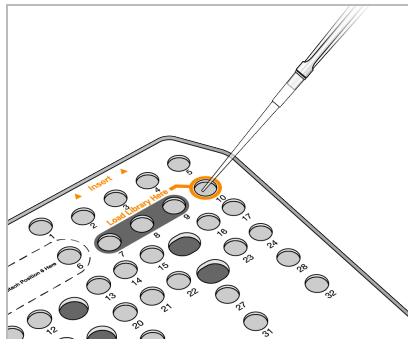
Desnature e dilua suas bibliotecas em um volume de carregamento de 1,3 ml e uma concentração de carregamento de 1,8 pM. Na prática, a concentração de carga pode variar dependendo dos métodos de preparação e de quantificação da biblioteca. Para obter instruções, consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do sistema NextSeq (documento n.º 15048776)*.

Carregar bibliotecas no cartucho de reagente

- 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 10 Carregar bibliotecas



Configurar uma execução de sequenciamento

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Experiment** (Experimento) e depois **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.

Se o instrumento estiver configurado para BaseSpace, será solicitado que você faça login no BaseSpace. Se o instrumento estiver configurado no modo independente, a próxima etapa será carregar a lâmina de fluxo.

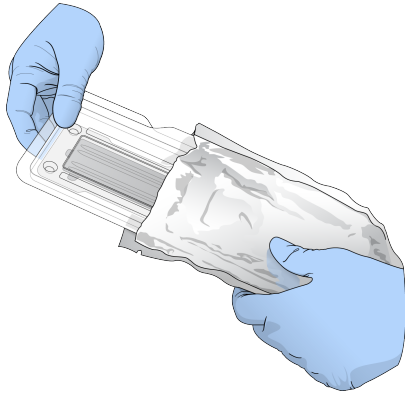
Fazer login no BaseSpace

- 1 Digite seu nome de usuário e senha do BaseSpace.
- 2 Selecione **Next** (Avançar).

Carregar a lâmina de fluxo

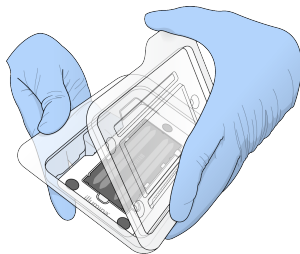
- 1 Remova a lâmina de fluxo utilizada em uma execução anterior.
- 2 Remova a lâmina de fluxo da embalagem metálica.

Figura 11 Remover da embalagem metálica



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

Figura 12 Remover do pacote transparente



- 4 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.

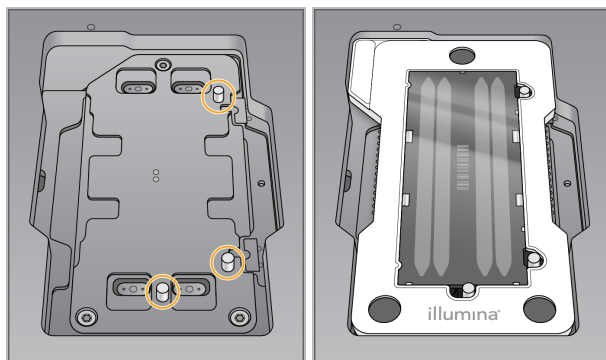


OBSERVAÇÃO

Verifique se a superfície de vidro da lâmina de fluxo está limpa. Se necessário, repita a etapa de limpeza.

- 5 Alinhe a lâmina de fluxo sobre os pinos de alinhamento e posicione-a na plataforma.

Figura 13 Carregar a lâmina de fluxo



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

OBSERVAÇÃO

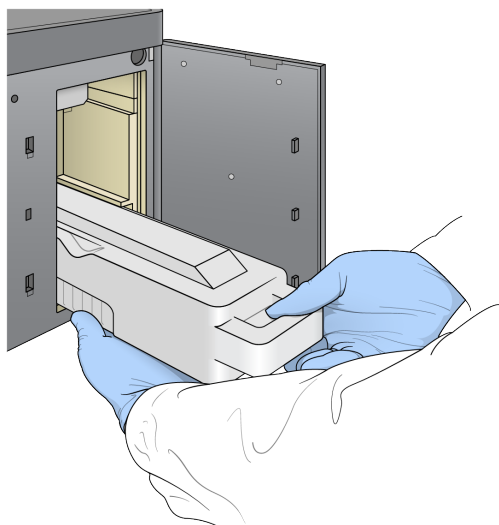
Mantenha as mãos afastadas da porta da lâmina de fluxo enquanto ela estiver fechando para evitar apertar os dedos.

- 7 Selecione **Next** (Avançar).

Esvaziar o receptáculo de reagentes gastos

- 1 Abra a porta do compartimento tampão com a trava abaixo do canto inferior esquerdo dela.
- 2 Remova o receptáculo de reagentes gastos e descarte o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.

Figura 14 Remover o receptáculo de reagentes gastos



OBSERVAÇÃO

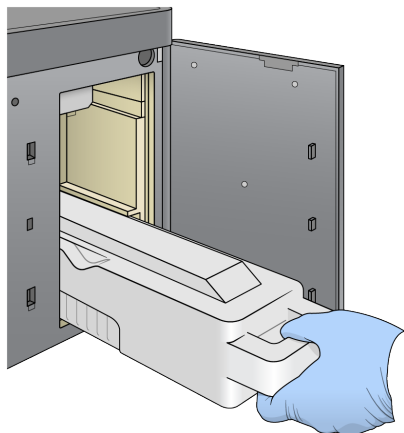
Enquanto remove o receptáculo, coloque sua outra mão embaixo dele para apoiá-lo.

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, apropriados 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 tampão até ele parar de deslizar. Um clique audível indica que o receptáculo está em posição.

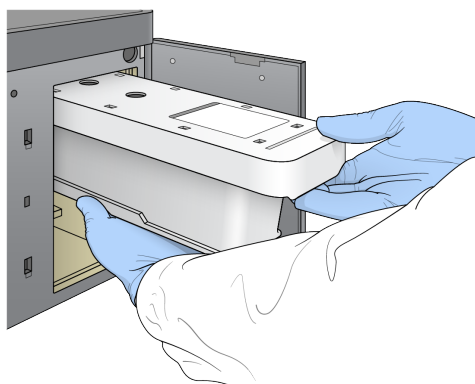
Figura 15 Carregar o receptáculo de reagentes gastos vazio



Carregar o cartucho de tampão

- 1 Remova o cartucho de tampão usado do compartimento superior. É necessária alguma força para levantar e puxar o cartucho de tampão para fora.
- 2 Deslize um novo cartucho de tampão no compartimento de tampão até que ele pare de se mover. Um clique audível indica que o cartucho está na posição, o ID do cartucho de tampão aparece na tela e o sensor é verificado.

Figura 16 Carregar o cartucho de tampão



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

Carregar o cartucho de reagente

- 1 Abra a porta do compartimento do reagente usando a trava abaixo do canto inferior direito dela.
- 2 Remova o cartucho de reagente utilizado do compartimento do reagente. Descarte conteúdos não utilizados 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, apropriados 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.

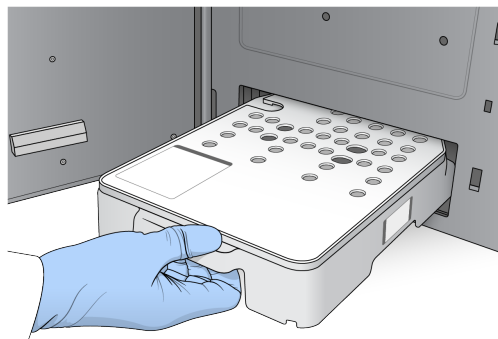


OBSERVAÇÃO

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 22.

- 3 Deslize o cartucho de reagente no compartimento do reagente até fixar o cartucho e feche a porta do compartimento do reagente.

Figura 17 Carregar o cartucho de reagente

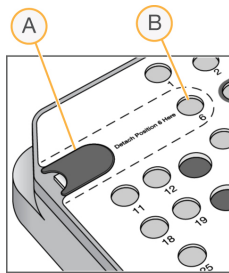


- 4 Selecione **Load** (Carregar).
O software move o cartucho para a posição automaticamente (cerca de 30 segundos), o ID do cartucho de reagente é exibido na tela e os sensores são verificados.
- 5 Selecione **Next** (Avançar).

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 18 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 em conformidade com as normas aplicáveis.

Especificar parâmetros de execução

As etapas na tela Run Setup (Configuração da execução) diferem com base na configuração do sistema:

- ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** — A tela Run Setup (Configuração da execução) exibe as execuções que foram configuradas usando a guia BaseSpace Prep (Preparação do BaseSpace). Se a execução correta não aparecer na tela Run Setup (Configuração da execução), verifique se a execução está marcada para sequenciamento no BaseSpace.
- ▶ **Standalone (Independente)** — A tela Run Setup (Configuração da execução) inclui campos para a definição dos parâmetros de execução.

Selecionar execução disponível (Configuração do BaseSpace)

- 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 Selecione **Next** (Avançar).
- 3 Confirme os parâmetros de execução.
 - ▶ **Run Name** (Nome da execução) — Nome da execução conforme atribuído no BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID da biblioteca) — Nome das bibliotecas agrupadas conforme atribuído no BaseSpace.
 - ▶ **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 única ou paired-end.
 - ▶ **Read Length** (Comprimento da leitura) — Número de ciclos de cada leitura.
 - ▶ **[Opcional]** Custom Primers (Primers personalizados), se for o caso.
- 4 **[Opcional]** Selecione o botão **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.

5 Selecione **Next** (Avançar).


Inserir parâmetros de execução (Configuração independente)

- 1 Digite um nome de sua preferência para a execução.
- 2 **[Opcional]** Insira um ID de biblioteca de sua preferência.
- 3 Selecione um tipo de leitura entre **Single Read** (Leitura única) ou **Paired End**.
- 4 Insira o número de ciclos para cada leitura da execução de sequenciamento.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Insira um valor até 151 ciclos.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1) — Insira o número de ciclos necessários para o primer do Índice 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Índice 2) — Insira o número de ciclos necessários para o primer do Índice 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Insira um valor até 151 ciclos. Esse valor normalmente é o mesmo número de ciclos da Leitura 1.

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

- 5 **[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.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1) — Primer personalizado para o Índice 1.
 - ▶ **Index 2** (Índice 2) — Primer personalizado para o Índice 2.
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Primer personalizado para a Leitura 2.


- 6 **[Opcional]** Selecione o botão **Advanced Settings**  (Configurações avançadas) para alterar os parâmetros de execução.
 - ▶ Na lista suspensa **Recipe** (Receita), selecione uma receita. Somente as receitas compatíveis são listadas.
 - ▶ **Output folder location** (Local da pasta de saída) — Altere o local da pasta de saída para a execução atual. Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até um local de rede.
 - ▶ **Included file** (Arquivo incluído) — Selecione os arquivos para incluir na pasta de saída que podem ser úteis se houver necessidade de outra análise. Por exemplo, os arquivos de manifesto e as listas de amostras.
 - ▶ **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.
 - ▶ **Use run monitoring for this run** (Usar monitoramento de execução para esta execução) – Altere a configuração para usar o monitoramento de execução no BaseSpace.

7 Selecione **Next** (Avançar).

Analisar a verificação antes da execução

O software realiza uma verificação automática antes da execução 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.
- ▶ **X vermelho** — A verificação não foi bem-sucedida. Para os itens com falha, é necessária uma ação antes de continuar. Consulte *Resolver erros da verificação automática na página 46*.

Para interromper uma verificação automática em andamento, selecione o botão **Cancel** (Cancelar). Para reiniciar a verificação, selecione o botão **Retry** (Tentar novamente). 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 a guia de categoria.

Iniciar a execução

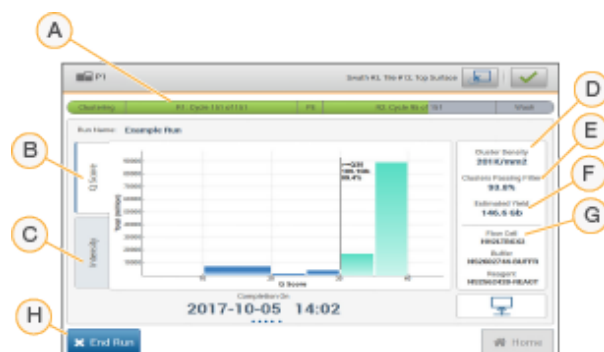
Quando a verificação automática antes da execução for concluída, selecione **Start** (Iniciar). A execução de sequenciamento inicia.

Para configurar o sistema para iniciar a execução automaticamente após uma verificação bem-sucedida, consulte *Definir opções de configuração da execução na página 13*.

Monitorar o andamento da execução

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

Figura 19 Andamento e medidas de execução de sequenciamento



- A **Run progress** (Andamento da execução) — Exibe a etapa atual e o número de ciclos concluídos para cada leitura. A barra de andamento não é proporcional à taxa de execução de cada etapa. A data e hora previstas de conclusão da execução são mostradas na parte inferior.
- B **Q-Score** (Pontuação de qualidade) — Exibe a distribuição de pontuações de qualidade (Q-scores). Consulte *Pontuação de qualidade na página 61*.
- C **Intensity** (Intensidade) — Mostra o valor de intensidade do cluster 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.
- 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 o filtro. Consulte *Filtro de passagem de clusters na página 60*.
- F **Estimated Yield** (Rendimento estimado) (Gb) — Mostra o número de bases projetadas para a execução.

- G **Lot Information** (Informações do lote) — Mostra os números de lotes de materiais de consumo de sequenciamento. Em relação à lâmina de fluxo, ele mostra o número de série.
- H **End Run** (Encerrar execução) — Para a execução de sequenciamento que está em andamento. Os materiais de consumo não podem ser reutilizados.



OBSERVAÇÃO

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

Ciclos para medidas de execução

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

- ▶ Durante as etapas de clusterização, nenhuma medida é exibida.
- ▶ Os primeiros cinco ciclos são reservados para a geração do modelo.
- ▶ As medidas 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

Status	Illumina BaseSpace	BaseSpace Onsite	Instrumento independente
Conectado			
Conectado e transferindo dados			
Desconectado			
Desativado			

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

Se a transferência de dados for interrompida durante a execução, os dados serão armazenados temporariamente no computador do instrumento. Quando a conexão for restaurada, 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 de execução

O System Software Suite NextSeq 550Dx contém um serviço de cópia de execução. 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 medidas de sequenciamento geradas durante a execução. As medidas são exibidas em forma de gráficos, gráficos de pontos e tabelas com base nos dados gerados pelo RTA e gravados nos arquivos InterOp. As medidas são atualizadas conforme a execução continua. Selecione **Refresh** (Atualizar) a qualquer momento durante a execução para visualizar as medidas 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 medidas da execução remotamente.

Limpeza automática após a execução

Quando a execução de sequenciamento é concluída, o software inicia uma limpeza automática após a execução utilizando a solução de limpeza fornecida no cartucho de tampão e o NaOCl fornecido no cartucho de reagente. Se a opção de descartar materiais de consumo para a execução estiver habilitada, o descarte ocorre antes da limpeza automática após a execução.

A limpeza automática após a execução demora aproximadamente 90 minutos. Quando a limpeza é concluída, o botão Home (Página inicial) fica 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 Leitura

Introdução	29
Fluxo de trabalho de leitura	30
Fazer download da pasta DMAP	30
Carregar o BeadChip no adaptador	31
Configurar uma leitura	32
Monitorar o progresso de leitura	34

Introdução

Para executar uma leitura no instrumento NextSeq 550Dx, são necessários os seguintes componentes de execução:

- ▶ Um BeadChip hibridizado e com coloração
- ▶ O adaptador BeadChip reutilizável
- ▶ Os arquivos Decode Map (DMAP) do BeadChip em uso
- ▶ Um arquivo de manifesto do tipo de BeadChip em uso
- ▶ Um arquivo de cluster do tipo de BeadChip em uso

Arquivos de saída são gerados durante a leitura e colocados em fila para transferência para a pasta de saída especificada.

Realize a análise utilizando o software BlueFuse Multi, que requer que os dados de leitura estejam disponíveis no formato de arquivo de determinação de genótipo (GTC, genotype call). Por padrão, o instrumento NextSeq 550Dx gera dados normalizados e as identificações de genótipo associadas no formato de um arquivo GTC. Opcionalmente, é possível configurar o instrumento para gerar arquivos de dados de intensidade adicionais (formato IDAT). Para obter mais informações, consulte *Configuração da leitura do BeadChip na página 55*.

Decode File Client

A pasta DMAP contém informações que identificam os locais de beads no BeadChip e quantificam o sinal associado a cada bead. A pasta DMAP é exclusiva para cada código de barras do BeadChip.

O utilitário Decode File Client permite fazer download de pastas DMAP diretamente dos servidores da Illumina usando o protocolo HTTP padrão.

Para obter acesso ao Decode File Client, acesse a [página de suporte do Decode File Client](#) no site da Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Instale o Decode File Client em um computador com acesso ao local de rede da pasta DMAP.

Para obter mais informações, consulte *Fazer download da pasta DMAP na página 30*.

Arquivos de manifesto e de cluster

Para cada BeadChip, o software requer acesso a um arquivo de manifesto e a um arquivo de cluster. Cada arquivo de manifesto e de cluster é exclusivo para um tipo de BeadChip. Certifique-se de usar arquivos de cluster que incluam NS550 no nome do arquivo. Esses arquivos são compatíveis com o sistema NextSeq 550Dx.

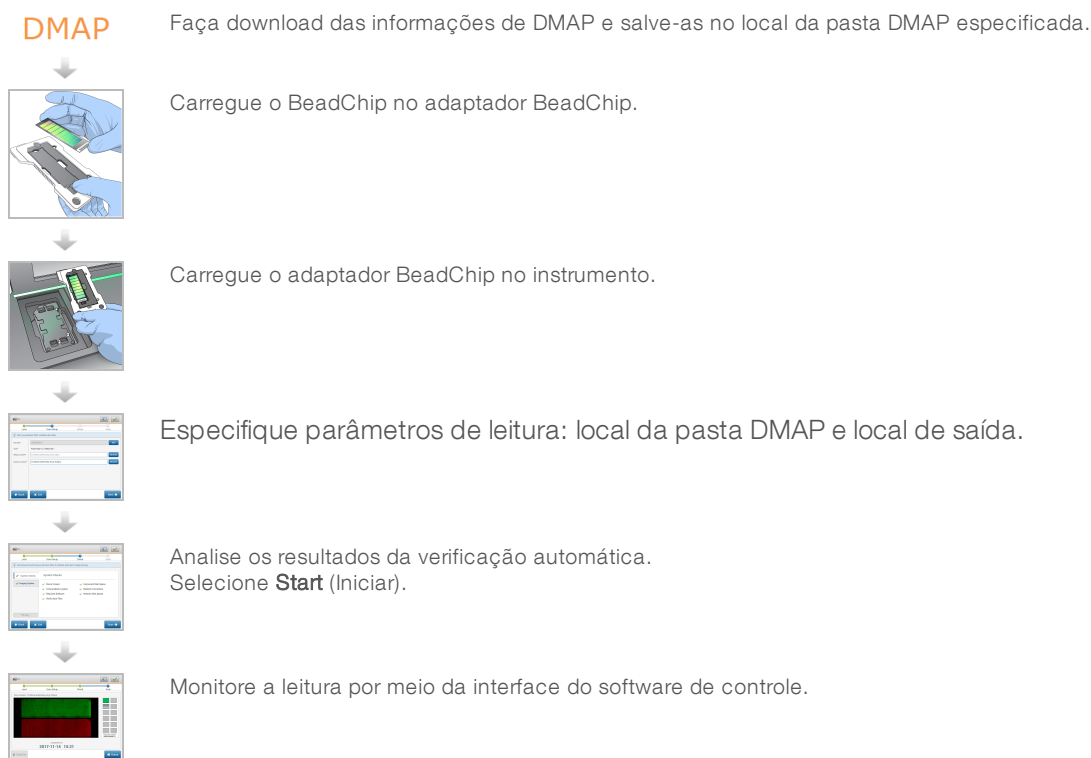
- ▶ **Arquivo de manifesto** — Os arquivos de manifesto descrevem o SNP ou o conteúdo da sonda de um BeadChip. Os arquivos de manifesto usam o formato de arquivo *.bpm.

- ▶ **Arquivos de cluster** — Os arquivos de cluster descrevem as posições de cluster para a matriz de genotipagem da Illumina e são usados na análise dos dados para realizar a identificação de genótipo. Os arquivos de cluster usam o formato de arquivo *.egt.

A localização dos arquivos é especificada na tela BeadChip Scan Configuration (Configuração da leitura do BeadChip). Na tela Home (Página inicial) do NCS, selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento), **System Configuration** (Configuração do sistema) e, em seguida, **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da leitura do BeadChip).

Quando o instrumento NextSeq 550Dx é instalado, o representante da Illumina faz download desses arquivos e especifica o caminho no software de controle. Não há necessidade de alterar esses arquivos, exceto no caso de perda ou de uma nova versão disponível. Para obter mais informações, consulte [Substituir arquivos de manifesto e de cluster na página 52](#).

Fluxo de trabalho de leitura



Fazer download da pasta DMAP

É possível acessar a pasta DMAP usando o Decode File Client por conta ou por BeadChip (visualização padrão).

Acessar pasta DMAP por conta

- 1 Na guia principal do Decode File Client, selecione uma opção de download:
 - ▶ AutoPilot
 - ▶ Todos os BeadChips ainda não baixados
 - ▶ Todos os BeadChips
 - ▶ BeadChips por ordem de compra

- ▶ BeadChips por código de barras
- 2 Insira as informações necessárias.
- 3 Localize a pasta DMAP da qual você deseja fazer download.
- 4 Certifique-se de que há espaço livre suficiente no destino do download.
- 5 Inicie o download. Veja o status do download na guia Download Status and Log (Status e registro de download).
- 6 Salve a pasta DMAP no local da pasta DMAP especificada.

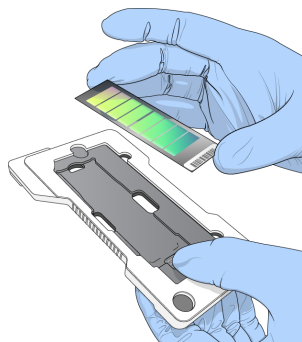
Acessar pasta DMAP por BeadChip

- 1 Identifique os BeadChips usando duas das seguintes opções:
 - ▶ Código de barras do BeadChip
 - ▶ ID da caixa dos BeadChips
 - ▶ Número do pedido de compra
 - ▶ Número do pedido de venda
- 2 Localize a pasta DMAP da qual você deseja fazer download.
- 3 Certifique-se de que há espaço livre suficiente no destino do download.
- 4 Inicie o download. Veja o status do download na guia Download Status and Log (Status e registro de download).
- 5 Salve a pasta DMAP no local da pasta DMAP especificada.

Carregar o BeadChip no adaptador

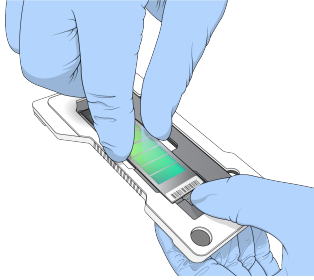
- 1 Pressione o clipe de retenção do adaptador para baixo. O clipe se inclina ligeiramente para trás para abrir.
- 2 Segurando o BeadChip pelas extremidades, posicione-o com o código de barras perto do clipe de retenção e coloque o BeadChip na plataforma rebaixada do adaptador.

Figura 20 Carregar o BeadChip no adaptador



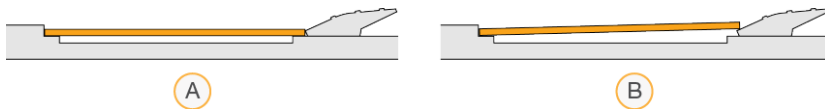
- 3 Usando as aberturas em ambos os lados do BeadChip, certifique-se de que ele esteja encaixado na plataforma rebaixada do adaptador.

Figura 21 Posicionar e fixar o BeadChip



- 4 Solte com cuidado o clipe de retenção para fixar o BeadChip.
- 5 Verifique o BeadChip de uma vista lateral para se certificar de que ele está assentado de forma plana no adaptador. Reposicione o BeadChip se necessário.

Figura 22 Inspeccionar a posição do BeadChip



- A Posição correta — O BeadChip fica plano em relação ao adaptador quando o clipe é liberado.
- B Posição incorreta — O BeadChip não fica plano quando o clipe é liberado.

Configurar uma leitura

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Experiment** (Experimento) e depois **Scan** (Ler).
O comando Scan (Ler) abre a porta do compartimento de imagem, libera materiais de consumo de uma execução anterior (se houver) e abre a série de telas de configuração da leitura. Um pequeno atraso é normal.

Descarregar materiais de consumo de sequenciamento

Se materiais de consumo de sequenciamento usados estiverem presentes quando você estiver configurando uma leitura, o software solicitará que você descarregue o cartucho de reagente e o cartucho de tampão antes de prosseguir para a próxima etapa.

- 1 Se for solicitado, remova os materiais de consumo de sequenciamento usados em uma execução de sequenciamento anterior.
 - a Remova o cartucho de reagente do compartimento do reagente. Descarte conteúdos não utilizados de acordo com as normas aplicáveis.
 - b Remova o cartucho de tampão usado do compartimento de tampão.



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, apropriados 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.

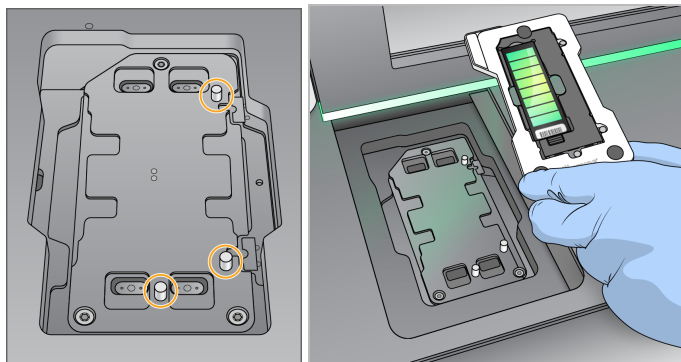
- 2 Remova a lâmina de fluxo do compartimento de imagens.

- 3 Feche as portas do compartimento do reagente e do compartimento de tampão.

Carregar o adaptador BeadChip

- 1 Utilize os pinos de alinhamento para posicionar o adaptador BeadChip na plataforma.

Figura 23 Carregar o adaptador BeadChip



- 2 Selecione **Load** (Carregar).
A porta se fecha automaticamente, o ID do BeadChip é exibido na tela e os sensores são verificados. Um pequeno atraso é normal. Se não for possível ler o código de barras do BeadChip, uma caixa de diálogo que permite que você insira o código de barras manualmente será exibida. Consulte *O software não consegue ler o código de barras do BeadChip* na página 51.
- 3 Selecione **Next** (Avançar).

Configuração da leitura

- 1 Na tela Scan Setup (Configuração da leitura), confirme as seguintes informações:
 - ▶ **Barcode** (Código de barras) — O software lê o código de barras do BeadChip quando o BeadChip é carregado. Se o código de barras foi inserido manualmente, o botão Edit (Editar) é exibido para mais alterações.
 - ▶ **Type** (Tipo) — O campo de tipo de BeadChip é preenchido automaticamente com base no código de barras do BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Local DMAP) — O local da pasta DMAP é especificado na tela BeadChip Scan Configuration (Configuração da leitura do BeadChip). Para alterar o local somente para a leitura atual, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até o local correto.
 - ▶ **Output Location** (Local de saída) — O local de saída é especificado na tela BeadChip Scan Configuration (Configuração da leitura do BeadChip). Para alterar o local somente para a leitura atual, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até o local desejado.
- 2 Selecione **Next** (Avançar).

Analisar a verificação antes da execução

O software realiza uma verificação automática antes da execução 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.

- ▶ **X vermelho** — A verificação não foi bem-sucedida. Para os itens com falha, é necessária uma ação antes de continuar. Consulte *Resolver erros da verificação automática na página 46*.

Para interromper uma verificação automática em andamento, selecione o botão **Cancel** (Cancelar). Para reiniciar a verificação, selecione o botão **Retry** (Tentar novamente). 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 a guia de categoria.

Iniciar a leitura

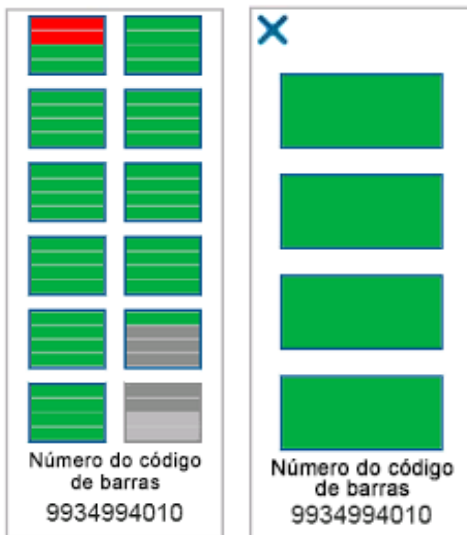
Quando a verificação automática for concluída, selecione **Start** (Iniciar). A leitura começa.

Para configurar o sistema para iniciar a leitura automaticamente após uma verificação bem-sucedida, consulte *Definir opções de configuração da execução na página 13*.

Monitorar o progresso de leitura

- 1 Monitorar o andamento da leitura usando a imagem do BeadChip. Cada cor na imagem indica o status da leitura.
 - ▶ **Cinza-claro** — Não lido
 - ▶ **Cinza-escuro** — Lido, mas não registrado.
 - ▶ **Verde** — Lido e registrado com sucesso.
 - ▶ **Vermelho** — A leitura e o registro falharam.Se o registro falhar, você pode ler novamente as amostras que contêm seções com falhas. Consulte *Falha de leitura do BeadChip na página 51*.
- 2 Selecione a imagem do BeadChip para alternar entre a visualização completa e a visualização detalhada de uma amostra selecionada.
 - ▶ A visualização completa exibe as amostras no BeadChip e as seções dentro de cada amostra.
 - ▶ A visão detalhada mostra cada seção dentro da amostra selecionada.

Figura 24 Imagem do BeadChip: visualização completa e detalhada





OBSERVAÇÃO

Encerrar uma leitura é uma ação definitiva. Se você encerrar uma leitura antes que ela seja concluída, os dados da leitura *não* serão salvos.

Transferência de dados

Os dados são enfileirados para a transferência para a pasta de saída da leitura quando a leitura é concluída. Os dados são temporariamente gravados no computador do instrumento. A pasta temporária é excluída do computador do instrumento automaticamente quando uma leitura subsequente é iniciada.

O tempo necessário para transferir os dados depende da conexão de rede. Antes de iniciar uma leitura posterior, certifique-se de que os dados foram gravados na pasta de saída. Para verificar, certifique-se de que os arquivos GTC estão presentes na pasta de código de barras. Para obter mais informações, consulte [Estrutura da pasta de saída da leitura na página 67](#).

Se a conexão for interrompida, a transferência de dados será retomada automaticamente quando a conexão for restabelecida. Cada arquivo tem um temporizador de 1 hora após ser colocado na fila para transferência para a pasta de saída. Quando o temporizador expirar ou se o instrumento for reiniciado antes que a transferência seja concluída, os dados não serão gravados na pasta de saída.

Capítulo 5 Manutenção

Introdução	37
Realizar uma limpeza manual	37
Trocar o filtro de ar	40
Atualizações de software	41
Opções de reinicialização e desligamento	43

Introdução

Os procedimentos de manutenção abrangem limpezas manuais do instrumento e atualizações de 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 necessária periodicamente de acordo com condições específicas. Consulte *Realizar uma limpeza manual na página 37*.
- ▶ **Atualizações de software** — Quando uma versão atualizada do software do sistema estiver disponível, você poderá instalar a atualização automaticamente por meio de uma conexão com o BaseSpace ou manualmente após o download do instalador do site da Illumina. Consulte *Atualizações de software na página 41*.
- ▶ **Troca do filtro de ar** — A substituição regular do filtro de ar garante o fluxo de ar apropriado pelo instrumento.

Manutenção preventiva

A Illumina recomenda que você agende um serviço de manutenção preventiva a cada 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.

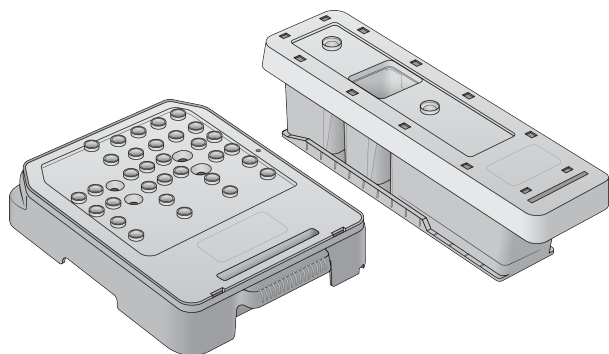
Realizar uma limpeza manual

As limpezas manuais são iniciadas a partir da 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 tampão). <ul style="list-style-type: none">• Necessária a cada 14 dias de ociosidade do instrumento com o cartucho de reagente e o cartucho de tampão posicionados.• Necessária a cada 7 dias em que o instrumento ficar em estado seco (cartucho de reagente e cartucho de tampão removidos).• Necessária após 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 tampão) e 0,12% de hipoclorito de sódio (cartucho de limpeza de reagente). Necessária 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 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 25 Cartucho de limpeza de reagente e cartucho de limpeza de tampão



Preparar uma limpeza manual após a execução

Escolha preparar uma limpeza manual após a execução conforme está descrito abaixo ou preparar uma limpeza rápida (próxima seção). Se você tenciona fazer uma limpeza manual após a execução, pule a seção de limpeza rápida e continue com *Carregar uma lâmina de fluxo usada e cartuchos de limpeza na página 39*.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	Volume e descrição
NaOCl	1 ml, diluído a 0,12% Carregado no cartucho de limpeza de reagente (posição n.º 28)
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 tampão (reservatório central)

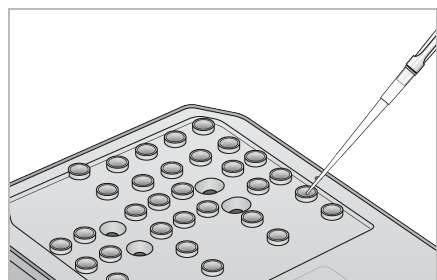


OBSERVAÇÃO

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.
- 3 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 26 Carregar o NaOCl



- 4 Combine os seguintes volumes para fazer uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,05%:

- ▶ Tween 20 a 100% (62 µl)
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (125 ml)
- 5 Adicione 125 ml de solução de limpeza ao reservatório central do cartucho de limpeza de tampão.
 - 6 Selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza) e depois **Manual Post-Run Wash** (Limpeza manual após a execução).

Preparar uma limpeza rápida

Você pode preparar uma limpeza rápida conforme descrito abaixo como alternativa para *Preparar uma limpeza manual após a execução* na página 38.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	Volume e descrição
Tween 20 a 100%	Usado para fazer a solução de limpeza de 40 ml e 0,05% de Tween 20
Água aprovada para uso em laboratório	Carregado no cartucho de limpeza de tampão (reservatório central)

- 1 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)
- 2 Adicione 40 ml de solução de limpeza ao reservatório central do cartucho de limpeza de tampão.
- 3 Selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza) e **Quick Wash** (Limpeza rápida).

Carregar uma lâmina de fluxo usada e cartuchos de limpeza

- 1 Se uma lâmina de fluxo usada não estiver presente, carregue uma lâmina de fluxo usada. Selecione **Load** (Carregar) e depois **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, apropriados 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 tampão até ele parar de deslizar.
- 4 Remova o cartucho de tampão usado na execução anterior, se houver.
- 5 Carregue o cartucho de limpeza de 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** (Página inicial).

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

O filtro de ar garante o fluxo de ar que passa pelo instrumento. O NextSeq 550Dx Operating Software no modo de diagnóstico do instrumento exibe uma notificação para alterar o filtro de ar a cada 90 dias. Quando for avisado, 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 posterior 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 para fora do instrumento.
- 4 Remova e descarte o filtro de ar antigo.
- 5 Insira o novo filtro de ar na bandeja.

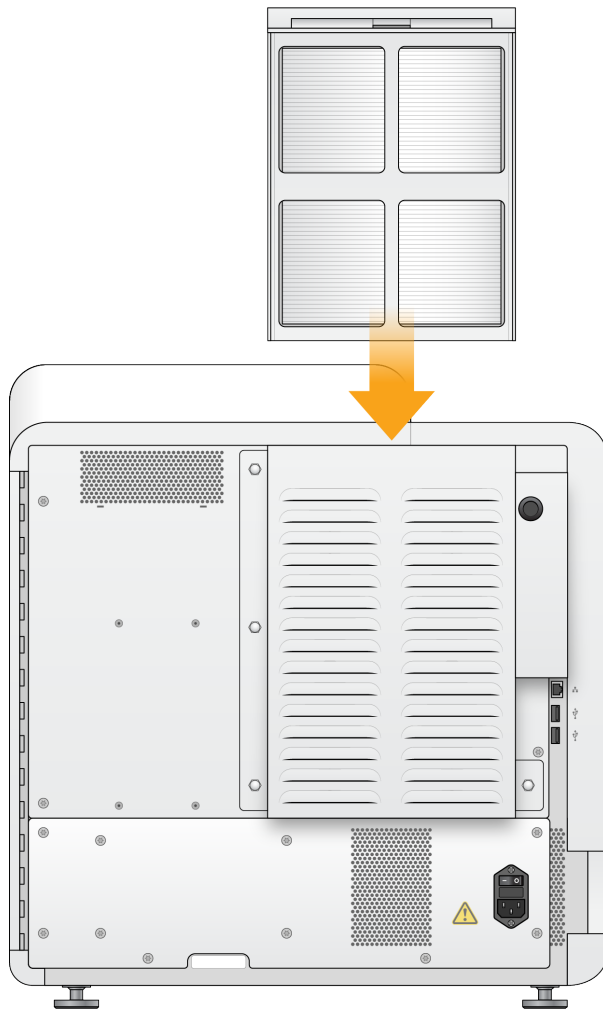


OBSERVAÇÃO

O filtro de ar não funciona 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 a etiqueta de alerta esteja oculta. A seta deve apontar para a alça da bandeja do filtro.

- 6 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 27 Inserção do filtro de ar




Atualizações de software

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

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Receitas do NextSeq
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

Você pode instalar atualizações de software automaticamente por meio de uma conexão com a internet ou manualmente a partir 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 a partir da [página de suporte do instrumento NextSeq 550Dx](#) no site da Illumina.

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 a partir do BaseSpace).
- 4 Selecione **Update** (Atualizar) para iniciar a atualização. Uma caixa de diálogo será exibida para confirmar o comando.
- 5 Siga as instruções do assistente de instalação:
 - a Aceite o contrato de licença.
 - b Analise as notas da versão.
 - c Analise 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 necessária uma reinicialização automática do sistema após essa atualização.

Atualização manual de software

- 1 Faça download do instalador do System Suite a partir do 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 a partir do seguinte local).
- 5 Selecione **Browse** (Procurar) para acessar o local do arquivo de instalação do software e depois selecione **Update** (Atualizar).
- 6 Siga as instruções do assistente de instalação:
 - a Aceite o contrato de licença.
 - b Analise as notas da versão.
 - c Analise 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 necessária uma reinicialização automática do sistema após essa atualização.

Opções de reinicialização e desligamento

Acesse os seguintes recursos selecionando o botão Shut Down Options (Opções de desligamento):

- ▶ Restart (Reiniciar) — O instrumento abre no modo Dx.
- ▶ Shutdown (Desligar) — O instrumento abre no modo Dx.
- ▶ Exit to Windows (Sair para o Windows) — Dependendo das permissões, você pode fechar o NCS e exibir o Windows.

Reiniciar no modo de diagnóstico

Use o comando Restart (Reiniciar) para desligar o instrumento com segurança e reiniciar no modo de diagnóstico. O modo de diagnóstico é o modo de início padrão.

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

Desligar o instrumento

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

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



OBSERVAÇÃO

Por padrão, o instrumento inicia no modo de diagnóstico quando é ligado.



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.

Sair para o Windows

O comando Exit to Windows (Sair para o Windows) oferece acesso ao sistema operacional do instrumento e a qualquer pasta do computador do instrumento. O comando desliga o software com segurança e sai para o Windows,

- 1 Selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **Shutdown Options** (Opções de desligamento).
- 3 Selecione **Exit to Windows** (Sair para o Windows).

Apêndice A Solução de problemas

Introdução	45
Arquivos de solução de problemas	45
Resolver erros da verificação automática	46
O receptáculo de reagentes gastos está cheio	48
Fluxo de trabalho de nova hibridização	49
Erros do BeadChip e da leitura	51
Receitas personalizadas e pastas de receitas	52
Mensagem de erro RAID	52
Definir as configurações do sistema	53

Introdução

Quanto a perguntas técnicas, visite as páginas de suporte do instrumento NextSeq 550Dx no site da Illumina. As páginas de suporte permitem acessar 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 73*.

Considere compartilhar um link para o resumo da execução no BaseSpace com o suporte técnico da Illumina para facilitar a solução de problemas.

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 solução de problemas.

Arquivos de solução de problemas para execuções de sequenciamento

Arquivo principal	Pasta	Descrição
Arquivo de informações da execução (RunInfo.xml)	Pasta principal	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)	Pasta principal	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)	Pasta principal	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.
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 nomeado [Nomedoinstrumento]_Hardwareactual.csv exibe os números de série dos componentes do instrumento.

Arquivo principal	Pasta	Descrição
Arquivos de registro de erros (*ErrorLog*.txt)	Registros de RTA	Registros de erros de RTA. Os arquivos de registro de erros são atualizados sempre que um erro ocorre.
Arquivos de registro global (*GlobalLog*.tsv)	Registros de RTA	Registro de todos os eventos de RTA. Os arquivos de registro global 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. Inclua o registro de erros ao relatar problemas para o suporte técnico da Illumina.

Arquivos de solução de problemas para leituras de matrizes

Arquivo principal	Pasta	Descrição
Arquivo de parâmetros de leitura (ScanParameters.xml)	Pasta principal	Contém informações sobre parâmetros de leitura. Essas informações incluem a data da leitura, o código de barras do BeadChip, o local do arquivo de cluster e o local do arquivo de manifesto.
Arquivos de registro	Logs (Registros)	Os arquivos de registro descrevem cada etapa realizada no instrumento durante a leitura.
Arquivos de medidas	[Código de barras]	As medidas são fornecidas como medidas de amostra e como medidas de seção. [código de barras]_sample_metrics.csv — Para cada amostra e canal (vermelho e verde), lista o percentual das imagens, o valor de porcentagem, P05, P50, P95, FWHM médio, FWHM padrão e a pontuação de registro mínima. [código de barras]_section_metrics.csv — Para cada seção e bloco, lista a posição Z do laser, a posição Z através do foco, FWHM do canal vermelho, FWHM do canal verde, a intensidade média dos pixels vermelhos, a intensidade média dos pixels verdes, a pontuação de registro do vermelho e a pontuação de registro do verde.
Arquivo de nova leitura	[Código de barras]	[código de barras]_rescan.flowcell — Relaciona os locais dos blocos ajustados para uma nova leitura, que abrangem um aumento na sobreposição bloco a bloco.

Resolver erros da verificação automática

Se ocorrerem erros durante a verificação automática, use as seguintes ações recomendadas para resolvê-los. As verificações automáticas são diferentes para os processos de sequenciamento e leitura de matrizes.

Verificações para execuções de sequenciamento

Se uma verificação antes da execução falhar, o RFID do cartucho de reagente não será bloqueado e poderá ser usado para uma execução posterior. No entanto, o RFID será bloqueado depois que o selo de alumínio for perfurado.

Verificações do sistema	Ação recomendada
Portas fechadas	Certifique-se de que as portas dos compartimentos estejam fechadas.
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.
Software necessário	Componentes críticos do software estão ausentes. Realize uma atualização manual do software para restaurar todos os componentes do software.
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.
Conexão de rede	A conexão de rede foi interrompida. Verifique o status da rede e a conexão física da rede.
Espaço em disco de rede	A conta do BaseSpace está cheia ou o servidor de rede está cheio.
Temperatura	Ação recomendada
Temperatura	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Sensores de temperatura	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Ventiladores	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Sistema de imagem	Ação recomendada
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.
Taxa de erros por bit	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Registro da lâmina de fluxo	É possível que a lâmina de fluxo não esteja encaixada corretamente. <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
Resposta da válvula	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Bomba	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Mecanismo de tampão	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Reagentes gastos vazios	Esvazie o receptáculo de reagentes gastos e recarregue o receptáculo vazio.

Verificações para leituras de matrizes

Verificações do sistema	Ação recomendada
Portas fechadas	Certifique-se de que as portas dos compartimentos estejam fechadas.
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.
Software necessário	Componentes críticos do software estão ausentes. Realize uma atualização manual do software para restaurar todos os componentes do software.
Verifique os arquivos de entrada	Certifique-se de que o caminho para o arquivo de cluster e para o arquivo de manifesto está correto e que os arquivos estão presentes.
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.
Conexão de rede	A conexão de rede foi interrompida. Verifique o status da rede e a conexão física da rede.
Espaço em disco de rede	A conta do BaseSpace está cheia ou o servidor de rede está cheio.
Sistema de imagem	Ação recomendada
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.
Taxa de erros por bit	Entre em contato com o suporte técnico da Illumina.
Centralização automática	Descarregue o adaptador BeadChip. Verifique se o BeadChip está encaixado no adaptador e recarregue o adaptador.

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 tampão.
- 4 Selecione **Continue** (Continuar). A execução continuará automaticamente.

Fluxo de trabalho de nova hibridização

Talvez seja necessária uma execução com nova hibridização se as medidas geradas durante os primeiros ciclos mostrarem intensidades abaixo de 2500. Algumas biblioteca com diversidade baixa podem mostrar intensidades abaixo de 1000, o que está previsto e não pode ser resolvido 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 é 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 necessários

Uma execução de nova hibridização requer um cartucho de reagente e um cartucho de tampão do NextSeq 550Dx 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). 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 transparente **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 37*.



OBSERVAÇÃO

Se você não tiver removido o cartucho de reagente e o cartucho de tampão da execução interrompida, pode 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 tampão.

Configurar uma nova execução na guia BaseSpace Prep (Preparação do BaseSpace)

- Se o instrumento estiver configurado para BaseSpace ou BaseSpace Onsite, configure uma nova execução na guia Prep (Preparação) utilizando 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 recarregue o receptáculo vazio.
- Carregue o novo cartucho de tampão e o novo cartucho de reagente.
- Na tela Run Setup (Configuração da execução), selecione uma das opções a seguir:
 - ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** — Selecione a execução e confirme os parâmetros de execução.
 - ▶ **Standalone** (Independente) — Insira o nome da execução e especifique os mesmos parâmetros da execução original.
- Selecione **Next** (Avançar) para avançar para a verificação antes da execução e iniciar a execução.

Erros do BeadChip e da leitura

O software não consegue ler o código de barras do BeadChip

Quando a caixa de diálogo de erro de código de barras for exibida, selecione dentre as seguintes opções:

- ▶ Selecione **Rescan** (Ler novamente). O software tenta ler o código de barras novamente.
- ▶ Selecione o campo de texto e insira o código de barras numérico como mostrado na imagem. Dependendo do BeadChip, os números do código de barras podem ter até 12 algarismos. Selecione **Save** (Salvar). A imagem do código de barras é armazenada na pasta de saída.
- ▶ Selecione **Cancel** (Cancelar). A porta do compartimento de imagem se abre para descarregar o adaptador BeadChip.

Falha de leitura do BeadChip

As imagens são registradas depois de serem lidas. O registro identifica beads correlacionando locais na imagem lida com informações fornecidas no mapa do bead ou na pasta DMAP.

As seções com falha de registro são indicadas em vermelho na imagem do BeadChip.

Figura 28 BeadChip mostrando seções com falha



Quando a leitura é concluída e os dados de leitura são gravados na pasta de saída, o botão Rescan (Ler novamente) se torna ativo.

Quando Rescan (Ler novamente) é selecionado, o software realiza as seguintes etapas:

- ▶ Lê novamente amostras que contêm seções com falha usando uma sobreposição aumentada de bloco a bloco.
- ▶ Gera arquivos de saída na pasta de saída original.
- ▶ Sobrescreve os arquivos de saída anteriores das seções com falha.
- ▶ Adiciona o valor 1 ao contador de leituras para cada nova leitura, mas faz isso em segundo plano. O software não renomeia a pasta de saída.

Ler novamente ou iniciar nova leitura

- 1 Selecione **Rescan** (Ler novamente) para examinar amostras contendo seções que falharam.
- 2 Se a leitura continuar a falhar, encerre a leitura.

- 3 Remova o BeadChip e o adaptador e verifique se há poeira ou resíduos no BeadChip. Use ar comprimido ou outro método de varredura comprimida para limpar os resíduos.
- 4 Carregue o BeadChip novamente e inicie uma nova leitura.
Quando uma nova leitura é iniciada, o software realiza as seguintes etapas:
 - ▶ Lê todo o BeadChip.
 - ▶ Gera arquivos de saída em uma nova pasta de saída.
 - ▶ Adiciona o valor 1 ao contador de leituras com base na contagem de leituras da última nova leitura.

Substituir arquivos de manifesto e de cluster

- 1 Acesse a página de suporte da Illumina (support.illumina.com) do BeadChip que você está usando e clique na guia **Downloads**.
- 2 Faça download dos arquivos a substituir ou atualizar e copie-os para o local de rede desejado.



OBSERVAÇÃO

Certifique-se de selecionar os arquivos de manifesto e de cluster que sejam compatíveis com o instrumento NextSeq 550Dx. Os arquivos compatíveis incluem **NS550** no nome do arquivo.

- 3 Somente se o local tiver sido alterado, atualize o local na tela BeadChip Scan Configuration (Configuração da leitura do BeadChip) da seguinte maneira:
 - a Na tela Home (Página inicial) do NCS, selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
 - b Selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
 - c Selecione **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da leitura do BeadChip).
- 4 Selecione **Browse** (Procurar) e navegue até o local dos arquivos substituídos ou atualizados.

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.


Personalizadas

 **Altas** — Receitas personalizadas usadas com um kit de alta produção.

 **Médias** — Receitas personalizadas usadas com um kit de média produção.

 **Altas** — Receitas originais usadas com um kit de alta produção.

 **Médias** — Receitas originais usadas com um kit de média produção.

 **Limpeza** — Contém a receita da limpeza manual.

Mensagem de erro RAID

O computador do NextSeq 550Dx é equipado com quatro discos rígidos, dois para o modo de diagnóstico e dois para o modo de pesquisa. 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 necessária.

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 **Close** (Fechar).

Definir as configurações do sistema

O sistema é configurado durante a instalação. No entanto, se uma alteração é necessária ou se o sistema tem de ser reconfigurado, utilize as opções de configuração do sistema. Só uma conta de administrador do Windows tem permissão para acessar as opções de configurações 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.
- ▶ **Analysis Configuration** (Configuração da análise) — Fornece opções para métodos de análise, inclusive BaseSpace, BaseSpace Onsite, modo independente e monitoramento de execução no BaseSpace, além de configurações para um login padrão no BaseSpace e relatórios de integridade do instrumento.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da leitura do BeadChip) — Fornece opções para especificar o local padrão da pasta DMAP, a localização da pasta de saída, o formato de arquivo das imagens salvas e o tipo de arquivo 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 ponto, semelhante a 168.62.20.37, por exemplo.
 - ▶ 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 é 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 exigir 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 insira o nome do domínio associado à conexão de internet de sua instalação. Alterações de domínio exigem 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 insira um nome de grupo de trabalho. O nome do grupo de trabalho é exclusivo da sua instalação.
- 7 Selecione **Save** (Salvar).

Definir configuração de análise

- 1 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Selecione **Analysis Configuration** (Configuração de análise).
- 3 Selecione uma das seguintes opções para especificar um local para onde os dados serão transferidos para análise posterior.
 - ▶ Selecione **BaseSpace** para enviar os dados de sequenciamento para o Illumina BaseSpace. **[Opcional]** Marque a caixa de seleção **Output Folder** (Pasta de saída), selecione **Browse** (Procurar) e navegue até um local de rede secundário no qual salvar arquivos BCL além do BaseSpace.
 - ▶ Selecione **BaseSpace Onsite**. No campo Server Name (Nome do servidor), digite o caminho completo do servidor do BaseSpace Onsite. **[Opcional]** Marque a caixa de seleção **Output Folder** (Pasta de saída), selecione **Browse** (Procurar) e navegue até um local de rede secundário para salvar arquivos BCL além do servidor do BaseSpace Onsite.
 - ▶ Selecione **Standalone instrument** (Instrumento independente) para salvar os dados somente em um local de rede. Selecione **Browse** (Procurar) e navegue até o local de rede desejado. O software de controle gera o nome da pasta de saída automaticamente.
 - ▶ **[Opcional]** Selecione **Use Run Monitoring** (Usar monitoramento de execução) para monitorar a execução usando ferramentas de visualização no BaseSpace. É necessário ter um login do BaseSpace e uma conexão de internet.
- 4 Se você selecionou BaseSpace ou BaseSpace Onsite, defina os parâmetros do BaseSpace da seguinte maneira:
 - ▶ Insira um **nome de usuário** e uma **senha** do BaseSpace para registrar o instrumento no BaseSpace.
 - ▶ Selecione **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Usar login padrão e ignorar a tela de login do BaseSpace) para definir o nome de usuário e a senha registrados como o login padrão. Esta configuração ignora a tela do BaseSpace durante a configuração da execução.
- 5 Selecione **Send instrument health information to Illumina** (Enviar informações de integridade do instrumento à Illumina) para habilitar o serviço de monitoramento do 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
- ▶ Exige que o instrumento esteja conectado a uma rede com acesso à Internet
- ▶ Exige que o instrumento esteja conectado ao BaseSpace



OBSERVAÇÃO

Esta opção não está disponível para o BaseSpace Onsite

- ▶ É ativado por padrão. Para cancelar esse serviço, desabilite a configuração **Send instrument health information to Illumina** (Enviar informações de integridade do instrumento à Illumina).

6 Selecione **Save** (Salvar).

Configuração da leitura do BeadChip

- 1 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Configuration** (Configuração do sistema).
- 2 Selecione **BeadChip Scan Configuration** (Configuração da leitura do BeadChip).
- 3 Para especificar o local de uma pasta DMAP padrão, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até o local da pasta desejada na rede de sua instalação.



OBSERVAÇÃO

Antes de cada leitura, faça download do conteúdo DMAP e copie-o para esse local. O conteúdo DMAP é necessário para cada BeadChip e é exclusivo para cada código de barras de BeadChip.

- 4 Para especificar um local de saída padrão, selecione **Browse** (Procurar) e navegue até o local desejado na rede de sua instalação.
- 5 Selecione um formato de arquivo de imagem para as imagens salvas. O tipo de imagem padrão é **JPG**.
- 6 Selecione um formato de arquivo de saída para os dados da leitura. O tipo de arquivo de saída padrão é **somente GTC**.
- 7 Selecione **Save** (Salvar).
- 8 Na tela Scan Map (Mapa de leitura), especifique o caminho completo do arquivo de manifesto e do arquivo de cluster para cada tipo de BeadChip. Selecione **Browse** (Procurar) para cada tipo de arquivo e navegue até o local da pasta que contém esses arquivos.
- 9 **[Opcional]** Selecione **Hide Obsolete BeadChips** (Ocultar BeadChips obsoletos) para remover os BeadChips obsoletos da exibição.
- 10 Selecione **Save** (Salvar).

Apêndice B Real-Time Analysis

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	57
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	58

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)

O instrumento NextSeq 550Dx utiliza uma implementação do software Real-Time Analysis (RTA) chamada RTA2. O RTA2 é executado no computador do instrumento e extrai intensidades a partir 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 e fornece o nome da execução, o número de ciclos, se uma leitura é indexada e o 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	Cada bloco analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases agregado (*.bcl.bgzf) 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	Cada bloco produz informações de filtro que são agregadas em um arquivo de filtro (*.filter) para cada cavidade. O arquivo de filtro especifica se um cluster passa pelos filtros.
Arquivos de localização de cluster	Os arquivos de localização de cluster (*.locs) contêm as coordenadas X e 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	Um arquivo de índice de identificação de bases (*.bci) é produzido para cada cavidade para preservar as informações originais do bloco. 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. Alternativamente, use o software de conversão bcl2fastq para a conversão FASTQ e soluções de análise de terceiros. Os arquivos do NextSeq 550Dx necessitam do bcl2fastq v2.0 ou superior. Para obter a versão mais recente do bcl2fastq, visite a [página de downloads do NextSeq 550Dx](#) no site da Illumina.

O RTA v2 fornece medidas de qualidade de execução em tempo real armazenadas como arquivos InterOp. Arquivos InterOp são uma saída binária que contém medidas de bloco, ciclo e de nível de leitura e são necessários para visualizar medidas 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.

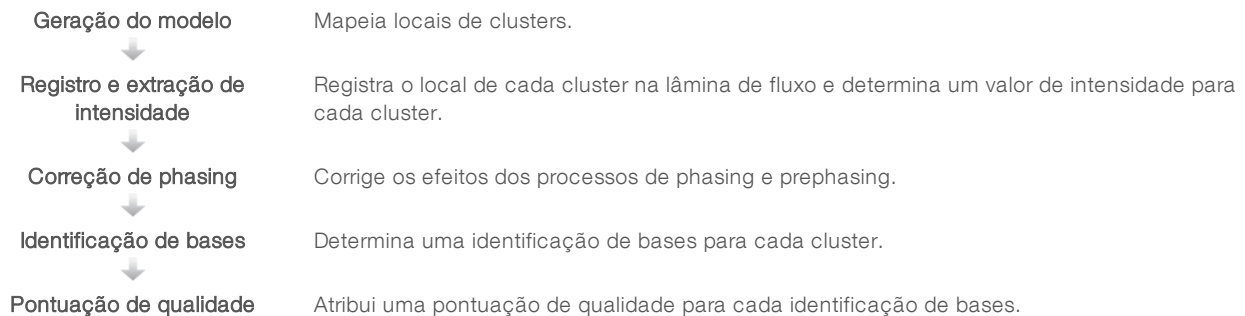
Tratamento de erros

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 no final do processamento:

- ▶ *GlobalLog*.tsv, resume eventos importantes da execução.
- ▶ *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 exige 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 seqüências de índice, o RTA v2 exige 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.

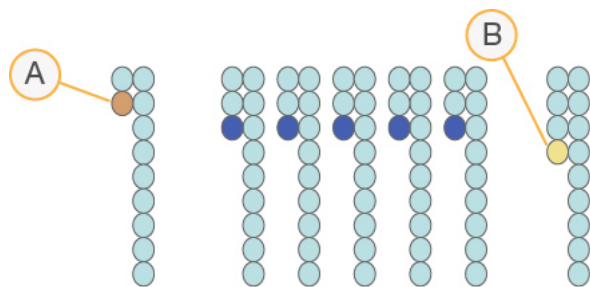
Se o registro falhar para qualquer imagem em um ciclo, identificações de bases não serão geradas para o bloco no ciclo. Use o software Sequencing Analysis Viewer (SAV) para examinar as imagens em miniatura e identificar as imagens que tiveram falha no registro.

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 29 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 potencializa 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 instrumento NextSeq 550Dx utiliza o sequenciamento de dois canais, que requer apenas duas imagens para codificar os dados para quatro bases de DNA, uma do canal vermelho e uma do canal verde.

Intensidades extraídas a partir 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 30 Visualização de intensidades de clusters

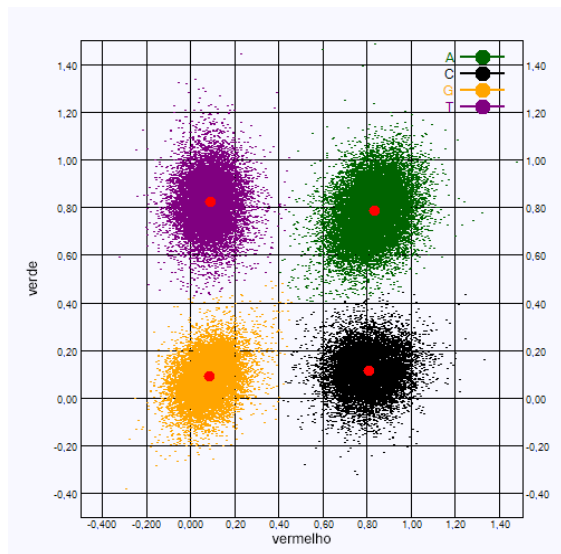


Tabela 1 Identificações de bases em sequenciamento de dois canais

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 nenhuma 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. O filtro de passagem (PF, passing filter) de clusters tem pureza de < 0,63 quando não há mais de uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos. 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 fornecem 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. As pontuações de qualidade são representadas como Q(X), onde 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 da Q-Score, os resultados são registrados em arquivos de identificação de bases (*.bcl.bgzf).

Apêndice C Pastas e arquivos de saída

Arquivos de saída de sequenciamento	63
Estrutura da pasta de saída de sequenciamento	66
Leitura dos arquivos de saída	67
Estrutura da pasta de saída da leitura	67

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, onde [Ciclo] representa o número do ciclo com quatro algarismos. Os arquivos de identificação de bases são comprimidos usando compressão block 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. [Pasta principal], 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. [Pasta principal], RunInfo.xml

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, feixes e superfícies que têm sua imagem captada na lâmina de fluxo e de como as câmeras trabalham juntas para coletar as imagens. As lâminas de fluxo de alta produção têm um total de 864 blocos.

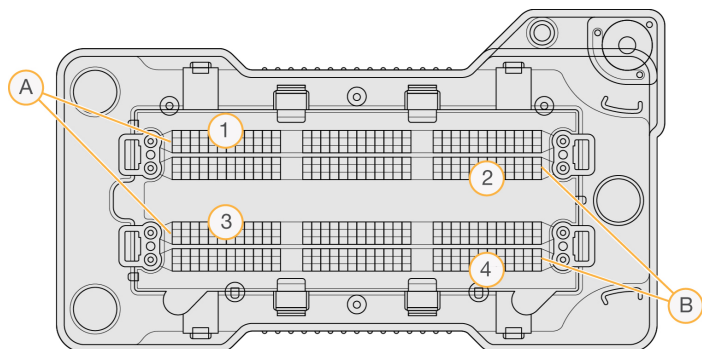
Tabela 2 Blocos da lâmina de fluxo

Componente da lâmina de fluxo	Alta produção	Descrição
Cavidades	4	Uma cavidade é um canal físico com portas de entrada e de saída dedicadas.
Superfícies	2	A imagem da lâmina de fluxo é captada em duas superfícies, a superior e a inferior. A imagem da superfície superior de um bloco é captada, depois a imagem da superfície inferior do mesmo bloco é captada antes de avançar para o próximo bloco.
Feixes por cavidade	3	Um feixe é uma coluna de blocos em uma cavidade.
Segmentos de câmera	3	O instrumento usa seis câmeras para captar a imagem da lâmina de fluxo em três segmentos para cada cavidade.
Blocos por feixe por segmento de câmera	12	Um bloco é a área da lâmina de fluxo que a câmara vê como uma imagem.
Total de blocos com imagem gerada	864	O número total de blocos é igual a cavidades × superfícies × feixes × segmentos de câmera × blocos por feixe 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 31 Numeração das cavidades

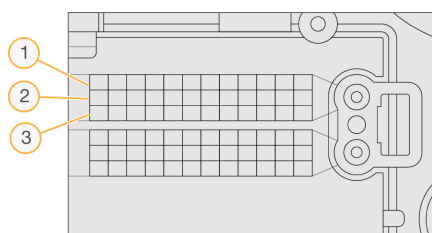


- A Par de cavidades A — Cavidades 1 e 3
- B Par de cavidades B — Cavidades 2 e 4

Numeração dos feixes

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

Figura 32 Numeração dos feixes

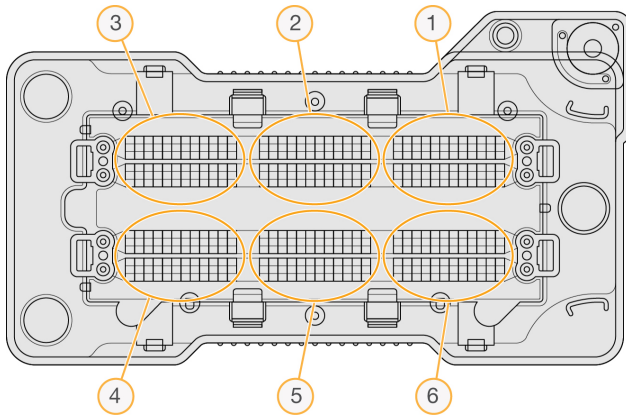


Numeração das câmeras

O instrumento NextSeq 550Dx usa seis câmeras para captar a imagem da lâmina de fluxo.

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

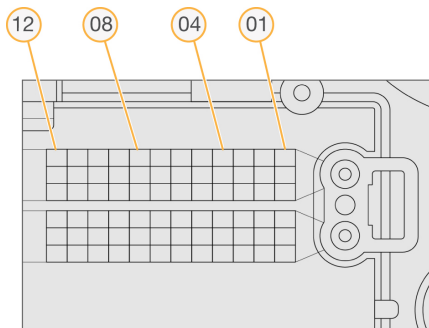
Figura 33 Numeração das câmeras e segmentos (lâmina de fluxo de alta produção exibida)



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 34 Numeração dos blocos



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

- ▶ **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 63](#).

Estrutura da pasta de saída de sequenciamento

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.

 RTAConfiguration.txt

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

Leitura dos arquivos de saída

Tipo de arquivo	Descrição, local e nome do arquivo
Arquivos GTC	Arquivo de identificação de genótipo. Um arquivo GTC é gerado para cada amostra lida no BeadChip. O nome do arquivo contém o código de barras e a amostra lida. [código de barras]_[amostra].gtc
Arquivos de imagem	Os arquivos de imagem são nomeados de acordo com a área lida no BeadChip. O nome contém o código de barras, a amostra e a seção do BeadChip, o feixe e o canal de imagem (vermelho ou verde). [código de barras]_[amostra]_[seção]_[feixe]_[câmera]_[bloco]_[canal].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Código de barras — O nome do arquivo começa com o código de barras do BeadChip. • Amostra — Uma área do BeadChip, numerada como uma linha (R0X), de cima para baixo, e uma coluna (C0X), da esquerda para a direita. • Seção — Uma linha numerada dentro de uma amostra. • Feixe — A imagem dos BeadChips é capturada como um conjunto de blocos sobrepostos. Portanto, somente um feixe é usado para capturar a imagem da seção. • Câmera — A câmera usada para coletar a imagem. • Bloco — Uma área de imagem definida como o campo de visão pela câmera. • Canal — O canal pode ser vermelho ou verde.

Estrutura da pasta de saída da leitura

📁 [Data_]_[Nome do instrumento]_[N.º da leitura]_[Código de barras]

📁 [Código de barras]

📁 Config (Configuração)

📄 Effective.cfg — Registra as definições de configuração usadas durante a leitura.

📁 Focus (Foco) — Contém arquivos de imagem usados para focar a leitura.

📁 Logs (Registros) — Contém arquivos de registro que enumeram cada etapa realizada durante a leitura.

📁 PreScanDiagnosticFiles

📁 [Data_Hora] Barcode Scan (Leitura do código de barras)

📄 ProcessedBarcode.jpg — Imagem do código de barras do BeadChip.

📄 Scanning Diagnostics (Diagnósticos de leitura) (arquivos de registro)

📄 PreScanChecks.csv — Registra os resultados da verificação automática.

📄 Arquivos GTC — Arquivos de identificação do genótipo (um arquivo por amostra).

📄 Arquivos IDAT — [Opcional] Arquivos de dados de intensidade (dois arquivos por amostra; um para cada canal).

📄 Arquivos de imagem — Imagens da leitura de cada amostra, seção, feixe, câmera, bloco e canal.

📄 [Código de barras]_sample_metrics.csv

📄 [Código de barras]_section_metrics.csv

📄 ScanParameters.xml

Índice

A

- adaptador
 - carregamento do BeadChip 33
 - orientação do BeadChip 31
 - visão geral 5
- ajuda
 - documentação 2
- alertas de status 4
- algoritmo Phred 61
- análise
 - arquivos de saída 63
- análise, primário
 - pureza de sinal 60
- arquivos de entrada, leitura
 - arquivos de cluster 29, 52
 - arquivos de manifesto 29, 52
 - pasta DMAP 29
 - pasta DMAP, download 30
- arquivos de filtro 63
- arquivos de identificação de bases 63
- arquivos de registro
 - GlobalLog 58
 - LaneNLog 58
- arquivos de saída 63
- arquivos de saída, leitura
 - GTC, IDAT 67
- arquivos de saída, sequenciamento 63
- arquivos GTC 67
- arquivos InterOp 45, 63
- arquivos locs 63
- assistência técnica 73
- atualização do software 41
- áudio 13

B

- barra de status 3
- BaseSpace 1, 54
 - ícones de transferência 26
 - login 18
- BeadChip
 - adaptador 5, 31
 - análise 1
 - carregamento 33
 - falha de registro 51
 - não é possível ler o código de barras 51
 - orientação do código de barras 31
 - tipos 1
- botão de energia 5, 11

C

- cartucho de reagente
 - reservatório n.º 28 38
 - visão geral 7
- cartucho de tampão 9, 21
- ciclos em uma leitura 15-16
- clusterização 15, 26
- compartimento de imagem 3
- compartimento de imagens 3
- compartimento de tampão 3
- compartimento do reagente 3
- compatibilidade
 - lâmina de fluxo, cartucho de reagente 6
 - rastreamento de RFID 6
 - rastreamento RFID 7
- componentes
 - barra de status 3
 - compartimento de imagem 3
 - compartimento de imagens 3
 - compartimento de tampão 3
 - compartimento do reagente 3
- Configuração 54
- configuração de execução, opção avançada 13
- configuração do BaseSpace 23
- configuração independente 24
- configurações do sistema 12
- considerações de indexação 60

D

- Decode File Client 29
 - acesso por BeadChip 31
 - acesso por conta 30
- definições de configuração 53
- descartar materiais de consumo 13
- desligamento do instrumento 43
- documentação 2, 73
- duração da execução 15-16
- duração da leitura 15

E

- erros de verificação antes da execução 46
- erros e advertências 4
 - nos arquivos de saída 58

F

- filtro de ar 4, 40
- filtro de passagem (PF) 60
- filtro de passagem de clusters 60
- filtro de pureza 60
- fluxo de trabalho
 - BeadChip 33
 - cartucho de reagente 21
 - cartucho de tampão 21
 - considerações de indexação 60
 - duração da execução 15-16
 - hipoclorito de sódio 38
 - lâmina de fluxo 18
 - login do BaseSpace 18
 - medidas de execução 25
 - modo do BaseSpace 23
 - modo independente 24
 - opção de carregamento avançado 13
 - preparação da lâmina de fluxo 17
 - reagentes gastos 20
 - sequenciamento 58
 - verificação antes da execução 24, 33
 - visão geral 16, 30
- fluxo de trabalho de sequenciamento 58
- formamida, posição 6 22

G

- geração do modelo 58
- gerenciar instrumento
 - desligamento 43
 - desligar 43

H

- hipoclorito de sódio, limpeza 38

I

- ícones
 - erros e advertências 4
 - status 4
- identificação de bases 59
 - considerações de indexação 60
- imagem, sequenciamento de dois canais 59
- indicadores de modo do instrumento 12
- instrumento
 - apelido 12
 - avatar 12

- botão de energia 5
- definições de configuração 53
- desligamento 43
- desligar 43
- inicialização 11
- reiniciar 43
- intensidades 59
- interruptor de alimentação 11

L

- lâmina de fluxo
 - blocos 63
 - embalagens 17
 - imagens 65
 - limpeza 17
 - nova hibridização 49
 - numeração de cavidades 64
 - numeração dos blocos 65
 - número do feixe 64
 - pares de cavidades 7
 - pinos de alinhamento 18
 - tipos 1
 - visão geral 7
- ler arquivos de saída
 - GTC, IDAT 67
- limpeza
 - automática 27
 - componentes de limpeza 37
 - limpeza manual 37
 - materiais de consumo fornecidos pelo usuário 37
- limpeza após a execução 27
- limpeza do instrumento 37
- localização da pasta 24
- localização de cluster
 - arquivos 63
 - geração do modelo 58

M

- manutenção do instrumento
 - materiais de consumo 14
- manutenção preventiva 37
- manutenção, preventiva 37
- materiais de consumo 6
 - água aprovada para uso em laboratório 14
 - cartucho de tampão 9
 - execuções de sequenciamento 14
 - lâmina de fluxo 7
 - manutenção do instrumento 14

- materiais de consumo de limpeza 37-38
- materiais de consumo fornecidos pelo usuário 14
- material de consumo
 - cartucho de reagente 7
- medidas
 - ciclos de densidade de cluster 26
 - ciclos de intensidade 26
 - identificação de bases 59
- medidas de execução 25
- Mensagem de erro RAID 52
- Modo URP 12

N

- nome de usuário e senha 11
- nova hibridização de primer 49
- nova hibridização, Leitura 1 49
- numeração das câmeras 65
- numeração de cavidades 64
- numeração do feixe 64
- numeração dos blocos 65

O

- opção de carregamento avançado 13
- orientações sobre água aprovada para uso em laboratório 14

P

- parâmetros de execução
 - modo do BaseSpace 23
 - modo independente 24
 - parâmetros de edição 23
- pares de cavidades 64
- pasta DMAP
 - Decode File Client 29
 - fazer download 30
- phasing empírico 59
- phasing, prephasing 59
- probabilidade de erro 61

Q

- Q-scores 61

R

- rastreamento de RFID 6

- reagentes
 - descarte adequado 21
 - equipado 6
- reagentes gastos
 - descarte 20, 39
 - receptáculo cheio 48
- Real-Time Analysis
 - phasing 59
- reiniciar 43
 - instrumento 43
- reiniciar no modo de pesquisa 12
- RTA2
 - tratamento de erros 58
- RunInfo.xml 45, 63

S

- sequenciamento
 - introdução 15
 - materiais de consumo fornecidos pelo usuário 14
- serviço de cópia de execução 26
- serviço de monitoramento Illumina Proactive 54
- software
 - análise de imagem, identificação de bases 4
 - atualização automática 42
 - atualização manual 42
 - definições de configuração 53
 - do instrumento 4
 - duração da execução 15-16
 - inicialização, nome de usuário do sistema e senha 11
- software BlueFuse Multi 1
- software de controle 4
- software Real-Time Analysis 1, 4
 - fluxo de trabalho 58
- Software Real-Time Analysis
 - resultados 63
- solução de problemas
 - arquivos específicos para a execução 45
 - arquivos específicos para a leitura 46
 - falha de registro de leitura 51
 - medidas de baixa qualidade 49
 - não é possível ler o código de barras do BeadChip 51
 - opções de contato 45
 - receptáculo de reagentes gastos 48
 - substituir arquivos de manifesto e de cluster 52
 - verificação antes da execução 46
- suporte ao cliente 73

T

- tamanho da leitura 16
- teclado 13
- técnica, ajuda 73
- transferência de dados
 - dados de leitura 35
 - ícones de atividade 26
 - serviço de cópia de execução 26
 - serviço de cópia universal 26
- treinamento on-line 2

V

- verificação antes da execução 24, 33

W

- Windows
 - sair 43

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	
Cingapura	+1.800.579.2745	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
Espanha	+34 911899417	+34 800300143
Finlândia	+358 800918363	+358 974790110
França	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong	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
Suécia	+46 850619671	+46 200883979
Suíça	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	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 PDF no site da Illumina. Acesse support.illumina.com, selecione um produto e depois selecione **Documentation & Literature** (Documentação e literatura).



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 pesquisa. Não deve ser usado para procedimentos de diagnóstico.

© 2018 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]