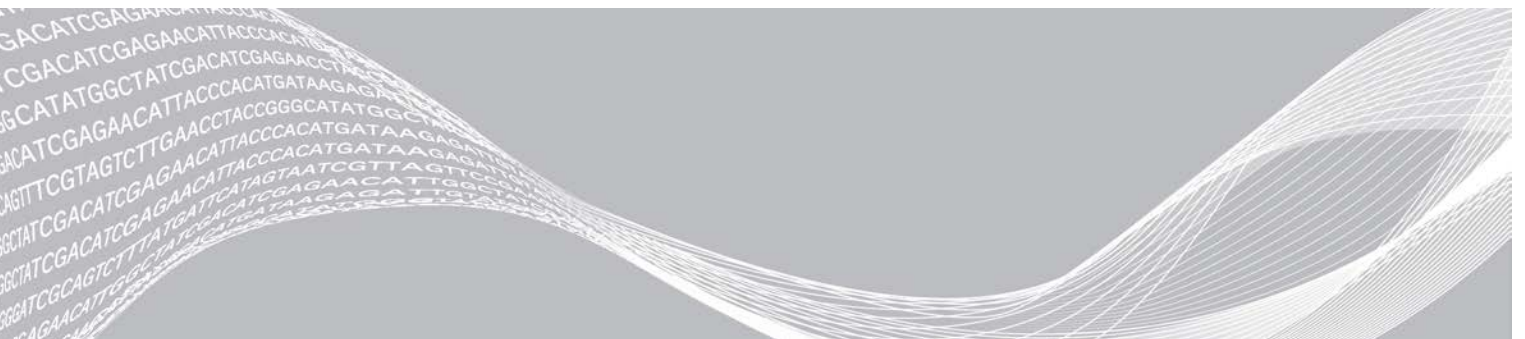


NovaSeq 6000

Guia do Sistema de Sequenciamento



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

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

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

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

© 2019 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

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

Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v11	Fevereiro de 2019	Atualizada a tabela Complexidade de pool de bibliotecas para o fluxo de trabalho do Xp.
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v10	Janeiro de 2019	Adicionadas informações da lâmina de fluxo SP. Atualizadas as tabelas de complexidade recomendada de pool de bibliotecas para os fluxos de trabalho Padrão e do Xp.
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v09	Novembro de 2018	Corrigido o link para a página de suporte do NovaSeq 6000. Corrigida advertência ausente.
Material n.º 20020483 Documento n.º 1000000019358 v08	Setembro de 2018	Adicionadas informações sobre o kit NovaSeq 6000 S4 (200 ciclos). Adicionadas informações sobre a conta de usuário. Adicionadas concentrações de carga de uma célula. Atualizadas as instruções para início escalonado de execuções. Atualizadas as instruções de acesso ao BaseSpace. Atualizadas as instruções de verificação antes da execução. Adicionadas notas sobre a exigência de confirmar desligamento ou reinicialização. Adicionada nota sobre limpeza após a execução incompleta. Esclarecidas as informações sobre limpeza de manutenção. Esclarecidas as informações sobre atualização de software.
Material n.º 20020483 Documento n.º 1000000019358 v07	Abril de 2018	Esclarecido o uso do tubo de bibliotecas para misturar reagentes na etapa de elevação antes do sequenciamento. Acrescentada uma tabela de descrições de símbolos para símbolos nos materiais de consumo ou na embalagem do material de consumo. Acrescentadas informações sobre o serviço de monitoramento Illumina Proactive na seção Run Setup Modes (Modos de configuração de execução). Acrescentadas informações sobre a API NovaSeq LIMS. Atualizadas as descrições de software sobre o NovaSeq Control Software v1.4.0 Atualizado o número típico de leituras que passam no filtro de lâminas de fluxo S2. Atualizadas as concentrações de carga recomendadas para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp. Atualizadas as instruções de abertura do pacote da lâmina de fluxo. Esclarecido o procedimento de carga de bibliotecas na lâmina de fluxo. Acrescentada uma nota sobre disponibilidade do instrumento para iniciar uma limpeza de manutenção. Acrescentadas informações sobre o cronômetro de contagem regressiva de início escalonado. Atualizadas as instruções sobre o modo de adicionar ou remover regras de SRP.

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000019358 v06	Fevereiro de 2018	<p>Acrescentada uma nota na seção Lâmina de fluxo para indicar que é necessária a versão 1.3.1 do software ao usar uma lâmina de fluxo S1. Atualizadas as descrições e o volume Padrão na tabela em <i>Métodos de carga de bibliotecas</i>.</p> <p>Acrescentado aviso de cuidado em <i>Componentes do kit de reagentes</i>. Acrescentados tubos de 0,5 e 1,5 ml, pontas de pipetas para pipetas de 20, 200, 1000 ul à tabela Materiais de consumo. Acrescentado um cilindro graduado à tabela Equipamento.</p> <p>Acrescentada a seção <i>Preparar a lâmina de fluxo</i> aos Capítulos 4 e 5, movidas as etapas do Capítulo 6 para essas seções.</p> <p>Atualizado o volume total da lâmina de fluxo S1 no Capítulo 4.</p> <p>Acrescentada a tabela Complexidade recomendada de pool de bibliotecas a <i>Criar um pool de bibliotecas normalizadas</i> no Capítulo 4.</p> <p>Atualizadas as etapas <i>Descongelar cartuchos de SBS e de cluster</i> nos Capítulos 4 e 5.</p> <p>Esclarecidas as instruções de descongelamento em <i>Preparar lâmina de fluxo</i>.</p> <p>Atualizadas as informações de descongelamento em <i>Concentrações de carga recomendadas no NovaSeq Xp</i>.</p> <p>Atualizada a tabela Complexidade recomendada de pool de bibliotecas em <i>Criar um pool de bibliotecas normalizadas</i> no Capítulo 5.</p> <p>Acrescentada uma frase especificando que a lâmina de fluxo deve ser usada em até 12 horas após a respectiva remoção da embalagem em <i>Resumo do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp</i> e <i>Preparar lâmina de fluxo</i>.</p>
Documento n.º 1000000019358 v05	Dezembro de 2017	<p>Acrescentado esclarecimento sobre tubo vazio de biblioteca para Xp no diagrama do fluxo de trabalho de sequenciamento.</p> <p>Em <i>Desnaturar biblioteca</i> e opção de controle PhiX para o fluxo de trabalho Padrão, foram atualizados os volumes Tris-HCl na tabela para a etapa 5.</p> <p>Em <i>Preparar a mistura master de ExAmp</i> para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, foi acrescentada uma nota após a etapa 4 para indicar que é necessário agitar para obter os melhores resultados.</p> <p>Em <i>Carregar bibliotecas na lâmina de fluxo</i> para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, foi acrescentado um lembrete após a etapa 3 para carregar as amostras lentamente.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v04	Outubro de 2017	<p>Acrescentada uma carga de cavidade individual à lista de recursos do instrumento.</p> <p>Materiais de consumo - acrescentado o kit NovaSeq Xp de 2 cavidades e o kit NovaSeq Xp de 4 cavidades. Acrescentado o conjunto do coletor NovaSeq Xp de 2 cavidades e o conjunto do coletor NovaSeq de 4 cavidades.</p> <p>Equipamento - acrescentadas a plataforma de lâmina de fluxo NovaSeq Xp e a pipeta P200 para fluxo de trabalho do NovaSeq Xp.</p> <p>Acrescentado um capítulo Preparação de materiais de consumo para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp.</p> <p>Movidos os frascos de reagentes vazios usados do capítulo Sequenciamento para o início dos capítulos Fluxo de trabalho do NovaSeq Padrão e Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp.</p> <p>Atualizada a tabela Concentração de bibliotecas em pool e a tabela Concentração de carga recomendada para o fluxo de trabalho Padrão.</p>
Material n.º 20020483 Documento n.º 1000000019358 v03	Setembro de 2017	<p>Descrições atualizadas do NovaSeq Control Software v1.2, que contém suporte para as lâminas de fluxo S1 e S4.</p> <p>Acrescentados requisitos de espaço em disco para uma execução de lâmina de fluxo dupla com lâminas de fluxo S1 e S4.</p> <p>Especificado o requisito de nomenclatura para determinados arquivos *.json.</p> <p>Reorganizadas as informações sobre a visão geral do kit no capítulo <i>Kits e acessórios</i>. Este capítulo trata de configurações, componentes e identificação de compatibilidade para os kits de reagentes e de carga de bibliotecas.</p> <p>Acrescentado o kit de reagentes NovaSeq 6000 aos materiais de consumo fornecidos pelo usuário.</p> <p>Atualizadas as instruções para agrupar e desnaturar biblioteca para conter informações de lâminas de fluxo S1 e S4.</p> <p>Atualizadas as instruções de descongelamento de cartuchos de reagente para exigir um banho-maria de 2 horas para S1 e S2 e um banho-maria de quatro horas para S4.</p> <p>Atualizadas as descrições do tubo de biblioteca, cartuchos de reagente e lâminas de fluxo para incluir componentes S4.</p> <p>Acrescentada uma seção sobre atualizações automáticas de software no capítulo Manutenção.</p> <p>Substituída a referência a <i>Redução do espaço ocupado para armazenamento de dados de genoma completo (Pub. n.º 970-2012-013)</i> com a <i>comparação de qualidade de dados da série NovaSeq e HiSeq X Ten (Pub. n.º 770-2017-010)</i>.</p> <p>Acrescentada uma nota à etapa 3 em <i>Digital parâmetros de execução</i> no Capítulo 6.</p> <p>Atualizada a seção <i>Blocos da lâmina de fluxo</i> para incluir informações de blocos S1 e S4.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20018871 Documento n.º 1000000019358 v02	Abril de 2017	<p>Foram adicionadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Materiais de consumo fornecidos pela Illumina necessários para uma execução. • Condições de armazenamento dos componentes do kit de reagentes. • Recomendações para a concentração de carga da biblioteca. • Diluição de NaOH para duas lâminas de fluxo. • Etapa para deixar a lâmina de fluxo em temperatura ambiente antes de carregar. • Etapa de troca de luvas após esvaziar os frascos de reagentes usados. • Configuração da saída do LIMS para sistemas LIMS de terceiros. • Convenção de nomenclatura para planilhas de amostras. • Ícones de gestão de processos e solução de problemas. • Apêndice contendo os recursos de segurança do Windows e instruções de configuração. • Informações de contato para assistência técnica. <p>Tempo de descongelamento do cartucho de reagente aumentado para 4 horas.</p> <p>Atualização das instruções de spike-in de PhiX para mudar o volume de spike-in de 1% de PhiX para 0,9 µl e usar 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5 para diluir 10 nM de PhiX.</p> <p>Atualização das instruções para limpar a lâmina de fluxo e o estágio da lâmina de fluxo apenas quando partículas estiverem visíveis.</p> <p>Atualização da frequência de limpeza de manutenção para a cada 14 dias.</p> <p>Reorganização e consolidação das instruções sobre a preparação de materiais de consumo para melhorar a continuidade.</p> <p>Renomeação das portas francesas para as portas do compartimento de líquidos.</p>
Material n.º 20018406 Documento n.º 1000000019358 v01	Março de 2017	Correção do nome de uma coluna na tela Process Management (Gestão de processos) para Sequencing (Sequenciamento).
Material n.º 20015871 Documento n.º 1000000019358 v00	Fevereiro de 2017	Versão inicial.

Índice

Capítulo 1 Visão geral	1
Introdução	1
Recursos adicionais	2
Visão geral do sequenciamento	2
Fluxo de trabalho de sequenciamento	3
Componentes do instrumento	5
Capítulo 2 Kits e acessórios	11
Visão geral dos kits	11
Componentes do kit de reagentes	12
Componentes do kit NovaSeq Xp	16
Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp	17
Descrições dos símbolos	18
Capítulo 3 Introdução	20
Iniciar o instrumento	20
Definir configurações	21
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	26
Capítulo 4 Fluxo de trabalho Padrão: preparação de materiais de consumo ..	30
Métodos	30
Orientações da biblioteca	30
Descongelar os cartuchos de SBS e de cluster	31
Esvaziar frascos de reagente usados	32
Preparar lâmina de fluxo	33
Agrupar e desnaturar as bibliotecas para o sequenciamento	33
Capítulo 5 Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp: preparação de materiais de consumo	38
Resumo do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp	38
Métodos	39
Orientações da biblioteca	39
Descongelar os cartuchos de SBS e de cluster	40
Esvaziar frascos de reagente usados	41
Preparar lâmina de fluxo	42
Agrupar, desnaturar e carregar bibliotecas para o sequenciamento	42
Capítulo 6 Sequenciamento	51
Configurar uma execução de sequenciamento	51
Monitorar o andamento da execução	57
Início escalonado de execuções	58
Excluir a execução	59
Remover a posição n.º 30	59

Limpeza automática após a execução	60
Capítulo 7 Manutenção	61
Manutenção preventiva	61
Realizar uma limpeza de manutenção	61
Atualizações de software	65
Apêndice A Solução de problemas	67
Recursos de solução de problemas	67
Arquivos de solução de problemas	67
Erros da verificação antes da execução	67
Solução de problemas de gestão de processos	68
Falha de execução antes da clusterização	69
Encerrar uma execução	70
Desligar o instrumento	70
Apêndice B Real-Time Analysis	71
Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	71
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	73
Apêndice C Arquivos e pastas de saída	76
Estrutura da pasta de saída de sequenciamento	76
Arquivos de saída de sequenciamento	77
Apêndice D Segurança do Windows	78
Configurações de segurança	78
Requisitos da senha	78
Firewall do Windows	78
Kit de Ferramentas Aprimorado da Experiência de Mitigação	78
Políticas de restrição de software	79
Índice	82
Assistência técnica	87

Capítulo 1 Visão geral

Introdução	1
Recursos adicionais	2
Visão geral do sequenciamento	2
Fluxo de trabalho de sequenciamento	3
Componentes do instrumento	5

Introdução

O Sistema de sequenciamento NovaSeq™ 6000 Illumina® reúne rendimento escalável e tecnologia de sequenciamento flexível em uma plataforma em escala de produção com a eficiência e o custo-benefício de um sistema de mesa.

Recursos

- ▶ **Sequenciamento escalável:** o NovaSeq 6000 aumenta a escala até o sequenciamento em nível de produção com dados de alta qualidade para uma ampla gama de aplicações.
- ▶ **Produção ajustável:** o NovaSeq 6000 é um sistema de lâmina de fluxo dupla com uma faixa de saída ampla. Sequencie uma lâmina de fluxo ou duas lâminas de fluxo com diferentes comprimentos de leitura simultaneamente. Misture e combine três tipos de lâminas de fluxo e diversos tamanhos de leitura.
- ▶ **Lâmina de fluxo em padrão:** uma lâmina de fluxo em padrão gera clusters com pouco espaçamento. O espaçamento reduzido entre nanowells aumenta a densidade de cluster e a saída de dados.
- ▶ **Mistura de ExAmp dentro do aparelho:** o NovaSeq 6000 mistura os reagentes ExAmp com a biblioteca, amplifica a biblioteca e realiza a clusterização para um fluxo de trabalho simplificado de sequenciamento.
- ▶ **Carregamento de cavidades individuais:** a plataforma de lâmina de fluxo NovaSeq Xp permite o pré-carregamento de bibliotecas em cavidades individuais da lâmina de fluxo e reduz o volume de carregamento da biblioteca.
- ▶ **Leitura de linha de alto rendimento:** o NovaSeq 6000 usa uma câmera com tecnologia de leitura bidirecional para captar rapidamente a imagem da lâmina de fluxo em dois canais de cores simultaneamente.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA):** o NovaSeq 6000 usa uma implementação do RTA chamada RTA3. Esse software integrado analisa imagens e identifica bases.
- ▶ **Integração com o BaseSpace™ Sequence Hub:** o fluxo de trabalho de sequenciamento é integrado com o BaseSpace Sequence Hub, o ambiente de computação genômica da Illumina para análise de dados, armazenamento e colaboração. Conforme ocorre a execução, os arquivos de saída são transmitidos para o ambiente em tempo real.
- ▶ **Pronto para o BaseSpace Clarity LIMS:** aumente a eficiência operacional com rastreamento de todo o processo de amostras e reagentes, fluxos de trabalho automatizados e operação integrada de instrumentos.

Recursos adicionais

As [páginas de suporte do Sistema de sequenciamento NovaSeq 6000](#) do site do Illumina fornecem recursos adicionais do sistema. Esses recursos abrangem software, treinamento, produtos compatíveis e a documentação abaixo. Verifique sempre as páginas de suporte quanto às versões mais recentes.

Recurso	Descrição
Seletor de protocolo personalizado	Um assistente para gerar documentação personalizada de todo o processo, que é adaptado ao método de preparação de biblioteca, aos parâmetros de execução e ao método de análise utilizado para a execução de sequenciamento.
<i>Guia de preparação do local da série NovaSeq (documento n.º 1000000019360)</i>	Fornecer especificações para a área do laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais e de rede.
<i>Guia de conformidade e segurança da série NovaSeq (documento n.º 1000000019357)</i>	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e rotulagem de instrumentos.
<i>Guia de conformidade do Leitor RFID (documento n.º 1000000002699)</i>	Fornecer informações sobre o leitor RFID no instrumento, incluindo certificações de conformidade e considerações de segurança.
<i>Guia de primers personalizados da série NovaSeq (documento n.º 1000000022266)</i>	Fornecer informações sobre a substituição de primers de sequenciamento da Illumina por primers de sequenciamento personalizados.

Visão geral do sequenciamento

Clusterização

Durante a clusterização, moléculas de DNA simples são ligadas à superfície da lâmina de fluxo e amplificadas simultaneamente para formar clusters. Para o fluxo de trabalho Padrão, a mistura master de ExAmp é misturada com as bibliotecas dentro do aparelho do instrumento antes da clusterização. Para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, os reagentes e bibliotecas de ExAmp são misturados e distribuídos à lâmina de fluxo fora do instrumento. Os volumes variam conforme o tipo da lâmina de fluxo e o fluxo de trabalho.

Sequenciamento

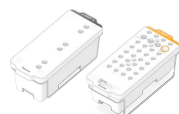
Os clusters têm a imagem capturada por meio da leitura bidirecional e da química de sequenciamento de dois canais. A câmera utiliza sensores que detectam luzes vermelhas e verdes para gerar imagens de cada feixe e, simultaneamente, gerar imagens em vermelho e verde de todo o feixe. Depois da geração de imagem, a identificação de base é feita para os clusters dentro de cada bloco na proporção do sinal vermelho para verde para cada cluster, que é baseado no local determinado pela lâmina de fluxo padronizada. Esse processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento.

Análise

À medida que a execução ocorre, o NovaSeq Control Software (NVCS) transfere automaticamente os arquivos de identificação de bases (*.cbcl) para o local da pasta de saída especificada para análise de dados.

Vários métodos de análise estão disponíveis e dependem de sua aplicação. Para obter mais informações, acesse a [página de suporte do BaseSpace Sequence Hub no site da Illumina](#).

Fluxo de trabalho de sequenciamento



Descongele os cartuchos de reagentes de SBS e cluster.



Agrupe e desnature as bibliotecas. Para o fluxo de trabalho Padrão, adicione bibliotecas ao tubo da biblioteca. Para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, carregue a mistura de ExAmp/biblioteca na lâmina de fluxo. Para ambos os fluxos de trabalho, carregue o tubo da biblioteca no cartucho de cluster descongelado.



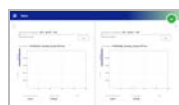
Na interface do software, selecione **Sequence** (Sequência) e especifique uma execução de lâmina de fluxo dupla ou simples.



Descarregue os materiais de consumo da execução anterior e carregue os novos materiais de consumo da execução atual.



Na tela Run Setup (Configuração de execução), especifique os parâmetros de execução. Se o BaseSpace Sequence Hub estiver configurado, acesse-o na tela Log In (Login). Após concluir as verificações antes da execução, a execução inicia automaticamente.



Monitore a execução na tela Sequence (Sequência), BaseSpace Sequence Hub se o monitoramento de execução estiver ativado, ou em um computador de rede com o Sequencing Analysis Viewer. Os dados são transferidos para a pasta de saída especificada.



Uma limpeza de instrumento começa automaticamente quando o sequenciamento é concluído.

Métodos de carregamento de bibliotecas

As bibliotecas são carregadas em uma lâmina de fluxo NovaSeq 6000 com o uso de um dos dois métodos seguintes, dependendo do fluxo de trabalho selecionado. A configuração de uma execução de sequenciamento varia conforme o fluxo de trabalho. Certifique-se de seguir sempre as instruções para seu método. Consulte *Fluxo de trabalho Padrão: preparação de materiais de consumo* na página 30 e *Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp: preparação de materiais de consumo* na página 38.

Tabela 1 Métodos de carregamento de bibliotecas

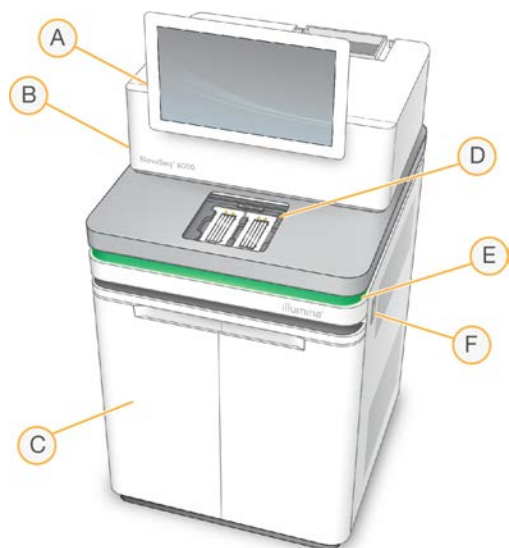
Fluxo de trabalho	Método de carregamento do pool de bibliotecas e de mistura de ExAmp	Endereçamento individual de cavidades e análise de dados	Volume de carregamento* Modos SP/S1–S2–S4 (µl)
Padrão	Um pool de biblioteca única é carregado no tubo de biblioteca, misturado dentro do aparelho no tubo de biblioteca com os reagentes ExAmp, e distribuído automaticamente à lâmina de fluxo para clusterização e sequenciamento. Uma etapa de elevação antes do sequenciamento usa reagentes no cartucho de cluster e o tubo de biblioteca para criar uma mistura de condicionamento que ajuda a aumentar a eficiência de clusterização.	Um pool de biblioteca única é distribuído e sequenciado em todas as cavidades da lâmina de fluxo. As leituras de todas as cavidades são analisadas juntas.	150–225–465 µl (toda a lâmina de fluxo)
NovaSeq Xp	Uma ou mais bibliotecas (o número corresponde ao número de cavidades da lâmina de fluxo) são misturadas manualmente com reagentes ExAmp fora do instrumento e carregadas diretamente em cavidades individuais da lâmina de fluxo usando a plataforma de lâmina de fluxo NovaSeq Xp. A lâmina de fluxo cheia é então carregada no instrumento para clusterização e sequenciamento. Uma etapa de elevação antes do sequenciamento usa o tubo de biblioteca vazio para misturar reagentes do cartucho de cluster para criar uma mistura de condicionamento que ajuda a aumentar a eficiência de clusterização.	Cada biblioteca é carregada em uma cavidade separada da lâmina de fluxo, que depois é sequenciada. Pode-se usar pools, alíquotas do mesmo pool ou combinações arbitrárias diferentes. As leituras das diversas cavidades são analisadas individualmente ou juntas, de modo correspondente.	27–33–45 µl (cavidade individual)

*O fluxo de trabalho do NovaSeq Xp exige uma concentração de 25 a 50% menor de bibliotecas desnaturadas, em comparação com o fluxo de trabalho Padrão.

Componentes do instrumento

O Sistema de sequenciamento NovaSeq 6000 compreende um monitor com tela de toque, uma barra de status, um botão de energia com portas USB adjacentes e três compartimentos.

Figura 1 Componentes externos



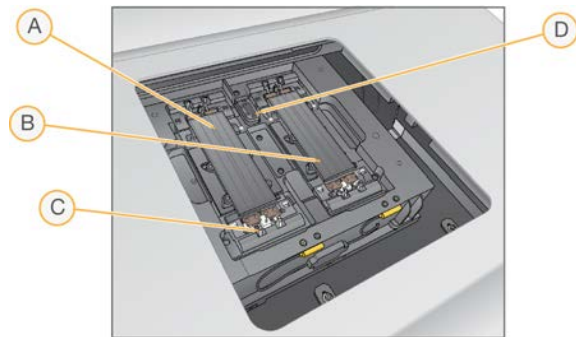
- A **Monitor com tela de toque:** exibe a interface do NVCS para configuração e monitoramento do sistema e da execução.
- B **Compartimento óptico:** contém os componentes ópticos que permitem a geração de imagens de superfície dupla de lâminas de fluxo.
- C **Compartimento de líquidos:** contém cartuchos de reagentes e de tampão e frascos de reagentes usados.
- D **Compartimento da lâmina de fluxo:** contém as lâminas de fluxo.
- E **Barra de status:** indica o status da lâmina de fluxo como pronta para sequenciamento (verde), em processamento (azul) ou requer atenção (laranja).
- F **Energia e portas USB:** fornece acesso ao botão de energia e às conexões USB para componentes periféricos.

Compartimento da lâmina de fluxo

O compartimento da lâmina de fluxo contém o estágio da lâmina de fluxo, que mantém a lâmina de fluxo A no lado esquerdo e a lâmina de fluxo B no lado direito. Cada lado tem quatro fixações que se posicionam automaticamente e prendem a lâmina de fluxo.

Um alvo do alinhamento óptico montado no estágio da lâmina de fluxo diagnostica e corrige problemas ópticos. Quando solicitado pelo NVCS, o alvo do alinhamento óptico realinha o sistema e ajusta o foco da câmera para melhorar os resultados de sequenciamento.

Figura 2 Estágio da lâmina de fluxo



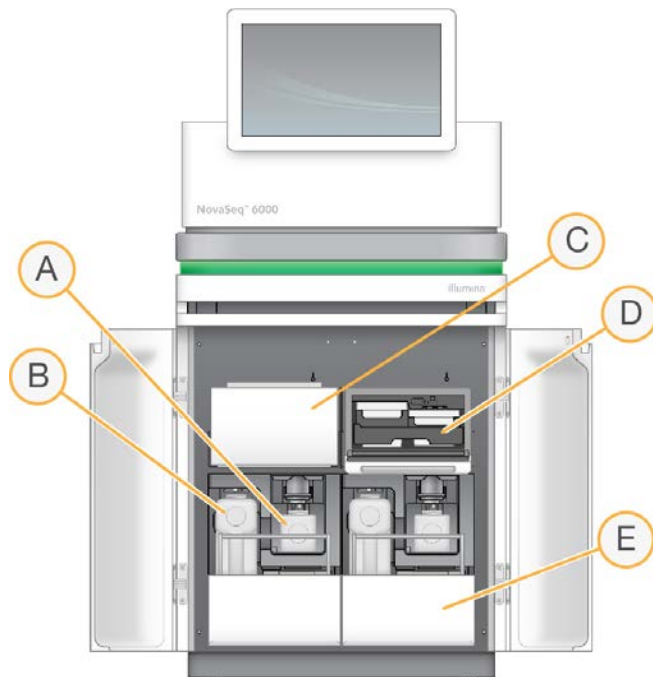
- A Suporte da lâmina de fluxo do Lado A
- B Suporte da lâmina de fluxo do Lado B
- C Fixação da lâmina de fluxo (uma de quatro por lado)
- D Alvo do alinhamento óptico

O software controla a abertura e o fechamento da porta do compartimento da lâmina de fluxo. A porta é aberta automaticamente para carregar uma lâmina de fluxo para uma execução ou limpeza de manutenção. Após o carregamento, o software fecha a porta do compartimento, move a lâmina de fluxo para a posição e ativa as fixações e o selo de vácuo. Os sensores verificam a presença e a compatibilidade da lâmina de fluxo.

Compartimento de líquidos

A configuração de uma execução requer o acesso ao compartimento de líquidos para carregar reagentes e tampão e esvaziar os frascos de reagente usados. Duas portas fecham o compartimento de líquidos, que é dividido em dois lados correspondentes para a lâmina de fluxo A e a lâmina de fluxo B.

Figura 3 Componentes do compartimento de líquidos



- A **Frasco pequeno de reagente usado:** contém os reagentes usados no cartucho de cluster, com um suporte da tampa para fácil armazenamento da tampa.
- B **Frasco grande de reagente usado:** contém os cartuchos de SBS e de tampão, com um suporte da tampa para fácil armazenamento da tampa.
- C **Refrigerador de reagentes:** refrigera os cartuchos de SBS e de cluster.
- D **Gaveta de refrigerador de reagentes:** as posições codificadas por cores mantêm o cartucho de SBS no lado esquerdo (etiqueta cinza) e o cartucho de cluster no lado direito (etiqueta laranja).
- E **Gaveta de tampão:** contém o frasco grande de reagente usado no lado esquerdo e o cartucho de tampão no lado direito.

Reagentes usados

O sistema de fluxo de reagentes destina-se a encaminhar reagentes de cartucho de cluster, que são potencialmente perigosos, para o frasco pequeno de reagente usado. Os reagentes dos cartuchos de SBS e de tampão são encaminhados para o frasco grande de reagente usado. Porém, pode ocorrer contaminação cruzada na transmissão de reagente usado. Para sua segurança, suponha que ambos os frascos de reagente usados contenham produtos químicos potencialmente perigosos. A ficha de dados de segurança (SDS, Safety Data Sheets) fornece informações detalhadas sobre os produtos químicos.



OBSERVAÇÃO

Se o sistema estiver configurado para coletar os reagentes utilizados externamente, a transmissão para o frasco grande de reagente usado será encaminhada externamente. Os reagentes do cartucho de cluster sempre vão para o frasco pequeno de reagente usado.

Software do sistema

O pacote de software do instrumento inclui aplicativos integrados que realizam execuções de sequenciamento, análise no instrumento e funções relacionadas.





- ▶ **NovaSeq Control Software (NVCS)** (Software de controle NovaSeq): guia você pelas etapas para configurar uma execução de sequenciamento, controla as operações do instrumento e exibe as estatísticas conforme a execução continua. Para demonstrar o carregamento e o descarregamento adequados dos materiais de consumo, o NVCS reproduz vídeos instrutivos durante a configuração de execução.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)**: realiza análise de imagens e identificação de bases durante uma execução. O NovaSeq 6000 usa o RTA3, que incorpora arquitetura, segurança e outras melhorias de recursos para otimizar o desempenho. Para obter mais informações, consulte *Real-Time Analysis na página 71*.
- ▶ **Serviço de cópia universal (UCS)** — copia arquivos de produção de RTA3 e NVCS para a pasta de saída durante uma execução. Se aplicável, o serviço também transfere dados para o BaseSpace Sequence Hub. Se o Serviço de cópia universal for interrompido durante uma execução, ele faz várias tentativas para reconectar e restabelece a transferência de dados automaticamente.

Ícones de status

Um ícone de status na interface do NVCS indica o status de execução. Um número no ícone indica o número de condições para um status.

Quando um status de execução muda, o ícone pisca para alertar você. Selecione o ícone para visualizar uma descrição da condição. Selecione **Acknowledge** (Reconhecer) para limpar a mensagem e, em seguida, **Close** (Fechar) para fechar a caixa de diálogo.

Tabela 2 Ícones de status do NVCS







Ícone de status	Nome do status	Descrição
	Status OK	O sistema está normal.
	Processando	O sistema está em processamento.
	Advertência	Ocorreu um aviso e é necessária atenção. Avisos não interrompem uma execução nem exigem uma ação antes de continuar.
	Erro	Ocorreu um erro. Erros exigem uma ação antes de continuar com a execução.

Gestão de processos

A tela Process Management (Gestão de processos) fornece acesso ao Compute Engine (CE) e ao disco rígido (C:\). Use a tela para monitorar o progresso da execução, excluir execuções e gerenciar o espaço em disco. Nunca apague arquivos e pastas diretamente do C:\.

A tela Process Management (Gestão de Processos) exibe o espaço em disco disponível, o espaço utilizado no CE e no C:\ e o status das execuções que estão utilizando espaço em disco. As colunas Run Date (Data da execução) e Run Name (Nome da execução) identificam cada execução. As colunas Run Status (Status de execução), BaseSpace e Network (Rede) mostram o status de cada processo para uma execução.

Tabela 3 Ícones de status da gestão de processos

Processo	Ícone	Descrição
Status de execução	 Running	A execução está em andamento.
	 Complete	A execução concluiu o sequenciamento.
Rede	 Copying	Os arquivos estão sendo copiados para a pasta de saída na rede.
	 Complete	Todos os arquivos foram copiados para a pasta de saída na rede.
	N/A	Não aplicável porque a execução não está configurada para fazer o upload para uma pasta de saída na rede ou o status de upload é desconhecido. Para solucionar problemas, consulte <i>Solução de problemas de gestão de processos na página 68</i> .
BaseSpace	 Uploading	Os arquivos estão sendo carregados para o BaseSpace Sequence Hub.
	 Complete	Todos os arquivos foram enviados para o BaseSpace Sequence Hub.
	N/A	Não aplicável porque a execução não está configurada para fazer upload para o BaseSpace Sequence Hub ou o status de upload é desconhecido. Para solucionar problemas, consulte <i>Solução de problemas de gestão de processos na página 68</i> .

Antes do início da execução de uma lâmina de fluxo, devem ser atendidos os requisitos mínimos de espaço do CE e C:\.



OBSERVAÇÃO

Para execuções de lâmina de fluxo única, os requisitos mínimos de espaço são a metade dos mostrados na tabela a seguir.

Tabela 4 Requisitos mínimos de espaço para CE e C:\ para execuções de lâminas de fluxo duplas

Lâmina de fluxo	Espaço do CE por ciclo	Espaço de C:\ por par de lâmina de fluxo
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 o espaço total exigido no CE para a execução, multiplique o valor abaixo de "Espaço do CE por ciclo" pela soma dos valores de duração da Leitura 1, Leitura 2, Índice 1 e Índice 2 (consulte [Digitar parâmetros de execução na página 55](#)). Por exemplo, para um ciclo 150 do tipo paired-end, execução com lâmina de fluxo S4 dupla com ambas as bases de 8 índices longas, o espaço necessário no CE é $(151 * 2 + 8 * 2) * 4,3 = 1,37$ Tb.

Para obter informações sobre a limpeza do disco rígido, consulte [Excluir a execução na página 59](#).

Capítulo 2 Kits e acessórios

Visão geral dos kits	11
Componentes do kit de reagentes	12
Componentes do kit NovaSeq Xp	16
Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp	17
Descrições dos símbolos	18

Visão geral dos kits

A execução no NovaSeq 6000 exige um kit de reagentes NovaSeq 6000. O fluxo de trabalho do NovaSeq Xp também exige um kit NovaSeq Xp. Esses kits estão disponíveis nas seguintes configurações.

Selecione o tamanho adequado do kit para seu projeto experimental. A Illumina recomenda o uso de kits de 500 ciclos somente para durações de execução superiores a 300 ciclos.

Para obter uma lista completa dos itens necessários para uma execução, consulte *Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário* na página 26.





Tabela 5 Configurações do kit

Nome do kit	N.º do catálogo Illumina
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012866
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20027466
Kit de reagentes S2 NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012860
Kit de reagentes S2 NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20012861
Kit de reagentes S2 NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20012862
Kit de reagentes S1 NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012863
Kit de reagentes S1 NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20012864
Kit de reagentes S1 NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20012865
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (500 ciclos)	20029137
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20027465
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20027464
Kit NovaSeq Xp com 2 cavidades	20021664
Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades	20021665

Identificação de compatibilidade

Para identificar os componentes compatíveis do kit, as lâminas de fluxo e os cartuchos são etiquetados com símbolos que apresentam o modo do kit: **SP**, **S1**, **S2** ou **S4**. Os coletores NovaSeq Xp têm suporte para vários modos e são identificados com 2 cavidades (para lâminas de fluxo SP, S1 e S2) ou 4 cavidades (para lâminas de fluxo S4).

Os componentes com modos diferentes não podem ser usados na mesma execução. Por exemplo, não combine cartuchos S1 com uma lâmina de fluxo S2.

Modo do kit	Marcação no rótulo	Descrição
Componentes do kit SP		A lâmina de fluxo SP gera 650 a 800 bilhões de leituras únicas que passam pelo filtro com produção de até 250 Gb a 2 x 150 bp e produção de até 400 Gb a 2 x 250 bp.
Componentes do kit S1		A lâmina de fluxo S1 gera até 1,6 bilhão de leituras únicas que passam pelo filtro com produção de até 500 Gb a 2 x 150 bp. O kit S1 oferece o sequenciamento rápido de menos amostras para as aplicações de mais alto rendimento.
Componentes do kit S2		A lâmina de fluxo S2 gera até 4,1 bilhões de leituras únicas que passam pelo filtro com produção de até 1250 Gb a 2 x 150 bp. A lâmina de fluxo S2 oferece sequenciamento rápido para a maioria das aplicações de alto rendimento, com um número maior de leituras que uma lâmina de fluxo S1 para mais saída de sequenciamento.
Componentes do kit S4		A lâmina de fluxo S4 gera até 10 bilhões de leituras únicas que passam pelo filtro com produção de até 3000 Gb a 2 x 150 bp. É uma versão de 4 cavidades da lâmina de fluxo, projetada para a saída máxima. Ela possibilita um sequenciamento econômico de genoma completo em uma variedade de espécies e profundidades de cobertura.

A [página do produto dos kits de reagentes NovaSeq](#) no site da Illumina oferece especificações detalhadas de cada modo.

Componentes do kit de reagentes

Cada kit de reagentes NovaSeq 6000 contém os seguintes componentes. Cada componente usa identificação por radiofrequência (RFID) para obter compatibilidade e um rastreamento de materiais de consumo preciso.

Quando receber seu kit, armazene prontamente os componentes na temperatura indicada para assegurar o desempenho apropriado.

Tabela 6 Componentes do kit

Quantidade	Componente do kit	Temperatura de armazenamento
1	Tubo da biblioteca	15 °C a 30 °C
1	Lâmina de fluxo	2 °C a 8 °C
1	Cartucho de tampão	15 °C a 30 °C
1	Cartucho de cluster	-25 °C a -15 °C
1	Cartucho de SBS	-25 °C a -15 °C



CUIDADO

Evite deixar cair os cartuchos. Podem ocorrer danos, se eles caírem. Pode ocorrer irritação na pele se os reagentes vazarem dos cartuchos. Inspeccione os cartuchos quanto a rachaduras, antes de usar.

Tubo da biblioteca

O tubo da biblioteca NovaSeq 6000 é um tubo de 16 mm que se encaixa na posição n.º 8 do cartucho de cluster. A posição n.º 8 é rotulada **Library Tube** (Tubo da biblioteca) e exibe um círculo laranja para facilitar a identificação. O tubo tem uma tampa com rosca que permite o armazenamento de bibliotecas quando for necessário. Assegure-se de que a tampa tenha sido removida antes de carregar no cartucho de cluster.

Figura 4 Tubo da biblioteca



O tubo da biblioteca pode ser usado de duas formas, dependendo do fluxo de trabalho:

- ▶ **Padrão** — Bibliotecas agrupadas e desnaturadas são adicionadas ao tubo da biblioteca, que é então carregado destampado no cartucho de cluster. Depois do início da execução, o instrumento mistura as bibliotecas com reagentes ExAmp no tubo da biblioteca, que depois são transferidos automaticamente para a lâmina de fluxo.
- ▶ **NovaSeq Xp** — O tubo da biblioteca vazio e destampado é carregado no cartucho de cluster. Durante a execução, os reagentes são misturados no tubo da biblioteca antes da distribuição para a lâmina de fluxo.

Lâmina de fluxo

A lâmina de fluxo do NovaSeq 6000 é uma lâmina de fluxo padronizada, revestida por um cartucho. A lâmina de fluxo é um substrato com base em vidro que contém bilhões de nanowells em um arranjo ordenado, aumentando o número de leituras de saída e os dados de sequenciamento. Os clusters são gerados nos nanowells, nos quais é, então, realizado o sequenciamento.

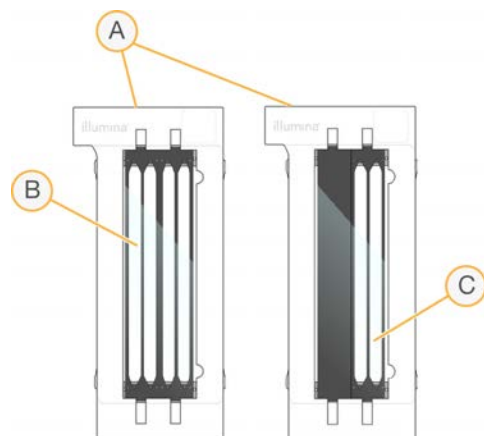
Cada lâmina de fluxo tem várias cavidades para fazer o sequenciamento de bibliotecas em pool. As lâminas de fluxo SP, S1 e S2 têm duas cavidades cada uma, e a lâmina de fluxo S4 tem quatro. Cada cavidade é captada em vários feixes e, em seguida, o software divide a imagem de cada feixe em porções menores chamadas de blocos. Para obter mais informações, consulte *Blocos da lâmina de fluxo na página 72*.



OBSERVAÇÃO

Se você estiver usando uma lâmina de fluxo S1, certifique-se de usar o NVCS v1.3.1 ou posterior. Se você estiver usando uma lâmina de fluxo SP, certifique-se de usar o NVCS v1.6 ou posterior.

Figura 5 Lâminas de fluxo



- A Cartucho da lâmina de fluxo
- B Lâmina de fluxo de quatro cavidades (S4)
- C Lâmina de fluxo de duas cavidades (SP, S1 e S2)

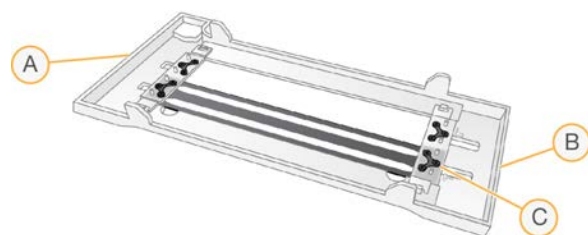
O lado inferior de cada lâmina de fluxo tem quatro juntas. As bibliotecas e os reagentes entram nas cavidades da lâmina de fluxo pelas juntas, na extremidade de entrada da lâmina de fluxo. Os reagentes usados são expelidos das cavidades por juntas localizadas na extremidade de saída.



OBSERVAÇÃO

Evite tocar nas juntas ao manusear a lâmina de fluxo.

Figura 6 Lâmina de fluxo invertida



- A Extremidade de saída
- B Extremidade de entrada
- C Junta (uma de quatro)




Cartuchos de tampão, de cluster e de SBS

Os cartuchos de tampão, de cluster e de SBS do NovaSeq 6000 têm reservatórios com selo de alumínio pré-carregados com reagentes, tampões e solução de limpeza. Um de cada tipo de cartucho é incluído no kit de reagentes.

Os cartuchos são carregados diretamente no instrumento, codificados por cores e rotulados para reduzir os erros de carregamento. As guias no refrigerador do reagente e as gavetas de tampão garantem a orientação adequada.

A etiqueta do cartucho inclui os modos suportados, como S1/S2 ou SP/S1/S2. Os cartuchos só podem ser usados para os modos indicados na etiqueta.

Tabela 7 Cartuchos de reagentes

Cartucho	Descrição
<p>Cartucho de tampão do NovaSeq 6000</p> 	<p>Pré-carregado com tampões de sequenciamento e pesa até 6,8 kg (15 lbs). Uma alça de plástico facilita o transporte, o carregamento e o descarregamento. Reentrâncias na parte superior da chapa permitem que os cartuchos sejam empilhados.</p>
<p>Cartucho de cluster do NovaSeq 6000</p> 	<p>Pré-carregado com reagentes de clusterização, indexação, do tipo paired-end e também com solução de limpeza. Contém uma posição designada para o tubo da biblioteca. A rotulagem cor de laranja distingue o cartucho de cluster do cartucho de SBS.</p>
<p>Cartucho de SBS do NovaSeq 6000</p> 	<p>Pré-carregado com reagentes de sequenciamento em volumes específicos para o número de ciclos que o kit suporta (500, 300, 200 ou 100). Cada uma das três posições de reagente tem uma posição adjacente reservada para a limpeza automática após a execução. A rotulagem cinza diferencia o cartucho de SBS do cartucho de cluster.</p>

Reservatórios de cartuchos de cluster

Reservatório removível

Um reagente de desnaturação na posição 30 contém formamida, que é uma amida orgânica e uma toxina reprodutiva. Para facilitar a eliminação segura de qualquer reagente não utilizado após a execução de sequenciamento, esse reservatório é removível.



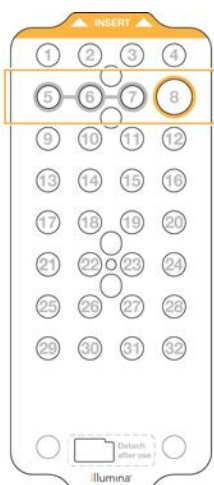
OBSERVAÇÃO

Não empilhe o cartucho de SBS na parte superior do cartucho de cluster, que pode soltar a posição n.º 30.

Reservatórios reservados

Três reservatórios são dedicados para primers personalizados e uma posição vazia é dedicada para o tubo da biblioteca. Para rastreabilidade de amostra, o tubo da biblioteca é carregado no cartucho de cluster durante a configuração de execução e permanece com o cartucho até o final da execução.

Figura 7 Reservatórios numerados



Posição	Reservado para
5, 6 e 7	Primers personalizados opcionais
8	Tubo da biblioteca

Para obter mais informações sobre primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados da série NovaSeq* (documento n.º 1000000022266).

Componentes do kit NovaSeq Xp

Cada kit NovaSeq Xp é de uso único e contém os seguintes componentes. Quando receber seu kit, armazene prontamente os componentes na temperatura indicada para assegurar o desempenho apropriado.

Tabela 8 Componentes do kit NovaSeq Xp

Quantidade	Componente do kit	Temperatura de armazenamento
1	DPX1	-25 °C a -15 °C
1	DPX2	-25 °C a -15 °C
1	DPX3	-25 °C a -15 °C
1	Coletor NovaSeq Xp	Deixe com o kit ou armazene à temperatura ambiente.

Reagentes DPX1, DPX2 e DPX3

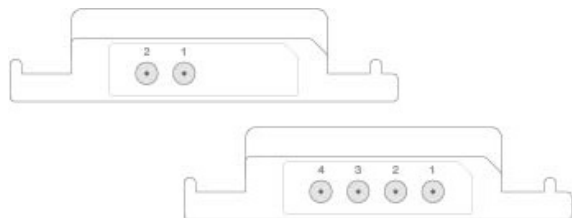
DPX1, DPX2 e DPX3 são reagentes ExAmp fornecidos em tubos individuais para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp. A combinação desses reagentes cria a mistura master de ExAmp que é misturada com pools de biblioteca antes de carregar na lâmina de fluxo.

Coletor NovaSeq Xp

O coletor NovaSeq Xp é colocado na plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp para habilitar o carregamento direto dos pools de biblioteca nas cavidades individuais da lâmina de fluxo. Os braços, em cada lado do coletor NovaSeq Xp, são projetados para a fácil colocação na plataforma.

Os coletores NovaSeq Xp são fornecidos em configurações de dois e quatro poços para corresponder às lâminas de fluxo de duas e quatro cavidades. Cada poço corresponde a uma cavidade da lâmina de fluxo. Como a lâmina de fluxo é carregada na plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp ao contrário, os poços são numerados da direita para a esquerda para corresponder à numeração das cavidades em uma lâmina de fluxo invertida.

Figura 8 Coletores NovaSeq Xp com poços numerados

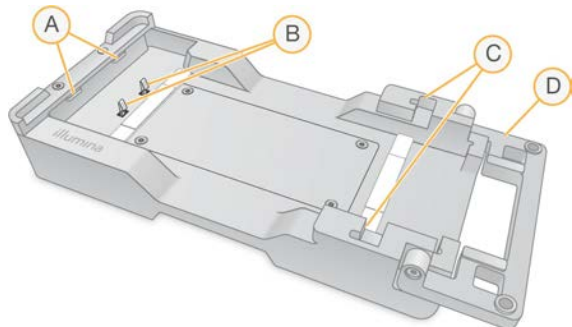


Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp

A plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp é um acessório que pode ser reutilizado para carregamento de bibliotecas diretamente em uma lâmina de fluxo. A lâmina de fluxo é invertida e carregada na plataforma e o coletor NovaSeq Xp é encaixado sobre a lâmina de fluxo.

Dois protuberâncias (abaixo do suporte) e duas molas guiam a inserção da lâmina de fluxo e garantem a orientação adequada. As incisões fixam os braços do coletor NovaSeq Xp na orientação adequada e eles ficam assentados uniformemente. Uma fixação magnética gira 180° para fixar o coletor NovaSeq Xp sobre a lâmina de fluxo.









Figura 9 Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp





- A Protuberâncias (abaixo do suporte) para guiar o carregamento
- B Molas para alinhar a lâmina de fluxo
- C Incisões para fixar os braços do coletor NovaSeq Xp
- D Fixação para prender a lâmina de fluxo e o coletor NovaSeq Xp

Descrições dos símbolos

A tabela a seguir descreve os símbolos localizados no material de consumo ou na embalagem deste.

Símbolo	Descrição
	A data em que o material de consumo expira. Para obter um resultado melhor, use o material de consumo antes dessa data.
	Indica o fabricante (Illumina).
	O uso previsto é uso restrito em pesquisa (URP).
	Indica o número da peça para que o material de consumo possa ser identificado. ¹
	Indica o código do lote para identificar o lote de fabricação do material de consumo. ¹
	Indica o número de série.
	Indica que é necessária proteção contra luz ou calor. Armazene protegido da luz solar.
	Indica um risco à saúde.

Símbolo	Descrição
	Indica um alerta de perigo.
	Faixa de temperatura de armazenamento em graus Celsius. Armazene o material de consumo na faixa indicada. ²

¹ REF identifica o componente individual, enquanto LOT identifica o lote ao qual o componente pertence.

² A temperatura de armazenamento pode ser diferente da temperatura de transporte.

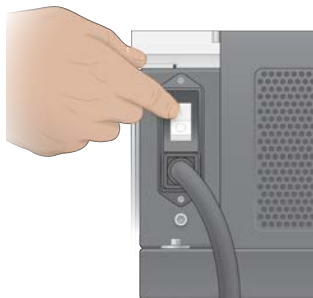
Capítulo 3 Introdução

Iniciar o instrumento	20
Definir configurações	21
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	26

Iniciar o instrumento

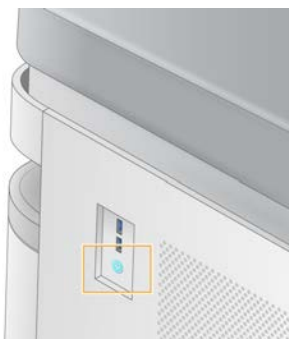
- 1 Altere o interruptor na parte traseira do instrumento para a posição | (on), ligado.

Figura 10 Localização do interruptor



- 2 Aguarde até que o botão de energia na lateral direita do instrumento brilhe em azul e, em seguida, pressione-o.

Figura 11 Localização do botão de energia



Contas de usuários

No NVCS v1.5 e nas versões mais recentes, há dois tipos de contas: administrador e usuário. As permissões para cada tipo são mostradas na seguinte tabela.

Permissões	Administrador	Usuário
Configuração, início, monitorar execuções de sequenciamento	X	X
Fazer download e atualizar o software	X	
Consultar o status da execução ativa iniciada por outro usuário	X	
Encerrar processo de UCS sem resposta	X	

Arquivos de dados do aplicativo são armazenados em **C:/ProgramData**. Os aplicativos são instalados em **C:/Program Files**. O NVCS é iniciado como um aplicativo de tela cheia para ambos os tipos de contas.

Login no sistema

- 1 Quando o sistema operacional for carregado, faça logon no Windows usando o nome de usuário e a senha de seu site.
- 2 Abra o NVCS.
O software é iniciado e inicializa o sistema. Quando a inicialização for concluída, a tela Home (Início) será exibida.

O NVCS é iniciado como um aplicativo de usuário. Se você tentar usar um recurso que exija permissões de administrador, como o Software Update, e você não fez login como administrador, será avisado para fazer login como administrador.

Para ficar informado sobre o progresso de uma execução de sequenciamento, permaneça conectado enquanto o NVCS estiver em execução e enquanto um sequenciamento estiver em andamento.

Definir configurações

O NVCS contém configurações para o seguinte:

- ▶ Modo de execução (manual ou com base em arquivo)
- ▶ Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Atualizações de software



OBSERVAÇÃO

Antes de configurar a Seleção de fluxo de trabalho ou as Verificações automáticas para atualizações do software, certifique-se de que a Seleção de modo tenha sido configurada.

Modos de configuração de execução

- ▶ **Manual:** o modo padrão que envia dados a uma pasta de saída especificada para análise posterior.
- ▶ **File-Based** (Com base em arquivo): um modo alternativo que usa arquivos do BaseSpace Clarity LIMS ou de outro sistema LIMS para definir parâmetros de execução. Para obter mais informações, consulte [Configurar a saída do LIMS na página 23](#).

Ao configurar o modo de configuração de execução, certifique-se de especificar um local existente para a pasta de configuração de execução. Essa pasta é obrigatória. Uma mensagem de local inválido indica que o local especificado não existe.

Os dois modos de configuração de execução contêm a opção de enviar dados ao BaseSpace Sequence Hub para análise.

Configurar o modo manual

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Selecione **Manual**.
- 3 **[Opcional]** Digite ou procure um local de rede preferencial para a pasta de saída.
Não especifique um local nas unidades C:\, D:\ ou Z:\. Isso provoca um erro de unidade inválida.
Esta configuração é o local padrão. O local da pasta de saída pode ser alterado para cada execução.

- 4 **[Opcional]** Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina) para habilitar o serviço de monitoramento Illumina Proactive. O nome da configuração na interface do software pode ser diferente do nome deste guia, dependendo da versão do NVCS em uso.

Com esta configuração ativada, os dados de desempenho do instrumento são enviados à Illumina. Esses dados ajudam a Illumina a resolver problemas com mais facilidade e detectar possíveis falhas, possibilitando a manutenção proativa e maximizando o tempo de atividade do instrumento. Para obter mais informações sobre os benefícios desse serviço, consulte a *Nota técnica do Illumina Proactive (documento n.º 1000000052503)*.

Esse serviço:

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

- 5 Selecione **Save** (Salvar).

Configurar modo com base em arquivo

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Selecione **File-Based** (Com base em arquivo).
- 3 Digite ou navegue até um local de rede desejado para definir a pasta de configuração da execução, que contém arquivos LIMS.
Certifique-se de que os arquivos LIMS apropriados foram adicionados à pasta de configuração da execução antes de configurar uma execução. Durante a configuração da execução, o software usa a identificação de tubo da biblioteca ou a identificação da lâmina de fluxo para localizar os arquivos para a execução atual.
- 4 **[Opcional]** Digite ou procure um local de rede preferencial para a pasta de saída.
Não especifique um local nas unidades C:\, D:\ ou Z:\. Isso provoca um erro de unidade inválida.
O local da pasta de saída pode ser alterado para cada execução.
- 5 **[Opcional]** Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina) para habilitar o serviço de monitoramento Illumina Proactive. O nome da configuração na interface do software pode ser diferente do nome deste guia, dependendo da versão do NVCS em uso.
Com esta configuração ativada, os dados de desempenho do instrumento são enviados à Illumina. Esses dados ajudam a Illumina a resolver problemas com mais facilidade e detectar possíveis falhas, possibilitando a manutenção proativa e maximizando o tempo de atividade do instrumento. Para obter mais informações sobre os benefícios desse serviço, consulte a *Nota técnica do Illumina Proactive (documento n.º 1000000052503)*.
Esse serviço:
 - ▶ Não envia dados de sequenciamento
 - ▶ Exige que o instrumento esteja conectado a uma rede com acesso à Internet
 - ▶ É ativado por padrão. Para cancelar esse serviço, desabilite a configuração **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina).Quando ativada, essa opção requer uma conexão de internet externa.
- 6 Selecione **Save** (Salvar).

Configurar a saída do LIMS

Se o seu sistema estiver configurado para o modo baseado em arquivos e você estiver usando o software LIMS diferente do BaseSpace Clarity LIMS, configure o LIMS para gerar um arquivo de configuração de execução no formato *.json. Para o fluxo de trabalho Padrão, o nome do arquivo deve corresponder à identificação do tubo da biblioteca. O campo de identificação da lâmina de fluxo do arquivo pode ser deixado em branco. Para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, o nome do arquivo deve corresponder à identificação da lâmina de fluxo e tanto esta como a identificação da biblioteca devem ser especificadas no arquivo. O nome do arquivo e os valores não diferenciam maiúsculas de minúsculas.

O software externo LIMS pode usar a API LIMS do NovaSeq para interagir com o NovaSeq 6000. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter mais informações sobre os pontos finais da API.

Nome do campo	Valor
run_name	Um nome de execução preferencial, que pode conter caracteres alfanuméricos, hífens e sublinhados
run_mode	Um dos seguintes modos: <ul style="list-style-type: none"> • SP • S1 • S2 • S4
workflow_type	NoIndex, SingleIndex ou DualIndex
librarytube_ID	O RFID do tubo da biblioteca
rehyb*	Verdadeiro ou falso
sample_loading_type	NovaSeqStandard ou NovaSeqXp
Flowcell_ID	A identificação da lâmina de fluxo
paired_end	Verdadeiro ou falso
read1	Um valor até 251
read2	Um valor até 251
index_read1	Qualquer valor
index_read2	Qualquer valor
output_folder	O caminho para a pasta de saída com duas barras invertidas para uma sequência de escape
samplesheet	O caminho para uma planilha de amostras ou outro arquivo no formato *.csv com duas barras invertidas para uma sequência de escape
use_basespace	Verdadeiro ou falso
basespace_mode	RunMonitoringOnly ou RunMonitoringAndStorage
use_custom_read1_primer	Verdadeiro ou falso
use_custom_read2_primer	Verdadeiro ou falso
use_custom_index_read1_primer	Verdadeiro ou falso

* A nova hibridização não está disponível no NVCS v1.4.0 ou anterior.

Exemplo * arquivo .json nomeado 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": "\\sgnt-prd-isi01\\NovaSEQ\\SeqRuns",
"attachment": "\\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 ciclos de índice padrão

Você pode configurar o número padrão de ciclos de índice para o fluxo de trabalho padrão da seguinte forma.

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Selecione a guia **Workflow Selection** (Seleção do fluxo de trabalho).
- 3 Insira o número de ciclos de índice na caixa de texto **Index Cycles** (Ciclos de Índice).
- 4 Selecione **Save** (Salvar).

Fluxos de trabalho do NovaSeq Padrão e do NovaSeq Xp

Os fluxos de trabalho do NovaSeq Padrão e do NovaSeq Xp usam a química ExAmp, de propriedade da Illumina.

► Fluxo de trabalho Padrão

O fluxo de trabalho do NovaSeq Padrão automatiza duas etapas essenciais da química de cluster ExAmp de propriedade da Illumina, dentro do aparelho do instrumento.

- Preparação da mistura master de ExAmp
- Distribuição da mistura master na lâmina de fluxo

A preparação dentro do aparelho e a distribuição da mistura master minimizam a interação do usuário e reduzem a variabilidade na mistura preparada.

Como parte da configuração de execução para o fluxo de trabalho Padrão, um tubo de biblioteca contendo o pool de biblioteca desnaturado e neutralizado à concentração recomendada é inserido na posição n.º 8 do cartucho de cluster. Depois de iniciar a execução, as etapas subseqüentes ocorrem dentro do aparelho do instrumento e não exigem interação do usuário. Isso abrange a transferência dos reagentes ExAmp do cartucho de cluster para o tubo de biblioteca, a preparação dos reagentes e a mistura do pool de biblioteca e a distribuição da mistura preparada para todas as cavidades da lâmina de fluxo.

Depois da clusterização dentro do aparelho, é realizada uma série de etapas comuns a ambos os fluxos de trabalho. Essas etapas abrangem a aplicação de uma mistura de condicionamento à lâmina de fluxo com clusterização e outras etapas de química para preparar os clusters para o sequenciamento por síntese. A mistura de condicionamento é preparada durante o processo de clusterização com o uso de reagentes no cartucho de cluster e o tubo de biblioteca inserido durante a configuração da execução. A mistura de condicionamento ajuda a aumentar a eficiência da clusterização no instrumento NovaSeq.

► Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp

O fluxo de trabalho do NovaSeq Xp habilita a carga de bibliotecas diferentes ou pools de bibliotecas em cavidades individuais da plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp e um kit de material de consumo específico para a lâmina de fluxo (kit NovaSeq Xp com 2 cavidades ou kit NovaSeq Xp com 4 cavidades). O kit NovaSeq Xp contém reagentes ExAmp, que são necessários para a clusterização e o coletor NovaSeq Xp, que é necessário para a carga de cavidades.

A mistura de ExAmp/biblioteca é preparada e carregada em cavidades individuais da lâmina de fluxo com o uso da plataforma de lâmina de fluxo NovaSeq Xp e do coletor NovaSeq Xp. Pode ser usado um manipulador automático de líquidos para a preparação da mistura de ExAmp/biblioteca e a distribuição ao coletor para o autoenchimento da lâmina de fluxo. Quando o carregamento da lâmina de fluxo de amostra estiver concluído, é inserido um tubo de biblioteca vazio na posição n.º 8 do cartucho de cluster, a lâmina de fluxo é colocada no instrumento e a execução do sequenciamento é iniciada.

Depois do início da execução, é realizada uma série de etapas comuns a ambos os fluxos de trabalho. Essas etapas abrangem a aplicação de uma mistura de condicionamento à lâmina de fluxo com clusterização e outras etapas de química para preparar os clusters para o sequenciamento por síntese. A mistura de condicionamento é preparada durante o processo de clusterização com o uso de reagentes no cartucho de cluster e misturada no tubo de biblioteca vazio inserido durante a configuração da execução. A mistura de condicionamento ajuda a aumentar a eficiência da clusterização no instrumento NovaSeq.

Configurar fluxo de trabalho do NovaSeq Xp

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Selecione a guia **Workflow Selection** (Seleção do fluxo de trabalho).
- 3 Para habilitar o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, selecione **Enable Workflow Selection** (Habilitar seleção do fluxo de trabalho).
- 4 [Opcional] Para tornar o NovaSeq Xp o fluxo de trabalho padrão, selecione **NovaSeq Xp**.
- 5 Selecione **Save** (Salvar).

Configurar o BaseSpace Sequence Hub

Use as seguintes instruções para definir as configurações padrão do BaseSpace Sequence Hub. Durante a configuração da execução, você pode desativar o BaseSpace Sequence Hub para a execução atual ou alterar as configurações do monitoramento de execução e do armazenamento. A conexão com o BaseSpace Sequence Hub requer uma conexão de internet.

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Marque a caixa de seleção **BaseSpace Sequence Hub**.
- 3 Selecione uma opção de configuração:

- ▶ **Run Monitoring and Storage** (Monitoramento de execução e armazenamento): envia dados de execução para o BaseSpace Sequence Hub para monitoramento remoto e análise de dados. Esta opção requer o upload de uma planilha de amostras com a execução.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Somente monitoramento de execução): envia arquivos InterOp, arquivos de registro e outros arquivos de execução que não são CBCL para o BaseSpace Sequence Hub, de modo que as execuções possam ser monitoradas remotamente.
- 4 No menu suspenso **Hosting Location** (Local de host), selecione **EU (Frankfurt)** (UE, Frankfurt) ou **USA (N. Virginia)** (EUA, Virgínia do Norte).
Essa opção determina onde os dados são carregados.
 - 5 Se você é um assinante do BaseSpace Enterprise:
 - a Marque a caixa de seleção **Private Domain** (Domínio privado).
 - b Digite o nome do domínio utilizado para início de sessão único no BaseSpace Sequence Hub.
 - 6 Selecione **Save** (Salvar).

Nome da planilha da amostra

Ao executar o NVCS v1.3.1 ou anterior, uma planilha de amostras usada para uma execução do NovaSeq 6000 e com upload no BaseSpace Sequence Hub deve ser nomeada como SampleSheet.csv (coincidência entre maiúsculas e minúsculas). Se a planilha de amostras for nomeada incorretamente e Run Monitoring and Storage (Monitoramento de execução e armazenamento) estiver ativado, o BaseSpace Sequence Hub marca a execução para revisão. Uma execução marcada para revisão pode ser colocada na fila para a geração de FASTQ ao selecionar **More (Mais) | Fix Sample Sheet and Requeue** (Corrigir planilha de amostras e recolocar na fila) e inserir a planilha de amostras apropriada. Até a planilha de amostras ser fornecida, os dados de sequenciamento não podem ser convertidos em arquivos FASTQ.

Se você estiver executando o NVCS v1.4 ou posterior, não haverá limitações nos nomes das planilhas de amostras.

Se você estiver usando o software de conversão bcl2fastq2 v2.19 ou posterior para converter dados em arquivos FASTQ localmente, é possível usar a opção de linha de comando `--sample-sheet` para especificar qualquer arquivo CSV file em qualquer local. A linha de comando permite o uso de qualquer nome de arquivo.

Configurar atualizações de software

A verificação automática de atualizações de software está ativada por padrão. Você pode desativar ou ativar a verificação automática de atualizações em Settings (Configurações).

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
- 2 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 3 Marque a caixa de seleção **If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available** (Se estiver ativado, o instrumento exibirá uma notificação quando a atualização de software estiver disponível).
- 4 Selecione **Save** (Salvar).

Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário

Os seguintes materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário são usados para preparação do material de consumo, sequenciamento e manutenção do sistema.

Materiais de consumo

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
1 N NaOH	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição a 0,2 N para a desnaturação de bibliotecas.
10 mM de Tris-HCl, pH 8,5	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas e um controle de PhiX opcional antes da desnaturação.
400 mM de Tris-HCl, pH 8,0	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Neutralização de bibliotecas e um controle de PhiX opcional após a desnaturação.
Frasco de centrifuga, 500 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de Tween 20 para uma limpeza de manutenção.
Tubo de centrifuga, 30 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de NaOCl para uma limpeza de manutenção.
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral.
Compressas com álcool isopropílico 70% ou Compressas com álcool etanol 70%	VWR, n.º do catálogo 95041-714 ou equivalente Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Componentes de limpeza antes de uma execução e finalidade geral.
Lenço para laboratório com poucos fiapos	VWR, n.º do catálogo 21905-026 ou equivalente	Secagem do estágio da lâmina de fluxo e para finalidade geral.
Tubo de microcentrifuga, 1,5 ml	VWR, n.º do catálogo 20170-038 ou equivalente	Combinação de volumes ao diluir NaOH e bibliotecas.
NaOCl, 5%	Sigma-Aldrich, n.º do catálogo 239305	Realização de uma limpeza de manutenção.
Kit de reagentes NovaSeq 6000	Illumina, consulte <i>Visão geral dos kits na página 11</i> para obter os números de catálogo	Realização de uma execução de sequenciamento.
Pontas de pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 1000 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Álcool isopropílico reagente ou de grau espectrofotométrico (99%), frasco de 100 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza dos componentes ópticos periodicamente e apoio ao cartucho de limpeza da objetiva.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º do catálogo P7949	Realização de uma limpeza de manutenção.
Água aprovada para uso em laboratório	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de NaOH para a desnaturação de bibliotecas. Diluição de Tween 20 e de hipoclorito de sódio para uma limpeza de manutenção.

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Um dos seguintes kits: <ul style="list-style-type: none"> • Kit NovaSeq Xp com 2 cavidades • Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N.º do catálogo 20021664 • N.º do catálogo 20021665 	Carregar bibliotecas manualmente na lâmina de fluxo: <ul style="list-style-type: none"> • Kit de duas cavidades para lâminas de fluxo SP, S1 e S2 • Kit de quatro cavidades para lâminas de fluxo S4
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Tubos de 0,5 ml e 1,7 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Necessário para mistura de ExAmp.
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] [Opcional] Um dos seguintes conjuntos do coletor: <ul style="list-style-type: none"> • Conjunto do coletor de duas cavidades do NovaSeq Xp • Conjunto do coletor de quatro cavidades do NovaSeq Xp 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • N.º do catálogo 20021666 • N.º do catálogo 20021667 	Coletores de reposição do NovaSeq Xp para carregamento manual de bibliotecas em uma lâmina de fluxo.
[Opcional] Controle de PhiX v3	Illumina, n.º do catálogo FC-110-3001	Fazer spike-in em um controle de PhiX.

Materiais de consumo nos kits Illumina

É necessário um kit de reagentes NovaSeq 6000 para fazer o sequenciamento de uma lâmina de fluxo. Cada kit é formado por vários materiais de consumo, que estão relacionados na tabela a seguir. Para uma execução de lâmina de fluxo dupla, use dois kits.

Tabela 9 Materiais de consumo em um kit de reagentes NovaSeq 6000

Material de consumo (um de cada)	Finalidade
Cartucho de tampão	Fornecer soluções tampão de sequenciamento para a execução.
Cartucho de cluster	Fornecer reagentes de clusterização, indexação e do tipo paired-end para a execução.
Lâmina de fluxo	A reação de clusterização e sequenciamento ocorre na lâmina de fluxo.
Cartucho de SBS	Fornecer reagentes de sequenciamento para a execução.
Tubo da biblioteca	O tubo vazio que é usado para dar suporte a bibliotecas agrupadas e desnaturadas (fornecidas pelo cliente) ou para preparar a mistura de condicionamento que aumenta a eficiência de clusterização do sequenciamento.

Se você está seguindo o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp para carregar bibliotecas diretamente na lâmina de fluxo, complemente cada kit de reagentes com um kit NovaSeq Xp. Cada kit NovaSeq Xp contém os seguintes materiais de consumo.

Tabela 10 Materiais de consumo em um kit NovaSeq Xp

Material de consumo (um de cada)	Finalidade
DPX1	Preparar a mistura master de ExAmp.
DPX2	
DPX3	
Coletor NovaSeq Xp	Carregar bibliotecas na lâmina de fluxo.

Orientações para água aprovada para uso em laboratório

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

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

Equipamento

Item	Origem
Congelador, -25 °C a -15 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Cilindro graduado, 500 ml, estéril	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Balde de gelo	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipeta, 1000 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Refrigerador, 2 °C a 8 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Banheira, banhos-maria*	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp	Illumina, nº do catálogo 20021663

*Use uma banheira que possa acomodar dois cartuchos de reagentes e o nível de água apropriado. Por exemplo, (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm)(24 pol. × 36 pol. × 10 pol.).

Capítulo 4 Fluxo de trabalho Padrão: preparação de materiais de consumo

Métodos	30
Orientações da biblioteca	30
Descongelar os cartuchos de SBS e de cluster	31
Esvaziar frascos de reagente usados	32
Preparar lâmina de fluxo	33
Agrupar e desnaturar as bibliotecas para o sequenciamento	33

Métodos

Antes de iniciar a preparação das amostras ou dos materiais de consumo, certifique-se de que a versão NVCS satisfaz os requisitos mínimos de software relacionados na tabela a seguir.

Tabela 11 Requisitos mínimos de software

Lâmina de fluxo	Versão mínima do software
SP	1,6
S1	1.3.1
S2	Todos
S4	1.2.0

- ▶ Verifique se você tem os equipamentos e os materiais de consumo necessários. Consulte *Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário* na página 26.
- ▶ Sempre verifique a etiqueta ao preparar materiais de consumo para garantir a compatibilidade entre os componentes. Não misture nem combine os componentes SP, S1, S2 e S4.
- ▶ Siga as instruções na ordem mostrada, usando os volumes, concentrações, temperaturas e durações especificadas.
- ▶ A menos que um ponto de parada esteja especificado nas instruções, prossiga imediatamente para a etapa seguinte.

Orientações da biblioteca

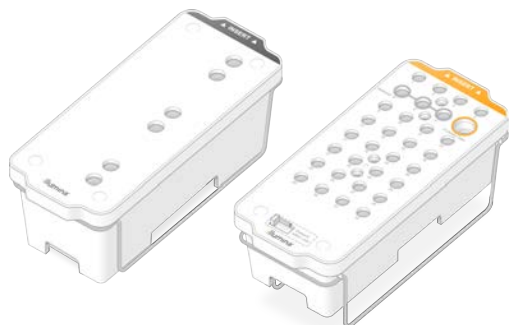
Todas as instruções aplicam-se a métodos de preparação de biblioteca compatíveis e presumem um tamanho de inserção típico para aplicações NovaSeq 6000 compatíveis.

- ▶ Para obter melhores resultados, agrupe e desnature bibliotecas para sequenciamento imediato.
- ▶ Dilua a biblioteca para uma concentração de carga apropriada para a aplicação. Uma concentração de carga muito baixa ou muito elevada tem um impacto negativo sobre a porcentagem de passagem de clusters pelo filtro (% de PF). Uma baixa concentração da biblioteca aumenta o sequenciamento de duplicados. Uma concentração excessivamente alta de bibliotecas diminui a % de PF.
- ▶ A obtenção de uma % de PF ideal requer uma quantificação precisa da biblioteca e um controle de qualidade adequado. Para obter recomendações, consulte a documentação do seu kit de preparação de bibliotecas.

Descongelar os cartuchos de SBS e de cluster

- 1 Se uma execução de sequenciamento estiver em andamento, certifique-se de que ambos os lados do instrumento estarão disponíveis quando o congelamento estiver concluído.
- 2 Remova os cartuchos de SBS e de cluster do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
- 3 Coloque cada cartucho em um rack de descongelamento com fios. Os racks são fornecidos com o instrumento e evitam que ele vire no banho-maria.

Figura 12 Cartuchos em racks de descongelamento com fios



- 4 Descongele em banho-maria em temperatura ambiente (19 °C a 25 °C). Mergulhe até a metade.
- 5 Use a seguinte tabela para determinar a duração do descongelamento.



CUIDADO

O uso de água quente para descongelar reagentes pode provocar degradação da qualidade dos dados ou falha na execução.

Cartucho	Duração do descongelamento
Cartucho de SBS SP, S1 e S2	4 horas
Cartucho de cluster SP, S1 e S2	Até 2 horas
Cartucho de SBS S4	4 horas
Cartucho de cluster S4	Até 4 horas

- 6 Seque bem as bases do cartucho usando toalhas de papel. Seque entre os poços para que toda a água seja removida.
- 7 Verifique se há presença de água nos selos de alumínio. Se houver água, seque com um tecido sem fiapos.
- 8 Inspeção o lado de baixo de cada cartucho para certificar-se de que os reservatórios estão livres de gelo, o que indica que os reagentes estão descongelados.
- 9 Inverta cada cartucho dez vezes para misturar os reagentes.
- 10 Bata levemente a parte inferior de cada cartucho na bancada para reduzir as bolhas de ar.
- 11 Se os reagentes não puderem ser carregados no instrumento em até 4 horas, armazene de 2 °C a 8 °C por até 24 horas.

Esvaziar frascos de reagente usados

Use as seguintes instruções para esvaziar os frascos de reagente usados com **cada** execução de sequenciamento. Se seu sistema estiver configurado para encaminhar externamente os reagentes usados, o frasco pequeno coletará reagentes usados e deverá ser esvaziado em cada execução de sequenciamento. O frasco grande deve estar no lugar.



ADVERTÊNCIA

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

- 1 Remova e esvazie o frasco pequeno de reagente usado conforme as instruções a seguir.
 - a Levante a alavanca e remova da alcova o frasco pequeno de reagente usado. Segure o frasco pelos lados.
 - b Remova a tampa com rosca do suporte da tampa na frente do frasco.
 - c Sele a abertura do frasco com a tampa para evitar derramamentos.
 - d Mantendo o conteúdo separado do conteúdo do outro frasco, descarte de acordo com as normas aplicáveis.
 - e Devolva o frasco destampado para a alcova e, em seguida, abaixe a alavanca. Guarde a tampa no suporte da tampa.
- 2 Remova e esvazie o frasco grande de reagente usado conforme as instruções a seguir.
 - a Utilizando a alça superior, remova o frasco grande de reagente usado pelo lado esquerdo da gaveta de tampão.
 - b Remova a tampa com rosca do suporte da tampa na frente do frasco.
 - c Sele a abertura do frasco com a tampa com rosca para evitar derramamentos.
 - d Descarte o conteúdo em conformidade com as normas aplicáveis. Segure ambas as alças ao esvaziar.
 - e Devolva o frasco destampado para a gaveta de tampão. Guarde a tampa no suporte da tampa.

Figura 13 Devolver o frasco vazio



- 3 Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície do instrumento.
- 4 Feche a gaveta de tampão e, em seguida, feche as portas do compartimento de líquidos.



ADVERTÊNCIA

O não esvaziamento dos frascos de reagente usados pode resultar em uma execução encerrada e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

Preparar lâmina de fluxo

- 1 Retire um novo pacote da lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- 2 Separe o pacote da lâmina de fluxo vedado por 10 a 15 minutos para permitir que a lâmina de fluxo atinja a temperatura ambiente.
Use a lâmina de fluxo em até 12 horas após a respectiva remoção do pacote.

Agrupar e desnaturar as bibliotecas para o sequenciamento

Criar um pool de bibliotecas normalizadas

Use as seguintes instruções para normalizar bibliotecas na concentração apropriada e depois agrupe. As bibliotecas sequenciadas na mesma lâmina de fluxo devem ser combinadas em um único pool normalizado.

- 1 Consulte a tabela a seguir para obter o número típico de leituras e a complexidade recomendada por aplicação e tipo da lâmina de fluxo.

Tabela 12 Complexidade recomendada de pool de biblioteca

Aplicação	Tipo da lâmina de fluxo	Leituras do tipo paired-end que passam pelo filtro por lâmina de fluxo (B)	Bibliotecas por cavidade
Genomas humanos	SP	1,3 a 1,6	~2
	S1	2,6 a 3,2	~4
	S2	6,6 a 8,2	~10
	S4	16 a 20	~24
Exomas	SP	1,3 a 1,6	~20
	S1	2,6 a 3,2	~40
	S2	6,6 a 8,2	~100
	S4	16 a 20	~250
Transcriptomas	SP	1,3 a 1,6	~16
	S1	2,6 a 3,2	~32
	S2	6,6 a 8,2	~82
	S4	16 a 20	~200

Normalizar as bibliotecas para o pool

- Determine a concentração da biblioteca agrupada necessária com base na concentração da carga final desejada.

Consulte *Concentrações de carga recomendadas na página 34*.

Concentração de carga final (pM)	Concentração da biblioteca agrupada (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

- Normalize as bibliotecas para a concentração da biblioteca agrupada desejada usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.

Para obter ajuda ao diluir as bibliotecas na concentração apropriada, consulte [o Pooling Calculator no site da Illumina](#).

Concentrações de carga recomendadas

A concentração de carga de DNA ideal depende do tipo de biblioteca e do tamanho de inserção. A tabela a seguir fornece as concentrações de carga de DNA recomendadas com base em bibliotecas da Illumina com tamanhos de inserção ≤ 450 bp. Carregue bibliotecas com tamanhos de inserção menores na extremidade inferior do intervalo recomendado. Para bibliotecas > 450 bp, podem ser necessárias concentrações de carga maiores.



OBSERVAÇÃO

Para bibliotecas geradas a partir de métodos de preparação de bibliotecas que não pertencem à Illumina, inicialmente talvez você precise realizar uma titulação de seu tipo específico de biblioteca para obter a concentração ideal de semeadura para render a melhor % de PF. Quando for determinada a concentração ideal de carregamento, ela deverá ser aplicada em tipos idênticos de bibliotecas daí em diante.

Tabela 13 Concentrações recomendadas para carregamento para fluxo de trabalho Padrão (versão do software 1.1 ou posterior)

Tipo de biblioteca	Concentração de carga final (pM)	Concentração de carga agrupada (nM)
PhiX ¹	250	1,25
Pool de bibliotecas de DNA PCR-free	175 a 350	0,875 a 1,75
Pool de bibliotecas de DNA PCR-amplified	300 a 600	1,5 a 3,0
Uma célula ²	250–500	1,25–2,5

¹ Para uma execução somente de PhiX.

² Uma célula foi verificada somente quanto ao fluxo de trabalho Xp.

Se você tiver otimizado uma concentração de carga final para HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 ou HiSeq™ 3000, use 1,5× dessa concentração para o NovaSeq 6000. Por exemplo, se a sua concentração de carga final para HiSeq X for 200 pM, use 300 pM no NovaSeq 6000.

Agrupar bibliotecas normalizadas e adicionar um controle PhiX opcional

- 1 Combinar o volume apropriado de cada biblioteca normalizada em um novo tubo de microcentrifuga para que produza um dos seguintes volumes finais:

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

Por exemplo, para um pool sêxtuplo de bibliotecas e modo S2, combine 25 µl de cada biblioteca que foi normalizada na mesma concentração. Ou, para um pool quádruplo e modo S1, combine 25 µl de cada biblioteca não desnaturada normalizada.

- 2 **[Opcional]** Armazene as bibliotecas *não agrupadas* restantes a uma temperatura de -25 °C a -15 °C.
- 3 **[Opcional]** Faça spike-in de 1% de PhiX não desnaturado da seguinte forma.
 - a Dilua 10 nM de PhiX em 2,5 nM usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
 - b Adicione o volume apropriado de PhiX 2,5 nM não desnaturado ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas.

Modo	PhiX 2,5 nM (µl) não desnaturado	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)
SP/S1	0,6	100
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Ao fazer spike-in em PhiX, 1% é a quantidade recomendada para bibliotecas bem equilibradas. Bibliotecas de baixa diversidade podem exigir mais. Para usar um controle de PhiX com bibliotecas de baixa diversidade, entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter orientações.

Preparar uma diluição fresca de NaOH

Prepare uma diluição **fresca** de 0,2 N de NaOH para desnaturar bibliotecas para o sequenciamento. Para evitar que pequenos erros de pipetagem afetem a concentração final de NaOH, é preparado um volume extra.



CUIDADO

É essencial usar 0,2 N de NaOH para o processo de desnaturação. A desnaturação inadequada pode reduzir o rendimento.

- 1 Combine os volumes a seguir em um tubo de microcentrífuga para diluir 1 N de NaOH em 0,2 N:

Tabela 14 Modo SP/S1/S2

Reagente	Volume para uma lâmina de fluxo (µl)	Volume para duas lâminas de fluxo (µl)
Água aprovada para uso em laboratório	40	80
Armazene 1 N de NaOH	10	20

Esses volumes resultam em 50 µl 0,2 N de NaOH para uma lâmina de fluxo ou 100 µl 0,2 N de NaOH para duas lâminas de fluxo.

Tabela 15 Modo S4

Reagente	Volume para uma lâmina de fluxo (µl)	Volume para duas lâminas de fluxo (µl)
Água aprovada para uso em laboratório	80	160
Armazene 1 N de NaOH	20	40

Esses volumes resultam em 100 µl 0,2 N de NaOH para uma lâmina de fluxo ou 200 µl 0,2 N de NaOH para duas lâminas de fluxo.

- 2 Inverta várias vezes para misturar ou agite completamente. Mantenha o tubo tampado e use em até **12 horas**.

Desnaturar pool de bibliotecas e controle de PhiX opcional

- 1 Adicione 0,2 N de NaOH ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas e PhiX opcional da seguinte maneira.

Lâmina de fluxo	0,2 N de NaOH	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)	Volume resultante
SP/S1	25	100	125 µl ou 125,6 µl com PhiX
S2	37	150	187 µl ou 187,9 µl com PhiX
S4	77	310	387 µl ou 388,9 µl com PhiX

- 2 Tampe e, em seguida, agite por um momento.
- 3 Centrifugue a 280 × g durante um minuto.

- 4 Incube à temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturar.
- 5 Adicione 400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 da seguinte forma, para neutralizar.

Modo	400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume resultante
SP/S1	25	150 µl ou 150,6 µl com PhiX
S2	38	225 µl ou 225,9 µl com PhiX
S4	78	465 µl ou 466,9 µl com PhiX

- 6 Tampe e, em seguida, agite por um momento.
- 7 Centrifugue a 280 × g durante um minuto.
- 8 Transfira o volume total da biblioteca desnaturada ou da biblioteca desnaturada e do PhiX para o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.
- 9 Prossiga imediatamente para o carregamento do tubo da biblioteca no cartucho de cluster e para a configuração da execução.
Os cartuchos de reagentes, incluindo o tubo da biblioteca, devem ser carregados no instrumento em até **30 minutos**.
- 10 **[Opcional]** Se não puder continuar imediatamente, tampe o tubo da biblioteca e armazene em -25 °C a -15 °C durante 3 semanas, no máximo. Não congele novamente depois de descongelado.



CUIDADO

Armazene o tubo da biblioteca somente se necessário. O armazenamento de longo prazo em -25 °C a -15 °C pode aumentar duplicados, reduzindo o rendimento.

Preparar cartuchos de SBS e de cluster

- 1 Inspeção o lado de baixo de cada cartucho para certificar-se de que os reservatórios estão livres de gelo, o que indica que os reagentes estão descongelados.
- 2 Inverta cada cartucho dez vezes para misturar os reagentes.
- 3 Bata levemente a parte inferior de cada cartucho na bancada para reduzir as bolhas de ar.

Carregar tubo da biblioteca

- 1 Sem perturbar a biblioteca na parte inferior, insira o tubo da biblioteca destampado na posição do **tubo da biblioteca** (n.º 8) do cartucho de cluster.

Figura 14 Tubo da biblioteca destampado carregado na posição n.º 8



Capítulo 5 Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp: preparação de materiais de consumo

Resumo do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp	38
Métodos	39
Orientações da biblioteca	39
Descongelar os cartuchos de SBS e de cluster	40
Esvaziar frascos de reagente usados	41
Preparar lâmina de fluxo	42
Agrupar, desnaturar e carregar bibliotecas para o sequenciamento	42

Resumo do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp

Antes de iniciar a preparação das amostras ou dos materiais de consumo, certifique-se de que a versão NVCS satisfaz os requisitos mínimos de software relacionados na tabela a seguir.

Tabela 16 Requisitos mínimos de software

Lâmina de fluxo	Versão mínima do software
SP	1.6
S1	1.3.1
S2	Todos
S4	1.2.0



OBSERVAÇÃO

O NVCS tem suporte para início escalonado de novas execuções. Consulte *Início escalonado de execuções* na página 58.

Certifique-se de concluir todas as etapas do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp na ordem especificada.



OBSERVAÇÃO

As etapas 1 a 5 podem ser concluídas em paralelo e devem ser concluídas antes de passar para a etapa 6.

- 1 Descongele os cartuchos de SBS e de cluster.
- 2 Esvazie os frascos de reagente usados.
- 3 Normalize as bibliotecas.
- 4 Agrupe as bibliotecas e adicione um controle PhiX opcional.
- 5 Separe o pacote da lâmina de fluxo vedado por 10 a 15 minutos para permitir que a lâmina de fluxo atinja a temperatura ambiente. Use a lâmina de fluxo em até 12 horas após a respectiva remoção do pacote.



OBSERVAÇÃO

Conclua as etapas 6 a 12 na ordem especificada.

- 6 Descongele os reagentes ExAmp.
- 7 Prepare uma diluição fresca de NaOH.
- 8 Desnature e neutralize o pool de bibliotecas.
- 9 Prepare a lâmina de fluxo e a plataforma.

- 10 Prepare a mistura master de ExAmp.
- 11 Carregue a mistura de ExAmp/biblioteca na lâmina de fluxo.
- 12 Carregue um tubo de biblioteca vazio na posição n.º 8 do cartucho de cluster.

Métodos

- ▶ Verifique se você tem os equipamentos e os materiais de consumo necessários. Consulte *Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário* na página 26.
- ▶ Verifique se o instrumento está ligado e tem espaço suficiente de armazenamento para a execução. Consulte *Gestão de processos* na página 9.
- ▶ Verifique se a limpeza automática após a execução em ambos os lados do instrumento está concluída antes de iniciar a etapa 6 do fluxo de trabalho (consulte *Resumo do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp* na página 38).
- ▶ Sempre verifique a etiqueta ao preparar materiais de consumo para garantir a compatibilidade entre os componentes. Não misture os componentes SP, S1, S2 e S4 ou componentes de duas cavidades com componentes de quatro cavidades em um lado do instrumento.
- ▶ Siga as instruções na ordem mostrada, usando os volumes, as temperaturas e as durações especificadas.
- ▶ Quando não estiver misturando ativamente, coloque todos os reagentes e bibliotecas em gelo.
- ▶ A menos que um ponto de parada esteja especificado nas instruções, prossiga imediatamente para a etapa seguinte.
- ▶ Para iniciar o sequenciamento com sucesso em uma lâmina de fluxo de duas cavidades, ambas as cavidades devem estar cheias. Para iniciar o sequenciamento com sucesso em uma lâmina de fluxo de quatro cavidades, uma cavidade pode estar parcialmente enchida ou vazia.
- ▶ As causas mais comuns de variações nos resultados ao misturar os reagentes ExAmp manualmente são a distribuição imprecisa dos volumes do componente ExAmp e mistura insuficiente. Não misture insuficientemente.



OBSERVAÇÃO

Inicie a execução de sequenciamento imediatamente após o carregamento de bibliotecas na lâmina de fluxo, preferencialmente em até 30 minutos.

Orientações da biblioteca

Todas as instruções aplicam-se a métodos de preparação de biblioteca compatíveis e presumem um tamanho de inserção típico para aplicações NovaSeq 6000 compatíveis.

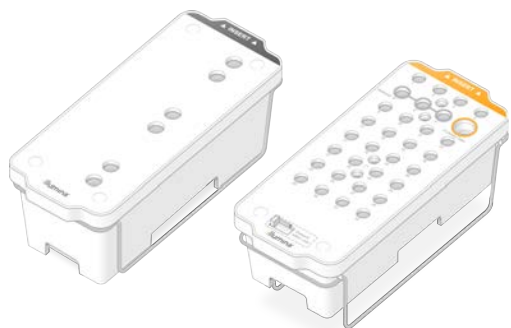
- ▶ Para obter melhores resultados, agrupe e desnature bibliotecas imediatamente antes do sequenciamento.
Para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, não prepare a mistura master de ExAmp até que esteja pronto para fazer o sequenciamento.
- ▶ Dilua a biblioteca para uma concentração de carga apropriada para a aplicação. Uma concentração de carga muito baixa ou muito elevada tem um impacto negativo sobre a porcentagem de passagem de clusters pelo filtro (% de PF). Uma baixa concentração da biblioteca aumenta o sequenciamento de duplicados. Uma alta concentração da biblioteca pode diminuir a % de PF.

- ▶ A obtenção de uma % de PF ideal requer uma quantificação precisa da biblioteca e um controle de qualidade adequado. Para obter recomendações, consulte a documentação do seu kit de preparação de bibliotecas.
- ▶ Carregue um tubo de biblioteca vazio na posição n.º 8 do cartucho de cluster antes de configurar a execução de sequenciamento. O tubo de biblioteca vazio é usado para preparar a mistura de condicionamento antes da distribuição da lâmina de fluxo. A mistura de condicionamento ajuda a melhorar a eficiência de clusterização para o sequenciamento.

Descongelar os cartuchos de SBS e de cluster

- 1 Se uma execução de sequenciamento estiver em andamento, certifique-se de que ambos os lados do instrumento estarão disponíveis quando o congelamento estiver concluído.
- 2 Remova os cartuchos de SBS e de cluster do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
- 3 Coloque cada cartucho em um rack de descongelamento com fios. Os racks são fornecidos com o instrumento e evitam que ele vire no banho-maria.

Figura 15 Cartuchos em racks de descongelamento com fios



- 4 Descongele em banho-maria em temperatura ambiente (19 °C a 25 °C). Mergulhe até a metade.
- 5 Use a seguinte tabela para determinar a duração do descongelamento.



CUIDADO

O uso de água quente para descongelar reagentes pode provocar degradação da qualidade dos dados ou falha na execução.

Cartucho	Duração do descongelamento
Cartucho de SBS SP, S1 e S2	4 horas
Cartucho de cluster SP, S1 e S2	Até 2 horas
Cartucho de SBS S4	4 horas
Cartucho de cluster S4	Até 4 horas

- 6 Seque bem as bases do cartucho usando toalhas de papel. Seque entre os poços para que toda a água seja removida.
- 7 Verifique se há presença de água nos selos de alumínio. Se houver água, seque com um tecido sem fiapos
- 8 Inspeccione o lado de baixo de cada cartucho para certificar-se de que os reservatórios estão livres de gelo, o que indica que os reagentes estão descongelados.

- 9 Inverta cada cartucho dez vezes para misturar os reagentes.
- 10 Bata levemente a parte inferior de cada cartucho na bancada para reduzir as bolhas de ar.
- 11 Se os reagentes não puderem ser carregados no instrumento em até 4 horas, armazene de 2 °C a 8 °C por até 24 horas.

Esvaziar frascos de reagente usados

Use as seguintes instruções para esvaziar os frascos de reagente usados com **cada** execução de sequenciamento. Se seu sistema estiver configurado para encaminhar externamente os reagentes usados, o frasco pequeno coletará reagentes usados e deverá ser esvaziado em cada execução de sequenciamento. O frasco grande deve estar no lugar.



ADVERTÊNCIA

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

- 1 Remova e esvazie o frasco pequeno de reagente usado conforme as instruções a seguir.
 - a Levante a alavanca e remova da alcova o frasco pequeno de reagente usado. Segure o frasco pelos lados.
 - b Remova a tampa com rosca do suporte da tampa na frente do frasco.
 - c Sele a abertura do frasco com a tampa para evitar derramamentos.
 - d Mantendo o conteúdo separado do conteúdo do outro frasco, descarte de acordo com as normas aplicáveis.
 - e Devolva o frasco destampado para a alcova e, em seguida, abaixe a alavanca. Guarde a tampa no suporte da tampa.
- 2 Remova e esvazie o frasco grande de reagente usado conforme as instruções a seguir.
 - a Utilizando a alça superior, remova o frasco grande de reagente usado pelo lado esquerdo da gaveta de tampão.
 - b Remova a tampa com rosca do suporte da tampa na frente do frasco.
 - c Sele a abertura do frasco com a tampa com rosca para evitar derramamentos.
 - d Descarte o conteúdo em conformidade com as normas aplicáveis. Segure ambas as alças ao esvaziar.
 - e Devolva o frasco destampado para a gaveta de tampão. Guarde a tampa no suporte da tampa.

Figura 16 Devolver o frasco vazio



- 3 Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície do instrumento.
- 4 Feche a gaveta de tampão e, em seguida, feche as portas do compartimento de líquidos.



ADVERTÊNCIA

O não esvaziamento dos frascos de reagente usados pode resultar em uma execução encerrada e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

Preparar lâmina de fluxo

- 1 Retire um novo pacote da lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- 2 Separe o pacote da lâmina de fluxo vedado por 10 a 15 minutos para permitir que a lâmina de fluxo atinja a temperatura ambiente.
Use a lâmina de fluxo em até 12 horas após a respectiva remoção do pacote.

Agrupar, desnaturar e carregar bibliotecas para o sequenciamento

Descongelar os reagentes ExAmp

- 1 Remova um tubo de cada, DPX1, DPX2 e DPX3, do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
- 2 Descongele em temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 3 Reserve em gelo.



OBSERVAÇÃO

Se você precisar congelar os reagentes ExAmp não abertos novamente, faça isso imediatamente após descongelá-los. Os reagentes ExAmp podem ser congelados novamente apenas uma vez. Os reagentes residuais não podem ser congelados nem combinados.

Criar um pool de bibliotecas normalizadas

Use as seguintes instruções para normalizar bibliotecas na concentração apropriada e depois agrupe. As bibliotecas sequenciadas na mesma cavidade devem ser combinadas em um único pool. O volume total por cavidade de cada pool normalizado é mostrado na seguinte tabela. Se o mesmo pool for sequenciado em mais de uma cavidade, multiplique o valor da [Tabela 17](#) pelo número de cavidades.

Tabela 17 Volume total da biblioteca em pool

Modo	Volume total do pool por cavidade (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Para o fluxo de trabalho Xp, a saída de dados é obtida para cada cavidade, em contraste com todas as cavidades juntas para o fluxo de trabalho Padrão. Conseqüentemente, os pools de biblioteca do fluxo de trabalho Xp contêm menos bibliotecas, em comparação com o fluxo de trabalho Padrão.

Consulte a tabela a seguir para obter o número típico de leituras e a complexidade recomendada por aplicação e tipo da lâmina de fluxo.

Tabela 18 Complexidade recomendada de pool de biblioteca

Aplicação	Tipo da lâmina de fluxo	Leituras do tipo paired-end que passam pelo filtro por cavidade (B)	Bibliotecas por cavidade
Genomas humanos	SP	0,65 a 0,8	1
	S1	1,3 a 1,6	~2
	S2	3,3 a 4,1	~5
	S4	4,0 a 5,0	~6
Exomas	SP	0,65 a 0,8	~10
	S1	1,3 a 1,6	~20
	S2	3,3 a 4,1	~50
	S4	4,0 a 5,0	~62
Transcriptomas	SP	0,65 a 0,8	~8
	S1	1,3 a 1,6	~16
	S2	3,3 a 4,1	~41
	S4	4,0 a 5,0	~50

Normalizar as bibliotecas para o pool

- Determine a concentração da biblioteca agrupada necessária com base na concentração da carga final desejada.

Consulte *Concentrações de carga recomendadas* na página 44.

Concentração de carga final (pM)	Concentração da biblioteca agrupada (nM)
100	0,5
150	0,75

Concentração de carga final (pM)	Concentração da biblioteca agrupada (nM)
200	1,0
250	1,25
300	1,5
350	1,75
400	2,0
450	2,25
500	2,5

- 2 Normalize as bibliotecas para a concentração de carga da biblioteca agrupada desejada usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
 Para assistência na diluição de bibliotecas para a concentração apropriada, consulte o Pooling Calculator em support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html.

Concentrações de carga recomendadas

A concentração de carga de DNA ideal depende do tipo de biblioteca e do tamanho de inserção. A tabela a seguir fornece as concentrações de carga de DNA recomendadas com base em bibliotecas da Illumina com tamanhos de inserção ≤ 450 bp. Carregue bibliotecas com tamanhos de inserção menores na extremidade inferior do intervalo recomendado. Para bibliotecas > 450 bp, podem ser necessárias concentrações de carga maiores.

Tabela 19 Concentrações de carga recomendadas

Tipo de biblioteca	Concentração de carga final (pM)	Concentração de carga agrupada (nM)
PhiX ¹	100	0,5
Pool de bibliotecas de DNA PCR-free	115 a 235	0,575 a 1,175
Pool de bibliotecas de DNA PCR-amplified	200 a 400	1,0 a 2,0
Uma célula	175 a 275	0,875 a 1,375

¹ Para uma execução somente de PhiX.

Se você tiver otimizado a concentração de carga para HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 ou HiSeq™ 3000, use aproximadamente a mesma concentração para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp. Se você tiver otimizado a concentração de carga para o fluxo de trabalho do NovaSeq Padrão, use aproximadamente 1/3 a menos para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp.



OBSERVAÇÃO

As bibliotecas podem precisar ser tituladas para se obter a concentração ideal de sementeira. Quando for determinada a concentração ideal de carregamento, ela é aplicada em tipos idênticos de bibliotecas.

Agrupar bibliotecas normalizadas e adicionar um controle PhiX opcional

- 1 Combine o volume apropriado de cada biblioteca normalizada em um novo tubo de microcentrífuga para que produza os volumes finais apropriados por cavidade.

Modo	Volume total do pool por cavidade (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Por exemplo, para um pool sêxtuplo de bibliotecas e modo S4, combine 5 µl de cada biblioteca que foi normalizada na mesma concentração.

- 2 **[Opcional]** Armazene as bibliotecas *não agrupadas* restantes a uma temperatura de -25 °C a -15 °C.
- 3 **[Opcional]** Faça spike-in de 1% de PhiX não desnaturado da seguinte forma.
 - a Dilua 10 nM de PhiX em 0,25 nM usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
 - b Adicione o volume apropriado de PhiX ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas.

Modo	PhiX 0,25 nM (µl) não desnaturado	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)
SP/S1	0,7	18
S2	0,8	22
S4	1,1	30

Ao fazer spike-in em PhiX, 1% é a quantidade recomendada para bibliotecas bem equilibradas. Bibliotecas de baixa diversidade podem exigir mais. Para usar um controle de PhiX com bibliotecas de baixa diversidade, entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter orientações.

Preparar uma diluição fresca de NaOH

Prepare uma diluição *fresca* de 0,2 N de NaOH para desnaturar bibliotecas para o sequenciamento. Para minimizar os erros de pipetagem que podem afetar a concentração final de NaOH, prepare pelo menos 30 µl de NaOH diluído por lâmina de fluxo. Para uma execução de lâmina de fluxo dupla, prepare 60 µl de NaOH diluído.



CUIDADO

É essencial usar 0,2 N de NaOH para o processo de desnaturação. A desnaturação inadequada pode reduzir o rendimento.

- 1 Para uma lâmina de fluxo, combine os seguintes volumes em um tubo de microcentrífuga para diluir 1 N de NaOH em 0,2 N.
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (24 µl)
 - ▶ 1 N de NaOH (6 µl) de estoque
 Esses volumes resultarão em 30 µl de NaOH 0,2 N. Para duas lâminas de fluxo, duplique os volumes.
- 2 Inverta várias vezes para misturar ou agite completamente. Mantenha o tubo tampado e use em até **12 horas**.

Desnaturar pool de bibliotecas e controle de PhiX opcional

- 1 Adicione 0,2 N de NaOH ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas e PhiX opcional da seguinte maneira.

Modo	0,2 N de NaOH (µl)	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)	Volume resultante
SP/S1	4,0	18,0	22,0 µl ou 22,7 µl com PhiX
S2	5,0	22,0	27,0 µl ou 27,8 µl com PhiX
S4	7,0	30,0	37,0 µl ou 38,1 µl com PhiX

- 2 Tampe e, em seguida, agite por um momento.
- 3 Centrifugue a 280 × g por até um minuto, no máximo.
- 4 Incube à temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturar.
- 5 Acrescente 400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 para neutralizar da seguinte forma.

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

- 6 Tampe e, em seguida, agite por um momento.
- 7 Centrifugue a 280 × g por até um minuto, no máximo.
- 8 Mantenha as bibliotecas desnaturadas em gelo até que estejam prontas para adicionar a mistura master de ExAmp.
- 9 **[Opcional]** Se não puder continuar imediatamente, tampe o tubo e armazene em -25 °C a -15 °C até três semanas, no máximo. Não congele novamente depois de descongelado.



CUIDADO

Armazene os pools de biblioteca desnaturada somente se for necessário. O armazenamento de longo prazo pode aumentar as duplicatas, que diminuem o rendimento.

Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma

- 1 Coloque a plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp em uma superfície plana. Mantenha o nível da lâmina de fluxo até que esteja carregado no instrumento.
- 2 Inspeccione a plataforma e certifique-se de que ela esteja livre de material particulado.
- 3 Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície de vidro da lâmina de fluxo.
- 4 Com a embalagem metálica da lâmina de fluxo sobre a superfície plana, puxe a ponta de alumínio da aba do canto para abrir.
- 5 Remova o retentor de plástico transparente que cobre a lâmina de fluxo.
- 6 Remova a lâmina de fluxo do pacote. Segure a lâmina de fluxo pelas laterais para evitar tocar o vidro ou as juntas inferiores.
- 7 Se o material particulado estiver visível em cada uma das superfícies do vidro, limpe a respectiva superfície com uma compressa sem fiapos com álcool e seque com um lenço para laboratório com poucos fiapos.

- Descarte a embalagem de modo apropriado.

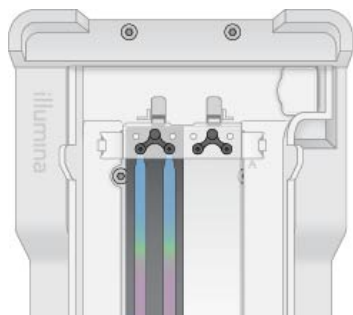


OBSERVAÇÃO

Alguns arranhões e outros defeitos cosméticos menores na lâmina de fluxo são normais e não afetam a qualidade dos dados.

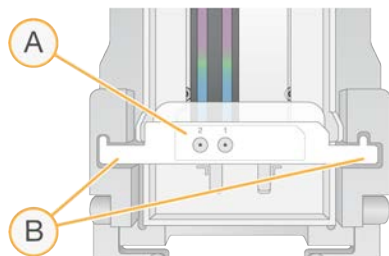
- Inverta a lâmina de fluxo de modo que a superfície superior fique voltada **para baixo**.
- Deslize a ponta de saída da lâmina de fluxo abaixo do suporte e coloque-a na plataforma. Consulte *Lâmina de fluxo* na página 13 e *Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp* na página 17.

Figura 17 Colocação da lâmina de fluxo



- Com os poços voltados para cima, carregue o coletor NovaSeq Xp sobre a extremidade de entrada da lâmina de fluxo. Certifique-se de que os braços do coletor NovaSeq Xp se encaixem firmemente nas incisões da plataforma.

Figura 18 Colocação do coletor NovaSeq Xp



- A Poços do coletor NovaSeq Xp voltados para cima
- B Braços do coletor NovaSeq Xp colocados nas incisões da plataforma

- Feche a fixação para prender a lâmina de fluxo e o coletor NovaSeq Xp e fechar as juntas.
- Descarte o coletor NovaSeq Xp após carregar os pools de biblioteca na lâmina de fluxo. O coletor NovaSeq Xp só pode ser usado uma vez.

Preparar a mistura master de ExAmp

Ao preparar a mistura master de ExAmp, use um tubo para microcentrífuga que comporte pelo menos duas vezes o volume necessário:

- ▶ Para uma lâmina de fluxo de duas cavidades, use um tubo de 0,5 ml ou 1,7 ml.
- ▶ Para uma lâmina de fluxo de quatro cavidades, use um tubo de 1,7 ml.

As causas mais comuns de variações nos resultados ao misturar os reagentes ExAmp manualmente são a distribuição imprecisa dos volumes e mistura insuficiente. Não misture insuficientemente.

- 1 Inverta ou agite por algum tempo para misturar o DPX1 e o DPX2.
- 2 Agite o DPX3 por algum tempo para misturar.
Os reagentes ExAmp podem ter sido separados no armazenamento. Eles são viscosos, especialmente o DPX2 e o DPX3. O DPX3 não mistura facilmente quando invertido, devido à alta viscosidade.
- 3 Centrifugue o DPX1, o DPX2 e o DPX3 por algum tempo.
- 4 Combine os seguintes volumes em um tubo adequado para microcentrifuga na ordem especificada.

Ordem de adição	Reagente*	Volume para lâminas de fluxo de duas cavidades (SP/S1/S2) (µl)	Volume para lâminas de fluxo de quatro cavidades (S4) (µl)
1	DPX1	126	315
2	DPX2	18	45
3	DPX3	66	165

*As tampas do tubo de reagente DPX podem ser codificadas por cores (vermelho, amarelo e azul para DPX1, DPX2 e DPX3, respectivamente). Verifique se os códigos de cores são preservados ao trocar as tampas dos tubos.

Esses volumes resultam na mistura master de 210 µl de ExAmp para o modo SP, S1 ou S2, ou 525 µl de mistura master para o modo S4. Esses volumes são suficientes para o modo aplicável. É incluído um volume extra para compensar erros de pipetagem ao carregar bibliotecas na lâmina de fluxo.

- 5 Pipete e distribua lentamente para evitar bolhas e certifique-se de que todo o volume seja expelido da ponta.
- 6 Agite durante 20 a 30 segundos ou até que esteja completamente misturado.



OBSERVAÇÃO

A mistura master de ExAmp é estável à agitação.

A mistura pode parecer turva, o que é normal.

- 7 Centrifugue a 280 × g por até um minuto.
- 8 **Para obter o melhor desempenho de sequenciamento, continue imediatamente com a próxima etapa. Se necessário, o armazenamento ideal da mistura master é até 1 hora em gelo. Use em 30 minutos se estiver armazenado em temperatura ambiente.**

Carregar bibliotecas na lâmina de fluxo

Para obter melhores resultados, faça o seguinte:

- ▶ Mantenha a lâmina de fluxo carregada à temperatura ambiente. Não refrigere nem coloque no gelo.
 - ▶ A incubação prolongada pode reduzir o percentual de clusters que passam pelo filtro (%PF).
 - ▶ Inicie a execução em até 30 minutos a contar do carregamento dos pools de biblioteca na lâmina de fluxo.
 - ▶ O uso imediato da mistura de ExAmp/biblioteca rende melhores resultados.
- 1 Adicione a mistura master de ExAmp a cada pool de bibliotecas desnaturadas da seguinte maneira e depois agite durante 20 a 30 segundos para misturar.
Se estiver usando tiras de tubos, pipete para misturar até que fique homogêneo.

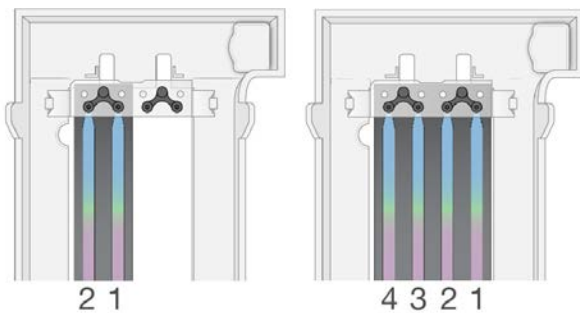
Modo	Pool de bibliotecas desnaturadas (µl)	Mistura master de ExAmp (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 2 Centrifugue a $280 \times g$ por até um minuto.
- 3 Usando uma pipeta de $200 \mu\text{l}$, adicione o volume apropriado da mistura de ExAmp/biblioteca a cada poço de coletor NovaSeq Xp.
 - ▶ Para evitar a formação de bolhas, carregue as amostras lentamente.
 - ▶ Certifique-se de adicionar a mistura do pool de biblioteca ao poço que corresponde à cavidade de destino.
 - ▶ Evite o contato com o filtro na parte inferior do poço ao pipetar.
 - ▶ Não é necessário aguardar até o enchimento completo da cavidade antes de adicionar a mistura aos poços restantes do coletor.

Modo	Mistura de biblioteca/ExAmp por poço (μl)
SP/S1	80
S2	95
S4	130

Os poços numerados do coletor NovaSeq Xp correspondem ao número da cavidade da lâmina de fluxo. Quando a lâmina de fluxo é invertida, a numeração da cavidade é revertida.

Figura 19 Numeração da cavidade invertida



- 4 Depois de adicionar a mistura de ExAmp/biblioteca a todos os poços do coletor, aguarde aproximadamente 2 minutos para a mistura alcançar a extremidade oposta de cada cavidade. Uma pequena bolha de ar na extremidade de saída da cavidade é normal. Um pequeno volume da mistura pode permanecer nos poços do coletor depois que a cavidade estiver cheia.



CUIDADO

Não incline a lâmina de fluxo ao tentar verificar se as cavidades estão cheias ou se há bolhas. A inclinação pode fazer com que a mistura de ExAmp/biblioteca vaze da lâmina de fluxo. Se uma cavidade não encher completamente, não tente corrigi-la. O rendimento de dados de uma cavidade parcialmente encheda pode ser reduzido. Não tente recuperar a amostra da lâmina de fluxo.



OBSERVAÇÃO

Não incline a lâmina de fluxo ao transportá-la.

Preparar cartuchos de SBS e de cluster

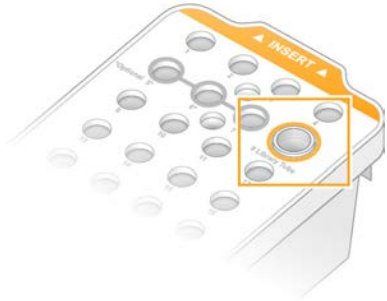
- 1 Inspecione o lado de baixo de cada cartucho para certificar-se de que os reservatórios estão livres de gelo, o que indica que os reagentes estão descongelados.
- 2 Inverta cada cartucho dez vezes para misturar os reagentes.
- 3 Bata levemente a parte inferior de cada cartucho na bancada para reduzir as bolhas de ar.

Carregar tubo vazio da biblioteca

- 1 Destampe o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.
- 2 Insira o tubo da biblioteca vazio e sem tampa na posição do **tubo da biblioteca** (n.º 8) do cartucho de cluster.

O tubo da biblioteca vazio deve estar presente para leitura por RFID e mistura de reagente dentro do aparelho. O código de barras do tubo da biblioteca não é validado em relação ao código de barras especificado no arquivo do LIMS. O RFID é validado para garantir que o tubo não foi usado.

Figura 20 Tubo da biblioteca destampado carregado na posição n.º 8



Capítulo 6 Sequenciamento

Configurar uma execução de sequenciamento	51
Monitorar o andamento da execução	57
Início escalonado de execuções	58
Excluir a execução	59
Remover a posição n.º 30	59
Limpeza automática após a execução	60

Configurar uma execução de sequenciamento

A Illumina recomenda que você permaneça conectado enquanto o NVCS estiver em execução e enquanto um sequenciamento estiver em andamento.

- 1 Remova todos os itens da superfície do instrumento.
Mantenha a superfície limpa durante a execução de sequenciamento e evite inclinar-se sobre o instrumento. A pressão na porta da lâmina de fluxo pode fazer com que a porta se abra, o que interrompe a execução. As execuções interrompidas não podem ser retomadas.



OBSERVAÇÃO

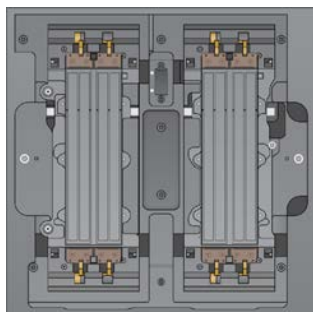
O início escalonado de novas execuções tem suporte. O cronômetro de início escalonado indica quando uma execução escalonada poderá ser iniciada. Para obter mais informações, consulte *Início escalonado de execuções* na página 58.

- 2 Na tela Home (Início), selecione **Sequence** (Sequência) e, em seguida, selecione uma execução de lâmina de fluxo simples ou dupla:
 - ▶ **A+B**: configura uma execução de lâmina de fluxo duplo.
 - ▶ **A**: configura uma execução de lâmina de fluxo simples na lateral A.
 - ▶ **B**: configura uma execução de lâmina de fluxo simples na lateral B.O software inicia a série de telas de configuração de execução, começando com Load (Carregar).
- 3 Selecione **OK** para reconhecer o aviso e abrir a porta da lâmina de fluxo.

Carregar a lâmina de fluxo no instrumento

- 1 Se estiver presente, remova a lâmina de fluxo da execução anterior.
- 2 Se o material particulado estiver visível no estágio da lâmina de fluxo, limpe todo o estágio, inclusive a interface do fluxo de reagentes e a superfície de vidro do alvo de alinhamento óptico com uma compressa com álcool. Seque com um tecido sem fiapos.

Figura 21 Estágio da lâmina de fluxo



- 3 [Fluxo de trabalho Padrão] Remova a lâmina de fluxo da embalagem da seguinte forma.
- Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície de vidro da lâmina de fluxo.
 - Com a embalagem sobre uma superfície plana, puxe a ponta de alumínio da aba do canto para abrir.
 - Remova o retentor de plástico transparente que cobre a lâmina de fluxo.
 - Remova a lâmina de fluxo do pacote. Segure a lâmina de fluxo pelas laterais para evitar tocar o vidro ou as juntas inferiores.
 - Se o material particulado estiver visível em cada uma das superfícies do vidro, limpe a respectiva superfície com uma compressa sem fiapos com álcool e seque com um lenço para laboratório com poucos fiapos.
 - Descarte a embalagem de modo apropriado.

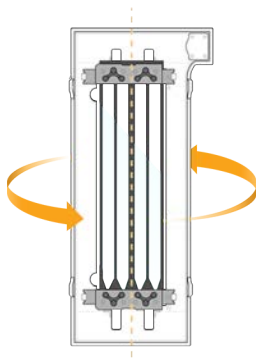


OBSERVAÇÃO

Alguns arranhões e outros defeitos cosméticos menores na lâmina de fluxo são normais e não afetam a qualidade dos dados.

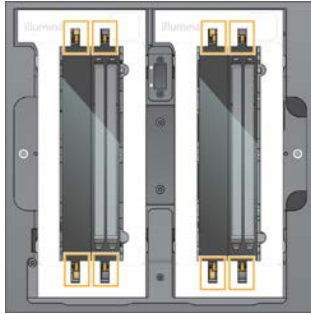
- 4 [Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Descarregue a lâmina de fluxo da plataforma da seguinte maneira.
- Abra a fixação que prende a lâmina de fluxo e o coletor.
 - Sem permitir que o líquido goteje na lâmina de fluxo, remova cuidadosamente e descarte o coletor.
 - Se o líquido gotejar na lâmina de fluxo, limpe com uma compressa com álcool sem fiapos e seque com um tecido de laboratório sem fiapos.
 - Segure os lados da lâmina de fluxo para removê-la da plataforma. Mantenha a lâmina de fluxo nivelada.
 - Se houver material residual nas juntas, seque as quatro juntas da lâmina de fluxo com um tecido sem fiapos para secar. Não toque nas juntas.
 - Inverta a lâmina de fluxo em volta do eixo longo de modo que a superfície superior fique voltada para cima.

Figura 22 Inverta a lâmina de fluxo em torno do eixo longo



- Antes de retornar a plataforma ao armazenamento, inspecione-a e certifique-se de que ela esteja livre de material particulado.
- 5 Alinhe a lâmina de fluxo ao longo das quatro fixações levantadas e coloque-a no estágio da lâmina de fluxo.

Figura 23 Lâminas de fluxo carregadas alinhadas sobre fixações



- 6 Selecione **Close Flow Cell Door** (Fechar porta da lâmina de fluxo).
A porta da lâmina de fluxo se fecha, os sensores e o RFID são verificados e a identificação da lâmina de fluxo é exibida na tela.

Carregar os cartuchos de SBS e de cluster

OBSERVAÇÃO

Para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, antes de carregar o cartucho de cluster, certifique-se de que o tubo da biblioteca vazio e destampado esteja carregado no cartucho.

- 1 Abra as portas de compartimentos de líquidos e, em seguida, abra a porta do refrigerador de reagentes.
- 2 Remova os cartuchos usados de SBS e de cluster.
Os cartuchos usados têm selos de alumínio perfurados.
- 3 Descarte conteúdos não utilizados de acordo com as normas aplicáveis.
Para um descarte seguro de posição n.º 30 do cartucho de cluster, consulte *Remover a posição n.º 30 na página 59*.
- 4 Carregue os cartuchos preparados na gaveta de refrigerador de reagentes de modo que as etiquetas **Insert** (Inserir) fiquem voltadas para a traseira do instrumento:
 - ▶ Coloque o cartucho de SBS (etiqueta cinza) na posição esquerda.
 - ▶ Coloque o cartucho de cluster (etiqueta laranja) que contém o tubo da biblioteca destampado na posição direita.

Figura 24 Cartuchos de reagente carregados

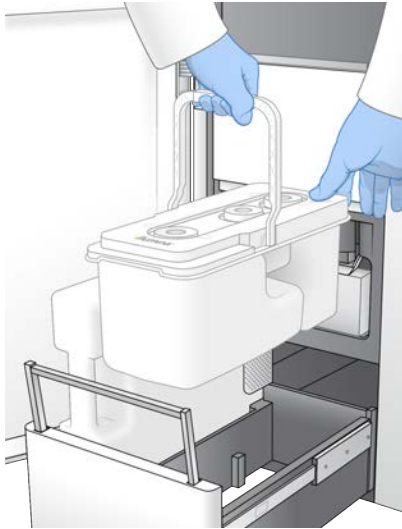


- 5 Deslize a gaveta para dentro do refrigerador e, em seguida, feche a porta do refrigerador de reagentes.
Os sensores e os RFIDs são verificados. As identificações do tubo da biblioteca e os dois cartuchos são exibidos na tela.

Carregar o cartucho de tampão

- 1 Puxe a alça de metal para abrir a gaveta de tampão.
- 2 Remova o cartucho de tampão usado pelo lado direito da gaveta de tampão. O cartucho de tampão usado tem selos de alumínio perfurado.
- 3 Coloque um novo cartucho de tampão na gaveta de tampão de modo que a etiqueta **Illumina** fique voltada para a frente da gaveta. Alinhe o cartucho com as guias levantadas no piso e laterais da gaveta. Quando carregado adequadamente, o cartucho de tampão é encaixado uniformemente e a gaveta pode ser fechada.

Figura 25 Carregar o cartucho de tampão



- 4 Se ambos os frascos de reagentes usados estiverem vazios, marque a caixa de seleção confirmando que ambos os frascos de reagentes usados estão vazios.



ADVERTÊNCIA

O não esvaziamento dos frascos de reagente usados pode resultar em uma execução encerrada e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

- 5 Selecione o botão disponível:
 - ▶ **Log In** (Fazer login): abre a tela Log In (Fazer login) para acessar o BaseSpace Sequence Hub. Prossiga para [Acessar o BaseSpace Sequence Hub](#).
 - ▶ **Run Setup** (Configuração da execução): pula o BaseSpace Sequence Hub e abre a tela Run Setup (Configuração da execução) para inserção dos parâmetros. Prossiga para [Digitar parâmetros de execução na página 55](#).

O botão que estará disponível dependerá de o sistema estar ou não configurado para o BaseSpace Sequence Hub.

Acessar o BaseSpace Sequence Hub

Quando você abre o NVCS, seu grupo de trabalho padrão do BaseSpace Sequence Hub é selecionado como grupo de trabalho. Se você não especificar um padrão, será selecionado seu grupo de trabalho pessoal.

- 1 **[Opcional]** Atualize as configurações do BaseSpace Sequence Hub para a execução atual:
 - ▶ Para desativar o BaseSpace Sequence Hub, desmarque a caixa de seleção **BaseSpace Sequence Hub** e, em seguida, selecione **Run Setup** (Configuração de execução) para continuar sem acessar.
 - ▶ Para enviar dados de execução ao BaseSpace Sequence Hub para monitoramento remoto e análise de dados, selecione **Run Monitoring and Storage** (Monitoramento de execução e armazenamento). Essa opção requer uma planilha de amostras.
 - ▶ Para enviar arquivos InterOp, runinfo.xml e runParameters.xml para o BaseSpace Sequence Hub a fim de monitorar a execução remotamente, selecione **Run Monitoring Only** (Somente monitoramento de execução).
- 2 Informe seu nome de usuário e sua senha do BaseSpace Sequence Hub e, em seguida, selecione **Sign In** (Acessar).
- 3 Se solicitado, selecione um grupo de trabalho para o qual fazer o upload dos dados de execução e, em seguida, selecione **Run Setup** (Configuração de execução).
Isso só será solicitado se você pertencer a vários grupos de trabalho.

Digitar parâmetros de execução

- 1 Se o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp estiver habilitado, selecione um tipo de fluxo de trabalho.
 - ▶ Se você selecionar **NovaSeq Xp**, certifique-se de que esteja carregado um tubo de biblioteca vazio.
 - ▶ Se você selecionar **NovaSeq Padrão**, certifique-se de que a amostra esteja carregada no tubo de biblioteca.
- 2 No campo Run Name (Nome da execução), digite um nome de sua preferência para identificar a execução atual.
O nome de execução pode conter caracteres alfanuméricos, hifens e sublinhados.
- 3 Insira o número de ciclos para cada duração de leitura e índice na execução de sequenciamento. Não existe um número máximo de ciclos de índice, mas a soma dos ciclos de leitura e dos ciclos de índice deve ser inferior ao número de ciclos do kit.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1)—Insira um valor de até 151 ciclos para kits de 300 kits, ou de até 251 para ciclos de 500 kits.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1) — Insira o número de ciclos do primer do Índice 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Índice 2) — Insira o número de ciclos do primer do Índice 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Leitura 1)—Insira um valor de até 151 ciclos para kits de 300 kits, ou de até 251 para ciclos de 500 kits. Este valor é normalmente igual ao valor da Leitura 1.



OBSERVAÇÃO

O número de ciclos analisado na Leitura 1 e Leitura 2 é um ciclo a menos que o valor inserido. Por exemplo, para fazer uma execução de ciclo 150 do tipo paired-end (execução de 2×150 bp), insira o valor de 151 ciclos para a Leitura 1 e Leitura 2.

A soma dos quatro valores inseridos pode ultrapassar o número indicado de ciclos para o kit de reagentes selecionado em até 23 ciclos para execuções do tipo paired-end e 30 ciclos para execuções de leitura única.

- 4 Expanda **Advanced Options** (Opções avançadas) para aplicar as configurações à execução atual. Essas configurações são opcionais, exceto quando indicado.
 - ▶ **Primers personalizados:** marque a caixa de seleção **Custom Primers** (Primers personalizados) e, em seguida, marque as caixas de seleção apropriadas:
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1): usar o primer personalizado para a Leitura 1.

- ▶ **Read 2** (Leitura 2): usar o primer personalizado para a Leitura 2.
- ▶ **Custom Index** (Índice personalizado): usar o primer personalizado para o Índice 1.
- ▶ **Pasta de saída**: selecione **Browse** (Procurar) para alterar a pasta de saída para a execução atual. Uma pasta de saída é necessária quando a execução não está conectada ao BaseSpace Sequence Hub para armazenamento.
- ▶ **Samplesheet** (Planilha de amostras): selecione **Browse** (Procurar) para fazer upload de uma planilha de amostras, que é necessária ao usar o BaseSpace Sequence Hub para o monitoramento e armazenamento de execuções ou outro arquivo CSV. O arquivo CSV é copiado para a pasta de saída e não afeta os parâmetros de execução.
- ▶ **Custom Recipe** (Receita personalizada): selecione **Custom Recipe** (Receita personalizada) e depois **Browse** (Procurar) para usar uma receita personalizada em formato XML para esta execução.



OBSERVAÇÃO

A modificação das etapas de clusterização em uma receita personalizada não tem suporte.

- 5 Selecione **Review** (Revisão).
O software confirma que os parâmetros especificados são apropriados para a receita.

Confirmar parâmetros de execução

- 1 Confirme os parâmetros de execução exibidos na tela Review (Revisão).
- 2 **[Opcional]** Selecione **Back** (Voltar) para retornar à tela Run Setup (Configuração de execução) e editar os parâmetros de execução.
- 3 Selecione **Start Run** (Iniciar execução).
As verificações pré-execução são iniciadas automaticamente.

Analisar verificações antes da execução

- 1 Aguarde cerca de 5 minutos até que a verificação antes da execução seja concluída.
A execução é iniciada automaticamente após uma conclusão bem-sucedida.



OBSERVAÇÃO

Para evitar encher demais o disco rígido, não copie dados para o C:\ após o início da execução.

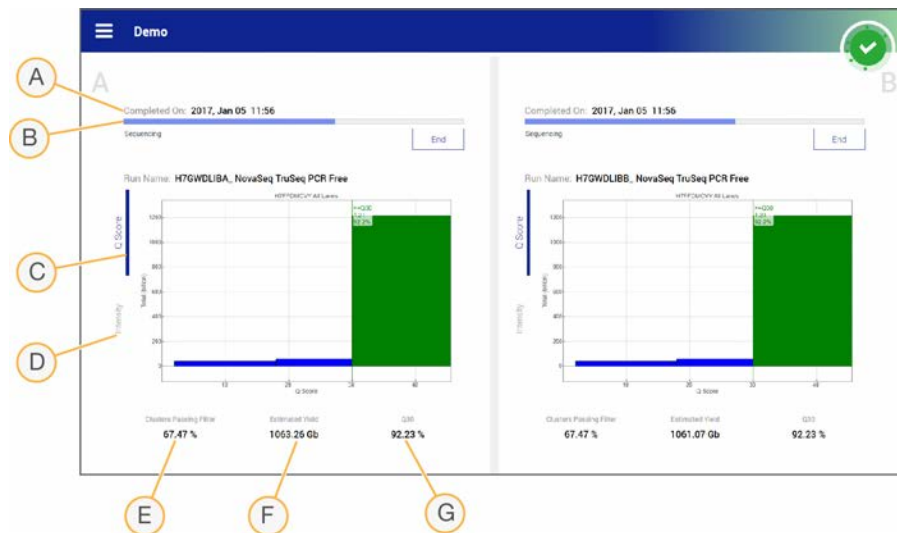
- 2 Se as verificações antes da execução falharem devido a um erro no sensor, por exemplo lâmina de fluxo não detectada, você deve sair e reiniciar o fluxo de trabalho.
- 3 Para outras falhas de verificações antes da execução, selecione **Retry** (Repetir) para reiniciar a verificação com falha ou **Retry All** (Repetir tudo) para reiniciar todas as verificações.
Os erros exigem resolução antes de iniciar a execução. Consulte [Erros da verificação antes da execução na página 67](#) quanto às informações de resolução de problemas.
- 4 Selecione o ícone **Error** (Erro) para ver os detalhes do erro.

- 5 Se a verificação de alinhamento falhar, resolva o erro conforme a seguir.
 - a Selecione **Reload** (Recarregar) e, em seguida, selecione **OK** para confirmar o retorno à tela Load (Carregar).
 - b Remova todos os itens da parte de cima do instrumento e, em seguida, selecione **OK**.
 - c Recarregue a lâmina de fluxo e, em seguida, selecione **Run Setup** (Configuração de execução).
 - d Continue em cada tela para reler todos os RFIDs e retorne à tela Pre-Run Checks (Verificações pré-execução).
 - e Refaça a verificação.

Monitorar o andamento da execução

- 1 Monitore o andamento, as intensidades e as pontuações de qualidade da execução conforme as medidas são exibidas na tela.
Para obter mais informações sobre medidas de execução, consulte *Real-Time Analysis* na página 71.

Figura 26 Andamento e medidas de execução de sequenciamento



- A **Time to completion** (Hora da conclusão): a data e a hora da conclusão (aaaa-mm-dd hh:mm).
- B **Run progress** (Progresso da execução): a etapa atual da execução. O tamanho da barra de andamento não é proporcional à taxa de execução de cada etapa.
- C **Q-Scores**: a distribuição das classificações de qualidade (Q-Scores).
- D **Intensity** (Intensidade): o valor das intensidades de cluster do 90^o percentil para cada bloco. As cores do gráfico indicam os canais vermelho e verde.
- E **Clusters passing filter (%)** (Passagem de clusters pelo filtro): a porcentagem da passagem de clusters pelo filtro.
- F **Estimated yield (Gb)** (Rendimento estimado): o número de bases projetadas para a execução.
- G **Q30**: a porcentagem de identificações de bases para a execução que tiverem um Q-Score ≥ 30 .



OBSERVAÇÃO

Se houver um desligamento ou reinicialização enquanto o NVCS estiver em execução, o usuário deve confirmar essa ação antes do prosseguimento da operação.

Medidas da execução

O software exibe medidas geradas durante a execução. As medidas são exibidas em forma de gráficos, gráficos de pontos e tabelas com base nos dados gerados pela RTA3 e gravados nos arquivos InterOp.

A clusterização leva cerca de duas horas; depois o sequenciamento é iniciado com o ciclo 1. As medidas são atualizadas conforme o sequenciamento continua. A passagem de clusters pelo filtro, o rendimento e as pontuações de qualidade estão disponíveis após o ciclo 26.

Status de processamento

A tela Process Management (Gestão de processos) lista o status de cada execução. No menu principal, selecione **Process Management** (Gestão de processos).

Para cada nome de execução, Process Management (Gestão de processos) lista o status dos seguintes processos:

- ▶ **Run Status** (Status de execução): com base no processamento de arquivos CBCL.
- ▶ **Network** (Rede): com base na transferência de arquivos usando o Serviço de cópia universal.
- ▶ **BaseSpace**: com base em upload de arquivo para o Serviço de cópia universal, se aplicável.

Quando um processo for concluído, uma marca de verificação verde será exibida. Para obter mais informações, consulte *Gestão de processos na página 9*.

Início escalonado de execuções

Você pode configurar e iniciar uma execução no lado ocioso do instrumento enquanto uma execução estiver em andamento no outro lado, o que é denominado início escalonado. As execuções escalonadas são configuradas em momentos específicos durante uma execução, conforme indicado pelos seguintes estados do cronômetro de contagem regressiva de início.

- ▶ **Run Start: Available** (Início da execução: Disponível) — O início escalonado está disponível no momento. A data e a hora mostradas quando o início escalonado ficar indisponível. Selecione **Sequence** (Sequência) para iniciar uma nova execução escalonada depois que o ciclo atual estiver concluído.
- ▶ **Run Start: Unavailable** (Início da execução: Indisponível) — O início escalonado está indisponível no momento. A data e a hora mostradas quando o início escalonado estiver disponível no outro lado do instrumento.
- ▶ **Waiting...** (Aguardando...) — Se for tentada uma nova execução quando o início escalonado estiver indisponível, o estado muda para Waiting (Aguardando) e a data e hora mostram o horário aproximado em que o instrumento estará pronto para a nova execução. O instrumento começará a configuração de execução quando o instrumento estiver disponível.

Quando você configura a nova execução, o software automaticamente faz uma pausa e retoma a execução na lâmina de fluxo adjacente, conforme necessário. O sistema é colocado em um estado seguro ao fazer a pausa.

Procedimento

- 1 Na tela início, selecione **Sequence** (Sequência) e, em seguida, selecione **A** ou **B**.
O lado selecionado deve ser o lado atualmente ocioso.
- 2 Aguarde até que a execução na lâmina de fluxo adjacente seja pausada. Para cancelar a nova execução e impedir a pausa, selecione **Cancel** (Cancelar).

Se a execução adjacente estiver executando a clusterização, ressíntese do tipo paired-end, geração de imagens ou limpeza, o software concluirá a etapa atual antes da pausa.

- 3 Quando a execução adjacente for pausada e a porta da lâmina de fluxo estiver aberta, configure a nova execução.
Quando a nova execução é iniciada, a execução em pausa é retomada automaticamente e, em seguida, a nova execução começa.

Excluir a execução

Após a conclusão da transferência de dados, você pode excluir a execução atual em Gestão de processos para liberar espaço para uma execução subsequente. A exclusão da execução limpa o CE e C:\ sem remover os arquivos de manutenção do sistema e sem afetar a rede nem a cópia do BaseSpace Sequence Hub. As execuções que estão em sequenciamento não podem ser excluídas.

- 1 No menu principal, selecione **Process Management** (Gestão de processos).
- 2 **[Opcional]** Certifique-se de que cada processo da execução exiba uma marca de verificação verde, o que indica que a transferência de dados foi concluída.
Você pode excluir uma execução cuja transferência para uma rede ou para o BaseSpace Sequence Hub não foi concluída, mas todos os dados da execução são perdidos.
- 3 Selecione **Delete Run** (Excluir execução) e **Yes** (Sim) para confirmar.
- 4 Selecione **Done** (Concluído).

Remover a posição n.º 30

O reservatório na posição n.º 30 do cartucho de cluster contém formamida. Ele é removido do cartucho de cluster usado e descartado separadamente.



ADVERTÊNCIA

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

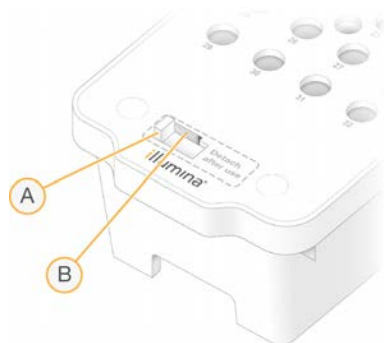
- 1 Usando luvas, empurre para a direita a aba de plástico branca rotulada **Detach after use** (Remover após o uso).
- 2 Coloque uma mão ou superfície sólida sob o reservatório e pressione a aba de plástico transparente em direção à etiqueta da Illumina para soltar o reservatório de sua posição sob o cartucho de cluster.



OBSERVAÇÃO

Evite empilhar os cartuchos de cluster ao armazenar. O empilhamento pode provocar deslocamento acidental do reservatório.

Figura 27 Posição removível n.º 30



- A Aba de plástico branca para remover
- B Aba de plástico transparente para soltar

3 Descarte o reservatório em conformidade com as normas aplicáveis.

Limpeza automática após a execução

Depois da conclusão do sequenciamento, o software inicia uma limpeza automática após a execução que leva cerca de 80 minutos. O sistema bombeia hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,24% na posição n.º 17 e o dilui a 0,12%. O NaOCl 0,12% é bombeado para o reagente ExAmp e as posições da biblioteca, por meio da lâmina de fluxo, e, em seguida, para os frascos de reagente usados. A lavagem limpa o modelo do sistema para evitar a contaminação cruzada.

Após a conclusão da limpeza, o sistema é colocado em um estado seguro, e o botão Home (Início) fica ativo. Deixe os materiais de consumo no lugar até a próxima execução. Após a limpeza, os aspiradores de líquidos permanecem nos cartuchos de SBS e de cluster para impedir a entrada de ar no sistema. Os aspiradores de líquidos no cartucho de tampão são levantados para que os frascos de reagente usados possam ser esvaziados.



OBSERVAÇÃO

Se ocorrer um erro durante uma limpeza automática após a execução, e esta estiver incompleta, é necessário fazer uma limpeza de manutenção.

Capítulo 7 Manutenção

Manutenção preventiva	61
Realizar uma limpeza de manutenção	61
Atualizações de software	65

Manutenção preventiva

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

Realizar uma limpeza de manutenção

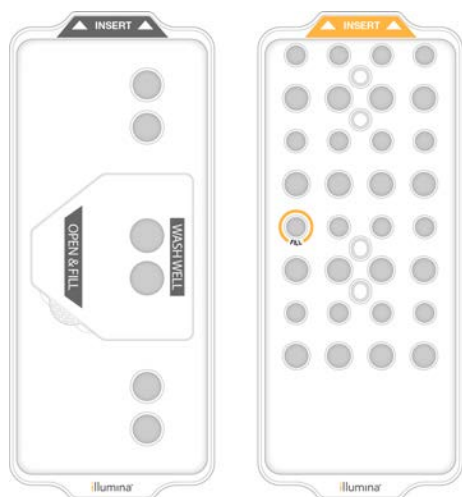
O software avisa que é necessária uma limpeza de manutenção nos seguintes momentos:

- ▶ Quando não houver uma execução de 4 cavidades com uma limpeza após a execução nos últimos 14 dias.
- ▶ Quando não houver uma limpeza de manutenção nos últimos 14 dias.
- ▶ Quando uma limpeza após a execução falhar ou estiver incompleta.

A limpeza de manutenção lava o sistema com as diluições fornecidas pelo usuário de Tween 20 e NaOCl. As diluições são bombeadas dos cartuchos de limpeza para a lâmina de fluxo, para os frascos de reagente usado e para todos os reservatórios de cartucho para limpar todos os aspiradores de líquido. A duração da limpeza é de cerca de 80 minutos.

A limpeza de manutenção exige um cartucho de tampão usado e o cartucho de limpeza SBS, o cartucho de limpeza de cluster e a lâmina de fluxo de quatro cavidades fornecida com o instrumento (ou uma lâmina de fluxo de quatro cavidades usada). Como os cartuchos reagentes, os cartuchos de limpeza são codificados por cores para impedir o carregamento de erros. O cartucho de limpeza SBS tem um poço central para a diluição de Tween 20. A diluição de NaOCl é adicionada a um reservatório no cartucho de limpeza do cluster.

Figura 28 Cartucho de limpeza SBS (à esquerda) e cartucho de limpeza de cluster (à direita)



Preparar a solução de limpeza

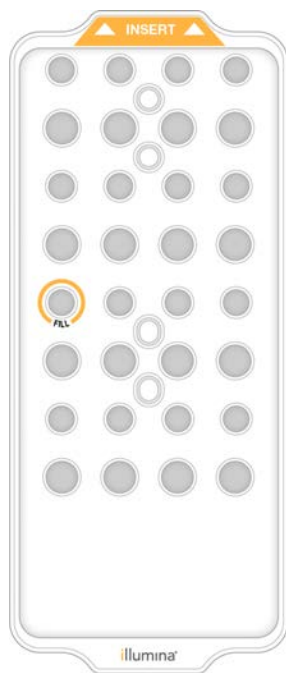
- 1 Adicione 400 ml de água aprovada para uso em laboratório a um frasco de centrífuga de 500 ml.
- 2 Adicione 0,2 ml de 100% de Tween 20 para resultar em pelo menos 400 ml de uma solução de limpeza de 0,05% de Tween 20.
O uso de uma diluição recém-preparada de Tween 20 impede a introdução de biocontaminantes no sistema do fluxo de reagentes.
- 3 Inverta para misturar.
- 4 Remova a tampa do poço central do cartucho de limpeza SBS.
- 5 Adicione a solução de limpeza ao poço central. Preencha até a linha de enchimento, que indica o volume mínimo necessário.
Os outros reservatórios permanecem vazios.

Figura 29 Poço central cheio até a linha MIN FILL VOLUME (Volume mínimo de enchimento)



- 6 Combine os seguintes volumes em um tubo de centrífuga de 30 ml para preparar 20 ml NaOCl 0,25%:
 - ▶ NaOCl 5% (1 ml)
 - ▶ Água deionizada (19 ml)
- 7 Inverta para misturar.
- 8 Adicione 5 ml de NaOCl 0,25% ao cartucho de limpeza de cluster.
O local é marcado como Fill (Encher) e tem um círculo laranja em torno dele. Todos os outros reservatórios permanecem vazios.

Figura 30 Posição para NaOCl 0,25%



Carregar a lâmina de fluxo de limpeza

- 1 Remova todos os itens da superfície do instrumento.
Mantenha a superfície livre durante a limpeza de manutenção e evite se inclinar sobre o instrumento. A pressão na porta da lâmina de fluxo pode causar sua abertura, o que impede a limpeza.
- 2 Na tela inicial, selecione **Wash** (Limpeza) e, em seguida, selecione qual lado limpar:
 - ▶ **A+B**: limpar ambos os lados simultaneamente.
 - ▶ **A**: limpar somente o lado A.
 - ▶ **B**: limpar somente o lado B.
 O software inicia a série de telas de limpeza.



OBSERVAÇÃO

Uma limpeza de manutenção apenas em um lado só pode ser iniciada quando o outro lado estiver ocioso ou realizando ciclos de leitura SBS. O tempo de início escalonado do NVCS indica a disponibilidade do instrumento para iniciar uma nova execução ou uma limpeza. Consulte *Início escalonado de execuções* na página 58.

- 3 Selecione **OK** para reconhecer o aviso e abrir a porta da lâmina de fluxo.
- 4 Se já não houver uma lâmina de fluxo de limpeza ou uma lâmina de fluxo de quatro cavidades, carregue uma.
- 5 Selecione **Close Flow Cell Door** (Fechar porta da lâmina de fluxo).
A porta se fecha, os sensores e o RFID são verificados e a identificação da lâmina de fluxo é exibida na tela.

Carregar os cartuchos de limpeza

É necessário lavar os cartuchos para uma limpeza de manutenção. Não use os cartuchos de SBS e de cluster usados.

- 1 Abra as portas de compartimentos de líquidos e, em seguida, abra a porta do refrigerador de reagentes.
- 2 Remova os cartuchos de reagentes de SBS e de cluster que foram usados. Descarte conteúdos não utilizados de acordo com as normas aplicáveis.
Para um descarte seguro de posição n.º 30 do cartucho de cluster, consulte *Remover a posição n.º 30 na página 59*.
- 3 Carregue os cartuchos de limpeza na gaveta de refrigerador de reagentes de modo que as etiquetas **Insert** (Inserir) fiquem voltadas para a traseira do instrumento:
 - ▶ Coloque o cartucho de SBS (etiqueta cinza) na posição esquerda.
 - ▶ Coloque o cartucho de cluster (etiqueta laranja) na posição direita.
- 4 Deslize a gaveta para dentro do refrigerador e, em seguida, feche a porta do refrigerador de reagentes. Os sensores são verificados, e o RFID para cada cartucho é digitalizado e exibido na tela.
- 5 Abra a gaveta de tampão.
- 6 Se já não estiver presente, carregue um cartucho de tampão usado.

Esvaziar frascos de reagente usados

Use as seguintes instruções para esvaziar os frascos de reagente usados com **cada** limpeza de manutenção. Mesmo que seu sistema esteja configurado para encaminhar externamente os reagentes usados, o frasco pequeno coleta reagentes usados e o frasco grande deve estar no local.



ADVERTÊNCIA

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

- 1 Remova o frasco pequeno de reagente usado e descarte o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis. Mantenha o conteúdo separado do conteúdo do outro frasco.
- 2 Devolva o receptáculo pequeno de reagente usado para a alcova.
- 3 Remova o frasco grande de reagente usado e descarte o conteúdo de acordo com as normas aplicáveis.
- 4 Devolva o frasco grande de reagente usado para a gaveta de tampão.
- 5 Coloque um novo par de luvas sem pó.
- 6 Feche a gaveta de tampão e, em seguida, feche as portas do compartimento de líquidos. Os sensores e os RFIDs são verificados. A identificação de cada componente de limpeza aparece na tela.

Iniciar a limpeza

- 1 Marque a caixa de seleção, reconhecendo que os frascos de reagente usados estão vazios e, em seguida, selecione **Start Wash** (Iniciar limpeza).
A limpeza inicia e o tempo estimado para sua conclusão é exibido.



ADVERTÊNCIA

Não esvaziar os frascos de reagente usados pode resultar em uma limpeza encerrada e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

- 2 Quando a limpeza for concluída, selecione **Home** (Início).
- 3 Deixe os materiais de consumo no lugar até a próxima execução.
Os aspiradores de líquidos permanecem nos cartuchos de SBS e de cluster para impedir a entrada de ar no sistema. Os aspiradores de líquidos no cartucho de tampão são levantados de modo que os frascos de reagente usados possam ser esvaziados.

Atualizações de software

As atualizações de software estão disponíveis para o NVCS v1.4 ou posterior. Pode ser feito download das atualizações de software, que podem ser instaladas a partir de NVCS. A verificação automática de atualizações de software está ativada por padrão. Você pode ativar ou desativar as atualizações automáticas em Settings (Configurações).



OBSERVAÇÃO

O NovaSeq 6000 deve ser conectado à Internet para verificar se há atualizações de software e para fazer download de atualizações.

A verificação automática de atualizações é realizada a cada 24 horas. Uma notificação será exibida no menu principal quando uma atualização estiver disponível. A notificação de atualização está visível para todos os usuários, mas apenas um administrador pode fazer download e instalar atualizações.

Para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, certifique-se de que a versão NVCS satisfaz os requisitos mínimos de software relacionados na tabela a seguir, antes de iniciar a preparação das amostras ou dos materiais de consumo.

Tabela 20 Requisitos mínimos de software

Lâmina de fluxo	Versão mínima do software
SP	1.6
S1	1.3.1
S2	Todos
S4	1.2.0



OBSERVAÇÃO

Você não pode atualizar o software se uma das seguintes ações estiver em andamento: execução de sequenciamento, limpeza, configuração de execução ou transferência de arquivo para a pasta de saída ou para o BaseSpace Sequence Hub. Se o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp estiver em andamento, aguarde para atualizar o software até que as bibliotecas tenham sido carregadas na lâmina de fluxo e o sequenciamento esteja concluído.

Para verificar atualizações manualmente ou para fazer download e instalar uma atualização, faça o seguinte:

- 1 No menu principal, selecione **Software Update** (Atualização de software).
A tela Software Update (Atualização de software), que fornece notas de versão para a atualização disponível, é exibida. Se a verificação automática de atualizações de software não estiver ativada, você pode verificar as atualizações manualmente ou ativar a verificação automática.
- 2 Para fazer download e instalar a atualização, marque a caixa de seleção para confirmar que o download e a instalação levam aproximadamente 30 minutos.
- 3 Selecione **Download and Install** (Fazer download e instalar).
Quando o download estiver concluído, o NVCS fecha e o instalador é iniciado. Siga as instruções do instalador para concluir a instalação.
Se ocorrerem erros durante o download ou a instalação, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Apêndice A Solução de problemas

Recursos de solução de problemas	67
Arquivos de solução de problemas	67
Erros da verificação antes da execução	67
Solução de problemas de gestão de processos	68
Falha de execução antes da clusterização	69
Encerrar uma execução	70
Desligar o instrumento	70

Recursos de solução de problemas

Para verificar perguntas técnicas, acesse a [página de suporte do Sistema de Sequenciamento do NovaSeq 6000 no site da Illumina](#). A página de suporte permite acessar documentação, downloads e perguntas frequentes. Para acessar os boletins de suporte, faça login em sua conta MyIllumina.

Para problemas de qualidade ou de desempenho de execução, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte [Assistência técnica na página 87](#). Para facilitar a solução de problemas, considere compartilhar um link do resumo da execução no BaseSpace Sequence Hub com o suporte técnico da Illumina.

Arquivos de solução de problemas

Arquivo principal	Pasta	Descrição
Arquivo de informações da execução (RunInfo.xml)	Pasta principal	Contém as configurações de execução: <ul style="list-style-type: none">• Número de ciclos da execução• Número de leituras da execução• Se a leitura é indexada• Número de feixes e blocos na lâmina de fluxo
Arquivo de parâmetros de execução (RunParameters.xml)	Pasta principal	Contém o nome da execução e informações sobre parâmetros e componentes de execução, incluindo as seguintes informações dos RFIDs: números de série, números de lote, datas de vencimento e números de catálogo.
Arquivos InterOp (*.bin)	InterOp	Arquivos binários de relatórios utilizados para o Sequencing Analysis Viewer. Os arquivos InterOp são atualizados ao longo da execução.
Arquivos de registro	Logs (Registros)	Os arquivos de registro descrevem cada etapa realizada pelo instrumento para cada ciclo, incluindo qual reagente é usado, e listam as versões de softwares e firmwares usadas na execução. O arquivo nomeado [Nomedoinstrumento]_Hardwareatual.csv exibe os números de série dos componentes do instrumento.

Erros da verificação antes da execução

Se ocorrer um erro durante as verificações antes da execução, use as seguintes ações para resolvê-lo. Se estiver configurando uma execução de lâmina de fluxo dupla e um lado falhar, você poderá cancelar o lado com falha e continuar com o lado que passou.

Quando uma verificação antes da execução falha, os RFIDs para a lâmina de fluxo, os reagentes e os tampões não são bloqueados, de maneira que os materiais de consumo possam ser usados para uma execução subsequente. Quando a execução é iniciada, os aspiradores de líquido perfuram os selos de alumínio nos cartuchos do reagente e todos os RFIDs são bloqueados.

Verificação do sistema	Motivo da falha	Ação recomendada
Sensores	A porta do compartimento está aberta, um material de consumo não foi colocado corretamente ou pelo menos um sensor não está funcionando.	Selecione Retry (Repetir) e siga as instruções na tela para solucionar o erro.
Espaço em disco	O espaço em disco é insuficiente, pois o local especificado da pasta de saída está cheio.	Use a tela Process Management (Gestão de processos) para liberar espaço em disco do local da pasta de saída especificada.
Conectividade do sistema	Ocorreu uma interrupção na conexão com o RTA3, o sistema de fluxo de reagentes ou outra conexão.	Selecione Retry (Repetir) e siga as instruções na tela para solucionar o erro.
Alinhamento	A posição da lâmina de fluxo evita a criação de imagens.	Siga as solicitações na tela para recarregar a lâmina de fluxo.

Bandeja de vazamento

Uma bandeja de vazamento está incorporada na base do instrumento para recolher os reagentes ou fluidos refrigerantes vazados e coletar o transbordamento dos frascos de reagente usados. Em condições normais, a bandeja de vazamento está seca. O vazamento indica um problema com o instrumento, e o transbordamento ocorre quando os frascos de reagente usados não são esvaziados regularmente.

Durante a verificação antes da execução, os sensores detectam se a bandeja de vazamento contém líquidos:

- ▶ Se a bandeja de vazamento apresentar líquidos mas não estiver cheia, a execução poderá continuar, mas você deverá entrar em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte [Assistência técnica na página 87](#).
- ▶ Se a bandeja de vazamento estiver cheia, a execução não poderá continuar e você deverá entrar em contato com o suporte técnico da Illumina.



ADVERTÊNCIA

Esvazie os frascos de reagente usados a **cada execução**. As execuções serão interrompidas se um dos frascos de reagentes usados estiver cheio. Além de representar um risco de segurança, o transbordamento de qualquer um dos frascos de reagente usados danifica o instrumento e requer uma visita de um representante da Illumina ao local.

Solução de problemas de gestão de processos

A tabela a seguir fornece opções de solução de problemas para o ícone N/A na tela Process Management (Gestão de processos):

- ▶ O ícone N/A é exibido na coluna BaseSpace, e a execução é configurada para fazer upload para o BaseSpace Sequence Hub.
- ▶ O ícone N/A é exibido na coluna Network (Rede), e a execução é configurada para fazer upload para uma pasta de saída na rede.

Status de execução	Ação para a solução do problema
Uma execução está em andamento	Feche a tela Process Management (Gestão de processos), aguarde cerca de 5 minutos e reabra a tela.
Uma execução não está em andamento	Desligue e reinicie o instrumento e volte a abrir a tela Process Management (Gestão de processos).

Se o ícone N/A continuar a ser exibido após a conclusão da ação para a solução do problema, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte *Assistência técnica* na página 87.

Falha de execução antes da clusterização

Se o software prejudicar a execução antes que a clusterização inicie, você pode salvar os cartuchos de reagente, o tubo da biblioteca (inclusive a amostra) e, se for reutilizada imediatamente, a lâmina de fluxo, para uma nova execução. Quando a clusterização é iniciada, os aspiradores penetram no selo de alumínio e os reagentes são transferidos para o tubo da biblioteca e a lâmina de fluxo, assim os materiais de consumo e bibliotecas não podem ser usados para outra execução.

Você tem duas opções para a configuração de uma nova execução usando os cartuchos de reagente, o tubo da biblioteca e a lâmina de fluxo salvos de outra execução com falhas:

- ▶ **Configurar uma nova execução imediatamente:** configurar a nova execução em até quatro horas após a execução com falhas. Os cartucho de reagente, o tubo da biblioteca e a lâmina de fluxo permanecem carregados.



OBSERVAÇÃO

Para obter resultados ideais de um fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, inicie a nova execução o mais breve possível.

- ▶ **Configurar uma nova execução posteriormente:** configurar a nova execução em até três semanas após a execução com falhas. Os cartuchos do reagente e o tubo da biblioteca são descarregados do instrumento e armazenados. Os materiais de consumo salvos devem ser identificados com a data e armazenados sob as condições originais.



OBSERVAÇÃO

A lâmina de fluxo não pode ser reutilizada e deve ser descartada. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter uma lâmina de fluxo de reposição.

Configurar uma nova execução imediatamente

Se uma execução com falha usou o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp, inicie a nova execução o mais rápido possível para obter resultados ideais.

- 1 Quando a execução falhar e o outro lado do instrumento estiver ocioso, reinicie o instrumento. Caso contrário, selecione **Home** (Início).
- 2 Configure uma nova execução.
- 3 Deixe a lâmina de fluxo atual no lugar.
- 4 Abra e feche a porta do refrigerador de reagentes e a gaveta de solução tampão para solicitar que o NVCS releia os RFIDs do cartucho de reagente.
Os cartuchos, tubo da biblioteca e lâmina de fluxo podem permanecer no instrumento por até 4 horas após a execução com falha.
- 5 Esvazie os frascos de reagente usados, se necessário, e devolva-os ao instrumento.
- 6 Prossiga com a configuração de execução.

Configurar uma nova execução posteriormente

- 1 Quando a execução falhar, selecione **Home** (Início).

- 2 Configure uma nova execução ou limpeza de manutenção para liberar os materiais de consumo do instrumento.
- 3 Quando solicitado, remova e armazene os seguintes materiais de consumo:
 - ▶ Tampe o tubo da biblioteca e armazene de -25 °C a -15 °C por até três semanas.
 - ▶ Recoloque os cartuchos de SBS e de cluster no armazenamento de -25 °C a -15 °C.
 - ▶ Recoloque o cartucho de tampão no armazenamento de temperatura ambiente, protegido da luz. Se não estiverem perfurados, os cartuchos podem ser reutilizados em uma nova execução.
- 4 Selecione **End** (Encerrar) para cancelar a execução ou limpeza de manutenção e, em seguida, selecione **Yes** (Sim) para confirmar o comando.
Você pode deixar a limpeza de manutenção ser concluída, em vez de cancelá-la.

Encerrar uma execução

Encerrar uma execução no sistema NovaSeq 6000 é uma ação **definitiva**. O software não pode retomar a execução nem salvar os dados de sequenciamento, e os materiais de consumo não podem ser reutilizados.

- 1 Selecione **End** (Encerrar) e então selecione **Yes** (Sim) para confirmar o comando.
Se a execução for encerrada após a Leitura 1, o software iniciará a limpeza automática após a execução.
- 2 Se solicitado, selecione uma das seguintes opções de limpeza:
 - ▶ **End Run Without Wash** (Encerrar execução sem limpeza): encerra a execução e inicia uma limpeza de manutenção.
 - ▶ **End Run and Wash** (Encerrar execução com limpeza): encerra a execução e realiza uma limpeza automática após a execução.
 - ▶ **Cancel** (Cancelar): continua com a execução atual.Se a execução for concluída entre a conclusão da clusterização e da Leitura 1, o software exibirá as opções de limpeza. Caso contrário, o software inicia a limpeza automática após a execução.
- 3 Se você selecionou End Run Without Wash (Encerrar execução sem limpeza), siga as instruções do software para configurar uma limpeza de manutenção.

Desligar o instrumento

Desligar o instrumento com segurança desliga todos os sistemas e software e desativa a energia do instrumento. A barra de status passa de verde para branco, indicando que o desligamento está em andamento.

Em circunstâncias normais, é desnecessário desligar o instrumento.

Se houver um desligamento ou reinicialização enquanto o NVCS estiver em execução, o usuário deve confirmar essa ação antes do prosseguimento da operação.

- 1 No menu principal, selecione **Shutdown Instrument** (Desligar instrumento).
- 2 Depois que a tela ficar em branco, alterne o interruptor, na parte traseira do instrumento, para a posição desligado (off).
- 3 Aguarde pelo menos 60 segundos antes de ligar o instrumento novamente.



CUIDADO

Não mude o instrumento de lugar. A movimentação inadequada pode afetar o alinhamento óptico e comprometer a integridade dos dados. Para obter assistência com a relocação, entre em contato com seu representante da Illumina.

Apêndice B Real-Time Analysis

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	71
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	73

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)

O Sistema de sequenciamento NovaSeq 6000 executa o RTA3, uma implementação do software Real-Time Analysis, no instrumento Compute Engine (CE). O RTA3 extrai intensidades de imagens recebidas da câmera, executa a identificação de bases, atribui uma pontuação da qualidade de base às identificações de bases, alinha ao PhiX e gera relatórios de dados em arquivos InterOp para exibição no Sequencing Analysis Viewer.

Para otimizar o tempo de processamento, o RTA3 armazena informações na memória. Se o RTA3 for desligado, o processamento não será restabelecido e qualquer dado de execução processado na memória será perdido.

Entradas do RTA3

O RTA3 requer imagens de blocos contidas na memória local do sistema para processamento. O RTA3 recebe informações da execução e comandos do NVCS.

Saídas do RTA3

As imagens de cada canal de cor são passadas na memória para o RTA3 como blocos. Nessas imagens, o RTA3 gera um conjunto de arquivos de identificação de bases com pontuação de qualidade e arquivos de filtro. Todas as outras saídas são arquivos de saída de apoio.

Tipo de arquivo	Descrição
Arquivos de identificação de bases	Cada bloco analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases concatenado (*.cbcl). Blocos de mesma cavidade e superfície são agregados em um arquivo *.cbcl para cada cavidade e superfície.
Arquivos de filtro	Cada bloco produz um arquivo de filtro (*.filter) que especifica se um cluster passa pelos filtros.
Arquivos de localização de cluster	Os arquivos de localização de cluster (*.locs) contêm as coordenadas X e Y para cada cluster em um bloco. Um arquivo de localização do cluster é gerado para cada execução.

Os arquivos de saída são usados para análise posterior no BaseSpace Sequence Hub. Você também pode usar o software de conversão bcl2fastq para a conversão de FASTQ e de soluções de análise de terceiros. Os arquivos NovaSeq exigem o software de conversão bcl2fastq2 v2.19 ou posterior. Para obter a versão mais recente do bcl2fastq2, visite a [página de downloads do bcl2fastq](#) no site da Illumina.

O RTA3 fornece medidas em tempo real da qualidade da execução armazenadas como arquivos InterOp, que são uma saída binária que contém medidas de blocos, ciclos e nível de leitura. É necessário ter arquivos InterOp para visualizar medidas em tempo real usando o Sequencing Analysis Viewer. Para obter a versão mais recente do Sequencing Analysis Viewer, acesse a [página de análise de download do Sequencing Analysis Viewer](#) no site da Illumina.

Tratamento de erros

O RTA3 cria arquivos de registro e os grava na pasta Logs (Registros). Os erros são gravados em um arquivo de texto em formato de arquivo *.log.

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

- ▶ info_00000.log resume eventos importantes da execução.
- ▶ error_00000.log lista erros que ocorreram durante uma execução.
- ▶ warning_00000.log lista avisos que ocorreram durante uma execução.

Blocos da lâmina de fluxo

Os blocos são pequenas áreas de imagem na lâmina de fluxo. A câmera captura uma imagem de cada feixe, que é dividida pelo software em blocos para processamento no RTA3. O número total de blocos depende de quantas cavidades, feixes e superfícies são captadas na lâmina de fluxo.

- ▶ As lâminas de fluxo SP têm um total de 312 blocos.
- ▶ As lâminas de fluxo S1 têm um total de 624 blocos.
- ▶ As lâminas de fluxo S2 têm um total de 1.408 blocos.
- ▶ As lâminas de fluxo S4 têm um total de 3.744 blocos.

Tabela 21 Blocos da lâmina de fluxo

Componente da lâmina de fluxo	SP	S1	S2	S4	Descrição
Cavidades	2	2	2	4	Uma cavidade é um canal físico com portas de entrada e de saída.
Superfícies	1	2	2	2	As lâminas de fluxo S1, S2 e S4 são captadas em duas superfícies: superior e inferior. A imagem da superfície superior de um bloco é captada primeiro. A lâmina de fluxo SP é captada somente na superfície inferior.
Feixes por cavidade	2	2	4	6	Um feixe é uma coluna em uma cavidade da lâmina de fluxo que a câmera capta como uma imagem.
Blocos por feixe	78	78	88	78	Um bloco é uma porção de um feixe e apresenta uma área com imagens na lâmina de fluxo.
Total de blocos gerados	312	624	1408	3744	Cavidades × superfícies × feixes × blocos por feixe é igual ao número total de blocos.

Nomenclatura do bloco

O nome do bloco é um número de cinco dígitos que representa a posição do bloco na lâmina de fluxo. Por exemplo, o nome do bloco

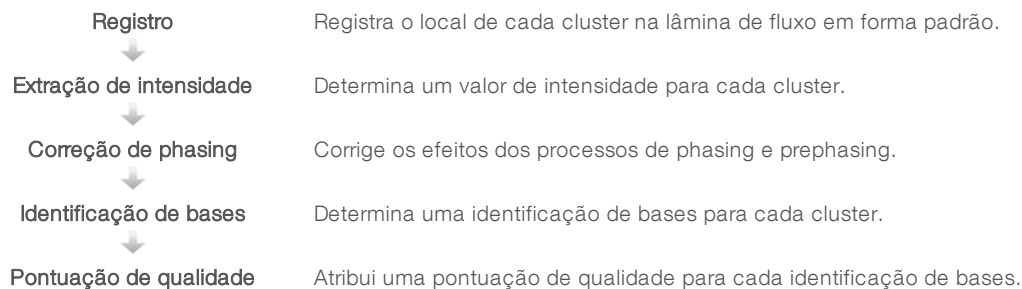
1_1205 indica cavidade 1, superfície superior, feixe 2, bloco 5.

- ▶ O primeiro dígito é o número da cavidade:
 - ▶ 1 ou 2 para uma lâmina de fluxo SP, S1 ou S2.
 - ▶ 1, 2, 3 ou 4 para uma lâmina de fluxo S4.
- ▶ O segundo dígito representa a superfície: 1 para superior e 2 para inferior.

Para a lâmina de fluxo SP, o segundo dígito sempre é 2, porque esta lâmina de fluxo só tem uma superfície inferior.
- ▶ O terceiro dígito representa o número do feixe:
 - ▶ 1 ou 2 para uma lâmina de fluxo SP ou S1.
 - ▶ 1, 2, 3 ou 4 para uma lâmina de fluxo S2.
 - ▶ 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 para uma lâmina de fluxo S4.

- ▶ Os últimos dois dígitos representam o número do bloco. A numeração começa com 01 na extremidade de saída da lâmina de fluxo e vai até 88 ou 78 na extremidade de entrada.
 - ▶ 01 a 78 para uma lâmina de fluxo SP, S1 ou S4.
 - ▶ 01 a 88 para uma lâmina de fluxo S2.

Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis



Registro

O registro alinha uma imagem à matriz hexagonal de nanowells na lâmina de fluxo, em forma padrão. Devido ao arranjo ordenado dos nanowells, as coordenadas X e Y para cada cluster em um bloco são predeterminadas. As posições de cluster são gravadas em um arquivo local do cluster (s.locs) para cada execução.

Se o registro falhar para qualquer imagem em um ciclo, as identificações de bases não serão geradas para o bloco no ciclo. Use o Sequencing Analysis Viewer para identificar as imagens que apresentaram falha no registro.

Extração de intensidade

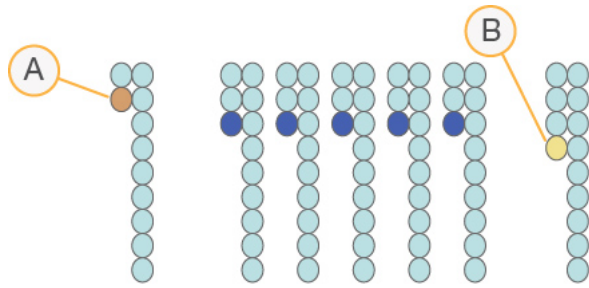
Após o registro, a extração de intensidade calcula um valor de intensidade para cada nanowell em uma determinada imagem. Se o registro falhar, a intensidade para aquele bloco não poderá ser extraída.

Correção de phasing

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

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

Figura 31 Phasing e prephasing



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

O RTA 3 corrige os efeitos do phasing e do prephasing, o que potencializa a qualidade dos dados em cada ciclo ao longo da execução.

Identificação de bases

A identificação de bases determina uma base (A, C, G ou T) para cada cluster de um determinado bloco em um ciclo específico. O Sistema de sequenciamento NovaSeq 6000 utiliza sequenciamento de dois canais, o que requer apenas duas imagens para codificar os dados de quatro bases de DNA, uma imagem do canal vermelho e outra do canal verde.

A ausência de identificação é designada como N. Isso ocorre quando um cluster não passa pelo filtro, o registro falha ou um cluster é deslocado para fora da imagem.

As intensidades para cada cluster são extraídas das imagens vermelhas e verdes e comparadas entre si, o que resulta em quatro populações distintas. Cada população corresponde a uma base. O processo de identificação de bases determina a que população cada cluster pertence.

Figura 32 Visualização de intensidades de clusters

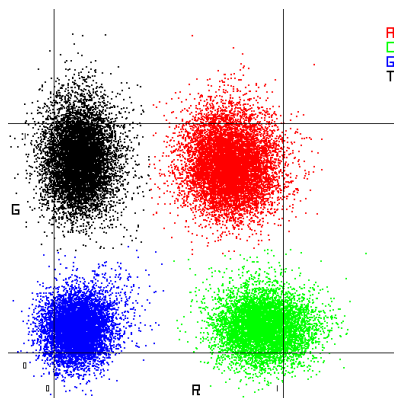


Tabela 22 Identificações de bases em sequenciamento de dois canais

Base	Canal vermelho	Canal verde	Resultado
A	1 (ligado)	1 (ligado)	Clusters que mostram intensidade nos canais vermelho e verde.
C	1 (ligado)	0 (desligado)	Clusters que mostram intensidade apenas no canal vermelho.

Base	Canal vermelho	Canal verde	Resultado
G	0 (desligado)	0 (desligado)	Clusters que não mostram nenhuma intensidade em locais de cluster conhecidos.
T	0 (desligado)	1 (ligado)	Clusters que mostram intensidade apenas no canal verde.

Passagem de clusters pelo filtro

Durante a execução, o RTA3 filtra os dados brutos para remover leituras que não estão de acordo com o limite de qualidade dos dados. Clusters de sobreposição e de baixa qualidade são removidos.

Para a análise de dois canais, o RTA3 usa um sistema de base populacional para determinar a pureza (medida de pureza de intensidade) de uma identificação de bases. Os clusters passam pelo filtro (PF) quando não mais que uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos tem uma pureza inferior a um limite fixo. O alinhamento PhiX é realizado no ciclo 26 em um subconjunto de blocos para clusters que passaram pelo filtro. Os clusters que não passam pelo filtro não passam pelo processo de identificação de bases nem são alinhados.

Pontuações de qualidade

Uma pontuação de qualidade (Q-Score) é uma previsão da probabilidade de uma identificação de bases errada. Uma Q-Score mais alta indica que uma identificação de bases tem mais qualidade e probabilidade de estar correta. Após a determinação da Q-Score, os resultados são registrados em arquivos de identificação de bases (*.cbcl).

A Q-Score sucintamente comunica pequenas probabilidades de erro. As pontuações de qualidade são representadas como Q(X), onde X é a pontuação. A tabela a seguir mostra a relação entre uma pontuação de qualidade e a probabilidade de erro.

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

Pontuação de qualidade e relatórios

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



OBSERVAÇÃO

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

O RTA3 atribui a cada identificação de bases uma de três pontuações de qualidade com base na confiança da identificação de base. Esse modelo de relatório de Q-score reduz os requisitos de espaço de armazenamento e largura de banda sem afetar a precisão e o desempenho.

Para obter mais informações sobre a pontuação de qualidade, consulte *Pontuações de qualidade do sistema NovaSeq™ 6000 e software RTA3 (Pub. N.º 770-2017-010)*.

Apêndice C Arquivos e pastas de saída

Estrutura da pasta de saída de sequenciamento	76
Arquivos de saída de sequenciamento	77

Estrutura da pasta de saída de sequenciamento

O NVCS gera o nome da pasta de saída automaticamente.


 **Config**: definições de configuração para a execução.

 **Logs**: arquivos de log que descrevem etapas operacionais, análise de instrumentos e eventos do RTA3.

 **Data** (Dados)

 **Intensities** (Intensidades)


 **BaseCalls** (Identificações de bases)

 **LOO[X]**: arquivos de identificação de bases (*.cbcl) agregados em um arquivo por cavidade, superfície e ciclo.

 s.locs: o arquivo dos locais do cluster para a execução.

 **InterOp**: arquivos binários usados pelo Sequencing Analysis Viewer.

 **Recipe** (Receita): arquivo de receita específico para a execução.

 **Thumbnail Images** (Imagens em miniatura): imagens em miniatura para cada 10^o bloco.

 **LIMS**: o arquivo (*.json) de configuração da execução, se aplicável.

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SampleSheet.csv — Planilha de amostras ou outro arquivo anexado, se aplicável.

 SequenceComplete.txt

Arquivos de saída de sequenciamento

Tipo de arquivo	Descrição, local e nome do arquivo
Arquivos de identificação de bases	Cada cluster analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases, agregado em um arquivo por ciclo, cavidade e superfície. O arquivo agregado contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade codificada de cada cluster. Os arquivos de identificação de base são usados pelo BaseSpace Sequence Hub ou bcl2fastq2. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane][surface].cbcl, por exemplo L001_1.cbcl
Arquivos de localização de cluster	Para cada lâmina de fluxo, um arquivo de localização do cluster binário contém as coordenadas XY para os clusters em um bloco. Um layout hexagonal que corresponde ao layout nanowell da lâmina de fluxo predefine as coordenadas. Data\Intensities (Dados\Intensidades) s_[cavidade].locs
Arquivos de filtro	O arquivo de filtro especifica se um cluster passou pelos filtros. Os arquivos de filtro são gerados no ciclo 26 usando 25 ciclos de dados. Um arquivo de filtro é gerado para cada bloco. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane][tile].filter
Arquivos InterOp	Arquivos binários de relatórios utilizados para o Sequencing Analysis Viewer. Os arquivos InterOp são atualizados ao longo da execução. Pasta InterOp
Arquivo de informações da execução	Lista o nome da execução, o número de ciclos em cada leitura, se a leitura é uma leitura de índice e o número de feixes e blocos da lâmina de fluxo. O arquivo de informações da execução é criado no início da execução. [Pasta principal], RunInfo.xml
Arquivos de miniaturas	Quando ativada, uma imagem em miniatura para cada 10° bloco em cada canal de cor (vermelho e verde). Thumbnail_Images\L001\C[X.1]: os arquivos são armazenados em uma subpasta para cada ciclo. s_[lane][tile][channel].jpg: a imagem em miniatura inclui o número do bloco.

Apêndice D Segurança do Windows

Configurações de segurança	78
Requisitos da senha	78
Firewall do Windows	78
Kit de Ferramentas Aprimorado da Experiência de Mitigação	78
Políticas de restrição de software	79

Configurações de segurança

O sistema operacional Windows que executa o computador de controle do instrumento inclui configurações de segurança que impedem a execução de software indesejado. As informações neste apêndice descrevem as configurações e como personalizá-las para atender às suas necessidades.

Sob circunstâncias normais, não é necessário alterar as configurações de segurança padrão. Se necessário, certifique-se para que um administrador experiente gerencie a alteração após um planejamento cuidadoso.



CUIDADO

Como essas configurações afetam o desempenho do sistema e podem comprometer a segurança, entre em contato com o suporte técnico da Illumina quando não estiver claro se uma configuração precisa ser editada ou se o impacto for desconhecido.

Requisitos da senha

A tabela a seguir identifica as políticas de senha necessárias para o computador de controle. O software solicita uma alteração de senha no primeiro login.

Tabela 23 Políticas de senha padrão

Política	Configuração de segurança
Aplicar o histórico de senhas	5 senhas memorizadas
Duração máxima da senha	180 dias
Duração mínima da senha	0 dia
Tamanho mínimo da senha	10 caracteres
A senha deve atender aos requisitos de complexidade	Desativado
Armazenar senhas usando criptografia reversível	Desativado

Firewall do Windows

O firewall do Windows protege o computador de controle filtrando o tráfego de entrada para remover possíveis ameaças. O firewall é ativado por padrão para bloquear todas as conexões de entrada. Mantenha o firewall ativado e permita conexões de saída. Para obter mais informações sobre conexões de saída, consulte o *Guia de preparação do local da série NovaSeq (documento n.º 1000000019360)*.

Kit de Ferramentas Aprimorado da Experiência de Mitigação

O Kit de Ferramentas Aprimorado da Experiência de Mitigação (EMET) impede a exploração de vulnerabilidades de software e fornece o recurso Confiança certificada. O recurso detecta e interrompe ataques que usam certificados mal-intencionados.

Políticas de restrição de software

As políticas de restrição de software (SRP) do Windows usam regras para permitir que se execute apenas o software especificado. Para o NovaSeq 6000, as regras das SRP são baseadas em certificados, nomes de arquivos e extensões e diretórios.

Por padrão, as SRP são ativadas para evitar a execução de um software indesejado no computador de controle. Um representante de IT ou administrador do sistema pode adicionar e remover regras para personalizar o nível de segurança. Se o sistema for adicionado a um domínio, o objeto de política de grupos (GPO) local poderá modificar as regras automaticamente e desativar as SRP.



CUIDADO

Desativar a política de restrição de software impede a proteção fornecida. A alteração das regras substitui as proteções padrão.

Regras de SRP permitidas

No Sistema de Sequenciamento NovaSeq 6000, as SRP assumem o padrão para permitir as seguintes regras.

Certificados

DigitalSystems
Illumina, Inc.
NovaSeq

Arquivos executáveis

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

Extensões de arquivos

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

Diretórios

%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%
%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows NT\CurrentVersion\SystemRoot%
C:\CrashDumps*

Diretórios

C:\Illumina*
C:\Illumina Maintenance Logs*
C:\LocalSymbols*
C:\Program Files (x86)\Chromium\Application*
C:\Program Files (x86)\EMET 5.5*
C:\Program Files (x86)\Illumina*
C:\Program Files (x86)\Internet Explorer*
C:\Program Files (x86)\LibreOffice 5*
C:\Program Files\Illumina*
C:\ProgramData\Illumina*
C:\ProgramData\Package Cache*
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix*
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs*
C:\Users\sbsuser\Desktop\FSE turn over to customer.bat
D:\Illumina*

Adicionar e remover regras de SRP

Adicione e remova regras de SRP para personalizar a segurança do sistema. A modificação das regras requer a desativação temporária das SRP.



CUIDADO

A desativação das SRP cancela as proteções padrão.

- 1 Faça login no sistema operacional.
- 2 Desative as SRP:
 - a Navegue até o diretório C:\Illumina\Security.
 - b Clique duas vezes em **Disable.reg**.
 - c Selecione **Yes** (Sim) para confirmar as alterações.

Ao usar a interface da tela de toque, tocar e manter por cerca de dois segundos é equivalente a um clique com o botão direito do mouse.
- 3 Selecione **Start** (Iniciar) e, em seguida, **Run** (Executar).
- 4 No campo Open (Abrir), insira **secpol.msc**.
- 5 Na caixa de diálogo Local Security Policy (Política de segurança local), expanda **Software Restriction Policies** (Políticas de restrição de software) e selecione **Additional Rules** (Outras regras).
- 6 Para adicionar uma regra:
 - a No menu Action (Ação), selecione **New Path Rule** (Nova regra de caminho).
 - b No campo Path (Caminho), insira o certificado, o nome do arquivo, a extensão do arquivo ou o diretório que você deseja permitir.
 - c Na lista do nível Security (Segurança), selecione **Unrestricted** (Irrestrito).
 - d **[Opcional]** No campo Description (Descrição), insira o motivo para criar a regra.
 - e Selecione **OK** para adicionar a regra.
- 7 Para excluir uma regra:
 - a Selecione a regra que deseja excluir e, em seguida, selecione **Delete** (Excluir).
 - b Selecione **Yes** (Sim) para confirmar a exclusão.

- 8 Feche a caixa de diálogo Local Security Policy (Política de segurança local).
- 9 Restabeleça o SRP *imediatamente*:
 - a Navegue até o diretório C:\Illumina\Security.
 - b Clique duas vezes em Enable.reg.
- 10 Se as regras de SRP foram modificadas pela primeira vez, faça logoff e depois faça login novamente para que as regras tenham efeito.

Índice

%

% PF 75
%PF 30, 39

A

advertências 8
ajuda 67
 documentação 2
 pool de bibliotecas 34, 43
algoritmo Phred 75
alvo de alinhamento óptico 5, 51
amplificação 2
análise 26
aplicações 1
aquisição de imagens 13
armazenamento de bibliotecas 36, 46
armazenamento de kits de reagentes 12
armazenamento dos kits de reagentes 16
arquivos
 específico para a execução 67
arquivos CBCL 3, 58, 75
arquivos de filtro 71, 77
arquivos de identificação de bases 71
arquivos de identificações de bases 77
arquivos de log 67
arquivos de registro 71
arquivos InterOp 8, 67, 71, 77
arranhões, lâminas de fluxo 46, 51
assistência técnica 87
atividades após a execução 60
ausência de identificações 73

B

bandeja coletora 68
banhos-maria 31, 40
barra de luzes 5, 70
barra de status 5, 70
BaseSpace Enterprise 25
BaseSpace Sequence Hub 1, 26
 conexão e desconexão 55
 suporte 3
bcl2fastq2 26, 71
bibliotecas
 armazenamento 36, 46, 69
 controle de qualidade 30, 39
 diluição 36

 quantificação 30, 39
blocos 2, 13, 71
boletins de suporte 67
bolhas 48

C

calculadora, pool 34, 43
câmeras 1, 5, 72
canal verde 74
canal vermelho 74
cartucho de cluster 12
cartucho de tampão 54, 64
cartuchos
 empilhamento 15
cartuchos de empilhamento 15
cartuchos de limpeza 61-62, 64
cartuchos de reagente
 armazenamento 69
 descarga 53
 preparação 31, 40
cartuchos de reagentes
 armazenamento 12
 etiquetagem 11
 rotulagem 14
cavidades 13, 72
cavidades endereçadas individualmente 3
cavidades individualmente endereçáveis 16
CE 9, 71
ciclos de sequenciamento 58
código do lote 18
coletores NovaSeq Xp 46
 armazenamento 16
compartimento de líquidos 14
compartimento de tampão 54
compartimentos 5
complexidade 33, 43
componentes do kit 28
computador de controle 78
Compute Engine 9, 59, 71
concentração de carga 2, 30, 39
condições de armazenamento 18
conectividade do sistema 67
conexões de entrada 78
conexões de saída 78
Confiança certificada 78
configuração do LIMS 22
configurações de análise 21
configurações de execução 21
configurações de segurança 78

- configurações do kit 11
- configurações padrão 21, 25
- configurações, segurança 78
- conta de administrador 80
- contaminação cruzada 7, 60
- controle de qualidade 30, 39
- conversão de FASTQ 26
- conversão FASTQ 71
- cores do gráfico 57

D

- dados de armazenamento 55
- dados de desempenho do instrumento 21-22
- dados de integridade 21-22
- datas de vencimento 18
- descarga de cartuchos de reagente 53
- descarte de formamida 15, 59
- desligamento 70
- diagnóstico 5
- diluentes 36, 45
- diluição de bibliotecas 36
 - biblioteca
 - diluição 46
- diluição de hidróxido de sódio 36, 45
- disco rígido 9, 21-22, 59
- documentação 2, 87
- domínio, BaseSpace Sequence Hub 25
- duração da clusterização 58
- duração da execução 57
- durações
 - clusterização 58
 - execução de sequenciamento 57
 - limpeza automática após a execução 60
 - limpeza de manutenção 61

E

- economizar tubos de biblioteca 69
- eliminação de reagentes usados 7
- EMET 78
- energia 20
- erros 8, 67
 - probabilidade 75
- espaço em disco 9, 67
- especificações 11
- Especificações de congeladores 29
- especificações de refrigeradores 29
- estágio da lâmina de fluxo 5, 51
- Etapas do sequenciamento 2
- etiquetas, componentes do kit 11

- execuções
 - escalonamento 58
 - exclusão 9
 - medidas 57, 71
 - monitoramento 25, 55
 - pausando 58
 - retomada 70
- execuções de leitura única 55
- execuções de sequenciamento
 - exclusão 59

F

- fabricante 18
- falha de alinhamento 67
- falhas de registro 73
- feixes 2, 13, 72
- fichas de dados de segurança 7
- filtragem de clusters 75
- filtro de pureza 75
- firewalls 78
- fixações, lâmina de fluxo 5
- fluxo de trabalho 24
- fluxo de trabalho do NovaSeq Xp 24
- fluxo de trabalho Padrão 24
- formato da planilha de amostras 26
- fornecedores 27

G

- geração de imagens 2, 71-72
- geração de modelo 73
- Gestão de processos 58
- GPO 79

H

- hidróxido de sódio, diluição 36, 45
- hipoclorito de sódio 60, 62

I

- ícone 18
- ícones 9
- ícones piscantes 8
- ícones, piscantes 8
- imagens 71
- inicialização 20
- instrumentos que se movem 70
- intensidades de cluster 73

J

juntas 13, 46, 51
juntas, transbordamento 48

L

lâmina de fluxo de limpeza 61
lâminas de fluxo
 armazenamento 12, 46
 arranhões 46, 51
 especificações 11
 etiquetagem 11
 limpeza 46, 51
lâminas de fluxo com duas cavidades 13
lâminas de fluxo com quatro cavidades 13
lâminas de fluxo em padrão 1
lâminas de fluxo padronizadas 13
leitura 2
Leitura 1 70
leituras de índice 55
leituras, números de 11
ligamento 20
limpezas
 duração 60-61
 frequência 61
limpezas de manutenção
 materiais de consumo 27, 61
 soluções de limpeza 62
LIMS 1, 21
LIMS de terceiros 23
lista de exceções, SRP 79
locais de cluster 71, 77
locais de host 25
luvas, troca 32, 41, 64

M

manutenção preventiva 61
manutenção, preventiva 61
materiais de consumo
 água aprovada para uso em laboratório 29
 descarga 59
 descarregamento 60, 65
 diluição e desnaturação 27
 embalagem 18
 limpezas de manutenção 61
materiais de consumo de sequenciamento 27
métodos de análise 3
miniaturas 77

mistura master de ExAmp 2
Mistura master de ExAmp 48
modos 11
modos de execução 21

N

nanowells 73
NaOCl 60, 62
nome da pasta de saída 76
normalização 33, 43
nova hibridização 23
NovaSeq Xp, definido 3
nucleotídeos 74
numeração de bloco 72
numeração de cavidades 16, 48
numeração de poços 48
numeração de superfície 72
numeração, poços 16
número de ciclos 55
números de catálogo 11
 materiais de consumo fornecidos pelo
 usuário 27
números de ciclos 58
números de peça 18

O

objeto de política de grupos 79
óptica 5
orientações sobre água aprovada para uso em
 laboratório 29

P

pacote do software 8
Padrão, definido 3
padrões SRP 79
páginas de suporte 67
parâmetros de execução, LIMS 23
passagem de clusters pelo filtro 30, 39, 57
passagem pelo filtro (PF) 75
pasta de configuração da execução 22-23
pasta de configuração de execuções 21
pasta de saída 21-22
pausando execuções 58
phasing e prephasing 73
PhiX
 alinhamento 71
 números de catálogo 27

- spike-in 35, 45
- pipetas 29
- planilhas de amostras 25, 55
- plataforma 46, 51
 - componentes 17
- Plataforma do NovaSeq Xp 46
- plataforma NovaSeq Xp 51
- poços de coletor NovaSeq Xp, numeração 16
- poços de entrada 16
- políticas de senha 78
- pool de bibliotecas 34, 43
- Pooling Calculator 34, 43
- portas USB 5
- posição n.º 30 59, 64
- posições do aspirador 60
- posições do aspirador de líquidos 65
- preparação do local 2, 78
- primers personalizados 2, 15, 55
- privilegios, conta de administrador 80
- problemas de fluxo de reagentes 68
- produtos químicos perigosos 7, 18

Q

- Q-scores 57
- Q-Scores 75
- qualidade dos dados 75
- quantificação 30, 39

R

- racks com fios 31, 40
- racks de descongelamento 31, 40
- rastreamento de amostra 15
- reagentes de desnaturação 36, 45
- reagentes DPX, armazenamento 16
- reagentes ExAmp 12
 - armazenamento 16
 - descongelamento 42
 - métodos de mistura 3
- Reagentes ExAmp 48
- reagentes usados 7, 32, 41, 53
- Real-Time Analysis 1, 8
- refrigerador 7
- refrigerador de reagentes 7
- registros de erro 71
- reinício após o desligamento 70
- relocação de instrumento 70
- rendimento 57
- retomada de execuções 70
- RFID 12, 67

RunInfo.xml 67, 77

S

- salvar cartuchos de reagentes 69
- segurança 79
 - personalização 80
 - sem identificações 74
- sensores 5, 64, 67
- sequenciamento de dois canais 2, 74
- Sequencing Analysis Viewer 71, 73
- Serviço de cópia universal 8-9, 58
- Serviço de monitoramento Illumina Proactive 22
- sistema de fluxo de reagentes 7, 62
- sistema operacional 20, 78
- site, suporte 67
- software de controle 8
- solução de limpeza 14
- spike-in, PhiX 35, 45
- suporte ao cliente 87
- suporte da lâmina de fluxo 51
- suportes da tampa 32, 41

T

- tabelas de qualidade 75
- tamanhos de inserção 34, 44
- técnica, ajuda 87
- tela de sequenciamento 57
- transbordamento 32, 41, 68
- transferência de dados 9, 59
- treinamento on-line 2
- tubos da biblioteca
 - armazenamento 36
 - armazenamento no cartucho 69
- tubos de biblioteca 15, 69
 - armazenamento 12, 69
- Tween 20 62

V

- valores de intensidade 73
- vazamentos 68
- verificações antes da execução 67
- verificações automatizadas 67
- volume de carga 2

W

- white papers 75

Windows
segurança 79

Assistência técnica

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

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

Telefones do suporte ao cliente da Illumina

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

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

Documentação do produto — Disponível para download em PDF no site da Illumina. Acesse support.illumina.com, selecione um produto e depois selecione **Documentation & Literature** (Documentação e literatura).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122, EUA

+1 (800) 809-ILMN (4566)

+1 (858) 202-4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Somente para pesquisa. Não deve ser usado para procedimentos de diagnóstico.

© 2019 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]