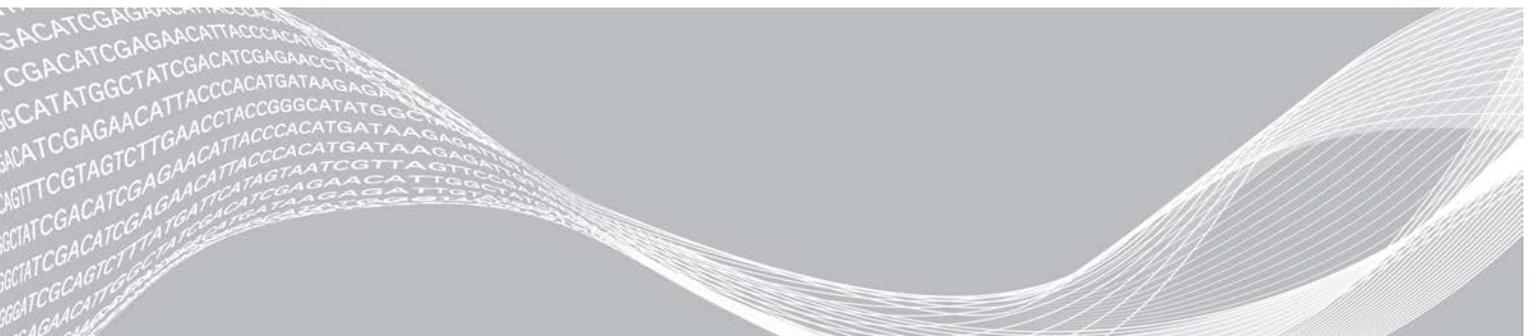


# NovaSeq 6000

## Guía del sistema de secuenciación



Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2019 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20023471 N.º de documento 1000000019358 v11	Febrero de 2019	Se ha actualizado la Tabla de Plexicidad del grupo de bibliotecas para el flujo de trabajo de Xp.
N.º de material 20023471 N.º de documento 1000000019358 v10	Enero de 2019	Se ha añadido información sobre la celda de flujo SP. Se han actualizado las Tablas de plexicidad recomendada del grupo de bibliotecas para los flujos de trabajo Standard y Xp.
N.º de material 20023471 N.º de documento 1000000019358 v09	Noviembre de 2018	Se ha corregido un enlace a la página de asistencia de NovaSeq 6000. Se ha corregido una advertencia que faltaba.
N.º de material 20020483 N.º de documento 1000000019358 v08	Septiembre de 2018	Se ha añadido información sobre el kit NovaSeq 6000 S4 (200 ciclos). Se ha añadido información sobre la cuenta del usuario. Se han añadido concentraciones de carga de celdas individuales. Instrucciones actualizadas para el inicio escalonado de experimentos. Se han actualizado las instrucciones de inicio de sesión de BaseSpace. Se han actualizado las instrucciones acerca de la comprobación previa al experimento. Se han añadido notas acerca de los requisitos necesarios para confirmar el apagado o el reinicio. Se ha añadido una nota acerca del lavado incompleto después del lavado posterior al experimento. Se ha aclarado la información relativa al lavado de mantenimiento. Se ha aclarado la información relativa a la actualización del software.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
<p>N.º de material 20020483 N.º de documento 1000000019358 v07</p>	<p>Abril de 2018</p>	<p>Se ha aclarado el uso del tubo de bibliotecas para mezclar reactivos en el paso de impulso antes de la secuenciación.                      Se ha añadido una tabla con descripciones de los símbolos a los consumibles o al embalaje de los consumibles.                      Se ha añadido información relativa al servicio de supervisión proactiva de Illumina en la sección Modos de configuración del experimento.                      Se ha añadido información acerca de la API NovaSeq LIMS.                      Se han actualizado las descripciones de software a las del software de control NovaSeq v1.4.0                      Se ha actualizado el número habitual de lecturas que superan el filtro para las celdas de flujo S2.                      Se han actualizado las concentraciones de carga recomendadas para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp.                      Se han actualizado las instrucciones para la apertura del embalaje de la celda de flujo.                      Se ha aclarado el procedimiento de carga de bibliotecas en la celda de flujo.                      Se ha añadido una nota acerca de la disponibilidad del instrumento para iniciar un lavado de mantenimiento.                      Se ha añadido información acerca del temporizador de cuenta atrás de inicio escalonado.                      Se han actualizado las instrucciones sobre cómo añadir o eliminar reglas de SRP.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000019358 v06	Febrero de 2018	<p>Se ha añadido una nota en la sección Celda de flujo para indicar que, al utilizar una celda de flujo S1, se requiere la versión de software 1.3.1.</p> <p>Se han actualizado las descripciones y el volumen de carga del flujo de trabajo de NovaSeq Standard en la tabla <i>Métodos de carga de bibliotecas</i>.</p> <p>Se ha añadido una nota de precaución a la sección <i>Componentes del kit de reactivos</i>.</p> <p>Se han añadido tubos de 0,5 y 1,5 ml, y puntas de pipeta para pipetas de 20, 200 y 1000 µl a la tabla Consumibles. Se ha añadido un tubo graduado a la tabla Equipo.</p> <p>Se ha añadido la sección <i>Preparación de la celda de flujo</i> a los capítulos 4 y 5, y se han movido los pasos del capítulo 6 a estas secciones.</p> <p>Se ha actualizado el volumen total para la celda de flujo S1 en el capítulo 4.</p> <p>Se ha añadido la tabla Plexicidad recomendada del grupo de bibliotecas a la sección <i>Creación de un grupo de bibliotecas normalizadas</i> en el capítulo 4.</p> <p>Se han actualizado los pasos de la sección <i>Descongelación de cartuchos de SBS y de grupo</i> en los capítulos 4 y 5.</p> <p>Se han aclarado las instrucciones de descongelación en la sección <i>Preparación de la celda de flujo</i>.</p> <p>Se ha actualizado la información sobre descongelación en la sección <i>Concentraciones de carga recomendadas de NovaSeq Xp</i>.</p> <p>Se ha actualizado la tabla Plexicidad recomendada del grupo de bibliotecas en la sección <i>creación de un grupo de bibliotecas normalizadas</i> en el capítulo 5.</p> <p>Se ha añadido una frase especificando que la celda de flujo debe utilizarse en un plazo máximo de 12 horas tras su retirada del embalaje a las secciones <i>Resumen del flujo de trabajo de NovaSeq Xp</i> y <i>Preparación de la celda de flujo</i>.</p>
N.º de documento 1000000019358 v05	Diciembre de 2017	<p>Se ha añadido una aclaración sobre el tubo de bibliotecas vacío para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp en el diagrama Flujo de trabajo de secuenciación.</p> <p>En la sección <i>Desnaturalización de grupos de bibliotecas y control PhiX opcional</i> para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard, se han actualizado los volúmenes de Tris-HCl en la tabla del paso 5.</p> <p>En la sección <i>Preparación de la mezcla maestra de ExAmp</i> para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, se ha añadido una nota después del paso 4 para indicar que es preciso agitar la mezcla en un vórtice para obtener mejores resultados.</p> <p>En la sección <i>Carga de bibliotecas del apartado Celda de flujo</i> para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, se ha añadido un recordatorio después del paso 3 para que se carguen las muestras lentamente.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20023471 N.º de documento 1000000019358 v04	Octubre de 2017	<p>Se ha añadido una carga de carril individual a la lista de funciones del instrumento.</p> <p>Se han añadido a la sección Consumibles el kit de dos carriles de NovaSeq Xp y el kit de cuatro carriles de NovaSeq Xp. Se han añadido el paquete de distribuidores de dos carriles de NovaSeq Xp y el paquete de distribuidores de cuatro carriles de NovaSeq Xp.</p> <p>Se han añadido a la sección Equipo la plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp y la pipeta de 200 µl para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp.</p> <p>Se ha añadido el capítulo Preparación de consumibles para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp.</p> <p>Se ha movido la sección Vaciado de botellas de reactivo utilizado del capítulo Secuenciación al principio de los capítulos Flujo de trabajo de NovaSeq Standard y Flujo de trabajo de NovaSeq Xp.</p> <p>Se han actualizado las tablas Concentración de bibliotecas agrupadas y Concentración de carga recomendada para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard.</p>
N.º de material 20020483 N.º de documento 1000000019358 v03	Septiembre de 2017	<p>Se han actualizado las descripciones del software de control de NovaSeq v1.2, que incluye asistencia para las celdas de flujo S1 y S4.</p> <p>Se han añadido requisitos de espacio en disco para los experimentos de celda de flujo doble con celdas S1 y S4.</p> <p>Se ha indicado el requisito para el nombre de ciertos archivos *.json.</p> <p>Se ha reorganizado la información general sobre los kits en el capítulo <i>Kits y accesorios</i>. En este capítulo se recoge información sobre configuraciones, componentes y etiquetado de compatibilidad de los kits de reactivos y de carga de bibliotecas.</p> <p>Se ha añadido el kit de reactivos NovaSeq 6000 a los consumibles proporcionados por el usuario.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones sobre grupos y desnaturalización de bibliotecas para incluir información sobre las celdas de flujo S1 y S4.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones de descongelado de cartuchos de reactivos para añadir un baño con agua de 2 horas para S1 y S2 y de 4 horas para S4.</p> <p>Se han actualizado las descripciones de los tubos de bibliotecas, de los cartuchos de reactivos y de las celdas de flujo para que incluyan los componentes de S4.</p> <p>Se ha añadido un apartado sobre las actualizaciones de software en el capítulo de Mantenimiento.</p> <p>Se ha sustituido la referencia a <i>Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint (Pub. No. 970-2012-013)</i> (Reducción del espacio de almacenamiento de datos del genoma completo) por <i>NovaSeq Series and HiSeq X Ten Data Quality Comparison (Pub.No.770-2017-010)</i> (Comparación de la calidad de datos de NovaSeq Series y HiSeq X Ten).</p> <p>Se ha añadido una nota al paso 3 de la sección <i>Introducción de parámetros del experimento</i> en el capítulo 6.</p> <p>Se ha actualizado la sección <i>Placas de la celda de flujo</i> para incluir información sobre las celdas de flujo S1 y S4.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20018871 N.º de documento 1000000019358 v02	Abril de 2017	<p>Adición de la siguiente información:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consumibles suministrados por Illumina necesarios para un experimento.</li> <li>• Condiciones de almacenamiento de componentes del kit de reactivos.</li> <li>• Recomendaciones para la concentración de carga de las bibliotecas.</li> <li>• Dilución de NaOH para dos celdas de flujo.</li> <li>• Paso para poner la celda de flujo a temperatura ambiente antes de cargarla.</li> <li>• Paso de cambio de guantes después de vaciar las botellas de reactivo utilizado.</li> <li>• Configuración de la salida del LIMS para sistemas de LIMS de terceros.</li> <li>• Convención de nomenclatura para hojas de muestras.</li> <li>• Iconos de gestión de procesos y solución de problemas.</li> <li>• Apéndice que contiene funciones de seguridad de Windows e instrucciones de configuración.</li> <li>• Información de contacto para asistencia técnica.</li> </ul> <p>Aumento del tiempo de descongelación del cartucho de reactivos a cuatro horas.</p> <p>Instrucciones actualizadas de enriquecimiento de PhiX para cambiar el volumen de enriquecimiento de PhiX del 1 % a 0,9 µl y utilizar 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5 para diluir 10 nM de PhiX.</p> <p>Instrucciones actualizadas para limpiar la celda de flujo y la platina de la celda de flujo solamente cuando hay visibles partículas.</p> <p>Frecuencia de lavado de mantenimiento actualizada a cada 14 días.</p> <p>Instrucciones reorganizadas y consolidadas sobre la preparación de consumibles para mejorar la continuidad.</p> <p>Las puertas de cristal han cambiado de nombre a puertas del compartimento de líquidos.</p>
N.º de material 20018406 N.º de documento 1000000019358 v01	Marzo de 2017	Corrección del nombre de una columna de la pantalla Process Management (Administración de procesos) a Sequencing (Secuenciación).
N.º de material 20015871 N.º de documento 1000000019358 v00	Febrero de 2017	Publicación inicial.

# Contenido

<b>Capítulo 1 Descripción general</b> .....	<b>1</b>
Introducción .....	1
Recursos adicionales .....	2
Descripción general de la secuenciación .....	2
Flujo de trabajo de secuenciación .....	3
Componentes del instrumento .....	5
<b>Capítulo 2 Kits y accesorios</b> .....	<b>11</b>
Descripción general de los kits .....	11
Componentes del kit de reactivos .....	12
Componentes del kit de NovaSeq Xp .....	16
Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp .....	17
Descripción de símbolos .....	17
<b>Capítulo 3 Primeros pasos</b> .....	<b>20</b>
Puesta en servicio del instrumento .....	20
Configuración de ajustes .....	21
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario .....	27
<b>Capítulo 4 Flujo de trabajo estándar: Preparación de consumibles</b> .....	<b>30</b>
Métodos .....	30
Directrices para las bibliotecas .....	30
Descongelación de los cartuchos de SBS y de grupo .....	31
Vaciado de botellas de reactivos utilizados .....	32
Preparación de la celda de flujo .....	33
Agrupación y desnaturalización de bibliotecas para la secuenciación .....	33
<b>Capítulo 5 Flujo de trabajo de NovaSeq Xp: Preparación de consumibles</b> .....	<b>38</b>
Resumen de flujo de trabajo de NovaSeq Xp .....	38
Métodos .....	39
Directrices para las bibliotecas .....	39
Descongelación de los cartuchos de SBS y de grupo .....	40
Vaciado de botellas de reactivos utilizados .....	41
Preparación de la celda de flujo .....	42
Agrupación, desnaturalización y carga de bibliotecas para la secuenciación .....	42
<b>Capítulo 6 Secuenciación</b> .....	<b>51</b>
Configuración de un experimento de secuenciación .....	51
Supervisión del progreso del experimento .....	57
Inicio de experimentos escalonado .....	58
Eliminación del experimento .....	59
Desacople de la posición n.º 30 .....	59
Lavado automático posterior al experimento .....	60

<b>Capítulo 7 Mantenimiento</b> .....	<b>61</b>
Mantenimiento preventivo .....	61
Realización de un lavado de mantenimiento .....	61
Actualizaciones de software .....	65
<b>Apéndice A Solución de problemas</b> .....	<b>67</b>
Recursos de solución de problemas .....	67
Archivos de solución de problemas .....	67
Errores de la comprobación previa al experimento .....	67
Solución de problemas de gestión de procesos .....	68
Error en experimento antes de la generación de grupos .....	69
Finalización de un experimento .....	70
Apagado del instrumento .....	70
<b>Apéndice B Análisis en tiempo real</b> .....	<b>72</b>
Descripción general del análisis en tiempo real .....	72
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real .....	74
<b>Apéndice C Archivos y carpetas de resultados</b> .....	<b>77</b>
Estructura de carpetas de resultados de secuenciación .....	77
Archivos de resultados de secuenciación .....	78
<b>Apéndice D Seguridad de Windows</b> .....	<b>79</b>
Configuraciones de seguridad .....	79
Requisitos de las contraseñas .....	79
Cortafuegos de Windows .....	79
Kit de herramientas de experiencia mejorada de migración .....	79
Directivas de restricción de software .....	80
<b>Índice alfabético</b> .....	<b>83</b>
<b>Asistencia técnica</b> .....	<b>87</b>

# Capítulo 1 Descripción general

Introducción .....	1
Recursos adicionales .....	2
Descripción general de la secuenciación .....	2
Flujo de trabajo de secuenciación .....	3
Componentes del instrumento .....	5

## Introducción

El sistema de secuenciación NovaSeq™ 6000 de Illumina® incluye una tecnología de secuenciación y un rendimiento flexibles en una plataforma a escala de producción con la eficacia y la rentabilidad de un sistema de sobremesa.

## Funciones

- ▶ **Secuenciación flexible:** El sistema NovaSeq 6000 se amplía a la secuenciación a niveles de producción con datos de alta calidad para una amplia variedad de aplicaciones.
- ▶ **Resultado ajustable:** El NovaSeq 6000 es un sistema de doble celda de flujo con una amplia variedad de resultados. Secuencie una celda de flujo o dos celdas de flujo con longitudes de lectura diferentes al mismo tiempo. Mezcle y empareje tres tipos de celdas de flujo y diferentes longitudes de lectura.
- ▶ **Celda de flujo de tramas:** Una celda de flujo de tramas genera grupos con espacios muy limitados. El reducido espacio entre los nanopocillos aumenta la densidad de grupos y la obtención de datos.
- ▶ **Mezcla de ExAmp en el instrumento:** El NovaSeq 6000 mezcla los reactivos ExAmp con la biblioteca, amplifica la biblioteca y realiza la generación de grupos para optimizar el flujo de trabajo de la secuenciación.
- ▶ **Carga de carril individual:** La plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp permite cargar previamente las bibliotecas en carriles individuales de la celda de flujo y reduce el volumen de carga de bibliotecas.
- ▶ **Lectura de líneas de alto rendimiento:** El NovaSeq 6000 utiliza una cámara con tecnología de lectura bidireccional para adquirir rápidamente imágenes de la celda de flujo en dos canales de color al mismo tiempo.
- ▶ **Análisis en tiempo real (RTA):** El NovaSeq 6000 utiliza una implementación del RTA llamada RTA3. Este software integrado analiza las imágenes y las bases de llamadas.
- ▶ **Integración de BaseSpace™ Sequence Hub:** El flujo de trabajo de secuenciación está integrado en BaseSpace Sequence Hub, el entorno informático de genómica de Illumina para la colaboración y el almacenamiento y análisis de datos. Conforme avanza el experimento, los archivos de resultados se envían al entorno en tiempo real.
- ▶ **Listo para utilizarse con BaseSpace Clarity LIMS:** Mejore la eficiencia operativa con un seguimiento integral de muestras y reactivos, unos flujos de trabajo automatizados y un funcionamiento del instrumento integrado.

## Recursos adicionales

Las [páginas de asistencia del sistema de secuenciación NovaSeq 6000](#) del sitio web de Illumina proporcionan recursos adicionales del sistema. Estos recursos incluyen el software, la formación, los productos compatibles y la siguiente documentación. Revise siempre las páginas de asistencia para obtener las versiones más recientes.

Recurso	Descripción
<a href="#">Herramienta de selección de protocolos personalizados</a>	Un asistente de generación de documentación de extremo a extremo personalizada que está adaptado al método de preparación de bibliotecas, a los parámetros del experimento y al método de análisis utilizado para el experimento de secuenciación.
<a href="#">Guía de preparación del centro para la serie NovaSeq (n.º de documento 1000000019360)</a>	Proporciona especificaciones para el espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales y de red.
<a href="#">Guía de cumplimiento y seguridad de la serie NovaSeq (n.º de documento 1000000019357)</a>	Proporciona información sobre las consideraciones de seguridad operativa, las declaraciones de cumplimiento normativo y el etiquetado del instrumento.
<a href="#">Guía de cumplimiento del lector de RFID (n.º de documento 1000000002699)</a>	Proporciona información sobre el lector de RFID del instrumento, incluidas las certificaciones de cumplimiento normativo y las consideraciones de seguridad.
<a href="#">Guía de cebadores personalizados de la serie NovaSeq (n.º de documento 1000000022266)</a>	Proporciona información sobre la sustitución de los cebadores de secuenciación de Illumina con cebadores de secuenciación personalizados.

## Descripción general de la secuenciación

### Generación de grupos

Durante la generación de grupos, las moléculas únicas de ADN se unen a la superficie de la celda de flujo y, a continuación, se amplifican para formar grupos. Para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard, la mezcla maestra de ExAmp se mezcla con las bibliotecas integradas en el instrumento antes de la generación de grupos. Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, los reactivos ExAmp y las bibliotecas se mezclan y suministran a la celda de flujo fuera del instrumento. Los volúmenes varían por tipo de celda de flujo y por flujo de trabajo.

### Secuenciación

Se adquieren imágenes de los grupos mediante una lectura bidireccional y un proceso químico de secuenciación de dos canales. La cámara utiliza sensores que detectan la luz roja y verde para obtener imágenes de cada sector y a la vez generar imágenes rojas y verdes de todo el sector. Tras obtener

imágenes, se realiza la llamada de bases de los grupos de cada placa en función de la proporción de la señal verde a roja de cada grupo, que se basa en la ubicación determinada por la celda de flujo de tramas. Este proceso se repite para cada ciclo de secuenciación.

## Análisis

A medida que el experimento avanza, el software de control NovaSeq (NVCS) transfiere de forma automática archivos de llamada de bases (\*.cbcl) a la ubicación de la carpeta de resultados especificada para el análisis de los datos.

En función de la aplicación, hay varios métodos de análisis disponibles. Para obtener más información, visite la [página de asistencia de BaseSpace Sequence Hub en el sitio web de Illumina](#).

## Flujo de trabajo de secuenciación



Descongele los cartuchos de SBS y de reactivo de grupo.



Agrupe y desnaturalice las bibliotecas. Para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard, añada bibliotecas al tubo de bibliotecas. Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, cargue la mezcla de ExAmp o de bibliotecas en la celda de flujo. Para ambos flujos de trabajo, cargue el tubo de bibliotecas en el cartucho de grupo descongelado.



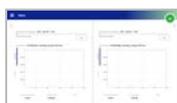
En la interfaz de software, seleccione **Sequence** (Secuenciar) y especifique un experimento de única celda de flujo o doble celda de flujo.



Descargue los consumibles del anterior experimento y cargue los nuevos del experimento actual.



Especifique los parámetros del experimento en la pantalla Run Setup (Configuración del experimento). Si se ha configurado BaseSpace Sequence Hub, inicie sesión en la pantalla de inicio de sesión. Una vez finalizadas las comprobaciones previas al experimento, este se inicia automáticamente.



Supervise el experimento en la pantalla Sequence (Secuenciar), desde BaseSpace Sequence Hub si la supervisión del experimento está activada, o desde un ordenador conectado a la red con Sequencing Analysis Viewer. Los datos se transfieren a la carpeta de resultados especificada.



El lavado del instrumento se inicia de forma automática tras finalizar la secuenciación.

## Métodos de carga de bibliotecas

Las bibliotecas se cargan en una celda de flujo de NovaSeq 6000 utilizando uno de los siguientes dos métodos, en función del flujo de trabajo seleccionado. La configuración de un experimento de secuenciación difiere según el flujo de trabajo. Asegúrese de que siempre sigue las instrucciones del método que ha elegido. Consulte las secciones *Flujo de trabajo estándar: Preparación de consumibles* en la página 30 y *Flujo de trabajo de NovaSeq Xp: Preparación de consumibles* en la página 38.

**Tabla 1** Métodos de carga de bibliotecas

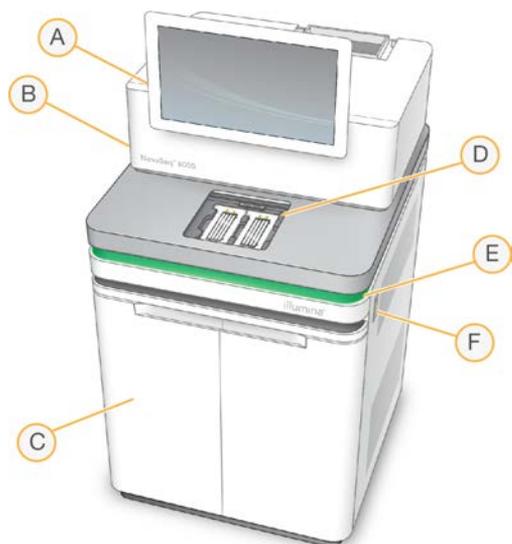
Flujo de trabajo	Método de carga de grupo de bibliotecas y de mezcla de ExAmp	Direccionabilidad de carril individual y análisis de datos	Volumen de carga* de los modos SP, S1, S2 o S4 (µl)
<b>NovaSeq Standard</b>	Se carga un grupo de bibliotecas individual en el tubo de bibliotecas, se mezcla de manera integrada en el tubo de bibliotecas con los reactivos ExAmp, y se suministra automáticamente a la celda de flujo para la generación de grupos y la secuenciación. Un paso de impulso antes de que la secuenciación utilice los reactivos en el cartucho de grupo y el tubo de bibliotecas para crear una mezcla acondicionadora que ayude a mejorar la eficacia de la generación de grupos.	Un grupo de bibliotecas individual se distribuye, y se secuencian, en todos los carriles de la celda de flujo. Las lecturas de todos los carriles se analizan en conjunto.	150, 225 y 465 µl (toda la celda de flujo)
<b>NovaSeq Xp</b>	Se mezclan manualmente una o más bibliotecas (el número se corresponde con el de carriles de la celda de flujo) con reactivos ExAmp fuera del instrumento y directamente cargados en los carriles individuales de la celda de flujo utilizando la plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp. A continuación, se carga la celda de flujo llena en el instrumento para la generación de grupos y la secuenciación. Un paso de impulso antes de que la secuenciación utilice el tubo de bibliotecas vacío para mezclar los reactivos del cartucho de grupo para crear una mezcla acondicionadora que ayude a mejorar la eficacia de la generación de grupos.	Cada biblioteca se carga en un carril independiente de la celda de flujo, que, posteriormente, se secuencian. Pueden utilizarse diferentes grupos, alícuotas del mismo grupo, o combinaciones aleatorias. Las lecturas de los diferentes carriles se analizan individualmente o en conjunto, según corresponda.	27, 33 y 45 µl (carril individual)

\* El flujo de trabajo de NovaSeq Xp requiere una concentración entre un 25 y un 50 % menor de bibliotecas desnaturalizadas en comparación con el flujo de trabajo de NovaSeq Standard.

## Componentes del instrumento

El sistema de secuenciación NovaSeq 6000 consta de un monitor de pantalla táctil, una barra de estado, un botón de encendido con puertos USB adyacentes y tres compartimentos.

Figura 1 Componentes externos



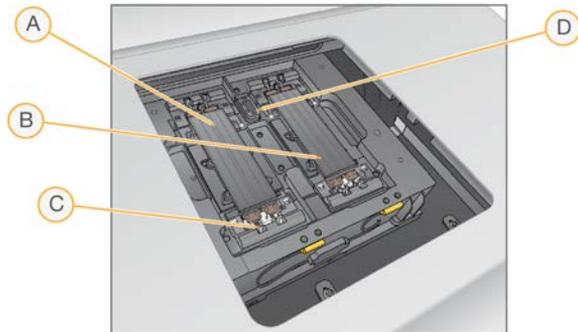
- A **Monitor de pantalla táctil:** Muestra la interfaz del NVCS para la monitorización y la configuración del sistema y del experimento.
- B **Compartimento de óptica:** Contiene los componentes ópticos que permiten la adquisición de imágenes de superficie doble de las celdas de flujo.
- C **Compartimento de líquidos:** Contiene cartuchos de reactivos y de tampones, y botellas para los reactivos utilizados.
- D **Compartimento de la celda de flujo:** Alberga la celda de flujo.
- E **Barra de estado:** Indica el estado de la celda de flujo como listo para la secuenciación (verde), en procesamiento (azul) o requiere asistencia (naranja).
- F **Botón de encendido y puertos USB:** Proporciona acceso al botón de encendido y a las conexiones USB para los componentes periféricos.

## Compartimento de la celda de flujo

El compartimento de la celda de flujo contiene la platina de la celda de flujo, que incluye la celda de flujo A en el lado izquierdo y la celda de flujo B en el derecho. Cada lado dispone de cuatro abrazaderas que sitúan y fijan automáticamente la celda de flujo.

Un objetivo de alineación óptica montado sobre la platina de la celda de flujo diagnostica y corrige los problemas ópticos. Cuando el NVCS así lo indica, el objetivo de alineación óptica alinea de nuevo el sistema y ajusta el enfoque de la cámara con el fin de mejorar los resultados de secuenciación.

**Figura 2** Platina de la celda de flujo



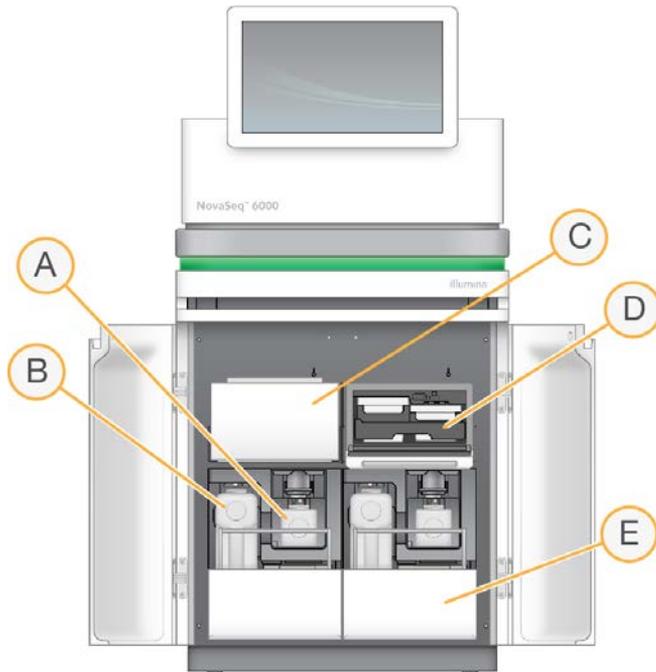
- A Lado del soporte de la celda de flujo A
- B Lado del soporte de la celda de flujo B
- C Abrazadera de la celda de flujo (una de cuatro por cada lado)
- D Objetivo de alineación óptica

El software controla la apertura y el cierre de la puerta del compartimento de la celda de flujo. La puerta se abre automáticamente para cargar una celda de flujo para un experimento o un lavado de mantenimiento. Después de la carga, el software cierra la puerta del compartimento, mueve la celda de flujo a su sitio y acopla las abrazaderas y la junta de vacío. Los sensores verifican la presencia y la compatibilidad de la celda de flujo.

## Compartimento de líquidos

Para configurar un experimento es necesario acceder al compartimento de líquidos para cargar reactivos y tampones y vaciar las botellas de reactivo utilizado. El compartimento de líquidos, que se divide en dos lados iguales para la celda de flujo A y la celda de flujo B, se cierra con dos puertas.

**Figura 3** Componentes del compartimento de líquidos



- A **Botella pequeña de reactivos utilizados:** Contiene reactivos usados del cartucho de grupo, con un soporte para tapones que permite almacenar los tapones de una forma sencilla.
- B **Botella grande de reactivos utilizados:** Contiene reactivos usados del cartucho de SBS y el de tampón, con un soporte para tapones que permite almacenar los tapones de una forma sencilla.
- C **Refrigerador de reactivos:** Refrigerar los cartuchos de SBS y grupo.
- D **Cajón de refrigerador de reactivos:** Las posiciones con códigos de color incluyen el cartucho de SBS a la izquierda (etiqueta gris) y el cartucho de grupo a la derecha (etiqueta naranja).
- E **Cajón de tampones:** Incluye la botella grande de reactivos utilizados a la izquierda y el cartucho de tampones a la derecha.

## Reactivos usados

El sistema de fluídica está diseñado para enviar los reactivos de los cartuchos de grupo, que son potencialmente peligrosos, a la botella pequeña de reactivos utilizados. Los reactivos de los cartuchos de SBS y de tampones pasan a la botella grande de reactivos utilizados. Sin embargo, puede producirse contaminación cruzada entre los flujos de reactivo utilizado. Por motivos de seguridad, se supone que ambas botellas de reactivo utilizado contienen sustancias químicas potencialmente peligrosas. La hoja de datos de seguridad (SDS) proporciona información detallada de la composición química.



## NOTA

Si el sistema está configurado para recoger los reactivos utilizados externamente, el flujo hacia la botella grande de reactivos utilizados se dirige de manera externa. Los reactivos de los cartuchos de grupo siempre se dirigen a la botella pequeña de reactivo utilizado.

## Software del sistema

El paquete de software del instrumento incluye aplicaciones integradas que realizan experimentos de secuenciación, análisis integrados en el instrumento y funciones relacionadas.

- ▶ **Software de control de NovaSeq (NVCS):** Este software le guía a través de los pasos para configurar un experimento de secuenciación, controla las operaciones del instrumento y muestra estadísticas a medida que el experimento avanza. Para mostrar cómo se realiza una descarga y una carga de consumibles adecuadas, el NVCS reproduce vídeos educativos durante la configuración del experimento.
- ▶ **Análisis en tiempo real (RTA):** Este software realiza análisis de imágenes y llamadas de bases durante un experimento. NovaSeq 6000 utiliza RTA3, que incorpora mejoras de arquitectura, de seguridad y de otras características para optimizar el rendimiento. Para obtener más información, consulte [Análisis en tiempo real en la página 72](#).
- ▶ **Servicio de copia universal (UCS):** Copia archivos de resultados de RTA3 y NVCS a la carpeta de resultados durante un experimento. Si procede, el servicio también transfiere datos a BaseSpace Sequence Hub. Si se detiene el Servicio de copia universal durante un experimento, el servicio realiza automáticamente varios intentos de reconexión y reanudación de la transferencia de datos.

## Iconos de estado

Un icono de estado en la interfaz del NVCS indica el estado del experimento. Un número en el icono indica el número de condiciones para un estado.

Cuando cambia el estado de un experimento, el icono parpadea para alertarle. Seleccione el icono para visualizar una descripción del estado. Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para que desaparezca el mensaje y **Close** (Cerrar) para salir del cuadro de diálogo.

**Tabla 2** Iconos de estado de NVCS

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado correcto	El sistema está normal.
	Procesando	El sistema está procesando.
	Advertencia	Se ha producido una advertencia y es necesaria su atención. Las advertencias no detienen un experimento ni requieren una acción antes de continuar.
	Error	Se ha producido un error. Los errores precisan una acción antes de continuar con el experimento.

## Gestión del proceso

La pantalla Process Management (Administración de procesos) proporciona acceso al motor informático (CE) y al disco duro (C:\). Utilice la pantalla Process Management (Administración de procesos) para supervisar el progreso de los experimentos, eliminar experimentos y realizar otras tareas de administración de espacio en disco. No elimine nunca archivos y carpetas directamente de C:\.

La pantalla Process Management (Administración de procesos) muestra el espacio disponible en disco, el espacio utilizado en el CE y la unidad C:\, así como el estado de los experimentos que utilizan espacio en disco. Las columnas Run Date (Fecha de experimento) y Run Name (Nombre de experimento) identifican cada experimento. Las columnas Run Status (Estado de experimento), BaseSpace y Network (Red) muestran el estado de cada proceso para un experimento.

**Tabla 3 Iconos de estado de la gestión del proceso**

Proceso	Icono	Descripción
Estado del experimento	 Running	El experimento está en curso.
	 Complete	El experimento ha finalizado la secuenciación.
Red	 Copying	Se están copiando los archivos a la carpeta de resultados de la red.
	 Complete	Se han copiado correctamente todos los archivos a la carpeta de resultados de la red.
	N/A	No es aplicable porque el experimento no está configurado para cargarse en una carpeta de resultados de red o se desconoce el estado de carga. Para solucionar problemas, consulte <a href="#">Solución de problemas de gestión de procesos en la página 68</a> .
BaseSpace	 Uploading	Se están cargando los archivos en BaseSpace Sequence Hub.
	 Complete	Se han cargado correctamente todos los archivos en BaseSpace Sequence Hub.
	N/A	No es aplicable porque el experimento no está configurado para cargarse en BaseSpace Sequence Hub o se desconoce el estado de carga. Para solucionar problemas, consulte <a href="#">Solución de problemas de gestión de procesos en la página 68</a> .

Para poder iniciar un experimento de celda de flujo, deben cumplirse los requisitos de espacio mínimo en CE y C:\.



### NOTA

Para experimentos de una celda de flujo individual, los requisitos de espacio mínimo corresponden a la mitad de los que se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 4** Requisitos de espacio mínimo en CE y C:\ para experimentos de doble celda de flujo

Celda de flujo	Espacio en CE por ciclo	Espacio en C:\ por par de celdas de flujo
SP	0,5 Gb	5 Gb
S1	1,35 Gb	20 Gb
S2	2,7 Gb	20 Gb
S4	4,3 Gb	40 Gb

Para calcular el espacio total requerido en CE para el experimento, multiplique el valor de "Espacio en CE por ciclo" por la suma de los valores de longitud de los campos de lectura 1, lectura 2, índice 1 e índice 2 (consulte la sección *Introducir parámetros del experimento en la página 55*). Por ejemplo, para un experimento "paired-end" S4 de doble celda de flujo y 150 ciclos con ambos índices de 8 bases de largo, el espacio requerido en CE es de  $(151 \times 2 + 8 \times 2) \times 4,3 = 1,37$  Tb.

Para obtener información acerca de cómo borrar espacio en el disco, consulte *Eliminación del experimento en la página 59*.

# Capítulo 2 Kits y accesorios

Descripción general de los kits .....	11
Componentes del kit de reactivos .....	12
Componentes del kit de NovaSeq Xp .....	16
Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp .....	17
Descripción de símbolos .....	17

## Descripción general de los kits

Para efectuar un experimento en NovaSeq 6000 es preciso contar con un kit de reactivos NovaSeq 6000. El flujo de trabajo de NovaSeq Xp también requiere un kit de NovaSeq Xp. Los kits están disponibles en las siguientes configuraciones.

Seleccione el tamaño de kit adecuado para su diseño de experimento. Illumina le recomienda que use los kits de 500 ciclos solo para longitudes de experimento superiores a los 300 ciclos.

Para ver la lista completa de elementos necesarios para un experimento, consulte *Consumibles y equipos proporcionados por el usuario en la página 27*.

**Tabla 5 Configuraciones del kit**

Nombre del kit	N.º de catálogo de Illumina
Kit de reactivos S4 de NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012866
Kit de reactivos S4 de NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20027466
Kit de reactivos S2 de NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012860
Kit de reactivos S2 de NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20012861
Kit de reactivos S2 de NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20012862
Kit de reactivos S1 de NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012863
Kit de reactivos S1 de NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20012864
Kit de reactivos S1 de NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20012865
Kit de reactivos SP de NovaSeq 6000 (500 ciclos)	20029137
Kit de reactivos SP de NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20027465
Kit de reactivos SP de NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20027464
Kit de dos carriles de NovaSeq Xp	20021664
Kit de cuatro carriles de NovaSeq Xp	20021665

## Etiquetado de compatibilidad

Para identificar componentes del kit compatibles, las celdas de flujo y los cartuchos están etiquetados con símbolos que muestran el modo del kit: **SP**, **S1**, **S2** o **S4**. Los distribuidores de NovaSeq Xp admiten varios modos y están etiquetados para dos carriles (para las celdas de flujo SP, S1 y S2) o para cuatro carriles (para las celdas de flujo S4).

Los componentes con modos diferentes no pueden usarse en el mismo experimento. Por ejemplo, no se pueden emparejar cartuchos S1 con una celda de flujo S2.

Modo del kit	Marcado de la etiqueta	Descripción
Componentes del kit SP		La celda de flujo SP genera de 650 a 800 millones de lecturas individuales que superan el filtro con un rendimiento de hasta 250 Gb a 2 × 150 pb y de hasta 400 Gb a 2 × 250 pb.
Componentes del kit S1		La celda de flujo S1 genera hasta 1600 millones de lecturas individuales que superan el filtro con resultados de hasta 500 Gb a 2 × 150 pb. El kit S1 proporciona secuenciación rápida de un número menor de muestras para la mayoría de las aplicaciones de alto rendimiento.
Componentes del kit S2		La celda de flujo S2 genera hasta 4100 millones de lecturas individuales que superan el filtro con resultados de hasta 1250 Gb a 2 × 150 pb. La celda de flujo S2 ofrece secuenciación rápida para la mayoría de las aplicaciones de alto rendimiento, con una cantidad mayor de lecturas que una celda de flujo S1 y más resultados de secuenciación.
Componentes del kit S4		La celda de flujo S4 genera hasta 10.000 millones de lecturas individuales que superan el filtro con resultados de hasta 3000 Gb a 2 × 150 pb. Se trata de una versión de celda de flujo de 4 carriles diseñada para lograr el mayor número de resultados. Hace posible obtener de forma rentable una secuenciación del genoma completo para una gran cantidad de especies y profundidades de cobertura diferentes.

En la [página de producto de los kits de reactivos NovaSeq](#) del sitio web de Illumina, se pueden encontrar las especificaciones para cada modo.

## Componentes del kit de reactivos

Los kits de reactivos NovaSeq 6000 contienen los siguientes componentes. Cada componente utiliza identificación de radiofrecuencia (RFID) para un seguimiento y compatibilidad de los consumibles más preciso.

Para garantizar un rendimiento adecuado, cuando reciba el kit, almacene sus componentes a la temperatura indicada.

**Tabla 6 Componentes del kit**

Cantidad	Componente del kit	Temperatura de almacenamiento
1	Tubo de bibliotecas	Entre 15 °C y 30 °C
1	Celda de flujo	Entre 2 °C y 8 °C
1	Cartucho de tampones	Entre 15 °C y 30 °C
1	Cartucho de grupos	Entre -25 °C y -15 °C
1	Cartucho de SBS	Entre -25 °C y -15 °C



### PRECAUCIÓN

Evite que los cartuchos se caigan. Si lo hacen, podrían producirse lesiones. Si los reactivos se salen de los cartuchos, podría producirse irritación en la piel. Antes de utilizarlos, inspeccione los cartuchos en busca de fisuras.

## Tubo de bibliotecas

El tubo de bibliotecas de NovaSeq 6000 es un tubo de 16 mm que se sitúa en la posición n.º8 del cartucho de grupo. La posición n.º8 contiene la etiqueta **Library Tube** (Tubo de bibliotecas) y tiene un círculo naranja para identificarla fácilmente. El tubo cuenta con un tapón de rosca que permite guardar bibliotecas cuando sea necesario. Asegúrese de que se le ha quitado la tapa antes de cargarlo en el cartucho de grupo.

Figura 4 Tubo de bibliotecas



El tubo de bibliotecas se utiliza de una de estas dos formas, en función del flujo de trabajo:

- ▶ **NovaSeq Standard:** Las bibliotecas agrupadas y desnaturalizadas se añaden al tubo de bibliotecas que, posteriormente, se carga sin tapar en el cartucho de grupo. Una vez iniciado el experimento, el instrumento mezcla las bibliotecas con los reactivos ExAmp en el tubo de bibliotecas que, posteriormente, se transfiere de manera automática a la celda de flujo.
- ▶ **NovaSeq Xp:** El tubo de bibliotecas vacío y sin tapar se carga en el cartucho de grupo. Durante el experimento, los reactivos se mezclan en el tubo de bibliotecas antes de su distribución en la celda de flujo.

## Celda de flujo

La celda de flujo de NovaSeq 6000 es una celda de flujo de tramas integrada en un cartucho. La celda de flujo es un sustrato basado en vidrio que contiene miles de millones de nanopocillos en una disposición ordenada, que aumenta el número de lecturas de salida y los datos de secuenciación. Los grupos se generan en los nanopocillos desde los cuales se lleva a cabo posteriormente la secuenciación.

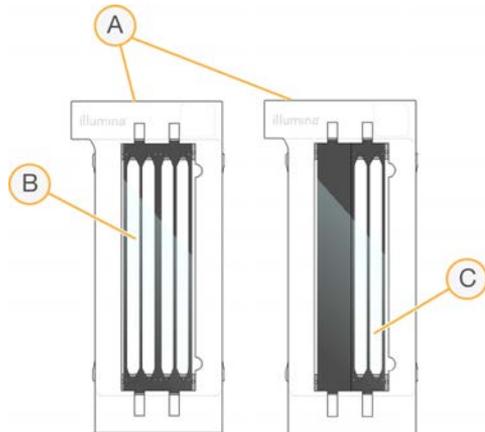
Cada celda de flujo cuenta con varios carriles para secuenciar bibliotecas agrupadas. Las celdas de flujo SP, S1 y S2 disponen de dos carriles cada una y la celda de flujo S4 tiene cuatro. Se adquieren imágenes de cada carril en varios sectores y, posteriormente, el software divide la imagen de cada sector en secciones de menor tamaño denominadas placas. Si desea obtener más información, consulte [Placas de la celda de flujo en la página 73](#).



### NOTA

Con una celda de flujo S1, asegúrese de utilizar el NVCS v1.3.1 o posterior. Con una celda de flujo SP, asegúrese de utilizar el NVCS v1.6 o posterior.

**Figura 5** Celdas de flujo



- A Cartucho de la celda de flujo
- B Celda de flujo de cuatro carriles (S4)
- C Celda de flujo de dos carriles (SP, S1 y S2)

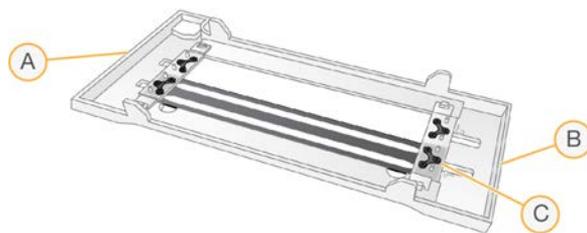
La parte inferior de las celdas de flujo cuenta con cuatro juntas. Las bibliotecas y los reactivos acceden a los carriles de la celda de flujo a través de las juntas del extremo de entrada de la celda de flujo. Los reactivos utilizados se expulsan de los carriles a través de las juntas del extremo de salida.



**NOTA**

No toque las juntas cuando manipule la celda de flujo.

**Figura 6** Celda de flujo invertida



- A Extremo de salida
- B Extremo de entrada
- C Junta (una de cuatro)

## Cartuchos de tampones, grupo y SBS

Los cartuchos de tampones, grupo y SBS de NovaSeq 6000 cuentan con depósitos con cierre metálico precargados con reactivos, ampones y solución de lavado. En el kit de reactivos se incluye un cartucho de cada tipo.

Los cartuchos se cargan directamente en el instrumento, y se codifican con colores y etiquetan para reducir los errores de carga. Las guías del cajón del refrigerador de reactivos y del cajón de tampones garantizan la orientación correcta.

La etiqueta de cada cartucho incluye los modos admitidos, como S1/S2 o SP/S1/S2. Los cartuchos solo pueden usarse para los modos indicados en la etiqueta.

**Tabla 7 Cartuchos de reactivos**

Cartucho	Descripción
<p>Cartucho de tampones de NovaSeq 6000</p> 	<p>Precargado con tampones de secuenciación y con un peso de hasta 6,8 kg. Un mango de plástico facilita el transporte, la carga y la descarga. Las hendiduras en la placa superior permiten que los cartuchos se apilen.</p>
<p>Cartucho de grupo de NovaSeq 6000</p> 	<p>Se llena previamente mediante la generación de grupos, el indexado y los reactivos "paired-end", así como con solución de lavado. Incluye una posición designada para el tubo de bibliotecas. El etiquetado naranja distingue el cartucho de grupo del cartucho de SBS.</p>
<p>Cartucho de SBS de NovaSeq 6000</p> 	<p>Precargado con reactivos de secuenciación en volúmenes específicos para el número de ciclos que admite el kit (500, 300, 200 o 100). Cada una de las tres posiciones de los reactivos tiene una posición contigua reservada para el lavado automático posterior al experimento. El etiquetado gris distingue el cartucho SBS del cartucho de grupo.</p>

## Depósitos de cartuchos de grupo

### Depósito extraíble

El reactivo de desnaturalización en la posición n.º30 contiene formamida, que es una amida orgánica y una toxina reproductiva. Para garantizar un desecho seguro de cualquier reactivo no usado tras el experimento de secuenciación, se puede extraer este depósito.



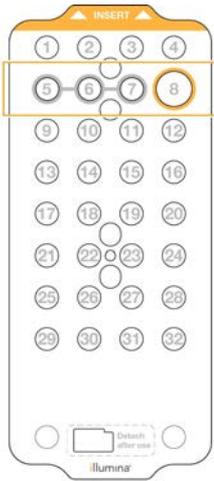
#### NOTA

No apile el cartucho de SBS encima del cartucho de grupo, ya que puede desacoplar la posición n.º30.

### Depósitos reservados

Hay reservados tres depósitos para cebadores personalizados y una posición vacía para el tubo de bibliotecas. Para la trazabilidad de las muestras, el tubo de bibliotecas se carga en el cartucho de grupo durante la configuración del experimento y permanece en el cartucho hasta que este haya finalizado.

**Figura 7** Depósitos numerados



Posición	Reservado para
5, 6 y 7	Cebadores personalizados opcionales
8	Tubo de bibliotecas

Para obtener más información sobre los cebadores personalizados, consulte la *Guía de cebadores personalizados de la serie NovaSeq* (n.º de documento 100000022266).

## Componentes del kit de NovaSeq Xp

Cada kit de NovaSeq Xp es de un solo uso e incluye los siguientes componentes. Para garantizar un rendimiento adecuado, cuando reciba el kit, almacene sus componentes a la temperatura indicada.

**Tabla 8** Componentes del kit de NovaSeq Xp

Cantidad	Componente del kit	Temperatura de almacenamiento
1	DPX1	Entre -25 °C y -15 °C
1	DPX2	Entre -25 °C y -15 °C
1	DPX3	Entre -25 °C y -15 °C
1	Distribuidor de NovaSeq Xp	Déjelo con el kit o almacénelo a temperatura ambiente.

## Reactivos DPX1, DPX2 y DPX3

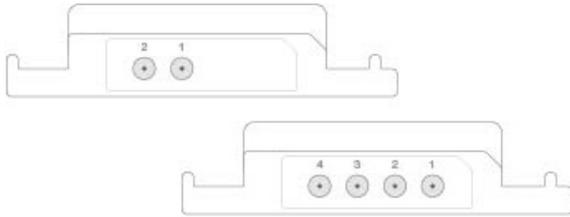
DPX1, DPX2 y DPX3 son reactivos ExAmp suministrados en tubos individuales para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp. La combinación de estos reactivos crea una mezcla maestra de ExAmp que se mezcla con los grupos de bibliotecas antes de cargarse en la celda de flujo.

## Distribuidor de NovaSeq Xp

El distribuidor de NovaSeq Xp se sitúa en la plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp para permitir la carga directa de los grupos de bibliotecas en los carriles individuales de la celda de flujo. Los brazos situados a ambos lados del distribuidor de NovaSeq Xp están diseñados para una fácil colocación en la plataforma.

Los distribuidores de NovaSeq Xp se suministran con configuraciones de dos pocillos y cuatro pocillos para que coincida con las celdas de flujo de dos carriles y cuatro carriles. Cada pocillo se corresponde con un carril de la celda de flujo. Dado que la celda de flujo está cargada al revés en la plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp, los pocillos están numerados de derecha a izquierda para que coincidan con la numeración de carriles de una celda de flujo invertida.

**Figura 8** Distribuidor de NovaSeq Xp con pocillos numerados

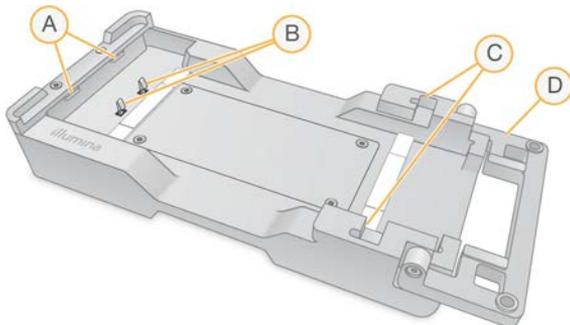


## Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp

La plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp es un accesorio reutilizable para la carga de bibliotecas directamente en una celda de flujo. La celda de flujo se invierte y se carga en la plataforma, y el distribuidor de NovaSeq Xp se ajusta sobre la celda de flujo.

Dos salientes (debajo del soporte) y dos muelles guían la inserción de la celda de flujo y garantizan su correcta orientación. Las ranuras sujetan los brazos del distribuidor de NovaSeq Xp con la debida orientación y una colocación pareja. Una abrazadera magnética se gira 180° para fijar el distribuidor de NovaSeq Xp sobre la celda de flujo.

**Figura 9** Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp



- A Salientes (debajo del soporte) para guiar la carga
- B Muelles para alinear la celda de flujo
- C Ranuras para sujetar los brazos del distribuidor de NovaSeq Xp
- D Abrazadera para fijar la celda de flujo y el distribuidor NovaSeq Xp

## Descripción de símbolos

La siguiente tabla describe los símbolos que aparecen en los consumibles o el embalaje de los consumibles.

Símbolo	Descripción
	La fecha en que caduca el consumible. Para unos resultados óptimos, utilice el consumible antes de esta fecha.
	Indica el fabricante (Illumina).
	El uso previsto es Solo para uso en investigaciones.
	Indica el número de referencia para poder identificar el consumible. <sup>1</sup>
	Indica el código de lote para identificar el lote en que se fabricó el consumible. <sup>1</sup>
	Indica el número de serie.
	Indica que se requiere protección de la luz o del calor. Almacenar lejos de la luz solar.
	Indica un peligro para la salud.
	Indica una advertencia de peligro.

Símbolo	Descripción
	Rango de temperatura de almacenamiento en grados Celsius. Almacene el consumible dentro del rango indicado. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> REF indica el componente individual; LOT identifica el lote al que pertenece el componente.

<sup>2</sup> La temperatura de almacenamiento puede diferir de la temperatura de envío.

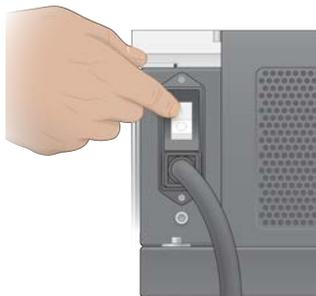
# Capítulo 3 Primeros pasos

Puesta en servicio del instrumento .....	20
Configuración de ajustes .....	21
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario .....	27

## Puesta en servicio del instrumento

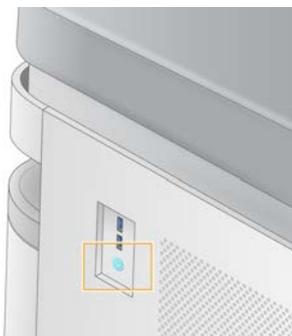
- 1 Cambie el interruptor de alimentación situado en la parte posterior del instrumento a la posición | (encendido).

Figura 10 Ubicación del interruptor de alimentación



- 2 Espere hasta que el botón de encendido en el lado derecho del instrumento se encienda en color azul y, a continuación, púlselo.

Figura 11 Ubicación del botón de encendido



## Cuentas de usuario

En NVCS v1.5 y en las versiones posteriores hay dos tipos de cuentas: de administrador y de usuario. En la siguiente tabla se muestran los permisos de cada tipo de cuenta.

Permisos	Administrador	Usuario
Configurar, iniciar, supervisar experimentos de secuenciación	X	X
Descargar y actualizar el software	X	
Ver el estado de un experimento activo iniciado por otro usuario	X	
Terminar un proceso de UCS que no responde	X	

Los archivos de datos de la aplicación se guardan en **C:/ProgramData**. Las aplicaciones se instalan en **C:/Archivos de programa**. El NVCS se inicia como una aplicación a pantalla completa en ambos tipos de cuentas.

## Inicie sesión en el sistema

- 1 Cuando se cargue el sistema operativo, inicie sesión en Windows con el nombre de usuario y la contraseña de su centro.
- 2 Abra el NVCS.  
El software se abre e inicia el sistema. Una vez completada la inicialización, aparecerá la pantalla Home (Inicio).

El NVCS se inicia como una aplicación de usuario. Si intenta usar una función que requiera de permisos de administrador, como la actualización de software, y no ha iniciado sesión como administrador, se le solicitará que lo haga.

Para estar informado sobre el progreso de un experimento de secuenciación, deje la sesión abierta mientras se ejecuta el NVCS y mientras se está llevando a cabo un experimento de secuenciación.

## Configuración de ajustes

El NVCS incluye ajustes para las siguientes opciones:

- ▶ Modo de experimento (manual o basado en archivos)
- ▶ Flujo de trabajo de NovaSeq Xp
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Actualizaciones de software



### NOTA

Antes de configurar la selección de flujo de trabajo o las comprobaciones automáticas de las actualizaciones de software, asegúrese de que se ha configurado Mode Selection (Selección de modo).

## Modos de configuración del experimento

- ▶ **Manual:** El modo predeterminado que envía datos a una carpeta de resultados especificada para futuros análisis.
- ▶ **Basado en archivo:** Un modo distinto que utiliza archivos de BaseSpace Clarity LIMS u otro sistema de LIMS para definir los parámetros del experimento. Si desea obtener más información, consulte [Configuración de la salida del LIMS en la página 23](#).

Cuando ajuste el modo de configuración del experimento, asegúrese de especificar una ubicación existente para la carpeta de configuración del experimento. Esta carpeta es obligatoria, y un mensaje de ubicación no válida indica que la ubicación especificada no existe.

Ambos modos de configuración del experimento incluyen la opción para enviar datos a BaseSpace Sequence Hub para su análisis.

## Configuración del modo manual

- 1 En el menú principal, seleccione **Settings** (Configuración).  
La pantalla Settings (Configuración) se abre en la ficha Mode Selection (Selección de modo).
- 2 Seleccione **Manual**.

- 3 **[Opcional]** Introduzca la ubicación de red que desee o navegue hasta ella para especificar la carpeta de resultados.  
No escoja una ubicación en las unidades C:\, D:\ o Z:\. De hacerlo, se producirá un error de disco no válido.  
Este ajuste es la ubicación predeterminada. La ubicación de la carpeta de resultados puede cambiarse en cada experimento.
- 4 **[Opcional]** Seleccione la opción **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina) para activar el servicio de supervisión proactiva de Illumina. El nombre del ajuste en la interfaz de software puede diferir del nombre que figura en esta guía, dependiendo de la versión del NVCS que se esté utilizando.  
Con este ajuste activado, los datos del rendimiento del instrumento se envían a Illumina. Estos datos ayudan a Illumina a solucionar problemas de forma más sencilla y a detectar posibles fallos, lo que permite llevar a cabo tareas de mantenimiento proactivo y maximizar el tiempo de actividad del instrumento. Para obtener más información sobre las ventajas de este servicio, consulte la *nota técnica proactiva de Illumina* (n.º de documento 1000000052503).  
Tenga en cuenta lo siguiente en relación con este servicio:
  - ▶ No envía datos de secuenciación.
  - ▶ Requiere que el instrumento esté conectado a una red con acceso a Internet.
  - ▶ Está activado de manera predeterminada. Para desactivar este servicio, desactive el ajuste **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina).
- 5 Seleccione **Save** (Guardar).

## Configuración del modo basado en archivos

- 1 En el menú principal, seleccione **Settings** (Configuración).  
La pantalla Settings (Configuración) se abre en la ficha Mode Selection (Selección de modo).
- 2 Seleccione **File-Based** (Basado en archivos).
- 3 Introduzca la ubicación de red que desee o navegue hasta ella para especificar la carpeta de configuración del experimento, que contiene los archivos del LIMS.  
Asegúrese de que se hayan añadido los archivos del LIMS correctos a la carpeta de configuración del experimento antes de configurar un experimento. Durante la configuración del experimento, el software utiliza el ID de la celda de flujo para encontrar los archivos del experimento actual.
- 4 **[Opcional]** Introduzca la ubicación de red que desee o navegue hasta ella para especificar la carpeta de resultados.  
No escoja una ubicación en las unidades C:\, D:\ o Z:\. De hacerlo, se producirá un error de disco no válido.  
La ubicación de la carpeta de resultados puede cambiarse en cada experimento.
- 5 **[Opcional]** Seleccione la opción **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina) para activar el servicio de supervisión proactiva de Illumina. El nombre del ajuste en la interfaz de software puede diferir del nombre que figura en esta guía, dependiendo de la versión del NVCS que se esté utilizando.  
Con este ajuste activado, los datos del rendimiento del instrumento se envían a Illumina. Estos datos ayudan a Illumina a solucionar problemas de forma más sencilla y a detectar posibles fallos, lo que permite llevar a cabo tareas de mantenimiento proactivo y maximizar el tiempo de actividad del instrumento. Para obtener más información sobre las ventajas de este servicio, consulte la *nota técnica proactiva de Illumina* (n.º de documento 1000000052503).

Tenga en cuenta lo siguiente en relación con este servicio:

- ▶ No envía datos de secuenciación.
- ▶ Requiere que el instrumento esté conectado a una red con acceso a Internet.
- ▶ Está activado de manera predeterminada. Para desactivar este servicio, desactive el ajuste **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina).

Cuando está habilitada, para esta opción hace falta una conexión externa a Internet.

6 Seleccione **Save** (Guardar).

## Configuración de la salida del LIMS

Si su sistema está configurado para el modo basado en archivos y utiliza un software de LIMS que no sea BaseSpace Clarity LIMS, configure el LIMS para generar un archivo de configuración del experimento en formato \*.json. Para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard, el nombre de archivo debe coincidir con el ID del tubo de bibliotecas. El ID de la celda de flujo en el archivo puede dejarse en blanco. Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, el nombre de archivo debe coincidir con el ID de la celda de flujo, y el ID de la celda de flujo y el ID de la biblioteca deben especificarse en el archivo. El nombre de archivo y los valores no distinguen entre mayúsculas y minúsculas.

El software LIMS externo puede usar la API LIMS de NovaSeq para interactuar con el sistema NovaSeq 6000. Para obtener más información sobre los puntos finales de la API, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Nombre del campo	Valor
run_name	El nombre de experimento que se desee, puede contener caracteres alfanuméricos, guiones y guiones bajos.
run_mode	Uno de los modos siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SP</li> <li>• S1</li> <li>• S2</li> <li>• S4</li> </ul>
workflow_type	NoIndex, SingleIndex o DualIndex
librarytube_ID	El RFID del tubo de bibliotecas
rehyb*	True o False (Verdadero o Falso)
sample_loading_type	NovaSeq Standard o NovaSeq Xp
Flowcell_ID	El ID de la celda de flujo
paired_end	True o False (Verdadero o Falso)
read1	Un valor hasta 251
read2	Un valor hasta 251
index_read1	Cualquier valor
index_read2	Cualquier valor
output_folder	La ruta a la carpeta de resultados con dos barras invertidas para una secuencia de escape
samplesheet	La ruta a una hoja de muestras u otro archivo en formato *.csv con dos barras invertidas para una secuencia de escape
use_basespace	True o False (Verdadero o Falso)
basespace_mode	RunMonitoringOnly o RunMonitoringAndStorage
use_custom_read1_primer	True o False (Verdadero o Falso)

Nombre del campo	Valor
use_custom_read2_primer	True o False (Verdadero o Falso)
use_custom_index_read1_primer	True o False (Verdadero o Falso)

\* La rehibridación no está disponible en NVCS v1.4.0 o anterior.

Archivo \*.json de ejemplo, llamado H6655DMXX.json:

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

## Configurar los ciclos de índices predeterminados

Puede configurar el número predeterminado de ciclos de índices para el flujo de trabajo Standard como se explica a continuación.

- 1 En el menú principal, seleccione **Settings** (Configuración).  
La pantalla Settings (Configuración) se abre en la ficha Mode Selection (Selección de modo).
- 2 Seleccione la pestaña **Workflow Selection** (Selección de flujo de trabajo).
- 3 Introduzca el número predeterminado de ciclos de índices en el cuadro de texto **Index Cycles** (Ciclos de índice).
- 4 Seleccione **Save** (Guardar).

## Flujos de trabajo de NovaSeq Standard y NovaSeq Xp

Los flujos de trabajo de NovaSeq Standard y NovaSeq Xp utilizan las composiciones químicas de ExAmp propiedad de Illumina.

### ▶ Flujo de trabajo de NovaSeq Standard

El flujo de trabajo de NovaSeq Standard automatiza dos pasos fundamentales de la química de grupos de ExAmp propiedad de Illumina en el instrumento.

- ▶ Preparación de la mezcla maestra de ExAmp

► Entrega de la mezcla maestra a la celda de flujo

La preparación y entrega incorporadas de la mezcla maestra minimizan la interacción del usuario y reducen la variabilidad de la mezcla preparada.

Como parte de la configuración del experimento para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard, se inserta un tubo de bibliotecas que contiene el grupo de bibliotecas naturalizadas y desnaturalizadas a la concentración recomendada en la posición n.º 8 del cartucho de grupo. Después de iniciar el experimento, tienen lugar en el instrumento los pasos siguientes sin que se requiera la interacción del usuario. Esto incluye la transferencia de reactivos ExAmp desde el cartucho de grupo hasta el tubo de bibliotecas, la preparación de la mezcla de grupos de bibliotecas y reactivos, así como el suministro de la mezcla preparada a todos los carriles de la celda de flujo.

Tras la generación de grupos integrada, se llevan a cabo varios pasos comunes a ambos flujos de trabajo. Estos pasos incluyen la aplicación de una mezcla acondicionadora a la celda de flujo agrupada y otros pasos del proceso químico para preparar los grupos para la secuenciación por síntesis. La mezcla acondicionadora se prepara durante el proceso de generación de grupos utilizando los reactivos en el cartucho de grupo, y el tubo de bibliotecas se inserta durante la configuración del experimento. La mezcla acondicionadora ayuda a aumentar la eficacia de la generación de grupos en el instrumento NovaSeq.

► Flujo de trabajo de NovaSeq Xp

El flujo de trabajo de NovaSeq Xp permite la carga de diferentes bibliotecas o grupos de bibliotecas en carriles independientes de la celda de flujo NovaSeq utilizando la plataforma de la celda de flujo NovaSeq Xp y un kit de consumibles específico para celdas de flujo (kit de dos carriles de NovaSeq Xp o kit de cuatro carriles de NovaSeq Xp). El kit NovaSeq Xp contiene reactivos ExAmp necesarios para la generación de grupos y el distribuidor NovaSeq Xp requerido para la carga en los carriles.

La mezcla de ExAmp o de bibliotecas se prepara y se carga en los carriles individuales de la celda de flujo utilizando tanto la plataforma de la celda de flujo como el distribuidor NovaSeq Xp. Puede usarse un controlador de líquidos automatizado para la preparación de la mezcla de ExAmp o de bibliotecas y suministrarse al distribuidor para el autollenado de las celdas de flujo. Cuando se termina la carga de la muestra en la celda de flujo, se inserta un tubo de bibliotecas vacío en la posición n.º 8 del cartucho de grupo, se coloca la celda de flujo en el instrumento y se inicia el experimento de secuenciación.

Después de que se inicie el experimento, se llevan a cabo varios pasos comunes a ambos flujos de trabajo. Estos pasos incluyen la aplicación de una mezcla acondicionadora a la celda de flujo agrupada y otros pasos del proceso químico para preparar los grupos para la secuenciación por síntesis. La mezcla acondicionadora se prepara durante el proceso de agrupación utilizando los reactivos en el cartucho de grupo y se mezcla en el tubo de bibliotecas vacío insertado durante la configuración del experimento. La mezcla acondicionadora ayuda a aumentar la eficacia de la generación de grupos en el instrumento NovaSeq.

## Configuración del flujo de trabajo de NovaSeq Xp

- 1 En el menú principal, seleccione **Settings** (Configuración).  
La pantalla Settings (Configuración) se abre en la ficha Mode Selection (Selección de modo).
- 2 Seleccione la pestaña **Workflow Selection** (Selección de flujo de trabajo).
- 3 Para activar el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, seleccione **Enable Workflow Selection** (Activar selección de flujo de trabajo).
- 4 [Opcional] Para convertir NovaSeq Xp en el flujo de trabajo predeterminado, seleccione **NovaSeq Xp**.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar).

## Configurar BaseSpace Sequence Hub

Lleve a cabo las siguientes instrucciones para configurar los ajustes predeterminados para BaseSpace Sequence Hub. Durante la configuración del experimento, puede deshabilitar BaseSpace Sequence Hub para el experimento actual o cambiar los ajustes para la supervisión y el almacenamiento del experimento. Para conectar con BaseSpace Sequence Hub hace falta una conexión a Internet.

- 1 En el menú principal, seleccione **Settings** (Configuración).  
La pantalla Settings (Configuración) se abre en la ficha Mode Selection (Selección de modo).
- 2 Seleccione la casilla de verificación **BaseSpace Sequence Hub**.
- 3 Seleccione una opción de configuración:
  - ▶ **Run Monitoring and Storage** (Almacenamiento y supervisión de experimentos): Envía los datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota y el análisis de los datos. Esta opción precisa la carga de una hoja de muestras con el experimento.
  - ▶ **Run Monitoring Only** (Solo supervisión de experimentos): Envía los archivos del experimento InterOp, de registro y otros archivos que no sean CBCL a BaseSpace Sequence Hub de forma que los experimentos se puedan supervisar de manera remota.
- 4 En el menú desplegable Hosting Location (Ubicación de alojamiento), seleccione **EU (Frankfurt)** (UE [Fráncfort]) o **USA (N. Virginia)** (EE. UU. [N. Virginia]).  
Esta opción determina la ubicación de carga de los datos.
- 5 Si está suscrito a BaseSpace Enterprise:
  - a Seleccione la casilla de verificación **Private Domain** (Dominio privado).
  - b Introduzca el nombre del dominio utilizado para el inicio de sesión individual en BaseSpace Sequence Hub.
- 6 Seleccione **Save** (Guardar).

## Nombre de la hoja de muestras

Al ejecutar el NVCS v1.3.1 o anterior, debe darse el nombre de SampleSheet.csv (con distinción entre mayúsculas y minúsculas) a una hoja de muestras utilizada para un experimento de NovaSeq 6000 y cargada en BaseSpace Sequence Hub. Si la hoja de muestras tiene un nombre incorrecto y está habilitada la supervisión y el almacenamiento del experimento, BaseSpace Sequence Hub marca el experimento con una advertencia. Un experimento marcado se puede poner en cola para generación de FASTQ al seleccionar **More | Fix Sample Sheet and Requeue** (Más | Solucionar hoja de muestras y volver a poner en cola) y luego introducir la hoja de muestras adecuada. Hasta que se proporcione la hoja de muestras, los datos de secuenciación no se pueden convertir en archivos de FASTQ.

Si ejecuta el NVCS v1.4 o posterior, no hay limitaciones en los nombres de la hoja de muestras.

Si utiliza el bcl2fastq2 Conversion Software v2.19 o posterior, para convertir datos a archivos FASTQ localmente, puede usar la opción de línea de comandos `--sample-sheet` para especificar un archivo CSV en cualquier ubicación. La línea de comandos permite el uso de cualquier nombre de archivo.

## Configuración de las actualizaciones de software

La búsqueda automática de actualizaciones de software está habilitada de forma predeterminada. Puede deshabilitar o habilitar la búsqueda automática de actualizaciones en Settings (Configuración).

- 1 En el menú principal, seleccione **Settings** (Configuración).
- 2 Seleccione **Software Update** (Actualización de software).
- 3 Seleccione la casilla **If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available** (Si está habilitado, el instrumento mostrará una notificación cuando haya una actualización de software disponible).
- 4 Seleccione **Save** (Guardar).

## Consumibles y equipos proporcionados por el usuario

Los siguientes consumibles y equipos proporcionados por el usuario son necesarios para preparar los consumibles, realizar secuenciaciones y para el mantenimiento del sistema.

### Consumibles

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOH 1 N	Proveedor de laboratorio general	Dilución a 0,2 N para la desnaturalización de bibliotecas.
10 mM de Tris-HCl, pH 8,5	Proveedor de laboratorio general	Dilución de bibliotecas y control PhiX opcional antes de la desnaturalización.
400 mM de Tris-HCl pH 8	Proveedor de laboratorio general	Neutralización de bibliotecas y control PhiX opcional tras la desnaturalización.
Botella de centrifugado, 500 ml	Proveedor de laboratorio general	Dilución de Tween 20 para un lavado de mantenimiento.
Tubo de centrifugado, 30 ml	Proveedor de laboratorio general	Dilución de NaOCl para un lavado de mantenimiento.
Guantes desechables sin polvo	Proveedor de laboratorio general	Usos múltiples.
Paños humedecidos en alcohol isopropilo al 70 % o Paños humedecidos en etanol al 70 %	WWR, n.º de catálogo 95041-714 (o equivalente) Proveedor de laboratorio general	Limpieza de componentes antes de un experimento y con fines generales.
Toallita de laboratorio sin pelusa	WWR, n.º de catálogo 21905-026 (o equivalente)	Secado de la platina de la celda de flujo y usos múltiples.
Tubo de microcentrifugado, 1,5 ml	WWR, n.º de catálogo 20170-038 (o equivalente)	Combinación de volúmenes al diluir NaOH y la biblioteca.
NaOCl, 5 %	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 239305	Realización de un lavado de mantenimiento.
Kit de reactivos NovaSeq 6000	Illumina, consulte <i>Descripción general de los kits</i> en la página 11 para ver los números de catálogo	Realización de un experimento de secuenciación.

Consumible	Proveedor	Finalidad
Puntas de pipeta (20 µl)	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Puntas de pipeta (200 µl)	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Puntas de pipeta (1000 µl)	Proveedor de laboratorio general	Pipeteo para dilución y carga de bibliotecas.
Reactivo o alcohol isopropílico de grado espectrofotométrico (99 %), botella de 100 ml	Proveedor de laboratorio general	Limpieza periódica de los componentes de la óptica y soporte para el cartucho de limpieza.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Realización de un lavado de mantenimiento.
Agua de laboratorio	Proveedor de laboratorio general	Dilución de NaOH para la desnaturalización de bibliotecas. Dilución de Tween 20 e hipoclorito sódico para un lavado de mantenimiento.
<b>[Flujo de trabajo de NovaSeq Xp]</b> Uno de los siguientes kits: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kit de dos carriles de NovaSeq Xp</li> <li>• Kit de cuatro carriles de NovaSeq Xp</li> </ul>	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N.º de catálogo 20021664</li> <li>• N.º de catálogo 20021665</li> </ul>	Carga manual de bibliotecas en una celda de flujo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kit de dos carriles para las celdas de flujo SP, S1 y S2</li> <li>• Kit de cuatro carriles para las celdas de flujo S4</li> </ul>
<b>[Flujo de trabajo de NovaSeq Xp]</b> Tubos de 0,5 ml y 1,7 ml	Proveedor de laboratorio general	Necesario para la mezcla de ExAmp.
<b>[Flujo de trabajo de NovaSeq Xp] [Opcional]</b> Uno de los siguientes paquetes de distribuidores: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Paquete de distribuidores de dos carriles NovaSeq Xp</li> <li>• Paquete de distribuidores de cuatro carriles NovaSeq Xp</li> </ul>	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N.º de catálogo 20021666</li> <li>• N.º de catálogo 20021667</li> </ul>	Distribuidores de repuesto de NovaSeq Xp para la carga manual de bibliotecas en una celda de flujo.
<b>[Opcional]</b> Control PhiX v3	Illumina, n.º de catálogo FC-110-3001	Adición de control PhiX.

## Consumibles de los kits de Illumina

Para secuenciar una celda de flujo es preciso contar con un kit de reactivos NovaSeq 6000. Cada kit consta de múltiples consumibles, que se indican en la tabla siguiente. Para las celdas de flujo dobles, utilice dos kits.

**Tabla 9 Consumibles de un kit de reactivos NovaSeq 6000**

Consumible (uno de cada)	Finalidad
Cartucho de tampones	Proporciona tampones de secuenciación para el experimento.
Cartucho de grupos	Proporciona agrupación, indexado y reactivo "paired-end" para el experimento.
Celda de flujo	La reacción de agrupación y secuenciación se produce en la celda de flujo.
Cartucho de SBS	Proporciona reactivos de secuenciación para el experimento.

Consumible (uno de cada)	Finalidad
Tubo de bibliotecas	El tubo vacío que se utiliza para conservar las bibliotecas agrupadas y desnaturalizadas (suministradas por un cliente) o para preparar la mezcla acondicionadora para aumentar la eficacia de la generación de grupos para la secuenciación.

Si está siguiendo el flujo de trabajo de NovaSeq Xp para cargar las bibliotecas directamente en la celda de flujo, complemente cada kit de reactivos con un kit de NovaSeq Xp. cada kit de NovaSeq Xp consta de los siguientes consumibles.

**Tabla 10 Consumibles de un kit de NovaSeq Xp**

Consumible (uno de cada)	Finalidad
DPX1	Preparación de la mezcla maestra de ExAmp.
DPX2	
DPX3	
Distribuidor de NovaSeq Xp	Carga de bibliotecas en la celda de flujo.

## Directrices para el agua de laboratorio

Utilice siempre agua de laboratorio o agua desionizada para llevar a cabo los procedimientos del instrumento. No utilice nunca agua corriente. Utilice solamente los siguientes tipos de agua o equivalentes:

- ▶ Agua desionizada
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Agua de 18 Megaohmios (MΩ)
- ▶ Agua Milli-Q
- ▶ Agua Super-Q
- ▶ Agua de biología molecular

## Equipo

Elemento	Proveedor
Congelador, entre -25 °C y -15 °C	Proveedor de laboratorio general
Tubo graduado, 500 ml, estéril	Proveedor de laboratorio general
Hielera	Proveedor de laboratorio general
Pipeta (20 µl)	Proveedor de laboratorio general
Pipeta (200 µl)	Proveedor de laboratorio general
Pipeta (1000 µl)	Proveedor de laboratorio general
Refrigerador, entre 2 °C y 8 °C	Proveedor de laboratorio general
Cubo, baños de agua*	Proveedor de laboratorio general
<b>[Flujo de trabajo de NovaSeq Xp]</b> Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp	Illumina, n.º de catálogo 20021663

\* Utilice un cubo que pueda alojar dos cartuchos de reactivo y el nivel de agua apropiado. Por ejemplo, 61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm (24 in × 36 in × 10 in).

# Capítulo 4 Flujo de trabajo estándar: Preparación de consumibles

Métodos .....	30
Directrices para las bibliotecas .....	30
Descongelación de los cartuchos de SBS y de grupo .....	31
Vaciado de botellas de reactivos utilizados .....	32
Preparación de la celda de flujo .....	33
Agrupación y desnaturalización de bibliotecas para la secuenciación .....	33

## Métodos

Antes de iniciar la preparación de muestras o consumibles, asegúrese de que la versión del NVCS cumple los requisitos mínimos de software enumerados en la siguiente tabla.

**Tabla 11 Requisitos mínimos del software**

Celda de flujo	Versión de software mínima
SP	1.6
S1	1.3.1
S2	Todas
S4	1.2.0

- ▶ Asegúrese de que dispone de los consumibles y equipos necesarios. Consulte *Consumibles y equipos proporcionados por el usuario en la página 27*.
- ▶ Compruebe siempre la etiqueta cuando prepare consumibles para garantizar la compatibilidad entre componentes. No mezcle ni empareje componentes de SP, S1, S2 y S4.
- ▶ Siga las instrucciones en el orden mostrado, con los volúmenes, las concentraciones, las temperaturas y las duraciones que se especifiquen.
- ▶ A menos que se haya especificado un punto de parada en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.

## Directrices para las bibliotecas

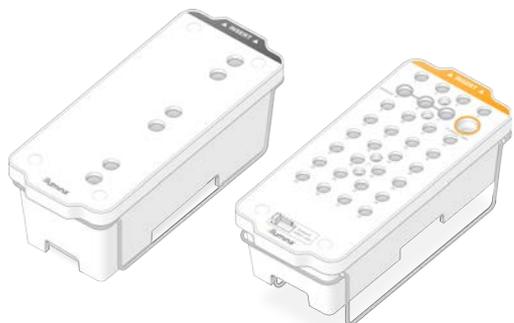
Todas las instrucciones se aplican a los métodos de preparación de bibliotecas compatibles y dan por hecho un tamaño de fragmento normal para aplicaciones de NovaSeq 6000 compatibles.

- ▶ Para obtener unos resultados óptimos, agrupe y desnaturalice las bibliotecas para una secuenciación inmediata.
- ▶ Diluya la biblioteca a una concentración de carga adecuada para la aplicación. Una concentración de carga que sea demasiado baja o demasiado alta afectará de manera negativa al porcentaje de grupos que superan el filtro (% de superación de filtro). Una concentración baja de biblioteca aumenta los duplicados de secuenciación. Una concentración demasiado alta de biblioteca reduce el % de superación de filtro.
- ▶ Para conseguir un % de superación de filtro óptimo se necesita una cuantificación de biblioteca precisa y un control de calidad adecuado. Para ver las recomendaciones, consulte la documentación del kit de preparación de bibliotecas.

## Descongelación de los cartuchos de SBS y de grupo

- 1 Si hay un experimento de secuenciación en curso, asegúrese de que ambas partes del instrumento estén disponibles cuando se complete la descongelación.
- 2 Retire los cartuchos de SBS y de grupo del almacenamiento a una temperatura entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 3 Coloque cada cartucho en una gradilla de descongelación de rejilla.  
Las gradillas se suministran con el instrumento y evitan vuelcos en el baño de agua.

**Figura 12** Cartuchos en gradillas de descongelación de rejilla



- 4 Introdúzcalo en un baño con agua a temperatura ambiente (entre  $19\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hasta que se descongele.  
Sumerja la mitad aproximadamente.
- 5 Utilice la siguiente tabla para determinar la duración de la descongelación.



### PRECAUCIÓN

El uso de agua caliente para descongelar reactivos puede reducir la calidad de los datos o provocar fallos en el experimento.

Cartucho	Duración de la descongelación
Cartucho de SBS SP, S1 y S2	4 horas
Cartucho de grupos SP, S1 y S2	Hasta 2 horas
Cartucho de SBS S4	4 horas
Cartucho de grupos S4	Hasta 4 horas

- 6 Seque por completo las bases de los cartuchos utilizando papeles absorbentes. Seque entre los pocillos de forma que se elimine toda el agua.
- 7 Inspeccione los cierres metálicos en busca de agua. Si hay agua presente, seque con una toallita sin pelusa.
- 8 Inspeccione la parte inferior de cada cartucho para asegurarse de que los depósitos no tengan hielo, lo que indica que los reactivos están descongelados.
- 9 Invierta cada cartucho diez veces para mezclar los reactivos.
- 10 Golpee suavemente el fondo de cada cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire.
- 11 Si no se van a poder cargar los reactivos en el instrumento en las siguientes cuatro horas, almacénelos a una temperatura entre  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas como máximo.

## Vaciado de botellas de reactivos utilizados

Siga las instrucciones que aparecen a continuación para vaciar las botellas de reactivos utilizados en *cada* experimento de secuenciación. Si su sistema está configurado para enviar reactivos utilizados de manera externa, la botella pequeña recoge los reactivos utilizados y debe vaciarse para cada experimento de secuenciación. La botella grande debe estar colocada.

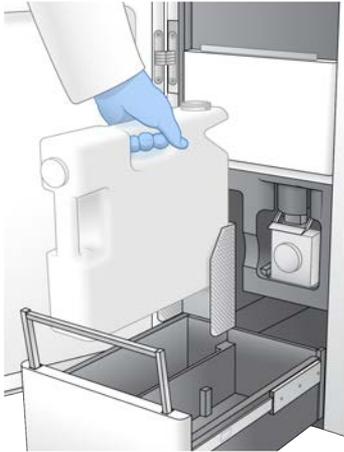


### ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

- 1 Retire y vacíe la botella pequeña de reactivo utilizado como se indica a continuación.
  - a Levante la palanca y retire la botella pequeña de reactivo utilizado del hueco. Sujete la botella por los lados.
  - b Retire el tapón a rosca del soporte para tapones de la parte delantera de la botella.
  - c Selle la abertura de la botella con el tapón para evitar que se derrame.
  - d Mantenga el contenido apartado del contenido de la otra botella y deséchelo de conformidad con las normativas aplicables.
  - e Vuelva a colocar la botella sin tapar en el hueco y baje la palanca. Guarde el tapón en el soporte para tapones.
- 2 Retire y vacíe la botella grande de reactivo utilizado como se indica a continuación.
  - a Con la ayuda del mango superior, retire la botella grande de reactivo utilizado del lado izquierdo del cajón de tapones.
  - b Retire el tapón a rosca del soporte para tapones de la parte delantera de la botella.
  - c Selle la abertura de la botella con el tapón rascado para evitar que se derrame.
  - d Deseche el contenido de conformidad con las normativas aplicables. Sujete los mangos durante el vaciado.
  - e Vuelva a colocar la botella sin tapar en el cajón de tapones. Guarde el tapón en el soporte para tapones.

**Figura 13** Devolución de la botella vacía



- 3 Póngase un par de guantes limpios sin polvo nuevos para evitar contaminar la superficie del instrumento.
- 4 Cierre el cajón de tampón y, después, cierre las puertas del compartimento de líquidos.



**ADVERTENCIA**

Si no vacía las botellas de reactivos utilizados puede interrumpir el experimento y producirse un desbordamiento, lo que dañaría el instrumento y constituiría un riesgo para la seguridad.

## Preparación de la celda de flujo

- 1 Extraiga un nuevo embalaje de celda de flujo de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 2 Deje a un lado el embalaje de la celda de flujo cerrado entre 10 y 15 minutos para que la celda de flujo alcance la temperatura ambiente.  
Utilice la celda de flujo en un plazo de 12 horas desde su extracción del embalaje.

## Agrupación y desnaturalización de bibliotecas para la secuenciación

### Creación de un grupo de bibliotecas normalizadas

Utilice las siguientes instrucciones para normalizar bibliotecas a la concentración adecuada y, después, agruparlas. Las bibliotecas secuenciadas en la misma celda de flujo deben combinarse en un solo grupo normalizado.

- 1 Consulte la siguiente tabla para ver el número habitual de lecturas y la plexicidad recomendada por la aplicación y el tipo de celda de flujo.

**Tabla 12 Plexicidad recomendada del grupo de bibliotecas**

Aplicación	Tipo de celda de flujo	Lecturas "paired-end" que superan el filtro por celda de flujo (B)	Bibliotecas por carril
Genomas humanos	SP	1,3-1,6	~2
	S1	2,6-3,2	~4
	S2	6,6-8,2	~10
	S4	16-20	~24
Exomas	SP	1,3-1,6	~20
	S1	2,6-3,2	~40
	S2	6,6-8,2	~100
	S4	16-20	~250
Transcriptomas	SP	1,3-1,6	~16
	S1	2,6-3,2	~32
	S2	6,6-8,2	~82
	S4	16-20	~200

## Normalización de bibliotecas para agruparlas

- Determine la concentración necesaria de bibliotecas agrupadas conforme a la concentración final de carga deseada.

Consulte la sección *Concentraciones de carga recomendadas en la página 34*.

Concentración final de carga (pM)	Concentración de bibliotecas agrupadas (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Normalice las bibliotecas a la concentración recomendada para bibliotecas agrupadas con 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.

Para obtener ayuda sobre la dilución de bibliotecas a la concentración adecuada, consulte [la Calculadora de agrupación en el sitio web de Illumina](#).

## Concentraciones de carga recomendadas

La concentración de carga de ADN óptima depende del tipo de biblioteca y el tamaño del fragmento. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de carga de ADN recomendadas conforme a las bibliotecas de Illumina con tamaños de fragmento ≤450 pb. Cargue las bibliotecas con tamaños de fragmento más pequeños en el extremo inferior del intervalo recomendado. Para bibliotecas >450 pb, podrían ser necesarias concentraciones de carga más altas.



### NOTA

Para las bibliotecas generadas a partir de métodos de preparación de bibliotecas distintos a los de Illumina, puede que tenga que llevar a cabo inicialmente una valoración de su tipo de biblioteca específico con el fin de obtener una concentración de inoculación óptima para producir el mejor % de superación de filtro. Cuando se determina una concentración de carga óptima, esta debería aplicarse a todos los tipos de bibliotecas idénticos en el futuro.

**Tabla 13 Concentraciones de carga recomendadas para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard (versión de software 1.1 o posterior)**

Tipo de biblioteca	Concentración final de carga (pM)	Concentración de carga de grupos (nM)
PhiX <sup>1</sup>	250	1,25
Grupo de bibliotecas de ADN sin PCR	175-350	0,875-1,75
Grupo de bibliotecas de ADN amplificadas por PCR	300-600	1,5-3,0
Celda única <sup>2</sup>	250-500	1,25-2,5

<sup>1</sup> Para un experimento solo de PhiX.

<sup>2</sup> La celda única se ha verificado solo para el flujo de trabajo Xp.

Si ha optimizado una concentración de carga final para HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 o HiSeq™ 3000, utilice 1,5 veces esa concentración para NovaSeq 6000. Por ejemplo, si su concentración de carga final para HiSeq X es de 200 pM, utilice 300 pM en NovaSeq 6000.

## Agrupación de bibliotecas normalizadas y adición de control PhiX opcional

- 1 Combine el volumen adecuado de cada biblioteca normalizada en un tubo de microcentrifugado nuevo para generar uno de los siguientes volúmenes finales:

Modo	Volumen final (µl)
SP/S1	100
S2	150
S4	310

Por ejemplo, para un grupo de seis bibliotecas y el modo S2, combine 25 µl de cada biblioteca normalizada con la misma concentración. O, para un grupo de cuatro bibliotecas y el modo S1, combine 25 µl de cada biblioteca normalizada no desnaturalizada.

- 2 **[Opcional]** Almacene las bibliotecas restantes *no agrupadas* a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.
- 3 **[Opcional]** Enriquezca con 1 % de PhiX no desnaturalizado como se indica a continuación.
  - a Diluya 10 nM de PhiX a 2,5 nM con 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
  - b Añada el volumen adecuado de control PhiX a 2,5 nM no desnaturalizado al tubo del grupo de bibliotecas no desnaturalizadas.

Modo	PhiX a 2,5 nM no desnaturalizado (µl)	Biblioteca no desnaturalizada (µl)
SP/S1	0,6	100
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Cuando añada el control PhiX, el 1 % es la cantidad recomendada para lograr bibliotecas bien equilibradas. Es posible que las bibliotecas de baja diversidad necesiten más. Para utilizar un control PhiX con bibliotecas de baja diversidad, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para que le orienten.

## Preparación de una dilución nueva de NaOH

Prepare una dilución *nueva* de NaOH a 0,2 N para desnaturalizar las bibliotecas para la secuenciación. Para evitar que pequeños errores de pipeteado afecten a la concentración final de NaOH, se preparará un volumen mayor.



### PRECAUCIÓN

El NaOH a 0,2 N recién diluido es fundamental para el proceso de desnaturalización. La desnaturalización inadecuada puede reducir el rendimiento.

- 1 Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifugado para diluir 1 N de NaOH a 0,2 N:

**Tabla 14 Modo SP/S1/S2**

Reactivo	Volumen para una celda de flujo (µl)	Volumen para dos celdas de flujo (µl)
Agua de laboratorio	40	80
Preparado de NaOH 1 N	10	20

Estos volúmenes producen 50 µl de NaOH a 0,2 N para una celda de flujo y 100 µl de NaOH a 0,2 N para dos celdas de flujo.

**Tabla 15 Modo S4**

Reactivo	Volumen para una celda de flujo (µl)	Volumen para dos celdas de flujo (µl)
Agua de laboratorio	80	160
Preparado de NaOH 1 N	20	40

Estos volúmenes producen 100 µl de NaOH a 0,2 N para una celda de flujo y 200 µl de NaOH a 0,2 N para dos celdas de flujo.

- 2 Invierta varias veces para agitar o mezcle bien. Mantenga el tubo tapado y utilícelo en un plazo máximo de **12 horas**.

## Desnaturalización de grupos de bibliotecas y control PhiX opcional

- 1 Añada NaOH a 0,2 N al tubo del grupo de bibliotecas no desnaturalizadas y un control PhiX opcional, tal como se describe a continuación.

Celda de flujo	NaOH a 0,2 N	Biblioteca no desnaturalizada (µl)	Volumen resultante
SP/S1	25	100	125 µl o 125,6 µl con PhiX
S2	37	150	187 µl o 187,9 µl con PhiX
S4	77	310	387 µl o 388,9 µl con PhiX

- 2 Tape y mezcle bien brevemente.
- 3 Centrifugue a 280 × g durante un minuto como máximo.
- 4 Incube a temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturalizar.

- 5 Añada 400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 tal como se describe a continuación para neutralizar.

Modo	400 mM de Tris-HCl, pH 8 (µl)	Volumen resultante
SP/S1	25	150 µl o 150,6 µl con PhiX
S2	38	225 µl o 225,9 µl con PhiX
S4	78	465 µl o 466,9 µl con PhiX

- 6 Tape y mezcle bien brevemente.
- 7 Centrifugue a  $280 \times g$  durante un minuto como máximo.
- 8 Transfiera el volumen completo de la biblioteca desnaturalizada o la biblioteca desnaturalizada más PhiX al tubo de bibliotecas incluido en el kit de reactivos NovaSeq 6000.
- 9 Continúe inmediatamente con la carga del tubo de bibliotecas en el cartucho de grupo y configure el experimento.  
Los cartuchos de reactivo, incluido el tubo de bibliotecas, se deben cargar en el instrumento en un plazo máximo de **30 minutos**.
- 10 **[Opcional]** Si no puede proceder de forma inmediata, tape el tubo de la biblioteca y almacénelo a entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta tres semanas. No lo congele después de descongelarlo.



#### PRECAUCIÓN

Solamente debe almacenar el tubo de bibliotecas si es necesario. Si se almacena durante un periodo prolongado a entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los duplicados pueden aumentar, pero disminuye el rendimiento.

## Preparación de cartuchos de SBS y de grupo

- 1 Inspeccione la parte inferior de cada cartucho para asegurarse de que los depósitos no tengan hielo, lo que indica que los reactivos están descongelados.
- 2 Invierta cada cartucho diez veces para mezclar los reactivos.
- 3 Golpee suavemente el fondo de cada cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire.

## Carga del tubo de bibliotecas

- 1 Sin alterar la biblioteca en el fondo del tubo, introduzca el tubo de bibliotecas sin tapar en la posición **Library Tube** (Tubo de bibliotecas) (n.º 8) del cartucho de grupo.

**Figura 14** Tubo de bibliotecas sin tapar en la posición n.º 8



# Capítulo 5 Flujo de trabajo de NovaSeq Xp: Preparación de consumibles

Resumen de flujo de trabajo de NovaSeq Xp .....	38
Métodos .....	39
Directrices para las bibliotecas .....	39
Descongelación de los cartuchos de SBS y de grupo .....	40
Vaciado de botellas de reactivos utilizados .....	41
Preparación de la celda de flujo .....	42
Agrupación, desnaturalización y carga de bibliotecas para la secuenciación .....	42

## Resumen de flujo de trabajo de NovaSeq Xp

Antes de iniciar la preparación de muestras o consumibles, asegúrese de que la versión del NVCS cumple los requisitos mínimos de software enumerados en la siguiente tabla.

**Tabla 16** Requisitos mínimos del software

Celda de flujo	Versión de software mínima
SP	1.6
S1	1.3.1
S2	Todas
S4	1.2.0



### NOTA

El NVCS admite el inicio escalonado de nuevos experimentos. Consulte *Inicio de experimentos escalonado en la página 58*.

Asegúrese de que completa todos los pasos del flujo de trabajo de NovaSeq Xp, en el orden especificado.



### NOTA

Los pasos del 1 al 5 pueden realizarse en paralelo, y deberán terminarse antes de continuar con el paso 6.

- 1 Descongele los cartuchos de SBS y de grupo.
- 2 Vacíe las botellas de reactivo utilizado.
- 3 Normalice las bibliotecas.
- 4 Agrupe las bibliotecas y añada un control PhiX opcional.
- 5 Deje a un lado el embalaje de la celda de flujo cerrado entre 10 y 15 minutos para que la celda de flujo alcance la temperatura ambiente. Utilice la celda de flujo en un plazo de 12 horas desde su extracción del embalaje.



### NOTA

Complete los pasos del 6 al 12 en el orden especificado.

- 6 Descongele los reactivos ExAmp.
- 7 Prepare una dilución nueva de NaOH.
- 8 Desnaturalice y naturalice el grupo de bibliotecas.

- 9 Prepare la celda de flujo y la plataforma.
- 10 Prepare la mezcla maestra de ExAmp.
- 11 Cargue la mezcla de ExAmp o de bibliotecas en la celda de flujo.
- 12 Cargue un tubo de bibliotecas vacío en la posición n.º 8 del cartucho de grupo.

## Métodos

- ▶ Asegúrese de que dispone de los consumibles y equipos necesarios. Consulte *Consumibles y equipos proporcionados por el usuario en la página 27*.
- ▶ Asegúrese de que el instrumento está encendido y tiene suficiente espacio de almacenamiento para el experimento. Consulte la sección *Gestión del proceso en la página 9*.
- ▶ Asegúrese de que se termina el lavado automático posterior al experimento en ambos lados del instrumento antes de iniciar el paso 6 del flujo de trabajo (consulte la sección *Resumen de flujo de trabajo de NovaSeq Xp en la página 38*).
- ▶ Compruebe siempre la etiqueta cuando prepare consumibles para garantizar la compatibilidad entre componentes. No mezcle los componentes de SP, S1, S2 y S4 ni los componentes de celdas de flujo de dos carriles y cuatro carriles, en un lado del instrumento.
- ▶ Siga las instrucciones en el orden mostrado, con los volúmenes, las temperaturas y las duraciones que se especifiquen.
- ▶ Cuando no esté mezclando de manera activa, meta todos los reactivos y bibliotecas en hielo.
- ▶ A menos que se haya especificado un punto de parada en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.
- ▶ Para iniciar correctamente la secuenciación de una celda de flujo de dos carriles, ambos carriles deberán estar llenos. Para iniciar correctamente la secuenciación de una celda de flujo de cuatro carriles, uno de los carriles podrá estar parcialmente lleno o vacío.
- ▶ Las causas más comunes de las variaciones en los resultados cuando se mezclan los reactivos ExAmp manualmente son la entrega imprecisa de volúmenes de componentes ExAmp y una mezcla insuficiente. No mezcle menos de lo normal.



### NOTA

Inicie el experimento de secuenciación inmediatamente después de cargar las bibliotecas en la celda de flujo, preferiblemente, antes de que transcurran 30 minutos.

## Directrices para las bibliotecas

Todas las instrucciones se aplican a los métodos de preparación de bibliotecas compatibles y dan por hecho un tamaño de fragmento normal para aplicaciones de NovaSeq 6000 compatibles.

- ▶ Para obtener unos resultados óptimos, agrupe y desnaturalice las bibliotecas inmediatamente antes de la secuenciación.  
Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, no prepare la mezcla maestra de ExAmp hasta que esté listo para iniciar la secuenciación.
- ▶ Diluya la biblioteca a una concentración de carga adecuada para la aplicación. Una concentración de carga que sea demasiado baja o demasiado alta afectará de manera negativa al porcentaje de grupos

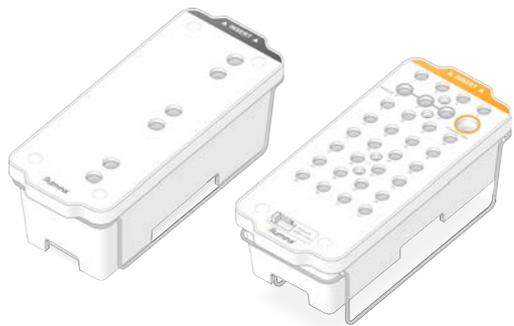
que superan el filtro (% de superación de filtro). Una concentración baja de biblioteca aumenta los duplicados de secuenciación. Una concentración alta de biblioteca puede reducir el % de superación de filtro.

- ▶ Para conseguir un % de superación de filtro óptimo se necesita una cuantificación de biblioteca precisa y un control de calidad adecuado. Para ver las recomendaciones, consulte la documentación del kit de preparación de bibliotecas.
- ▶ Cargue un tubo de bibliotecas vacío en la posición n.º 8 del cartucho de grupo antes de configurar el experimento de secuenciación. El tubo de bibliotecas vacío se utiliza para preparar la mezcla acondicionadora antes de la distribución a la celda de flujo. La mezcla acondicionadora ayuda a aumentar la eficacia de la generación de grupos para la secuenciación.

## Descongelación de los cartuchos de SBS y de grupo

- 1 Si hay un experimento de secuenciación en curso, asegúrese de que ambas partes del instrumento estén disponibles cuando se complete la descongelación.
- 2 Retire los cartuchos de SBS y de grupo del almacenamiento a una temperatura entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 3 Coloque cada cartucho en una gradilla de descongelación de rejilla. Las gradillas se suministran con el instrumento y evitan vuelcos en el baño de agua.

**Figura 15** Cartuchos en gradillas de descongelación de rejilla



- 4 Introdúzcalo en un baño con agua a temperatura ambiente (entre  $19\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hasta que se descongele. Sumerja la mitad aproximadamente.
- 5 Utilice la siguiente tabla para determinar la duración de la descongelación.



### PRECAUCIÓN

El uso de agua caliente para descongelar reactivos puede reducir la calidad de los datos o provocar fallos en el experimento.

Cartucho	Duración de la descongelación
Cartucho de SBS SP, S1 y S2	4 horas
Cartucho de grupos SP, S1 y S2	Hasta 2 horas
Cartucho de SBS S4	4 horas
Cartucho de grupos S4	Hasta 4 horas

- 6 Seque por completo las bases de los cartuchos utilizando papeles absorbentes. Seque entre los pocillos de forma que se elimine toda el agua.

- 7 Inspeccione los cierres metálicos en busca de agua. Si hay agua presente, seque con una toallita sin pelusa.
- 8 Inspeccione la parte inferior de cada cartucho para asegurarse de que los depósitos no tengan hielo, lo que indica que los reactivos están descongelados.
- 9 Invierta cada cartucho diez veces para mezclar los reactivos.
- 10 Golpee suavemente el fondo de cada cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire.
- 11 Si no se van a poder cargar los reactivos en el instrumento en las siguientes cuatro horas, almacénelos a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante 24 horas como máximo.

## Vaciado de botellas de reactivos utilizados

Siga las instrucciones que aparecen a continuación para vaciar las botellas de reactivos utilizados en *cada* experimento de secuenciación. Si su sistema está configurado para enviar reactivos utilizados de manera externa, la botella pequeña recoge los reactivos utilizados y debe vaciarse para cada experimento de secuenciación. La botella grande debe estar colocada.



### ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

- 1 Retire y vacíe la botella pequeña de reactivo utilizado como se indica a continuación.
  - a Levante la palanca y retire la botella pequeña de reactivo utilizado del hueco. Sujete la botella por los lados.
  - b Retire el tapón a rosca del soporte para tapones de la parte delantera de la botella.
  - c Selle la abertura de la botella con el tapón para evitar que se derrame.
  - d Mantenga el contenido apartado del contenido de la otra botella y deséchelo de conformidad con las normativas aplicables.
  - e Vuelva a colocar la botella sin tapar en el hueco y baje la palanca. Guarde el tapón en el soporte para tapones.
- 2 Retire y vacíe la botella grande de reactivo utilizado como se indica a continuación.
  - a Con la ayuda del mango superior, retire la botella grande de reactivo utilizado del lado izquierdo del cajón de tapones.
  - b Retire el tapón a rosca del soporte para tapones de la parte delantera de la botella.
  - c Selle la abertura de la botella con el tapón rascado para evitar que se derrame.
  - d Deseche el contenido de conformidad con las normativas aplicables. Sujete los mangos durante el vaciado.
  - e Vuelva a colocar la botella sin tapar en el cajón de tapones. Guarde el tapón en el soporte para tapones.

**Figura 16** Devolución de la botella vacía



- 3 Póngase un par de guantes limpios sin polvo nuevos para evitar contaminar la superficie del instrumento.
- 4 Cierre el cajón de tampón y, después, cierre las puertas del compartimento de líquidos.



#### **ADVERTENCIA**

Si no vacía las botellas de reactivos utilizados puede interrumpir el experimento y producirse un desbordamiento, lo que dañaría el instrumento y constituiría un riesgo para la seguridad.

## **Preparación de la celda de flujo**

- 1 Extraiga un nuevo embalaje de celda de flujo de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 2 Deje a un lado el embalaje de la celda de flujo cerrado entre 10 y 15 minutos para que la celda de flujo alcance la temperatura ambiente.  
Utilice la celda de flujo en un plazo de 12 horas desde su extracción del embalaje.

## **Agrupación, desnaturalización y carga de bibliotecas para la secuenciación**

### **Reactivos de descongelación ExAmp**

- 1 Saque un tubo de cada reactivo DPX1, DPX2 y DPX3 de su almacenamiento a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.
- 2 Descongele a temperatura ambiente durante diez minutos.
- 3 Reserve en hielo.



#### **NOTA**

Si tiene que volver a congelar los reactivos ExAmp sin abrir, hágalo inmediatamente después de descongelarlos. Los reactivos ExAmp pueden volver a congelarse solo una vez. Los reactivos remanentes no se pueden congelar ni combinar.

## Creación de un grupo de bibliotecas normalizadas

Utilice las siguientes instrucciones para normalizar bibliotecas a la concentración adecuada y, después, agruparlas. Las bibliotecas secuenciadas en el mismo carril deben combinarse en un único grupo. El volumen total por carril de cada grupo normalizado se muestra en la siguiente tabla. Si el mismo grupo se secuencía en más de un carril, multiplique el valor de la [Tabla 17](#) por el número de carriles.

**Tabla 17 Volumen total de bibliotecas agrupadas**

Modo	Volumen total de grupo por carril (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, la producción de datos se obtiene para cada carril, a diferencia de la del flujo de trabajo de NovaSeq Standard que se obtiene para todos los carriles en conjunto. Por lo tanto, los grupos de bibliotecas para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp contienen menos bibliotecas en comparación con el flujo de trabajo de NovaSeq Standard.

Consulte la siguiente tabla para ver el número habitual de lecturas y la plexicidad recomendada por la aplicación y el tipo de celda de flujo.

**Tabla 18 Plexicidad recomendada del grupo de bibliotecas**

Aplicación	Tipo de celda de flujo	Lecturas "paired-end" que superan el filtro por carril (B)	Bibliotecas por carril
Genomas humanos	SP	0,65-0,8	1
	S1	1,3-1,6	~2
	S2	3,3-4,1	~5
	S4	4,0-5,0	~6
Exomas	SP	0,65-0,8	~10
	S1	1,3-1,6	~20
	S2	3,3-4,1	~50
	S4	4,0-5,0	~62
Transcriptomas	SP	0,65-0,8	~8
	S1	1,3-1,6	~16
	S2	3,3-4,1	~41
	S4	4,0-5,0	~50

## Normalización de bibliotecas para agruparlas

- Determine la concentración necesaria de bibliotecas agrupadas conforme a la concentración final de carga deseada.

Consulte la sección [Concentraciones de carga recomendadas en la página 44](#).

Concentración final de carga (pM)	Concentración de bibliotecas agrupadas (nM)
100	0,5
150	0,75

Concentración final de carga (pM)	Concentración de bibliotecas agrupadas (nM)
200	1,0
250	1,25
300	1,5
350	1,75
400	2,0
450	2,25
500	2,5

- 2 Normalice las bibliotecas a la concentración de carga recomendada para bibliotecas agrupadas con 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.  
 Para obtener ayuda sobre la dilución de bibliotecas a la concentración adecuada, consulte la Calculadora de agrupación en [support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html](http://support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html).

## Concentraciones de carga recomendadas

La concentración de carga de ADN óptima depende del tipo de biblioteca y el tamaño del fragmento. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de carga de ADN recomendadas conforme a las bibliotecas de Illumina con tamaños de fragmento  $\leq 450$  pb. Cargue las bibliotecas con tamaños de fragmento más pequeños en el extremo inferior del intervalo recomendado. Para bibliotecas  $>450$  pb, podrían ser necesarias concentraciones de carga más altas.

**Tabla 19** Concentraciones de carga recomendadas

Tipo de biblioteca	Concentración final de carga (pM)	Concentración de carga de grupos (nM)
PhiX <sup>1</sup>	100	0,5
Grupo de bibliotecas de ADN sin PCR	115-235	0,575-1,175
Grupo de bibliotecas de ADN amplificadas por PCR	200-400	1,0-2,0
Celda única	175-275	0,875-1,375

<sup>1</sup> Para un experimento solo de PhiX.

Si ha optimizado la concentración de carga optimizada para HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 o HiSeq™ 3000, utilice aproximadamente la misma concentración para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp. Si ha optimizado la concentración de carga para el flujo de trabajo de NovaSeq Standard, utilice aproximadamente 1/3 menos para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp.



### NOTA

Puede que las bibliotecas necesiten un título para obtener una concentración de inoculación óptima. Cuando se determina la concentración de carga óptima, esta se aplica a los tipos de bibliotecas idénticos.

## Agrupación de bibliotecas normalizadas y adición de control PhiX opcional

- 1 Combine el volumen adecuado de cada biblioteca normalizada en un tubo de microcentrifugado nuevo para generar los volúmenes finales adecuados por carril.

Modo	Volumen total de grupo por carril (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Por ejemplo, para un grupo de seis bibliotecas y el modo S4, combine 5 µl de cada biblioteca normalizada con la misma concentración.

- 2 **[Opcional]** Almacene las bibliotecas restantes *no agrupadas* a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.
- 3 **[Opcional]** Enriquezca con 1 % de PhiX no desnaturalizado como se indica a continuación.
  - a Diluya 10 nM de PhiX a 0,25 nM con 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
  - b Añada el volumen adecuado de PhiX al tubo del grupo de bibliotecas no desnaturalizadas.

Modo	PhiX a 0,25 nM no desnaturalizado (µl)	Biblioteca no desnaturalizada (µl)
SP/S1	0,7	18
S2	0,8	22
S4	1,1	30

Cuando añada el control PhiX, el 1 % es la cantidad recomendada para lograr bibliotecas bien equilibradas. Es posible que las bibliotecas de baja diversidad necesiten más. Para utilizar un control PhiX con bibliotecas de baja diversidad, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para que le orienten.

## Preparación de una dilución nueva de NaOH

Prepare una dilución *nueva* de NaOH a 0,2 N para desnaturalizar las bibliotecas para la secuenciación. Para minimizar los errores de pipeteo que podrían afectar a la concentración de NaOH final, prepare, al menos, 30 µl de NaOH diluido por celda de flujo. Para un experimento de doble celda de flujo, prepare 60 µl de NaOH diluido.



### PRECAUCIÓN

El NaOH a 0,2 N recién diluido es fundamental para el proceso de desnaturalización. La desnaturalización inadecuada puede reducir el rendimiento.

- 1 Para una celda de flujo, combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifugado para diluir NaOH 1 N a 0,2 N.
  - ▶ Agua de laboratorio (24 µl)
  - ▶ Preparado de NaOH 1N (6 µl)

Estos volúmenes proporcionan un resultado de 30 µl de NaOH a 0,2 N. Para dos celdas, se recomienda duplicar los volúmenes.
- 2 Invierta varias veces para agitar o mezcle bien. Mantenga el tubo tapado y utilícelo en un plazo máximo de **12 horas**.

## Desnaturalización de grupos de bibliotecas y control PhiX opcional

- 1 Añada NaOH a 0,2 N al tubo de bibliotecas no desnaturalizadas y un control PhiX opcional como se describe a continuación.

Modo	NaOH (µl) a 0,2 N	Biblioteca no desnaturalizada (µl)	Volumen resultante
SP/S1	4,0	18,0	22 µl o 22,7 µl con PhiX
S2	5,0	22,0	27 µl o 27,8 µl con PhiX
S4	7,0	30,0	37 µl o 38,1 µl con PhiX

- 2 Tape y mezcle bien brevemente.
- 3 Centrifugue a 280 × g, como máximo, hasta 1 minuto.
- 4 Incube a temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturalizar.
- 5 Añada 400 mM de Tris-HCl, pH 8 para neutralizar como se indica a continuación.

Modo	400 mM de Tris-HCl, pH 8 (µl)	Volumen resultante
SP/S1	5,0	27 µl o 27,7 µl con PhiX
S2	6,0	33 µl o 33,8 µl con PhiX
S4	8,0	45 µl o 46,1 µl con PhiX

- 6 Tape y mezcle bien brevemente.
- 7 Centrifugue a 280 × g, como máximo, hasta 1 minuto.
- 8 Mantenga las bibliotecas desnaturalizadas en hielo hasta que estén listas para añadir la mezcla maestra de ExAmp.
- 9 **[Opcional]** Si no puede proceder de forma inmediata, tape el tubo y almacénelo a entre -25 °C y -15 °C hasta tres semanas. No lo congele después de descongelarlo.



### PRECAUCIÓN

Solamente debe almacenar grupos de bibliotecas desnaturalizadas si es necesario. El almacenamiento a largo plazo puede aumentar los duplicados, con la consiguiente reducción del rendimiento.

## Preparación de la celda de flujo y la plataforma

- 1 Coloque la plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp sobre una superficie plana. Mantenga la celda de flujo nivelada hasta cargarla en el instrumento.
- 2 Inspeccione la plataforma y asegúrese de que no contiene partículas.
- 3 Póngase un par de guantes nuevos sin polvo para evitar contaminar la superficie de vidrio de la celda de flujo.
- 4 Con el envase metálico de la celda de flujo ubicado en una superficie plana, ábralo tirando desde la pestaña de la esquina.
- 5 Quite el retenedor de plástico transparente que cubre la celda de flujo.
- 6 Extraiga la celda de flujo del embalaje. Sujete la celda de flujo por los laterales sin tocar el vidrio ni las juntas de la parte inferior.
- 7 Si hay partículas visibles en alguna de las superficies de vidrio, límpiela con un paño sin pelusa humedecido en alcohol y séquela con una toallita de laboratorio sin pelusa.

- 8 Deseche el embalaje de manera adecuada.

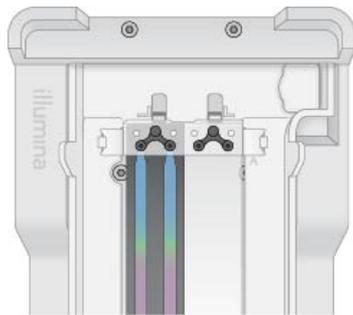


**NOTA**

Es normal que la celda presente algunos arañazos u otros defectos superficiales y estos no afectan a la calidad de los datos.

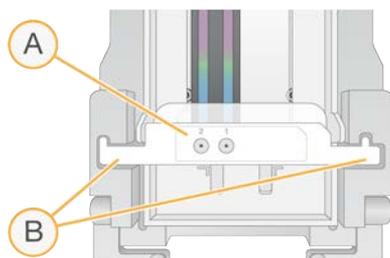
- 9 Invierta la celda de flujo de modo que la superficie superior quede **hacia abajo**.
- 10 Deslice el extremo de salida de la celda de flujo debajo del soporte y colóquelo en la plataforma. Consulte las secciones *Celda de flujo en la página 13* y *Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp en la página 17*.

**Figura 17** Colocación de la celda de flujo



- 11 Con los pocillos hacia arriba, cargue el distribuidor de NovaSeq Xp sobre el extremo de entrada de la celda de flujo. Asegúrese de que los brazos del distribuidor de NovaSeq Xp encajan bien en las ranuras de la plataforma.

**Figura 18** Colocación del distribuidor de NovaSeq Xp



- A Pocillos del distribuidor de NovaSeq Xp hacia arriba
- B Brazos del distribuidor de NovaSeq Xp colocados en las ranuras de la plataforma

- 12 Cierre la abrazadera para fijar la celda de flujo y el distribuidor de NovaSeq Xp y sellar las juntas.
- 13 Deseche el distribuidor de NovaSeq Xp después de cargar los grupos de bibliotecas en la celda de flujo. El distribuidor de NovaSeq Xp es de un solo uso.

## Preparación de la mezcla maestra de ExAmp

Al preparar la mezcla maestra de ExAmp, utilice un tubo de microcentrifugado capaz de albergar, al menos, el doble de volumen requerido:

- ▶ Para la celda de flujo de dos carriles, utilice un tubo de 0,5 ml o 1,7 ml.
- ▶ Para la celda de flujo de cuatro carriles, utilice un tubo de 1,7 ml.

Las causas más comunes de la variación en los resultados cuando se mezclan los reactivos ExAmp manualmente son la entrega imprecisa de volúmenes y una mezcla insuficiente. No mezcle menos de lo normal.

- 1 Invierta o agite brevemente en un vórtice para mezclar DPX1 y DPX2.
- 2 Agite brevemente para mezclar también DPX3.  
Los reactivos ExAmp podrían estar separados en el almacenamiento. Son viscosos, en especial DPX2 y DPX3. DPX3 no se mezcla fácilmente cuando se invierte debido a su alta viscosidad.
- 3 Centrifugue brevemente DPX1, DPX2 y DPX3.
- 4 Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifugado apropiado en el orden especificado.

Orden de adición	Reactivo*	Volumen para celda de flujo de dos carriles (SP/S1/S2) (µl)	Volumen para celda de flujo de cuatro carriles (S4) (µl)
1	DPX1	126	315
2	DPX2	18	45
3	DPX3	66	165

\* Los tapones de los tubos de reactivo DPX pueden estar clasificados por colores (rojo, amarillo y azul para DPX1, DPX2 y DPX3, respectivamente). Asegúrese de que la codificación por color se mantiene cuando se sustituyen los tapones de los tubos.

Estos volúmenes proporcionan un resultado de mezcla maestra ExAmp de 210 µl para los modos SP, S1 o S2 o de 525 µl para el modo S4. Estos volúmenes son suficientes para el modo aplicable. Se incluye un volumen mayor para representar los errores de pipeteo al cargar las bibliotecas en la celda de flujo.

- 5 Pipetee y dispense lentamente para evitar la formación de burbujas y asegurarse de que el volumen íntegro se expulsa desde la punta.
- 6 Agite con un vórtice entre 20 y 30 segundos o hasta que esté bien mezclado.



#### NOTA

La mezcla maestra de ExAmp es estable para agitarla en un vórtice.

La mezcla podría parecer turbia, lo cual es normal.

- 7 Centrifugue a 280 × g, como máximo, hasta 1 minuto.
- 8 **Para lograr un mejor rendimiento de la secuenciación, prosiga de inmediato con el siguiente paso. Si fuera necesario, el almacenamiento ideal de la mezcla maestra es de hasta 1 hora en hielo. Si la almacena a temperatura ambiente, utilícela en un plazo máximo de 30 minutos.**

## Carga de bibliotecas en la celda de flujo

Para obtener mejores resultados, haga lo siguiente:

- ▶ Mantenga la celda de flujo cargada a temperatura ambiente. No la refrigere ni la ponga en hielo.
- ▶ Una incubación prolongada podría reducir el porcentaje de grupos que superan el filtro (% de superación de filtro).
- ▶ Inicie el experimento dentro de los 30 minutos siguientes a la carga de los grupos de bibliotecas en la celda de flujo.
- ▶ El uso inmediato de la mezcla de ExAmp y de bibliotecas ofrece mejores resultados.

- 1 Añada la mezcla maestra de ExAmp a cada grupo de bibliotecas desnaturalizadas como se indica a continuación y, después, agite con el vórtice entre 20 y 30 segundos para mezclarla. Si utiliza gradillas de tubos, pipetee para mezclar hasta que la mezcla sea homogénea.

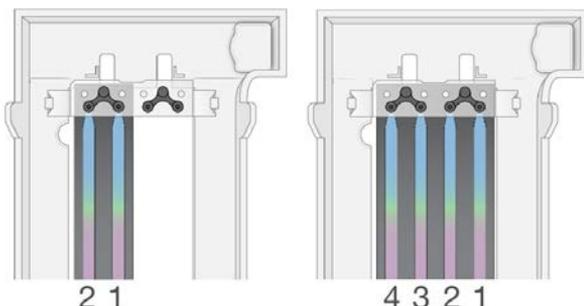
Modo	Agrupación de bibliotecas desnaturalizadas (µl)	Mezcla maestra de ExAmp (µl)	Volumen resultante (µl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 2 Centrifugue a 280 × g, como máximo, hasta 1 minuto.
- 3 Con una pipeta de 200 µl, añada el volumen apropiado de mezcla de ExAmp o de bibliotecas a cada pocillo del distribuidor de NovaSeq Xp.
  - ▶ Para evitar que se formen burbujas, cargue las muestras lentamente.
  - ▶ Asegúrese de añadir la mezcla de grupo de bibliotecas al pocillo que se corresponde con el carril indicado.
  - ▶ Al pipetear, evite el contacto con el filtro en la parte inferior del pocillo.
  - ▶ No es necesario esperar a que el carril se llene por completo antes de añadir la mezcla a los pocillos restantes del distribuidor.

Modo	Mezcla de bibliotecas/ExAmp por pocillo (µl)
SP/S1	80
S2	95
S4	130

Los pocillos numerados del distribuidor de NovaSeq Xp coinciden con el número del carril de la celda de flujo. Cuando la celda de flujo está invertida, se invierte la numeración de carriles.

**Figura 19** Numeración de carriles invertida



- 4 Después de añadir la mezcla de ExAmp o de bibliotecas a todos los pocillos del distribuidor, espere 2 minutos aproximadamente para que la mezcla llegue al extremo opuesto de cada carril. Es normal que se forme una pequeña burbuja de aire en el extremo de salida. Un pequeño volumen de mezcla permanecerá en los pocillos del distribuidor después de que se llene el carril.



**PRECAUCIÓN**

No incline la celda de flujo cuando trate de determinar si los carriles están llenos o tienen burbujas de aire. Si lo hace, la mezcla de ExAmp o de bibliotecas puede filtrarse desde la celda de flujo. Si un carril no se llena por completo, no intente corregirlo. La cantidad de datos obtenidos del carril parcialmente lleno podría verse reducida. No trate de recuperar la muestra de la celda de flujo.



#### NOTA

No incline la celda de flujo cuando la transporte.

## Preparación de cartuchos de SBS y de grupo

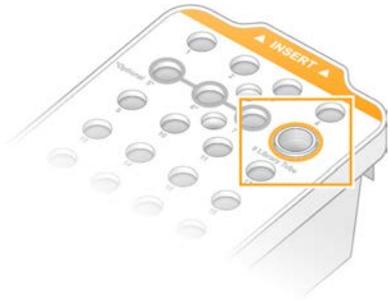
- 1 Inspeccione la parte inferior de cada cartucho para asegurarse de que los depósitos no tengan hielo, lo que indica que los reactivos están descongelados.
- 2 Invierta cada cartucho diez veces para mezclar los reactivos.
- 3 Golpee suavemente el fondo de cada cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire.

## Carga del tubo de bibliotecas vacío

- 1 Destape el tubo de bibliotecas suministrado con el kit de reactivos NovaSeq 6000.
- 2 Inserte el tubo de bibliotecas vacío y sin tapar en la posición (n.º 8) **Library Tube** (Tubo de bibliotecas) del cartucho de grupo.

El tubo de bibliotecas vacío debe estar presente durante la lectura de RFID y la mezcla de reactivos integrada. El código de barras del tubo de bibliotecas no se valida con el código de barras especificado en el archivo LIMS. El RFID se valida para garantizar que el tubo no ha sido utilizado.

**Figura 20** Tubo de bibliotecas sin tapar en la posición n.º 8



# Capítulo 6 Secuenciación

Configuración de un experimento de secuenciación .....	51
Supervisión del progreso del experimento .....	57
Inicio de experimentos escalonado .....	58
Eliminación del experimento .....	59
Desacople de la posición n.º 30 .....	59
Lavado automático posterior al experimento .....	60

## Configuración de un experimento de secuenciación

Ilumina le recomienda que permanezca con la sesión abierta mientras el NVCS esté en funcionamiento y mientras la secuenciación esté en curso.

- 1 Retire cualquier elemento de la superficie del instrumento.  
Mantenga la superficie libre durante el experimento de secuenciación y evite apoyarse en el instrumento. Cualquier presión sobre la puerta de la celda de flujo puede hacer que se abra, lo que detendría el experimento. Los experimentos detenidos no se pueden reanudar.



### NOTA

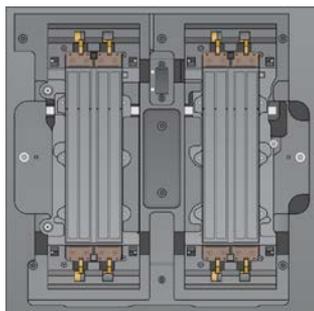
Los experimentos se pueden iniciar de forma escalonada. El temporizador de inicio escalonado indica cuándo se puede iniciar un experimento escalonadamente. Para obtener más información, consulte *Inicio de experimentos escalonado* en la página 58.

- 2 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Sequence** (Secuenciar) y, después, elija una única celda de flujo o una doble celda de flujo:
  - ▶ **A+B**: Configure un experimento con una doble celda de flujo.
  - ▶ **A**: Configure una única celda de flujo en el lado A.
  - ▶ **B**: Configure una única celda de flujo en el lado B.El software inicia la serie de pantallas de configuración del experimento, empezando por la de carga.
- 3 Seleccione **OK** (Aceptar) para aceptar la advertencia y abrir la puerta de la celda de flujo.

## Carga de la celda de flujo en el instrumento

- 1 Si está presente, retire la celda de flujo del experimento anterior.
- 2 Si hay partículas visibles en la platina de la celda de flujo, con un paño humedecido en alcohol, límpiela entera, incluidas la interfaz de fluidica y la superficie de vidrio del objetivo de alineación óptica. Séquela mediante una toallita sin pelusa.

Figura 21 Platina de la celda de flujo



- 3 [Flujo de trabajo de NovaSeq Standard] Extraiga la celda de flujo del embalaje como se explica a

continuación.

- a Póngase un par de guantes nuevos sin polvo para evitar contaminar la superficie de vidrio de la celda de flujo.
- b Con el paquete en una superficie plana, abra el envase metálico tirando desde la pestaña de la esquina.
- c Quite el retenedor de plástico transparente que cubre la celda de flujo.
- d Extraiga la celda de flujo del embalaje. Sujete la celda de flujo por los laterales sin tocar el vidrio ni las juntas de la parte inferior.
- e Si hay partículas visibles en alguna de las superficies de vidrio, límpiela con un paño sin pelusa humedecido en alcohol y séquela con una toallita de laboratorio sin pelusa.
- f Deseche el embalaje de manera adecuada.

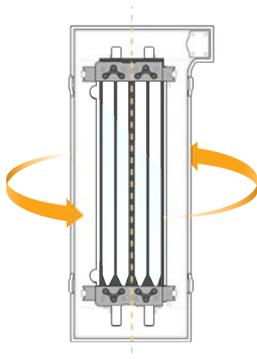


#### NOTA

Es normal que la celda presente algunos arañazos u otros defectos superficiales y estos no afectan a la calidad de los datos.

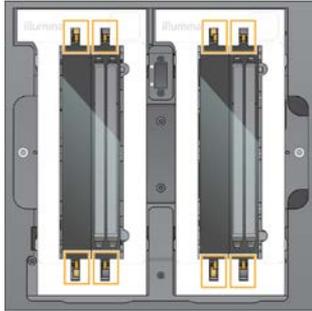
- 4 **[Flujo de trabajo de NovaSeq Xp]** Descargue la celda de flujo de la plataforma como se explica a continuación.
  - a Abra la abrazadera que fija la celda de flujo y el distribuidor.
  - b Sin dejar que el líquido caiga sobre la celda de flujo, quite y deseche con cuidado el distribuidor.
  - c Si cae líquido sobre la celda, límpiela con un paño sin pelusa humedecido en alcohol y séquela con una toallita de laboratorio sin pelusa.
  - d Agarre la celda de flujo por ambos lados para extraerla de la plataforma. Mantenga la celda de flujo nivelada.
  - e Si quedan restos de material residual en las juntas, seque las cuatro juntas de la celda de flujo con una toallita sin pelusa. No toque las juntas.
  - f Invierta la celda de flujo en torno al eje largo de modo que la superficie superior quede hacia arriba.

**Figura 22** Inversión de la celda de flujo en torno al eje largo



- g Antes de devolver la plataforma a su almacenamiento, inspecciónela y asegúrese de que no tiene restos de partículas.
- 5 Alinee la celda de flujo con respecto a las cuatro abrazaderas levantadas y colóquela en la platina de la celda de flujo.

**Figura 23** Celdas de flujo cargadas alineadas sobre las abrazaderas



- 6 Seleccione **Close Flow Cell Door** (Cerrar puerta de la celda de flujo). La puerta de la celda de flujo se cierra, se comprueban los sensores y el RFID, y aparece en la pantalla el ID de la celda de flujo.

## Carga de los cartuchos de SBS y de grupo



### NOTA

Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, antes de cargar el cartucho de grupo, asegúrese de que está cargado en el cartucho el tubo de bibliotecas vacío y sin tapar.

- 1 Abra las puertas del compartimento de líquidos y, a continuación, la puerta del refrigerador de reactivos.
- 2 Retire el SBS y los cartuchos de grupo utilizados.  
Los cierres metálicos de los cartuchos utilizados están perforados.
- 3 Deseche el contenido no usado de conformidad con las normativas aplicables.  
Para un desecho seguro de la posición n.º 30 del cartucho de grupo, consulte la sección *Desacople de la posición n.º 30 en la página 59*.
- 4 Cargue los cartuchos preparados en el cajón del refrigerador de reactivos de modo que las etiquetas **Insert** (Insertar) estén orientadas hacia la parte trasera del instrumento:
  - ▶ Coloque el cartucho de SBS (etiqueta gris) en la posición izquierda.
  - ▶ Coloque el cartucho de grupo (etiqueta naranja) que contiene el tubo de bibliotecas sin tapar en la posición derecha.

**Figura 24** Cartuchos de reactivos cargados

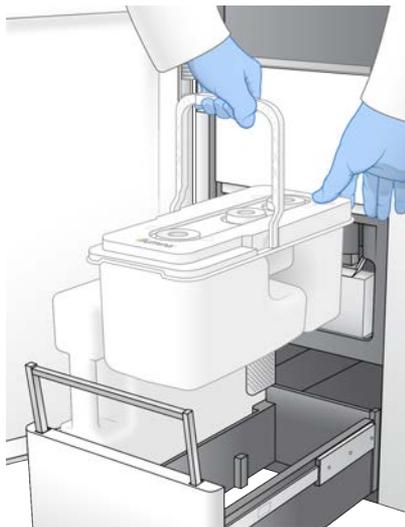


- 5 Deslice el cajón para introducirlo en el refrigerador de reactivos y, seguidamente, cierre la puerta de este. Se comprueban los sensores y los RFID. Los ID del tubo de bibliotecas y los dos cartuchos aparecerán en la pantalla.

## Carga del cartucho de tampones

- 1 Tire del mango de metal para abrir el cajón de tampones.
- 2 Retire el cartucho de tampones utilizados del lado derecho del cajón de tampones. Los cierres metálicos del cartucho de tampones utilizados están perforados.
- 3 Coloque un nuevo cartucho de tampones en el cajón de forma que la etiqueta de **illumina** esté orientada a la parte delantera del cajón. Alinee el cartucho con las guías levantadas en la base y los lados del cajón.  
Una vez que el cartucho de tampones esté cargado y debidamente fijado, puede cerrarse el cajón.

Figura 25 Carga del cartucho de tampones



- 4 Si las dos botellas de reactivo utilizado se han vaciado, seleccione la casilla de verificación que sirve para dejar constancia de que ambas botellas de reactivo utilizado están vacías.



### ADVERTENCIA

Si no vacía las botellas de reactivos utilizados puede interrumpir el experimento y producirse un desbordamiento, lo que dañaría el instrumento y constituiría un riesgo para la seguridad.

- 5 Seleccione el botón disponible:
  - ▶ **Log In** (Iniciar sesión): Abre la pantalla de inicio de sesión para iniciar sesión en BaseSpace Sequence Hub. Vaya a *Inicio de sesión en BaseSpace Sequence Hub*.
  - ▶ **Run Setup** (Configuración del experimento): Omite BaseSpace Sequence Hub y abre la pantalla Run Setup (Configuración del experimento) para introducir los parámetros del experimento. Vaya a *Introducir parámetros del experimento en la página 55*.

El botón disponible dependerá de si el sistema está configurado para BaseSpace Sequence Hub.

## Inicio de sesión en BaseSpace Sequence Hub

Al abrir NVCS, su grupo de trabajo de predeterminado de BaseSpace Sequence Hub estará seleccionado como su grupo de trabajo. Si no ha especificado uno predeterminado, se seleccionará su grupo de trabajo personal.

- 1 **[Opcional]** Actualice la configuración de BaseSpace Sequence Hub para el experimento actual:

- ▶ Para deshabilitar BaseSpace Sequence Hub, desmarque la casilla de verificación **BaseSpace Sequence Hub** y, a continuación, seleccione **Run Setup** (Configuración del experimento) para continuar sin iniciar sesión.
  - ▶ Para enviar los datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota y el análisis de los datos, seleccione **Run Monitoring and Storage** (Almacenamiento y supervisión de experimentos). Para esta opción hace falta una hoja de muestras.
  - ▶ Para enviar archivos InterOp, runinfo.xml y runParameters.xml a BaseSpace Sequence Hub para supervisar el experimento de manera remota, seleccione **Run Monitoring Only** (Solo supervisión de experimentos).
- 2 Introduzca el nombre de usuario y la contraseña de BaseSpace Sequence Hub y, a continuación, seleccione **Sign In** (Iniciar sesión).
  - 3 Si se le solicita, seleccione un grupo de trabajo en el que cargar los datos del experimento y, a continuación, seleccione **Run Setup** (Configuración del experimento).  
Se le solicitará solo si pertenece a varios grupos de trabajo.

## Introducir parámetros del experimento

- 1 Si el flujo de trabajo de NovaSeq Xp está activado, seleccione un tipo de flujo de trabajo.
  - ▶ Si selecciona **NovaSeq Xp**, asegúrese de que hay cargado un tubo de bibliotecas vacío.
  - ▶ Si selecciona **NovaSeq Standard**, asegúrese de que la muestra está cargada en el tubo de bibliotecas.
- 2 En el campo Run Name (Nombre del experimento), introduzca un nombre de su preferencia para identificar el experimento actual.  
El nombre de experimento puede contener caracteres alfanuméricos, guiones y guiones bajos.
- 3 Introduzca el número de ciclos de cada lectura y la longitud del índice en el experimento de secuenciación.  
No existe un número máximo de ciclos de índices, pero la suma de los ciclos de lectura y los ciclos de índices debe ser inferior al número de ciclos para el kit.
  - ▶ **Read 1** (Lectura 1): Introduzca un valor de hasta 151 ciclos para kits de 300 ciclos, o de hasta 251 para kits de 500 ciclos.
  - ▶ **Index 1** (Índice 1): Introduzca el número de ciclos para el cebador del índice 1 (i7).
  - ▶ **Index 2** (Índice 2): Introduzca el número de ciclos para el cebador del índice 2 (i5).
  - ▶ **Read 2** (Lectura 1): Introduzca un valor de hasta 151 ciclos para kits de 300 ciclos, o de hasta 251 para kits de 500 ciclos. Este valor suele ser el mismo que el valor de lectura 1.



### NOTA

El número de ciclos analizados en las lecturas 1 y 2 es un ciclo menos que el valor introducido. Por ejemplo, para llevar a cabo un experimento "paired-end" de 150 ciclos (experimento de 2 × 150 pb), introduzca el valor de 151 ciclos para la lectura 1 y la lectura 2.

La suma de los cuatro valores introducidos puede superar el número indicado de ciclos para cada kit de reactivos seleccionado en hasta 23 ciclos para experimentos "paired-end" y en 30 ciclos para experimentos de lectura individual.

- 4 Amplíe la opción **Advanced Options** (Opciones avanzadas) para aplicar la configuración del experimento actual.  
Estos ajustes son opcionales a menos que se especifique lo contrario.

- ▶ **Custom Primers** (Cebadores personalizados): Seleccione la casilla de verificación **Custom Primers** (Cebadores personalizados) y, a continuación, seleccione las casillas de verificación correspondientes:
  - ▶ **Read 1** (Lectura 1): Utilice un cebador personalizado para la lectura 1.
  - ▶ **Read 2** (Lectura 2): Utilice un cebador personalizado para la lectura 2.
  - ▶ **Custom Index** (Índice personalizado): Utilice un cebador personalizado para el índice 1.
- ▶ **Output Folder** (Carpeta de resultados): Seleccione **Browse** (Examinar) para cambiar la carpeta de resultados para el experimento actual. Cuando el experimento no está conectado a BaseSpace Sequence Hub es necesaria una carpeta de resultados para almacenarlos.
- ▶ **Hoja de muestras:** Seleccione **Browse** (Examinar) para cargar una hoja de muestras, que es necesaria cuando se utiliza BaseSpace Sequence Hub para el almacenamiento y la supervisión del experimento, u otro archivo CSV. El archivo CSV se copia en la carpeta de resultados y no afecta a los parámetros del experimento.
- ▶ **Custom Recipe** (Fórmula personalizada): Seleccione la opción **Custom Recipe** (Fórmula personalizada) y, a continuación, elija **Browse** (Examinar) para utilizar una fórmula personalizada en formato XML para este experimento.



#### NOTA

No se pueden modificar los pasos de generación de grupos en una fórmula personalizada.

- 5 Seleccione **Review** (Revisar).  
El software confirma que los parámetros especificados son adecuados para la fórmula.

## Confirmación de los parámetros del experimento

- 1 Confirme los parámetros del experimento que se muestran en la pantalla Review (Revisión).
- 2 **[Opcional]** Seleccione **Back** (Atrás) para volver a la pantalla Run Setup (Configuración del experimento) y edite los parámetros del experimento.
- 3 Seleccione **Start Run** (Iniciar experimento).  
Las comprobaciones previas al experimento se inician automáticamente.

## Revisar comprobaciones previas al experimento

- 1 Espere unos 5 minutos a que finalicen las comprobaciones previas al experimento.  
El experimento comienza de manera automática después de finalizar correctamente las comprobaciones.



#### NOTA

Para evitar un sobrellenado del disco duro, no copie ningún dato en C:\ después de iniciar el experimento.

- 2 Si las comprobaciones previas al experimento fallaran debido a un error del sensor, por ejemplo a la no detección de una celda de flujo, debe salir y reiniciar el flujo de trabajo.
- 3 Para otros fallos de la comprobación previa al experimento, seleccione **Retry** (Reintentar) para reiniciar una comprobación con error o **Retry All** (Reintentar todo) para reiniciar todas las comprobaciones. Hace falta solucionar los errores antes de poder iniciar el experimento. Consulte la sección *Errores de la comprobación previa al experimento en la página 67* para obtener información sobre la solución de problemas.
- 4 Seleccione el icono de **Error** para ver los detalles del error.

- 5 Si falla la comprobación de alineación, solucione los errores de la siguiente manera.
  - a Seleccione **Reload** (Volver a cargar) y, a continuación, **OK** (Aceptar) para confirmar que desea regresar a la pantalla Load (Cargar).
  - b Retire cualquier elemento de encima del instrumento y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
  - c Vuelva a cargar la celda de flujo y, después, seleccione **Run Setup** (Configuración del experimento).
  - d Navegue por las pantallas para volver a leer cada RFID y regrese a la pantalla Pre-Run Checks (Comprobaciones previas al experimento).
  - e Vuelva a realizar la comprobación.

## Supervisión del progreso del experimento

- 1 Supervise el progreso del experimento, las intensidades y las puntuaciones de calidad mientras los datos de medición aparecen en la pantalla.  
Para obtener más información sobre los datos de medición del experimento, consulte *Análisis en tiempo real* en la página 72.

Figura 26 Progreso y datos de medición del experimento de secuenciación



- A **Time to completion** (Tiempo hasta la finalización): Muestra la fecha y la hora (aaaa-mm-dd hh:mm) de finalización del experimento.
- B **Run progress** (Progreso del experimento): El paso actual del experimento. El tamaño de la barra de progreso no es proporcional a la velocidad del experimento de cada paso.
- C **Q-scores** (Puntuaciones Q): La distribución de las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q).
- D **Intensity** (Intensidad): El valor de las intensidades de grupos del percentil 90 para cada placa. Los colores de los diagramas indican los canales verde y rojo.
- E **Clusters passing filter (%)** (Grupos que superan el filtro [%]): El porcentaje de grupos que superan el filtro.
- F **Estimated yield (Gb)** (Rendimiento estimado [Gb]): El número proyectado de bases para el experimento.
- G **Q30**: El porcentaje de llamada de bases para el experimento que tiene una puntuación Q de  $\geq 30$ .



### NOTA

Si se inicia un apagado o un reinicio mientras el NVCS está en ejecución, el usuario debe confirmar esta acción para que el cierre o el reinicio puedan continuar.

## Datos de medición del experimento

El software muestra los datos de medición que se hayan generado durante el experimento. Estos datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas según los datos generados por RTA3 y escritos en los archivos InterOp.

La generación de grupos suele durar dos horas; después, se inicia la secuenciación con el ciclo n.º 1. Los datos se actualizan conforme avanza la secuenciación. Los grupos que superan el filtro, el rendimiento y las puntuaciones de calidad están disponibles después del ciclo 26.

## Estado de procesamiento

En la pantalla Process Management (Administración de procesos) figura el estado de cada experimento. En el menú principal, seleccione **Process Management** (Administración de procesos).

Para cada nombre del experimento, la pantalla Process Management (Administración de procesos) enumera el estado de los siguientes procesos:

- ▶ **Run Status** (Estado del experimento): Se basa en el procesamiento de archivos CBCL.
- ▶ **Network** (Red): Se basa en la transferencia de archivos mediante el uso del Servicio de copia universal.
- ▶ **BaseSpace** (BaseSpace): Se basa en la carga de archivos a BaseSpace Sequence Hub, si procede.

Cuando finaliza un proceso, aparece una marca de verificación de color verde. Para obtener más información, consulte *Gestión del proceso en la página 9*.

## Inicio de experimentos escalonado

Puede configurar e iniciar un experimento en el lado inactivo del instrumento mientras hay un experimento en curso en el otro lado, lo que se conoce como un inicio escalonado. Los experimentos escalonados se configuran en momentos concretos durante un experimento, según lo requieran los siguientes estados del temporizador de cuenta atrás de inicio.

- ▶ **Run Start: Available** (Inicio de experimento: Disponible): El inicio escalonado está disponible. Se muestra la fecha y la hora en la que el inicio escalonado no estará disponible. Seleccione **Sequence** (Secuenciar) para iniciar un nuevo experimento escalonado después de que se haya completado el ciclo actual.
- ▶ **Run Start: Unavailable** (Inicio de experimento: No disponible): El inicio escalonado no está disponible en este momento. La fecha y la hora muestran cuando estará disponible el inicio escalonado en el otro lado del instrumento.
- ▶ **Waiting...** (En espera...): Si se intenta realizar un nuevo experimento cuando el inicio escalonado no está disponible, el estado cambia a Waiting (En espera), y se muestra la fecha y la hora aproximada en la que el instrumento estará listo para un nuevo experimento. El instrumento continuará con la configuración del experimento cuando esté listo.

Cuando configure el nuevo experimento, el software hará una pausa y reanudará automáticamente el experimento en la celda de flujo adyacente si fuera necesario. El sistema se pone en un estado seguro cuando entra en pausa.

## Procedimiento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Sequence** (Secuenciar) y, a continuación, seleccione **A** o **B**. El lado seleccionado debe ser el lado actualmente inactivo.
- 2 Espere a que se pause el experimento en la celda de flujo adyacente. Para cancelar el nuevo experimento y evitar ponerlo en pausa, seleccione **Cancel** (Cancelar).

Si el experimento adyacente está realizando una generación de grupos, una resíntesis “paired-end”, una adquisición de imágenes o un lavado, el software finalizará el paso actual sin ponerlo en pausa.

- 3 Cuando el experimento adyacente se haya puesto en pausa y se abra la puerta de la celda de flujo, configure el nuevo experimento.  
Cuando comienza el nuevo experimento, el experimento en pausa se reanuda automáticamente y, a continuación, empieza el nuevo experimento.

## Eliminación del experimento

Una vez que la transferencia de datos haya finalizado, puede eliminar el experimento actual de Process Management (Administración de procesos) para liberar espacio para los siguientes experimentos. Al eliminar el experimento se libera espacio en el CE y la unidad C:\ sin necesidad de eliminar archivos de mantenimiento del sistema ni de que ello afecte a la copia de BaseSpace Sequence Hub ni a la red. Los experimentos que se encuentran en la fase de secuenciación no se pueden eliminar.

- 1 En el menú principal, seleccione **Process Management** (Administración de procesos).
- 2 **[Opcional]** Asegúrese de que cada proceso del experimento muestra una marca de verificación de color verde, lo que indica que la transferencia de datos ha finalizado.  
Puede eliminar un experimento cuya transferencia de datos a una red o BaseSpace Sequence Hub no haya finalizado, pero se perderán todos los datos del mismo.
- 3 Seleccione **Delete Run** (Eliminar experimento) y, después, **Yes** (Sí) para confirmar.
- 4 Seleccione **Done** (Hecho).

## Desacople de la posición n.º 30

El depósito en la posición n.º 30 del cartucho de grupo contiene formamida. Se retira del cartucho de grupo utilizado y se desecha por separado.



### ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

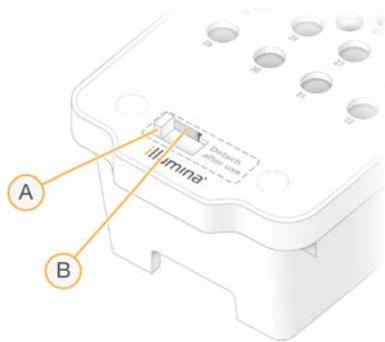
- 1 Con unos guantes puestos, empuje la lengüeta de plástico con la etiqueta **Detach after use** (Desacoplar después del uso) a la derecha.
- 2 Coloque una mano o una superficie bajo el depósito, presione la lengüeta de plástico transparente hacia la etiqueta de Illumina para liberar el depósito de debajo del cartucho de grupo.



### NOTA

Evite apilar grupos de cartuchos cuando los vaya a almacenar, ya que se podría salir el depósito por accidente.

Figura 27 Posición n.º 30 extraíble



- A Lengüeta de plástico blanca para desacople
- B Lengüeta de plástico transparente para liberación

3 Deseche el depósito de conformidad con las normativas aplicables.

## Lavado automático posterior al experimento

Al completarse la secuenciación, el software inicia un lavado automático posterior al experimento que dura aproximadamente 80 minutos. El sistema bombea hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,24 % desde la posición n.º 17 y lo diluye hasta el 0,12 %. El NaOCl al 0,12 % se bombea a las posiciones de las bibliotecas y los reactivos ExAmp a través de la celda de flujo y, a continuación, a las botellas de reactivos utilizados. El lavado enjuaga la cadena molde del sistema para evitar la contaminación cruzada.

Cuando el lavado finalice, el sistema se coloca en un lugar seguro y el botón de inicio se activa. Deje los consumibles en su sitio hasta el siguiente experimento. Después del lavado, los dispensadores permanecen en los cartuchos de SBS y de grupo con el fin de evitar que entre aire en el sistema. Los dispensadores del cartucho de tampones se elevan para que las botellas de reactivos utilizados puedan vaciarse.



### NOTA

Si se produce un error durante un lavado automático posterior al experimento y este queda incompleto, se requiere un lavado de mantenimiento.

# Capítulo 7 Mantenimiento

Mantenimiento preventivo .....	61
Realización de un lavado de mantenimiento .....	61
Actualizaciones de software .....	65

## Mantenimiento preventivo

Ilumina recomienda programar un servicio de mantenimiento preventivo cada año. Si no dispone de contrato de servicios, póngase en contacto con el comercial de su región o con el servicio de asistencia técnica de Ilumina para acordar un servicio de mantenimiento preventivo facturable.

## Realización de un lavado de mantenimiento

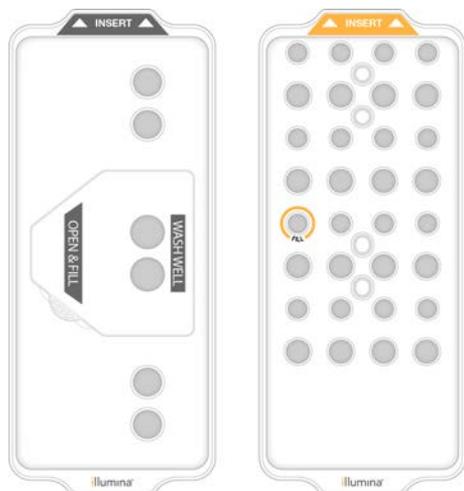
El software solicita un lavado de mantenimiento en las siguientes condiciones:

- ▶ Si no ha realizado un experimento de cuatro carriles con un lavado posterior al experimento en los últimos 14 días
- ▶ Si no se ha realizado un lavado de mantenimiento en los últimos 14 días
- ▶ Si el lavado posterior al experimento ha fallado o no ha finalizado.

El lavado de mantenimiento irriga el sistema con diluciones de Tween 20 y NaOCl suministradas por el usuario. Las diluciones se dispensan desde los cartuchos de lavado a la celda de flujo, a las botellas de reactivo utilizado y a cada depósito de cartuchos con el fin de lavar todos los dispensadores. La duración del lavado es de, aproximadamente, 80 minutos.

Para el lavado de mantenimiento hace falta un cartucho de tampones utilizados, el cartucho de lavado de SBS, el cartucho de lavado de grupo y la celda de flujo de lavado de cuatro carriles suministrados con el instrumento (o una celda de flujo de cuatro carriles utilizada). Al igual que con los cartuchos de reactivos, los cartuchos de lavado están codificados por colores para evitar los errores de carga. El cartucho de lavado de SBS tiene un pocillo central para la dilución de Tween 20. La dilución de NaOCl se añade a un depósito en el cartucho de lavado de grupo.

Figura 28 Cartucho de lavado de SBS (izquierda) y cartucho de lavado de grupo (derecha)



## Preparación de la solución de lavado

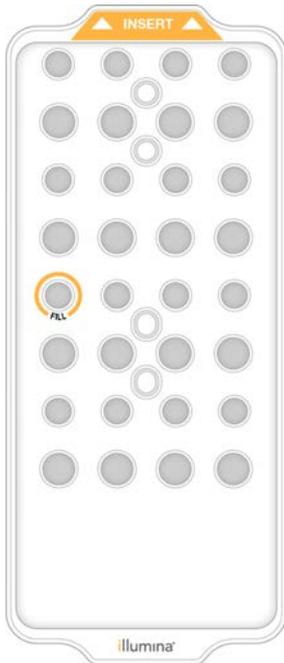
- 1 Añada 400 ml de agua de laboratorio a una botella de centrifugado de 500 ml.
- 2 Añada 0,2 ml de Tween 20 al 100 % para obtener una solución de lavado de, al menos, 400 ml de Tween 20 al 0,05 %.  
Con una dilución recién preparada de Tween 20 se limita la entrada de biocontaminantes en el sistema de fluidica.
- 3 Invierta para mezclar.
- 4 Retire la tapa del pocillo central del cartucho de lavado de SBS.
- 5 Añada solución de lavado al pocillo central. Llene hasta la línea de llenado, la cual indica el volumen mínimo necesario.  
Los otros depósitos permanecerán vacíos.

**Figura 29** Pocillo central lleno hasta línea de volumen de llenado mínimo



- 6 Combine los siguientes volúmenes en un tubo de centrifugado de 30 ml para preparar 20 ml de NaOCl al 0,25 %:
  - ▶ NaOCl al 5 % (1 ml)
  - ▶ Agua desionizada (19 ml)
- 7 Invierta para mezclar.
- 8 Añada 5 ml de NaOCl al 0,25 % al cartucho de lavado de grupo.  
La ubicación se marca como llena y tiene un círculo naranja a su alrededor. Todos los demás depósitos permanecerán vacíos.

**Figura 30** Posición para NaOCl al 0,25 %



## Carga de la celda de flujo de lavado

- 1 Retire cualquier elemento de la superficie del instrumento.  
Mantenga la superficie libre durante el lavado de mantenimiento y evite apoyarse en el instrumento. Cualquier presión sobre la puerta de la celda de flujo puede hacer que se abra, lo que detendría el lavado.
- 2 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Wash** (Lavado) y, después, elija el lado que desee lavar:
  - ▶ **A+B**: Lavar ambos lados simultáneamente.
  - ▶ **A**: Solo el lado A.
  - ▶ **B**: Solo el lado B.
 El software inicia la serie de pantallas de lavado.



### NOTA

Un lavado de mantenimiento en una cara solo se puede iniciar cuando la otra está inactiva o realizando ciclos de lectura de SBS. El tiempo de inicio escalonado de NVCS indica la disponibilidad del instrumento para iniciar un nuevo experimento o un lavado. Consulte *Inicio de experimentos escalonado* en la página 58.

- 3 Seleccione **OK** (Aceptar) para aceptar la advertencia y abrir la puerta de la celda de flujo.
- 4 Si todavía no hay presente una celda de flujo de lavado, o una celda de flujo de cuatro carriles utilizada, cargue una.
- 5 Seleccione **Close Flow Cell Door** (Cerrar puerta de la celda de flujo).  
La puerta se cierra, se comprueban los sensores y el RFID, y aparece en la pantalla el ID de la celda de flujo.

## Carga de los cartuchos de lavado

Los cartuchos de lavado son necesarios para realizar un lavado de mantenimiento. No utilice el SBS ni los cartuchos de grupo utilizados.

- 1 Abra las puertas del compartimento de líquidos y, a continuación, la puerta del refrigerador de reactivos.
- 2 Retire el SBS y los cartuchos de reactivo de grupo utilizados. Deseche el contenido no usado de conformidad con las normativas aplicables.  
Para un desecho seguro de la posición n.º 30 del cartucho de grupo, consulte la sección *Desacople de la posición n.º 30 en la página 59*.
- 3 Cargue los cartuchos de lavado en el cajón del refrigerador de reactivos de modo que las etiquetas **Insert** (Insertar) estén orientadas hacia la parte trasera del instrumento:
  - ▶ Coloque el cartucho de SBS (etiqueta gris) en la posición izquierda.
  - ▶ Coloque el cartucho de grupo (etiqueta naranja) en la posición derecha.
- 4 Deslice el cajón para introducirlo en el refrigerador de reactivos y, seguidamente, cierre la puerta de este. Se comprueban los sensores, y se escanea y se muestra en pantalla el RFID de cada cartucho.
- 5 Abra el cajón de tampones.
- 6 Si todavía no hay ninguno, cargue un cartucho de tampones utilizados.

## Vaciado de botellas de reactivos utilizados

Siga las instrucciones que aparecen a continuación para vaciar las botellas de reactivos utilizados con *cada* lavado de mantenimiento. Incluso si su sistema está configurado para enviar reactivos utilizados de manera externa, la botella pequeña recoge los reactivos utilizados y la botella grande debe encontrarse en su posición.



### ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos utilizados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información sobre seguridad, salud y medioambiente, consulte la hoja de datos de seguridad en [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- 1 Extraiga la botella pequeña de reactivos utilizados y deseche el contenido de conformidad con las normas aplicables. Mantenga el contenido apartado del contenido de la otra botella.
- 2 Vuelva a colocar el contenedor pequeño de reactivos utilizados en el hueco.
- 3 Extraiga la botella grande de reactivos utilizada y deseche el contenido de conformidad con las normas aplicables.
- 4 Vuelva a colocar la botella grande de reactivos utilizada en el cajón de tampones.
- 5 Utilice un nuevo par de guantes sin polvo.
- 6 Cierre el cajón de tampón y, después, cierre las puertas del compartimento de líquidos. Se comprueban los sensores y los RFID. Aparece en la pantalla el ID de cada componente de lavado.

## Inicio del lavado

- 1 Seleccione la casilla de verificación que sirve para dejar constancia de que ambas botellas de reactivos utilizados están vacías y, a continuación, seleccione **Start Wash** (Iniciar lavado).  
El lavado empieza y se muestra la hora estimada de finalización de este.



### ADVERTENCIA

Si no vacía las botellas de reactivos utilizados puede interrumpir el lavado y producirse un desbordamiento, lo que dañaría el instrumento y constituiría un riesgo para la seguridad.

- 2 Una vez finalizado el lavado, seleccione **Home** (Inicio).
- 3 Deje los consumibles en su sitio hasta el siguiente experimento.  
Los dispensadores permanecen en los cartuchos de SBS y de grupo con el fin de evitar que entre aire en el sistema. Los dispensadores del cartucho de tampones se elevan para que las botellas de reactivos utilizados puedan vaciarse.

## Actualizaciones de software

Las actualizaciones del software están disponibles para la versión v1.4 de NVCS o posterior. Puede descargar e instalar actualizaciones de software del NVCS. La búsqueda automática de actualizaciones de software está habilitada de forma predeterminada. Puede habilitar o deshabilitar las actualizaciones automáticas en Settings (Configuración).



### NOTA

El NovaSeq 6000 debe estar conectado a Internet para poder buscar actualizaciones de software y descargarlas.

La búsqueda automática de actualizaciones se realiza cada 24 horas. Cuando haya una actualización disponible aparece una notificación en el menú principal. Todos los usuarios pueden ver la notificación de la actualización, pero solo un administrador puede descargar e instalar las actualizaciones.

Para el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, asegúrese de que la versión del NVCS cumple los requisitos mínimos de software enumerados en la siguiente tabla antes de comenzar la preparación de las muestras o los consumibles.

**Tabla 20** Requisitos mínimos del software

Celda de flujo	Versión de software mínima
SP	1.6
S1	1.3.1
S2	Todas
S4	1.2.0



### NOTA

No es posible actualizar el software si se está efectuando un experimento de secuenciación, un lavado, la configuración de un experimento o una transferencia de archivos a la carpeta de resultados o a BaseSpace Sequence Hub. Si hay un flujo de trabajo de NovaSeq Xp en curso, espere para actualizar el software a que las bibliotecas se hayan cargado en la celda de flujo y a que la secuenciación haya terminado.

Para buscar manualmente las actualizaciones o para descargar e instalar una, realice los siguientes pasos:

- 1 En el menú principal, seleccione **Software Update** (Actualización de software).  
Se muestra la pantalla de actualización de software, que ofrece las notas de la publicación para la actualización disponible. Si no está habilitada la búsqueda automática de actualizaciones de software, puede buscarlas manualmente o habilitar la búsqueda automática.
- 2 Para descargar la actualización e instalarla, marque la casilla para confirmar que entiende que la descarga y la instalación tardarán unos 30 minutos.
- 3 Seleccione **Download and Install** (Descargar e instalar).  
Una vez finalizada la descarga, el NVCS se cierra y se inicia el instalador. Siga las instrucciones del instalador para efectuar la instalación.  
Si se producen errores durante la descarga o la instalación, póngase en contacto con la asistencia técnica de Illumina.

# Apéndice A Solución de problemas

Recursos de solución de problemas .....	67
Archivos de solución de problemas .....	67
Errores de la comprobación previa al experimento .....	67
Solución de problemas de gestión de procesos .....	68
Error en experimento antes de la generación de grupos .....	69
Finalización de un experimento .....	70
Apagado del instrumento .....	70

## Recursos de solución de problemas

Para cuestiones técnicas, visite la [página de asistencia del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 en el sitio web de Illumina](#). Las páginas de asistencia proporcionan acceso a la documentación, las descargas y las preguntas frecuentes. Para acceder a los boletines de asistencia, inicie sesión en su cuenta de MyIllumina.

Si tiene problemas con el rendimiento o la calidad de los experimentos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Consulte [Asistencia técnica en la página 87](#). Para facilitar la solución de problemas, le recomendamos compartir un enlace al resumen del experimento en BaseSpace Sequence Hub con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

## Archivos de solución de problemas

Archivo clave	Carpeta	Descripción
Archivo de información del experimento (RunInfo.xml)	Carpeta raíz	Contiene los ajustes del experimento: <ul style="list-style-type: none"><li>• Número de ciclos del experimento</li><li>• Número de lecturas del experimento</li><li>• Si la lectura es indexada</li><li>• Número de sectores y placas de la celda de flujo</li></ul>
Archivo de parámetros del experimento (RunParameters.xml)	Carpeta raíz	Contiene el nombre del experimento e información sobre los parámetros y componentes del experimento, incluida la siguiente información de RFID: números de serie, números de lote, fechas de caducidad y números de catálogo.
Archivos InterOp (*.bin)	InterOp	Archivos binarios de informes utilizados por el Visor del análisis de secuenciación. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro	Logs (Registros)	Los archivos de registro describen cada paso llevado a cabo por el instrumento en cada ciclo — incluido el tipo de reactivo utilizado— y enumeran las versiones de software y firmware empleadas con el experimento. El archivo llamado <b>[NombreDelInstrumento]_CurrentHardware.csv</b> muestra los números de serie de los componentes del instrumento.

## Errores de la comprobación previa al experimento

Si se produce un error durante las comprobaciones previas al experimento, utilice las siguientes acciones para resolverlo. Si va a configurar un experimento con una doble celda de flujo y un lado falla, puede cancelar el lado fallido y continuar con el lado que pasó.

Cuando una comprobación previa al experimento falla, los RFID de la celda de flujo, los reactivos y los tampones no se bloquean, de modo que es posible utilizar los consumibles para un experimento posterior. Cuando se inicia el experimento, los dispensadores perforan los cierres metálicos de los cartuchos de reactivo y se bloquean todos los RFID.

Comprobación del sistema	Motivo del error	Acción recomendada
Sensores	Una puerta del compartimento está abierta, un consumible no está bien cargado o un sensor, como mínimo, no funciona.	Seleccione <b>Retry</b> (Reintentar) y siga las indicaciones en pantalla para resolver el error.
Espacio en disco	El espacio en disco es insuficiente, porque la ubicación especificada para la carpeta de resultados está llena.	Utilice la pantalla Process Management (Administración de procesos) para borrar espacio de disco de la ubicación de carpeta de resultados especificada.
Conectividad del sistema	La conexión a RTA3, el sistema de fluidica u otra conexión se ha interrumpido.	Seleccione <b>Retry</b> (Reintentar) y siga las indicaciones en pantalla para resolver el error.
Alineación	La posición de la celda de flujo impide la adquisición de imágenes.	Siga las indicaciones en pantalla para volver a cargar la celda de flujo.

## Bandeja de pérdidas

Hay una bandeja de pérdidas en la base del instrumento para recoger las fugas de reactivos o de refrigerante, así como para recoger el desbordamiento de las botellas de reactivos utilizados. En condiciones normales, la bandeja de fugas está seca. Las pérdidas indican un problema con el instrumento y el desbordamiento se produce cuando las botellas de reactivos utilizados no se vacían con regularidad.

Durante la comprobación previa al experimento, los sensores detectan si la bandeja de pérdidas contiene algún líquido:

- ▶ Si la bandeja de pérdidas contiene líquido pero no está llena, el experimento puede continuar, aunque debe ponerse en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Consulte [Asistencia técnica en la página 87](#).
- ▶ Si la bandeja de pérdidas está llena, el experimento no puede continuar y debe ponerse en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.



### ADVERTENCIA

Vacíe las botellas de reactivos utilizados antes de **cada experimento**. Los experimentos se detienen si cualquiera de las botellas de reactivo utilizado está llena. El desbordamiento de cualquiera de las botellas de reactivo utilizado produce daños en el instrumento, hace que un representante de Illumina tenga que ir al centro y constituye un riesgo para la seguridad.

## Solución de problemas de gestión de procesos

En la siguiente tabla se proporcionan opciones de solución de problemas para el icono N/A en la pantalla Process Management (Administración de procesos):

- ▶ El icono N/A se muestra en la columna BaseSpace y el experimento se configura para cargarse en BaseSpace Sequence Hub.
- ▶ El icono N/A se muestra en la columna Network (Red) y el experimento se configura para cargarse en una carpeta de resultados de la red.

Estado del experimento	Acción de solución de problemas
Hay un experimento en curso	Cierre la pantalla Process Management (Administración de procesos), espere aproximadamente cinco minutos y vuelva a abrir la pantalla.
No hay un experimento en curso	Apague y vuelva a encender el instrumento y vuelva a abrir la pantalla Process Management (Administración de procesos).

Si el icono N/A sigue mostrándose después de haber realizado estas acciones de solución de problemas, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Consulte [Asistencia técnica en la página 87](#).

## Error en experimento antes de la generación de grupos

Si el software no completa el experimento antes de que se inicie la generación de grupos, puede guardar los cartuchos de reactivos, el tubo de bibliotecas (incluida la muestra), y, si se reutiliza de inmediato, la celda de flujo, para un nuevo experimento. Cuando se inicia la generación de grupos, los dispensadores perforan los cierres metálicos y los reactivos se transfieren al tubo de bibliotecas y a la celda de flujo, de modo que los consumibles y las bibliotecas no se pueden usar para otro experimento.

Tiene dos opciones para configurar un nuevo experimento con los cartuchos de reactivos, el tubo de bibliotecas y la celda de flujo guardados del experimento fallido:

- ▶ **Configurar un nuevo experimento inmediatamente:** Configure el nuevo experimento en un plazo de cuatro horas desde el error del experimento. Los cartuchos de reactivos, el tubo de bibliotecas y la celda de flujo permanecen cargados.



### NOTA

Para lograr unos resultados óptimos en un flujo de trabajo de NovaSeq Xp, inicie el nuevo experimento lo antes posible.

- ▶ **Configurar un nuevo experimento más tarde:** Configure el nuevo experimento en un plazo de tres semanas desde el error del experimento. Los cartuchos de reactivos y el tubo de bibliotecas se descargan del instrumento y se almacenan. Los consumibles guardados deberán estar etiquetados con la fecha y almacenados en las condiciones iniciales.



### NOTA

La celda de flujo no se puede reutilizar y debe desecharse. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para obtener una celda de flujo de repuesto.

## Configuración de un experimento nuevo de manera inmediata

Si un experimento fallido utilizó el flujo de trabajo de NovaSeq Xp, inicie el nuevo experimento lo antes posible para obtener unos resultados óptimos.

- 1 Si el experimento falla y el otro lado del instrumento está inactivo, reinicie el instrumento. De lo contrario, seleccione **Home** (Inicio).
- 2 Configure un experimento nuevo.
- 3 Deje la celda de flujo actual en su sitio.
- 4 Abra y cierre la puerta del refrigerador de reactivos y el cajón de tampones para hacer que el NVCS vuelva a leer los RFID del cartucho de reactivos.

Los cartuchos, el tubo de bibliotecas y la celda de flujo pueden permanecer en el instrumento hasta cuatro horas después del fallo en el experimento.

- 5 En caso necesario, vacíe las botellas de reactivo utilizadas y vuelva a colocarlas en el instrumento.
- 6 Continúe con la configuración del experimento.

## Configuración de un experimento nuevo más adelante

- 1 Cuando se produzca un fallo en el experimento, seleccione **Home** (Inicio).
- 2 Configure un nuevo experimento o un lavado de mantenimiento para liberar a los consumibles del instrumento.
- 3 Cuando se le solicite, elimine y almacene los siguientes consumibles:
  - ▶ Tape el tubo de bibliotecas y almacénelo a una temperatura comprendida entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tres semanas como máximo.
  - ▶ Vuelva a almacenar los cartuchos de SBS y de grupo a una temperatura de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
  - ▶ Vuelva a almacenar el cartucho de tampones a temperatura ambiente y protegido de la luz. Si no se han perforado, es posible reutilizar los cartuchos en un nuevo experimento.
- 4 Seleccione **End** (Finalizar) para cancelar el experimento o el lavado de mantenimiento y, a continuación, seleccione **Yes** (Sí) para confirmar el comando. También puede dejar que el lavado de mantenimiento termine en lugar de cancelarlo.

## Finalización de un experimento

La finalización de un experimento en el sistema NovaSeq 6000 es **definitiva**. El software no puede reanudar el experimento ni guardar los datos de secuenciación, y tampoco se pueden reutilizar los consumibles.

- 1 Seleccione **End** (Finalizar) y, después, seleccione **Yes** (Sí) para confirmar el comando. Si el experimento finalizó después de la lectura 1, el software iniciará el lavado posterior al experimento automático.
- 2 Si se le solicita, seleccione entre las siguientes opciones de lavado:
  - ▶ **End Run Without Wash** (Finalizar experimento sin lavar): Se finaliza el experimento y se inicia un lavado de mantenimiento.
  - ▶ **End Run and Wash** (Finalizar experimento y lavar): Se finaliza el experimento y se lleva a cabo un lavado automático posterior al experimento.
  - ▶ **Cancel** (Cancelar): Se continúa con el experimento actual.Si se finaliza el experimento entre la finalización de la formación del grupo y la finalización de la lectura 1, el software muestra las opciones de lavado. En caso contrario, el software iniciará el lavado posterior al experimento automático.
- 3 Si ha seleccionado End Run Without Wash (Finalizar experimento sin lavar), siga las indicaciones del software para configurar un lavado de mantenimiento.

## Apagado del instrumento

Al apagar el instrumento se desconecta de forma segura el software y los sistemas, así como la fuente de alimentación del instrumento. La barra de estado pasa de color verde a blanco, lo que indica que el apagado está en curso.

En circunstancias normales, el apagado del instrumento es innecesario.

Si se inicia un apagado o un reinicio mientras el NVCS está en ejecución, el usuario debe confirmar esta acción para que el cierre o el reinicio puedan continuar.

- 1 En el menú principal, seleccione **Shutdown Instrument** (Apagar instrumento).
- 2 Después de que la pantalla se quede en blanco, ponga el interruptor de alimentación de la parte posterior del instrumento en la posición de apagado.
- 3 Espere al menos 60 segundos antes de volver a encender el instrumento.



### **PRECAUCIÓN**

No cambie la posición del instrumento. Un movimiento inadecuado podría afectar a la alineación óptica y poner en riesgo la integridad de los datos. Para obtener ayuda con el cambio de posición, póngase en contacto con el representante de Illumina.

# Apéndice B Análisis en tiempo real

Descripción general del análisis en tiempo real .....	72
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real .....	74

## Descripción general del análisis en tiempo real

El sistema de secuenciación NovaSeq 6000 utiliza RTA3, una implementación del software de análisis en tiempo real, en el motor informático del instrumento. RTA3 extrae las intensidades de las imágenes recibidas de la cámara, lleva a cabo una llamada de bases, asigna una puntuación de calidad a las llamadas de bases, se alinea con PhiX y genera informes de datos en archivos InterOp para su visualización en el visor del análisis de secuenciación.

Para optimizar el tiempo de procesamiento, RTA3 almacena información en memoria. Si se interrumpe RTA3, el procesamiento no se reanuda y se pierden los datos del experimento que se estén procesando en la memoria.

## Entradas de RTA3

Para procesarlas, RTA3 necesita las imágenes de placas que se encuentran en la memoria local del sistema. RTA3 recibe información del experimento y comandos del NVCS.

## Resultados de RTA3

Las imágenes de cada canal de color se transfieren en memoria a RTA3 como placas. A partir de estas imágenes, RTA3 produce un conjunto de archivos de filtro y archivos de llamada de bases clasificadas por calidad. Todos los demás conjuntos admiten archivos de resultados.

Tipos de archivo	Descripción
Archivos de llamada de bases	Cada placa que se analiza se incluye en un archivo de llamada de bases concatenado (*.cbcl). Las placas del mismo carril y superficie se agregan a un archivo *.cbcl para cada carril y superficie.
Archivos de filtro	Cada placa produce un archivo de filtro (*.filter) que especifica si un grupo pasa filtros.
Archivos de ubicación de grupos	Los archivos de ubicación de grupos (*.locs) contienen las coordenadas X e Y para cada grupo en una placa. Se genera un archivo de ubicación de grupos para cada experimento.

Los archivos de resultados se utilizan para los análisis sucesivos en BaseSpace Sequence Hub. De manera alternativa, utilice el software de conversión bcl2fastq para la conversión a FASTQ y soluciones de análisis de otros proveedores. Para los archivos de NovaSeq es necesario el software de conversión bcl2fastq2 v2.19 o versiones posteriores. Para obtener la última versión de bcl2fastq2, visite la [página de descargas de bcl2fastq2](#) en el sitio web de Illumina.

RTA3 ofrece datos en tiempo real sobre la calidad del experimento almacenados como archivos InterOp, que son archivos binarios de resultados que contienen datos de medición sobre placas, ciclos y niveles de lectura. Para ver datos de medición en tiempo real con Sequencing Analysis Viewer hacen falta archivos InterOp. Para obtener la última versión de Sequencing Analysis Viewer, visite la [página de descargas de Sequencing Analysis Viewer](#) en el sitio web de Illumina.

## Gestión de errores

RTA3 crea archivos de registro y los guarda en la carpeta de registros. Los errores se registran en un archivo de texto con formato \*.log.

Los archivos de registro siguientes se transfieren a la ubicación de destino de los resultados finales tras completar el procesamiento:

- ▶ info\_00000.log contiene un resumen de los eventos importantes del experimento.
- ▶ error\_00000.log enumera los errores que se han producido durante un experimento.
- ▶ warning\_00000.log enumera las advertencias que se hayan producido durante un experimento.

## Placas de la celda de flujo

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo. La cámara toma una imagen de cada sector, que el software divide en placas para el procesamiento de RTA3. El número total de placas depende de la cantidad de imágenes de carriles, sectores y superficies que se adquieran en la celda de flujo.

- ▶ Las celdas de flujo SP tienen un total de 312 placas.
- ▶ Las celdas de flujo S1 tienen un total de 624 placas.
- ▶ Las celdas de flujo S2 tienen un total de 1408 placas.
- ▶ Las celdas de flujo S4 tienen un total de 3744 placas.

**Tabla 21 Placas de la celda de flujo**

Componente de la celda de flujo	SP	S1	S2	S4	Descripción
Carriles	2	2	2	4	Un carril es un canal físico con puertos de entrada y salida.
Superficies	1	2	2	2	Las celdas de flujo S1, S2 y S4 se adquieren en dos superficies: la superior y la inferior. En primer lugar, se adquieren imágenes de la superficie superior de una placa. La celda de flujo de flujo SP se adquiere solo en la superficie inferior.
Sectores por carril	2	2	4	6	Un sector es una columna del carril de una celda de flujo que la cámara captura como una imagen.
Placas por sector	78	78	88	78	Una placa es una porción de un sector y describe un área de la celda de flujo cuya imagen se ha adquirido.
Total de placas generadas	312	624	1408	3744	Carriles × superficies × sectores × placas por cada sector equivale al número total de placas.

## Nomenclatura de placa

El nombre de la placa contiene un número de cinco dígitos que representa la posición de la placa en la celda de flujo. Por ejemplo, el nombre de placa

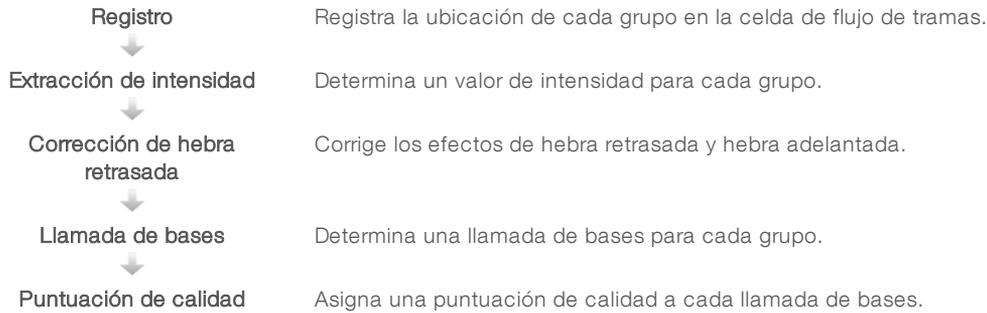
1\_1205 indica la superficie superior de carril 1, el sector 2 y la placa 5.

- ▶ El primer dígito es el número de carril:
  - ▶ 1 o 2 para una celda de flujo SP, S1 o S2.
  - ▶ 1, 2, 3 o 4 para una celda de flujo S4.
- ▶ El segundo dígito representa la superficie: 1 para la parte superior o 2 para la inferior.
 

Para la celda de flujo SP, el segundo dígito siempre es 2, porque esta celda de flujo solo tiene superficie inferior.
- ▶ El tercer dígito representa el número de sector:
  - ▶ 1 o 2 para una celda de flujo SP o S1.
  - ▶ 1, 2, 3 o 4 para una celda de S2.

- ▶ 1, 2, 3, 4, 5 o 6 para una celda de flujo S4.
- ▶ Los dos últimos dígitos representan el número de placa. La numeración comienza por 01 en el extremo de salida de la celda de flujo hasta 88 o 78 en el extremo de entrada.
  - ▶ De 01 a 78 para una celda de flujo SP, S1 o S4.
  - ▶ De 01 a 88 para una celda de flujo S2.

## Flujo de trabajo de análisis en tiempo real



## Registro

El registro alinea una imagen con la matriz hexagonal de nanopocillos en la celda de flujo de tramas. Debido a la disposición ordenada de los nanopocillos, las coordenadas X e Y para cada grupo de una placa son predeterminadas. Las posiciones de los grupos se recopilan en un archivo de ubicación de grupos (s.locs) para cada experimento.

Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Utilice el Visor del análisis de secuenciación para identificar qué imágenes no se han podido registrar.

## Extracción de intensidad

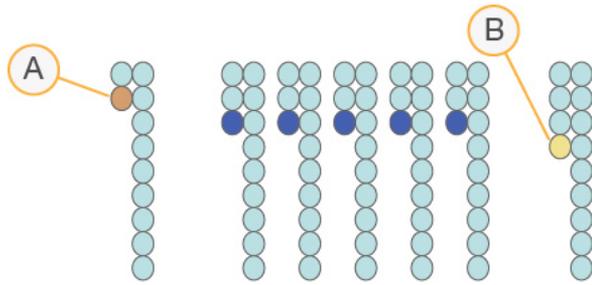
Tras el registro, la extracción de intensidad calcula un valor de intensidad para cada nanopocillo en una imagen determinada. Si el registro falla, no es posible extraer la intensidad para dicha placa.

## Corrección de hebra retrasada

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. Las hebras retrasadas y hebras adelantadas se producen cuando una cadena queda fuera de su lugar con respecto al ciclo de incorporación.

- ▶ La hebra retrasada se produce cuando una base se atrasa.
- ▶ La hebra adelantada se produce cuando una base se avanza.

**Figura 31** Hebra retrasada y hebra adelantada



- A Lectura con una base con hebra retrasada
- B Lectura con una base con hebra adelantada

RTA3 corrige los efectos de la hebra retrasada y adelantada, lo que aumenta al máximo la calidad de los datos en cada uno de los ciclos del experimento.

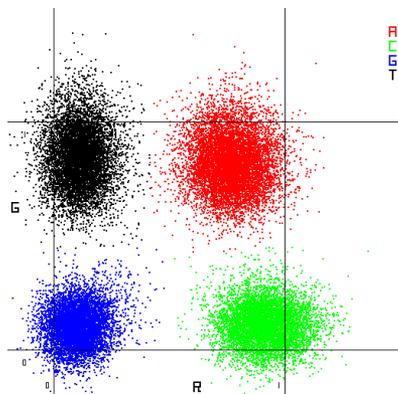
## Llamada de bases

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. El sistema de secuenciación NovaSeq 6000 utiliza secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos de cuatro bases de ADN, una del canal rojo y una del canal verde.

Una ausencia de llamada se identifica como N. La ausencia de llamadas se produce cuando un grupo no supera el filtro, el registro falla o se desplaza un grupo fuera de la imagen.

Las intensidades de cada grupo se extraen de la imagen roja y de la verde y se comparan una con otra, lo que produce cuatro poblaciones diferenciadas. Cada población se corresponde con una base. El proceso de llamada de bases determina a qué población pertenece cada grupo.

**Figura 32** Visualización de intensidades de grupos



**Tabla 22** Llamada de bases en secuenciación de dos canales

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
A	1 (encendido)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad en el canal rojo y verde.
C	1 (encendido)	0 (apagado)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal rojo.

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
G	0 (apagado)	0 (apagado)	Grupos que no presentan intensidad en una ubicación de grupos conocida.
T	0 (apagado)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal verde.

## Grupos que superan el filtro

Durante el experimento, RTA3 filtra incidencias para eliminar las lecturas que no satisfagan el umbral de calidad de los datos. Los grupos que se solapan o de baja calidad se eliminan.

En el caso del análisis de dos canales, RTA3 utiliza un sistema basado en la población para determinar la castidad (medición de pureza de la intensidad) de una llamada de bases. Los grupos superan el filtro (PF) cuando solo una llamada de bases de los primeros 25 ciclos tiene un valor de castidad inferior al umbral fijado. La alineación de PhiX se lleva a cabo en el ciclo 26 en un subconjunto de placas de grupos que superan el filtro. Los grupos que no superan el filtro no se alinean ni se realiza en ellos la llamada de bases.

## Puntuaciones de calidad

Una puntuación de calidad (puntuación Q) es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que la llamada de bases tiene una calidad mayor y es más probable que sea correcta. Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en archivos de llamada de bases (\*.cbcl).

La puntuación Q comunica brevemente pequeñas probabilidades de error. Las puntuaciones de calidad se representan como Q(X), donde X es la puntuación. En la siguiente tabla, figura la relación entre una puntuación de calidad y la probabilidad de error.

Puntuación Q, Q(X)	Probabilidad de error
Q40	0,0001 (1 entre 10 000)
Q30	0,001 (1 entre 1000)
Q20	0,01 (1 entre 100)
Q10	0,1 (1 entre 10)

## Puntuación de calidad y elaboración de informes

Para la puntuación de calidad, se calcula un conjunto de predictores para cada llamada de bases y, a continuación, se utilizan los valores de los predictores para determinar la puntuación Q en la tabla de calidad. Las tablas de calidad se crean para proporcionar predicciones de calidad con una precisión óptima de experimentos generados mediante una configuración específica de la plataforma de secuenciación y una versión de composición química concreta.



### NOTA

La puntuación de calidad se basa en una versión modificada del algoritmo Phred.

RTA3 asigna a cada llamada de bases una de las tres puntuaciones de calidad según su grado de confianza. El modelo de elaboración de informes de puntuaciones de calidad (puntuaciones Q) reduce los requisitos de espacio de almacenamiento y ancho de banda sin detrimento de la precisión o el rendimiento.

Para obtener información acerca de la puntuación de calidad, consulte *Puntuaciones de calidad del sistema NovaSeq™ 6000 y software RTA3 (n.º de publicación 770-2017-010)*.

# Apéndice C Archivos y carpetas de resultados

Estructura de carpetas de resultados de secuenciación .....	77
Archivos de resultados de secuenciación .....	78

## Estructura de carpetas de resultados de secuenciación

El NVCS genera el nombre de la carpeta de resultados de forma automática.

 **Config** (Configuración): Parámetros de configuración del experimento.

 **Logs** (Registros): Archivos de registro que describen los pasos operativos, los análisis del instrumento y los eventos de RTA3.

 **Data** (Datos)

 **Intensities** (Intensidades)

 **BaseCalls** (Llamada de bases)

 **LOO[X]**: Archivos de llamada de bases (\*.cbcl) agregados en un archivo por carril, superficie y ciclo.

 s.locs: El archivo de ubicaciones de grupo para el experimento.

 **InterOp**: Archivos binarios utilizados por Sequencing Analysis Viewer.

 **Recipe** (Fórmula): Archivo de la fórmula específico del experimento.

 **Thumbnail Images** (Imágenes en miniatura): Imágenes en miniatura cada 10 placas.

 **LIMS**: El archivo de configuración del experimento (\*.json), si procede.

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 Samplesheet.csv: Hoja de muestras u otro archivo adjunto, si procede.

 SequenceComplete.txt

## Archivos de resultados de secuenciación

Tipos de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos de llamada de bases	<p>Cada grupo analizado se incluye en un archivo de llamadas de bases, agregado en un archivo para cada ciclo, carril y superficie. El archivo agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada para cada grupo. Los archivos de llamada de bases se utilizan con BaseSpace Sequence Hub o bcl2fastq2.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1  <b>L[carril]_[superficie].cbcl</b>, por ejemplo, L001_1.cbcl</p>
Archivos de ubicación de grupos	<p>Para cada celda de flujo, un archivo binario de ubicación de grupos contiene las coordenadas X e Y para los grupos en una placa. Una disposición hexagonal que coincide con la disposición de nanopocillos de la celda de flujo define previamente las coordenadas.</p> <p>Data\Intensities  <b>s_[carril].locs</b></p>
Archivos de filtro	<p>El archivo de filtro especifica si los grupos han superado los filtros. Estos archivos se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos. Para cada placa, se genera un archivo de filtro.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001  <b>s_[carril]_[placa].filter</b></p>
Archivos InterOp	<p>Archivos binarios de informes utilizados por el Visor del análisis de secuenciación. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento.</p> <p>Carpeta <b>InterOp</b></p>
Archivo de información del experimento	<p>Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si la lectura es una Lectura del índice, y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento.</p> <p>[Carpeta raíz], <b>RunInfo.xml</b></p>
Archivos de vistas en miniatura	<p>Si se activa, aparece una imagen en miniatura cada 10 placas en cada canal de color (rojo y verde).</p> <p>Thumbnail_Images\L001\C[X.1]: Los archivos se almacenan en una subcarpeta para cada ciclo.  <b>s_[carril]_[placa]_[canal].jpg</b>: La imagen en miniatura incluye el número de placa.</p>

# Apéndice D Seguridad de Windows

Configuraciones de seguridad .....	79
Requisitos de las contraseñas .....	79
Cortafuegos de Windows .....	79
Kit de herramientas de experiencia mejorada de migración .....	79
Directivas de restricción de software .....	80

## Configuraciones de seguridad

El sistema operativo Windows que se ejecuta en el ordenador de control incluye configuraciones de seguridad que evitan que se ejecute software no deseado. La información de este apéndice describe las configuraciones y cómo personalizarlas para que satisfagan sus necesidades.

En circunstancias normales no es necesario cambiar las configuraciones de seguridad predeterminadas. Si es necesario, asegúrese de que un administrador experimentado gestione el cambio después de haber hecho una planificación cuidadosa.



### PRECAUCIÓN

Dado que estas configuraciones afectan al rendimiento y puede poner en riesgo la seguridad, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina cuando no quede claro si hay que editar un ajuste o se desconoce su impacto.

## Requisitos de las contraseñas

La siguiente tabla identifica las políticas de contraseñas necesarias para el ordenador de control. El software solicita que se cambie la contraseña la primera vez que se inicia sesión.

Tabla 23 Políticas de contraseña predeterminadas

Política	Ajusta de seguridad
Aplicar historial de contraseñas	Se recuerdan cinco contraseñas
Edad máxima de la contraseña	180 días
Edad mínima de la contraseña	0 días
Longitud mínima de la contraseña	10 caracteres
La contraseña debe cumplir los requisitos de complejidad	Desactivado
Guardar las contraseñas con cifrado reversible	Desactivado

## Cortafuegos de Windows

El cortafuegos de Windows protege el ordenador de control al filtrar el tráfico entrante a fin de eliminar las posibles amenazas. El cortafuegos está habilitado de forma predeterminada para bloquear todas las conexiones entrantes. Mantenga el cortafuegos habilitado y permita todas las conexiones salientes. Para obtener más información sobre las conexiones salientes, consulte la *Guía de preparación del centro para la serie NovaSeq* (n.º de documento 100000019360).

## Kit de herramientas de experiencia mejorada de migración

El Kit de herramientas de experiencia mejorada de migración (EMET, por sus siglas en inglés) evita la explotación de las vulnerabilidades del software; y proporciona la función Certificate Trust (Certificado de confianza) que detecta y detiene ataques que utilizan certificados maliciosos.

## Directivas de restricción de software

Las Directivas de restricción de software (SRP) de Windows utilizan reglas para permitir que se ejecute únicamente el software especificado. Para NovaSeq 6000, las reglas SRP se basan en certificados, nombres y extensiones de archivos y directorios.

De manera predeterminada, las SRP se activan para evitar que se ejecute software no deseado en el ordenador de control. Un representante de TI o un administrador del sistema puede añadir y quitar reglas para personalizar el nivel de seguridad. Si el sistema se añade a un dominio, el Objeto de directiva de grupo (GPO) local puede modificar automáticamente las reglas y desactivar las SRP.



### PRECAUCIÓN

Si se desactiva la directiva de restricción de software, se anula la protección que proporciona. Si se cambian las reglas, se anulan las protecciones predeterminadas.

## Reglas SRP permitidas

En el sistema de secuenciación NovaSeq 6000, se establecen de manera predeterminada las SRP para permitir las siguientes reglas.

#### Certificado

DigitalSystems  
Illumina, Inc.  
NovaSeq

#### Archivos ejecutables

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

#### Extensiones de archivo

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

#### Directorios

%HKEY\_LOCAL\_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%  
%HKEY\_LOCAL\_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows NT\CurrentVersion\SystemRoot%  
C:\CrashDumps\\*

#### Directorios

C:\Illumina\  
C:\Illumina Maintenance Logs\  
C:\LocalSymbols\  
C:\Archivos de programa (x86)\Chromium\Application\  
C:\Archivos de programa (x86)\EMET 5.5\  
C:\Archivos de programa (x86)\Illumina\  
C:\Archivos de programa (x86)\Internet Explorer\  
C:\Archivos de programa (x86)\LibreOffice 5\  
C:\Archivos de programa\Illumina\  
C:\ProgramData\Illumina\  
C:\ProgramData\Package Cache\  
C:\Usuarios\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix\  
C:\Usuarios\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs\  
C:\Usuarios\sbsuser\Desktop\FSE cambiar a customer.bat  
D:\Illumina\

## Añadir y quitar reglas SRP

Añada y quite reglas SRP para personalizar la seguridad del sistema. Para modificar las reglas hay que desactivar temporalmente las SRP.



### PRECAUCIÓN

La desactivación de las SRP omite las protecciones predeterminadas.

- 1 Inicie sesión en el sistema operativo.
  - 2 Desactive las SRP:
    - a Vaya al directorio C:\Illumina\Security.
    - b Haga doble clic en **Disable.reg**.
    - c Seleccione **Yes** (Sí) para confirmar los cambios.
- Si utiliza la interfaz de la pantalla táctil, tocar y mantener pulsado el botón durante unos dos segundos equivale a un clic con el botón derecho del ratón.
- 3 Seleccione **Start** (Iniciar) y, a continuación, **Run** (Experimento).
  - 4 En el campo Open (Abrir), introduzca **secpol.msc**.
  - 5 En el cuadro de diálogo Local Security Policy (Directiva de seguridad local), expanda **Software Restriction Policies** (Directivas de restricción de software) y, a continuación, seleccione **Additional Rules** (Reglas adicionales).
  - 6 Para añadir una regla:
    - a En el menú Action (Acción), seleccione **New Path Rule** (Nueva regla de ruta).
    - b En el campo Path (Ruta), introduzca el certificado, el nombre del archivo, la extensión del archivo o el directorio que desee permitir.
    - c En la lista Security level (Nivel de seguridad), seleccione **Unrestricted** (Sin restricciones).
    - d **[Opcional]** En el campo Description (Descripción), escriba el motivo para crear la regla.
    - e Seleccione **OK** (Aceptar) para añadir la regla.

- 7 Para eliminar una regla:
  - a Seleccione la regla que desee eliminar y, a continuación, seleccione **Delete** (Eliminar).
  - b Seleccione **Yes** (Sí) para confirmar la eliminación.
- 8 Cierre el cuadro de diálogo Local Security Policy (Directiva de seguridad local).
- 9 Vuelva a activar las SRP **de inmediato**:
  - a Vaya al directorio C:\Illumina\Security.
  - b Haga doble clic en **Enable.reg**.
- 10 Si se modificaron por primera vez las reglas SRP, cierre sesión y vuelva a iniciar sesión para que estas se hagan efectivas.

# Índice alfabético

## %

% de PF 30, 39, 76

## A

abrazaderas, celda de flujo 6  
actividades posteriores al experimento 60  
adquisición de imágenes 2, 13, 72-73  
advertencias 8  
agrupación de bibliotecas 34, 43  
agrupación, calculadora 34, 43  
ajustes de seguridad 79  
ajustes del experimento 21  
ajustes, seguridad 79  
algoritmo Phred 76  
alimentación 20  
alineación, error 67  
almacenamiento 12  
almacenamiento de bibliotecas 36, 46  
almacenamiento de datos 54  
almacenamiento de kits de reactivos 12, 16  
amplificación 2  
análisis 26  
análisis en tiempo real 1, 8  
apagado 70  
apilamiento de cartuchos 15  
aplicaciones 1  
arañazos, celdas de flujo 46, 51  
archivos  
    específicos del experimento 67  
archivos CBCL 3, 58, 76  
archivos de filtro 72, 78  
archivos de llamada de bases 72, 78  
archivos de registro 67, 72  
archivos InterOp 8, 67, 72, 78  
asistencia técnica 87  
ausencia de llamadas 74-75  
ayuda 67  
    agrupación de bibliotecas 34, 43  
    asistencia técnica 87  
    documentación 2

## B

bandeja para gotas 68  
baños de agua 31, 40  
barra de estado 5, 70  
barra de luz 5, 70

BaseSpace Enterprise 26  
BaseSpace Sequence Hub 1, 26  
    asistencia 3  
    conexión y desconexión 54  
bcl2fastq2 26, 72  
bibliotecas  
    almacenamiento 36, 46, 70  
    control de calidad 30, 39  
    cuantificación 30, 39  
    dilución 36, 46  
boletines de asistencia 67  
burbujas 49

## C

Calculadora de agrupación 34, 43  
calidad de datos 76  
cámaras 1, 6, 73  
canal rojo 75  
canal verde 75  
carpeta de configuración del experimento 21-23  
carpeta de resultados 21-22  
carpeta de salida 21  
carriles 13, 73  
carriles direccionables de manera individual 4  
carriles direccionales individualmente 16  
cartucho de grupo 13  
cartucho de tampones 54, 64  
cartuchos  
    apilamiento 15  
cartuchos de lavado 61-62, 64  
cartuchos de reactivos 12  
    almacenamiento 69  
    descarga 53  
    etiquetado 11, 14  
    preparación 31, 40  
CE 9, 72  
cebadores personalizados 2, 15, 55  
celdas de flujo  
    almacenamiento 12, 46  
    arañazos 46, 51  
    especificaciones 11  
    etiquetado 11  
    limpieza 46, 51  
celdas de flujo de cuatro carriles 13  
celdas de flujo de dos carriles 13  
celdas de flujo de tramas 1, 13  
Certificate Trust 79  
ciclos de secuenciación 58  
código de lote 17

- colores de los diagramas 57
- compartimento de líquidos 14
- compartimento de tampones 54
- compartimentos 5
- componentes del kit 28
- comprobaciones automatizadas 67
- comprobaciones previas al experimento 67
- concentración de carga 2, 30, 39
- condiciones de almacenamiento 17
- conectividad del sistema 67
- conexiones entrantes 79
- conexiones salientes 79
- configuración de ajustes 21
- configuración de LIMS 22
- configuración predeterminada 21, 26
- configuraciones del kit 11
- consumibles
  - agua de laboratorio 29
  - descarga 59-60, 65
  - dilución y desnaturalización 27
  - embalaje 17
  - lavados de mantenimiento 61
- consumibles de secuenciación 27
- contaminación cruzada 7, 60
- control de calidad 30, 39
- conversión a FASTQ 26, 72
- cortafuegos 79
- cuantificación 30, 39
- cuenta de administrador 81

## D

- datos de estado 21-22
- datos de rendimiento del instrumento 21-22
- desbordamiento 32, 41, 68
- descarga de cartuchos de reactivos 53
- desecho de reactivos utilizados 7
- desnaturalización, reactivos 36
- desplazamiento de instrumentos 70
- diagnóstico 6
- dilución de bibliotecas 36, 46
- dilución de hidróxido sódico 36, 45
- diluyentes 36, 45
- directrices para el agua de laboratorio 29
- disco duro 9, 21-22, 59
- distribuidores de NovaSeq Xp 46
  - almacenamiento 16
- documentación 2, 87
- documentación técnica 76
- dominio, BaseSpace Sequence Hub 26

- duraciones
  - experimento de secuenciación 57
  - generación de grupos 58
  - lavado automático posterior al experimento 60
  - lavado de mantenimiento 61

## E

- eliminación de formamida 15, 59
- EMET 79
- encendido 20
- enriquecer, PhiX 35, 45
- errores 8, 67
  - probabilidad 76
- espacio en disco 9, 67
- especificaciones 11
- especificaciones del congelador 29
- especificaciones del refrigerador 29
- etiquetas, componentes del kit 11
- ExAmp Master Mix 2
- experimentos
  - duración 57
  - eliminación 9
  - escalonamiento 58
  - métricas 72
  - puesta en pausa 58
  - supervisión 26, 54
- experimentos de lectura individual 55
- experimentos de secuenciación
  - eliminación 59

## F

- fabricante 17
- fallos de registro 74
- fechas de caducidad 17
- filtrado de grupos 76
- filtro de castidad 76
- flujo de trabajo 24
- flujo de trabajo de NovaSeq Xp 24
- flujo de trabajo Standard 24
- formación en línea 2
- formato de la hoja de muestras 26

## G

- generación de grupos, duración 58
- generación de plantillas 74
- GPO 80

gradillas de descongelación 31, 40  
gradillas de rejilla 31, 40  
grupos que superan el filtro 30, 39, 57  
guantes, cambio 32, 41, 64  
guardado de cartuchos de reactivos 69  
guardado de tubos de bibliotecas 70

## H

hebra retrasada y hebra adelantada 74  
hidróxido sódico, dilución 36, 45  
hipoclorito sódico 60, 62  
hojas de datos de seguridad 7  
hojas de muestras 26, 54-55

## I

iconos 9, 17  
iconos parpadeantes 8  
imágenes 72  
inicialización 20  
intensidades de grupos 74  
introducción de pocillos 16

## J

juntas 13, 46, 51  
juntas, desbordamiento 49

## L

lavados  
  celda de flujo 61  
  duración 60-61  
  frecuencia 61  
lavados de mantenimiento  
  consumibles 27, 61  
  solución de lavado 62  
lectura 2  
lecturas del índice 55  
lecturas, número 11  
LIMS 1, 21  
LIMS de terceros 23  
lista blanca, SRP 80

## M

mantenimiento preventivo 61  
métodos de análisis 3  
métrica 57

mezcla maestra de ExAmp 49  
miniaturas 78  
modos 11  
modos del experimento 21  
motor informático 9, 59, 72

## N

nanopocillos 74  
NaOCl 60, 62  
nombre de carpeta de resultados 77  
normalización 33, 43  
NovaSeq Xp, definición 4  
nucleótidos 75  
numeración de carriles 16, 49  
numeración de placas 73  
numeración de pocillos 49  
numeración de superficies 73  
numeración, pocillos 16  
número de ciclos 55, 58  
números de catálogo 11  
  consumibles suministrados por el usuario 27  
números de lote 17  
números de referencia 17

## O

objetivo de alineación óptica 6, 51  
Objeto de directiva de grupo 80  
óptica 5  
ordenador de control 79

## P

páginas de asistencia 67  
pantalla de secuenciación 57  
paquete de software 8  
parámetros del experimento 23  
parpadeo, iconos 8  
pasos de secuenciación 2  
pausa de experimentos 58  
pérdidas 68  
PhiX  
  alineación 72  
  enriquecer 35, 45  
  números de catálogo 27  
pipetas 29  
placas 2, 13, 72  
plataforma 46, 51  
  componentes 17

- plataforma NovaSeq Xp 46, 51
- platina de la celda de flujo 6, 51
- plexicidad 33, 43
- pocillos del distribuidor de NovaSeq Xp,
  - numeración 16
- políticas de contraseñas 79
- posición n.º 30 59, 64
- posiciones del dispensador 60, 65
- preparación del centro 2, 79
- privilegios, cuenta de administrador 81
- problemas de fluídica 68
- problemas técnicos, asistencia al cliente 87
- Process Management 58
- proveedores 27
- puertos USB 5
- puntuaciones Q 57, 76

## R

- reactivos de desnaturalización 45
- reactivos DPX, almacenamiento 16
- reactivos ExAmp 13, 48
  - almacenamiento 16
  - descongelación 42
  - métodos de mezcla 4
- reactivos utilizados 7, 32, 41, 53
- reactivos, refrigerador 7
- reanudación
  - lectura 1 70
- reanudación de experimentos 70
- refrigerador 7
- registros de errores 72
- rehibridación 23
- reinicio tras apagado 70
- rendimiento 57
- reubicación del instrumento 70
- RFID 12, 67
- RunInfo.xml 67, 78

## S

- sectores 2, 13, 73
- secuenciación de dos canales 2, 75
- seguimiento de muestras 15
- seguridad 80
  - personalización 81
- sensores 6, 64, 67
- Servicio de copia universal 8-9, 58
- Servicio de supervisión proactiva de Illumina 22
- sistema de fluídica 7, 62
- sistema operativo 20, 79

- sitio web, asistencia 67
- software de control 8
- solución de lavado 14
- soporte de la celda de flujo 51
- soportes de tapones 32, 41
- SRP predeterminadas 80
- Standard, definición 4
- superan el filtro (PF) 76
- sustancias químicas peligrosas 7, 17

## T

- tablas de calidad 76
- tamaños de fragmentos 34, 44
- transferencia de datos 9, 59
- tubos de bibliotecas 15, 69
  - almacenamiento 12, 36, 70
  - almacenamiento en cartucho 69
- Tween 20 62

## U

- ubicaciones de alojamiento 26
- ubicaciones de grupos 72, 78

## V

- valores de intensidad 74
- Visor del análisis de secuenciación 72, 74
- volumen de carga 2

## W

- Windows
  - seguridad 80

# Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sitio web: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
Correo electrónico: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Números del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Regional
Norteamérica	+1.800.809.4566	
Alemania	+49 8001014940	+49 8938035677
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
España	+34 911899417	+34 800300143
Finlandia	+358 800918363	+358 974790110
Francia	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Japón	0800.111.5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nueva Zelanda	0800.451.650	
Países Bajos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapur	+1.800.579.2745	
Suecia	+46 850619671	+46 200883979
Suiza	+41 565800000	+41 800200442
Taiwán	00806651752	
Otros países	+44.1799.534000	

**Hojas de datos de seguridad (SDS):** Disponibles en el sitio web de Illumina, [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

**Documentación del producto:** Disponible para su descarga en formato PDF en el sitio web de Illumina. Vaya a [support.illumina.com](http://support.illumina.com), seleccione un producto y, a continuación, seleccione **Documentation & Literature** (Documentación y bibliografía).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 (EE. UU.)

+ 1 800 809 ILMN (4566)

+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Para uso exclusivo en investigación.  
Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.**

© 2019 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

**illumina®**