

HiSeq 2500

Guía del sistema



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

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

SI NO SE LEE EL PRESENTE DOCUMENTO EN SU TOTALIDAD NI SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES EN ÉL DESCRITAS, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS A LOS USUARIOS O A OTRAS PERSONAS, Y DAÑOS EN OTROS BIENES, Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

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

© 2020 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20000451 N.º de documento 15035786 v03	Mayo de 2020	<p>Actualización de la información sobre los ciclos de índices de V4 y el modo de experimento rápido V2.</p> <p>Reincorporación de los kits de SBS para ofrecer información sobre la secuenciación de doble índice, que se había trasladado al sitio de asistencia.</p> <p>Corrección de la información sobre el reactivo HP14 para revertirla a la del HP12.</p> <p>Corrección de las unidades "O:\\" y "S:\\" a "D:\\" y "E:\", respectivamente.</p> <p>Eliminación del paso redundante de rellenado de la solución</p>
N.º de material 20000451 N.º de documento 15035786 v02	Marzo de 2018	<p>Incorporación de cBot 2 como instrumento de generación de grupos compatible. El paso de generación de grupos se puede realizar en cBot 2 o cBot para un experimento de rendimiento elevado o rápido.</p> <p>Adición de la herramienta de selección de protocolos personalizados a Recursos adicionales.</p> <p>Incorporación de información sobre el servicio de supervisión proactiva de Illumina en la sección Visualización y envío de datos del instrumento.</p> <p>Indicación de la frecuencia aproximada para renovar los tubos y las botellas de lavado.</p> <p>Modificación del nombre del software de análisis a BaseSpace Sequence Hub.</p> <p>Modificación de la información sobre reactivos para sustituir HP12 por HP14.</p> <p>Actualización de las instrucciones para iniciar el instrumento:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eliminación del nombre de usuario y la contraseña predeterminados necesarios para iniciar sesión en el sistema operativo. Illumina recomienda utilizar credenciales específicas del centro. • Espere a que el sistema se cargue antes de iniciar sesión en el sistema operativo, no después. • Aumento de 1 a 3 minutos el tiempo para que se configuren los dispositivos del instrumento y se inicialice DoNotEject. • Indicación de que los discos duros deben estar vacíos para un funcionamiento correcto. <p>Eliminación de la recomendación de realizar un lavado de mantenimiento en vez de un lavado con agua tras un experimento de rendimiento elevado.</p> <p>Eliminación de volúmenes administrados incorrectos para el lavado con agua posterior a un experimento rápido.</p> <p>Corrección del formato de asignación de nombres a la carpeta del experimento para incluir el lado de la celda de flujo.</p> <p>Actualización del procedimiento de lavado de mantenimiento.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20000451 N.º de documento 15035786 v01	Octubre de 2015	Incorporación de instrucciones sobre la preparación de reactivos SBS, "paired-end", de indexado y de generación de grupos. Adición de información sobre BaseSpace Onsite. Adición de una recomendación para el servicio de mantenimiento preventivo anual.
N.º de material 20000451 N.º de documento 15035786 v01	Octubre de 2015	Incorporación de instrucciones sobre la preparación de reactivos SBS, "paired-end", de indexado y de generación de grupos. Adición de información sobre BaseSpace Onsite. Adición de una recomendación para el servicio de mantenimiento preventivo anual.
N.º de referencia 15035786, rev. D	Noviembre de 2014	Actualización de las descripciones de software a las del HiSeq Control Software v2.2.58. Actualización del flujo de trabajo del modo de experimento rápido para incluir la compatibilidad con el análisis químico de HiSeq Rapid v2. Sustitución de lavado de mantenimiento con NaOH por el lavado de mantenimiento con Tween 20 y ProClin 300 incluida la información sobre la preparación, el almacenamiento y el desecho de la solución de lavado de mantenimiento. Actualización de las descripciones del lavado de mantenimiento y del lavado con agua para especificar que se debe realizar un lavado con agua tras cada experimento. Adición de descripciones sobre el flujo de trabajo, los archivos de entrada y salida, la solución de errores y la puntuación de calidad en el capítulo Análisis en tiempo real. Actualización del n.º de catálogo de VWR para las toallitas de alcohol a 95041-714. Actualización de la URL de las hojas de datos de seguridad (SDS) a support.illumina.com/sds.html .
N.º de referencia 15035786, rev. C	Abril de 2014	Actualización de descripciones de HiSeq Control Software v2.2, que incluye el modo de rendimiento elevado de HiSeq v4, la eliminación de la opción de carril de control, la agrupación de puntuaciones Q predeterminada y la opción de utilización de diferentes esquemas de indexación en cada carril. Adición del flujo de trabajo de HiSeq v4 para su utilización con química de HiSeq v4. Adición del cálculo del volumen de cebado de SBS total.
N.º de referencia 15035786, rev. B	Noviembre de 2013	Eliminación de las instrucciones de preparación de reactivos. Para obtener las instrucciones de preparación de reactivos, incluida la información acerca de los diversos cebadores de secuenciación, consulte la documentación del kit correspondiente. Sustitución de los siguientes reactivos: • RMR por RMX
N.º de referencia 15035786, rev. A	Octubre de 2012	Publicación inicial.

Índice

Capítulo 1 Descripción general	1
Introducción	1
Otros recursos	2
Componentes del instrumento	2
Descripción general de los consumibles de secuenciación	6
Capítulo 2 Primeros pasos	9
Inicio de HiSeq 2500	9
Personalización de los ajustes del sistema	10
Visualización y envío de datos del instrumento	11
Consumibles proporcionados por el usuario	11
Capítulo 3 Secuenciación en el modo HiSeq v4	13
Introducción	13
Preparación de reactivos	14
Introducir parámetros del experimento	16
Carga y cebado de reactivos	19
Carga de la celda de flujo de secuenciación	24
Supervisión del experimento	27
Descarga de reactivos	28
Realización de un lavado con agua	28
Capítulo 4 Secuenciación en el modo TruSeq v3	30
Introducción	30
Preparación de reactivos para la Lectura 1	31
Introducir parámetros del experimento	35
Carga y cebado de reactivos	38
Carga de la celda de flujo de secuenciación	42
Supervisión del experimento	45
Preparación de reactivos para la Lectura 2	46
Descarga de reactivos	50
Realización de un lavado con agua	50
Capítulo 5 Secuenciación en el modo de experimento rápido	52
Introducción	52
Preparación de reactivos	53
Realización de una comprobación del volumen	54
Introducir parámetros del experimento	55
Carga y cebado de reactivos	58
Carga de la celda de flujo de secuenciación	63
Supervisión del experimento	66
Descarga de reactivos	67
Realización de un lavado con agua	67

Capítulo 6 Mantenimiento	69
Introducción	69
Realización de un lavado de mantenimiento	69
Cambio de modos de secuenciación	74
Inactividad del instrumento	75
Apagado del instrumento	76
Apéndice A Solución de problemas	77
Posibles problemas de configuración de experimentos	77
Realización de una comprobación de fluidica	78
BaseSpace no está disponible	78
Detención y reanudación de un experimento	78
Pausa de un experimento	81
Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B	81
División de kits SBS	82
Rehibridación del cebador	83
Apéndice B Análisis en tiempo real	85
Descripción general de Análisis en tiempo real	85
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real	86
Supervisión de métricas de experimento	89
Apéndice C Archivos y carpetas de resultados	91
Archivos de resultados de secuenciación	91
Estructura de la carpeta de resultados	92
Numeración de placas	93
Imágenes en miniatura	94
Índice alfabético	95
Asistencia técnica	100

Capítulo 1 Descripción general

Introducción	1
Otros recursos	2
Componentes del instrumento	2
Descripción general de los consumibles de secuenciación	6

Introducción

El sistema HiSeq® 2500 aporta capacidad y eficiencia para la genómica a gran escala. La tecnología más avanzada se combina con tecnología SBS demostrada para definir nuevos estándares de resultado, sencillez y rentabilidad. Dos opciones de rendimiento elevado ofrecen la máxima profundidad de cobertura, mientras que un experimento rápido arroja resultados al momento.

Funciones

- ▶ **Adquisición de imágenes de las dos superficies:** HiSeq 2500 utiliza un sistema de epifluorescencia de cuatro cámaras con una tecnología de adquisición de imágenes de vanguardia que permite adquirir imágenes de las dos superficies.
- ▶ **Celdas de flujo dobles:** El sistema HiSeq 2500 es un sistema de celda de flujo doble, que posibilita la secuenciación simultánea de una celda de flujo o de dos celdas de flujo con diferentes longitudes de lectura.
- ▶ **Generación de grupos integrada en el instrumento:** HiSeq 2500 ofrece la opción de un modo de experimento rápido que incluye la generación de grupos integrada en el instrumento.
- ▶ **Refrigerador de reactivos de alta capacidad:** El compartimento de reactivos es un refrigerador de alta capacidad que almacena la cantidad de reactivos suficiente para todo el experimento de secuenciación.
- ▶ **Fluídica integrada para experimentos "paired-end":** La fluídica "paired-end" integrada suministra reactivos del compartimento de reactivos a la celda de flujo para la resíntesis de la lectura 2 y para la secuenciación indexada.
- ▶ **Opciones de control de la interfaz:** La interfaz del software del instrumento proporciona opciones para la configuración de un experimento y el funcionamiento del instrumento. Utilice el monitor de pantalla táctil o el teclado integrado para introducir los datos.
- ▶ **Llamada de bases en tiempo real:** El software del instrumento extrae las intensidades a partir de las imágenes y realiza una llamada de bases con puntuación de calidad en el ordenador del instrumento, lo que permite supervisar los datos de calidad durante el experimento y ahorra tiempo en el análisis de datos posterior.
Los análisis sucesivos de datos de secuenciación se pueden realizar con software de análisis de Illumina u otros proveedores en IlluminaCompute, BaseSpace de Illumina o una infraestructura personalizada.
- ▶ **Integración de BaseSpace® Sequence Hub:** El flujo de trabajo de secuenciación está integrado en BaseSpace Sequence Hub, el entorno informático de genómica de Illumina para la colaboración y el almacenamiento y análisis de datos. En el transcurso del experimento, los archivos de resultados se envían en tiempo real a BaseSpace Sequence Hub o a BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Otros recursos

La documentación siguiente está disponible para descargar en el sitio web de Illumina. Revise siempre las páginas de asistencia para obtener las versiones más recientes.

Recurso	Descripción
Herramienta de selección de protocolos personalizados	Un asistente de generación de documentación de extremo a extremo personalizada que está adaptado al método de preparación de bibliotecas, a los parámetros del experimento y al método de análisis utilizado para el experimento de secuenciación.
Guía de preparación del centro para los sistemas HiSeq 2500, 1500 y 2000 (n.º de documento 15006407)	Proporciona especificaciones del espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales.
Guía de cumplimiento y seguridad del sistema HiSeq 2500 (n.º de documento 1000000000651)	Proporciona información sobre el etiquetado del instrumento, las certificaciones de cumplimiento y las consideraciones de seguridad.
Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas para sistemas HiSeq y GAllx (n.º de documento 15050107)	Proporciona instrucciones para la desnaturalización y dilución de bibliotecas preparadas para un experimento de secuenciación, así como para la preparación de un control PhiX. Este paso se aplica a la mayoría de los tipos de bibliotecas.

Visite la página de asistencia del sistema HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para acceder a la documentación, las descargas de software, la formación en línea y las preguntas frecuentes.

Componentes del instrumento

El sistema HiSeq 2500 se compone del instrumento, el monitor, el ordenador de control del instrumento y los accesorios, tales como el teclado, el ratón y el lector de códigos de barras. El instrumento incluye cuatro compartimentos principales: el módulo óptico, el compartimento de la celda de flujo, el compartimento de fluidica y el compartimento de reactivos. Si la barra de estado está iluminada, el equipo está en funcionamiento.

Figura 1 Componentes externos



- A **Módulo óptico:** Contiene componentes ópticos que permiten la adquisición de imágenes de las dos superficies de la celda de flujo, así como de A, C, G y T al mismo tiempo mediante epifluorescencia. El haz láser de excitación pasa a través del objetivo y la fluorescencia se almacena simultáneamente por medio del

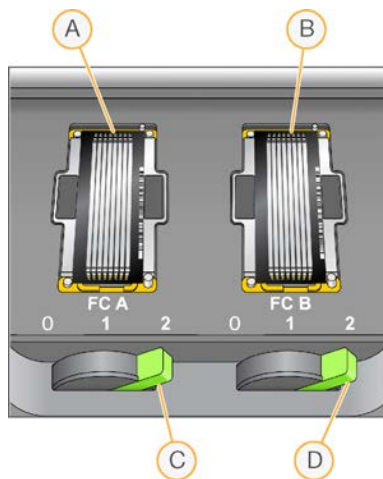
mismo objetivo.

- B **Compartimento de la celda de flujo y estación de carga de cadenas molde:** contiene la platina de la celda de flujo controlada por vacío, que mantiene las celdas de flujo en su sitio durante los experimentos de secuenciación. A través del modo de experimento rápido, la estación de carga de cadenas molde transfiere bibliotecas a la celda de flujo para la generación de grupos integrada en el instrumento.
- C **Compartimento de fluídica:** Contiene bombas de fluídica que suministran reactivos a la celda de flujo y, a continuación, al contenedor de residuos.
- D **Barra de estado:** Utiliza tres colores para indicar el estado del instrumento. El azul indica que el instrumento está en funcionamiento, el naranja indica que el instrumento necesita atención y el verde indica que el instrumento está listo para empezar el siguiente experimento.
- E **Compartimento de reactivos:** Contiene gradillas de reactivos que a su vez contienen los reactivos necesarios para los experimentos de secuenciación y la solución de lavado para el lavado del instrumento.

Compartimento de la celda de flujo

El compartimento de la celda de flujo contiene la platina de la celda de flujo, las estaciones térmicas, el sistema de vacío y las conexiones de fluídica para cada celda de flujo.

Figura 2 Platina de la celda de flujo con dos celdas de flujo



- A Celda de flujo A
- B Celda de flujo B
- C Palanca de la celda de flujo A
- D Palanca de la celda de flujo B

La celda de flujo A está situada a la izquierda y la celda de flujo B, a la derecha. Las celdas de flujo se colocan en la platina, que entra y sale del módulo óptico según se lo indique el software de control. La platina debe situarse en la posición más avanzada para abrir la puerta del compartimento de la celda de flujo y para cargar o retirar una celda de flujo.

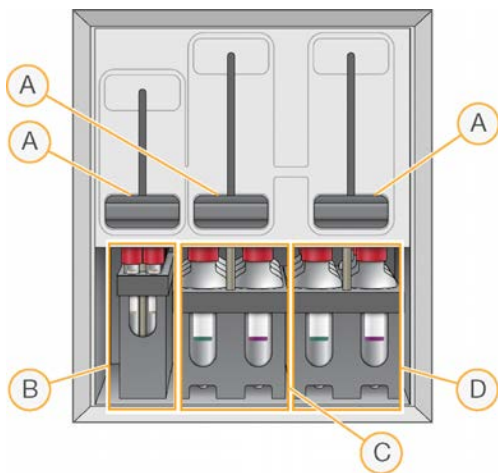
La celda de flujo está colocada en el soporte de la celda de flujo con los orificios de entrada y salida mirando hacia abajo, y fijada en su sitio mediante vacío bajo cada soporte de la celda de flujo. La palanca de la celda de flujo iluminada delante de cada soporte de la celda de flujo controla el vacío. La palanca de la celda de flujo se vuelve verde cuando la junta de vacío es segura.

Compartimento de reactivos

El compartimento de reactivos es un refrigerador de reactivos de alta capacidad que alberga tres gradillas de reactivos: dos para reactivos SBS y una para los reactivos de generación de grupos, de indexado y "paired-end". Los mangos de los dispensadores sirven para bajar los dispensadores e introducirlos en las botellas de reactivo.

- ▶ **Gradillas de reactivos SBS:** Albergan botellas cónicas de 250 ml. La gradilla de reactivos de la celda de flujo A está en la posición central y la de la celda de flujo B, en el extremo derecho. Cada gradilla de reactivos tiene posiciones numeradas que se corresponden con las conexiones de una válvula selectora de reactivos interna.
- ▶ **Gradilla de reactivos "paired-end", de indexado y de generación de grupos:** Se encuentra en la posición izquierda. Tiene dos filas de posiciones numeradas que albergan tubos cónicos de 15 ml que contienen reactivos "paired-end" y de indexado. La fila izquierda es para la celda de flujo A y la fila derecha, para la celda de flujo B.
- ▶ **Refrigerador de reactivos:** El refrigerador de reactivos contiene gradillas de reactivos y mantiene una temperatura interna de entre 2 y 8 °C.

Figura 3 Compartimento de reactivos



- A Mangos de los dispensadores
- B Gradilla de reactivos para reactivos "paired-end", de indexado y de generación de grupos
- C Gradilla de reactivos SBS de la celda de flujo A
- D Gradilla de reactivos SBS de la celda de flujo B

Software de HiSeq 2500

Hay tres aplicaciones de software instaladas en el ordenador del instrumento:

- ▶ **Software de control de HiSeq 2500:** La interfaz de HiSeq Control Software (HCS) le guía por los pasos necesarios para configurar un experimento de secuenciación. Durante el experimento, el software de control activa el hardware del instrumento, controla la fluídica, establece las temperaturas y ofrece un resumen visual de las estadísticas de calidad.
- ▶ **Software de análisis en tiempo real:** Integrado en el software de control, el análisis en tiempo real (RTA) realiza la llamada de bases y asigna una puntuación de calidad a cada base de cada ciclo. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real en la página 85*.

- **Software del visor del análisis de secuenciación:** Sequencing Analysis Viewer (SAV) proporciona estadísticas de calidad detalladas.

Iconos de estado

El icono de estado que se encuentra en la esquina superior derecha de cada pantalla muestra los cambios de condiciones, errores o advertencias que se producen durante la configuración de un experimento o durante este.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado correcto	No hay cambios. El sistema está normal.
	Información	Solo información. No se requiere ninguna acción.
	Atención	Información que puede requerir atención.
	Advertencia	Las advertencias no detienen un experimento, pero pueden requerir una acción antes de continuar.
	Error	Los errores normalmente detienen los experimentos y suelen requerir acciones antes de continuar con el experimento.

Cuando se produce un cambio de estado, el icono asociado parpadea para avisarle.

- Seleccione el icono para abrir la ventana de estado y visualizar una descripción de la condición.
- Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para aceptar el mensaje y **Close** (Cerrar) para cerrar el cuadro de diálogo.

Indicadores de actividad y del sensor

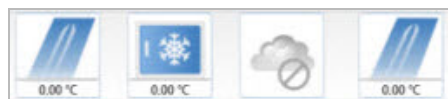
La pantalla Welcome (Bienvenida) contiene una serie de iconos en la esquina inferior derecha de la pantalla. Los iconos indican la actividad del instrumento y el estado de sus componentes específicos a partir de los sensores del instrumento.

Figura 4 Indicadores de actividad



En la imagen, aparecen de izquierda a derecha los indicadores de actividad que representan los motores X, Y y Z, la función de los componentes electrónicos, la cámara, el sistema de fluidica y las funciones de procesamiento.

Figura 5 Indicadores del sensor



De izquierda a derecha, los indicadores del sensor representan la temperatura de la celda de flujo A, la temperatura del refrigerador de reactivos, el estado de la transferencia de datos, el estado de BaseSpace Hub en la nube y la temperatura de la celda de flujo B.

Espacio disponible en el disco

El ordenador del instrumento HiSeq tiene una capacidad de almacenamiento de más de 2,7 TB por cada celda de flujo. Los datos de la celda de flujo A se almacenan en la unidad D:, mientras que los datos de la celda de flujo B se almacenan en la unidad E:.

Al final de cada ciclo de adquisición de imágenes de cada carril, el software comprueba el espacio disponible en las unidades D: y E: locales. Si hay poco espacio en el disco, el software pone en pausa el experimento y coloca la celda de flujo en un estado seguro. Obtenga más espacio para poder continuar. En cuanto se libere suficiente espacio, el experimento se reanudará automáticamente.

Descripción general de los consumibles de secuenciación

Para realizar un experimento en HiSeq 2500, se necesitan un kit de SBS y un kit de generación de grupos.

Los kits de SBS incluyen los reactivos de secuenciación que se emplean en el sistema HiSeq, y cuentan con suficientes reactivos para secuenciar una celda de flujo. Los kits de SBS rápidos incluyen un juego de tapas de embudo. Los reactivos de secuenciación se suministran en botellas de 250 ml que se cargan directamente en las gradillas de reactivos. Las etiquetas de reactivos están codificadas con colores para reducir los errores a la hora de cargarlos.

Los kits de generación de grupos para modos de rendimiento elevado contienen reactivos de generación de grupos que se utilizan en cBot 2 o cBot, reactivos "paired-end" y de indexado que se utilizan en HiSeq 2500, y tapas de embudo para botellas de reactivo SBS. Los kits de generación de grupos rápidos contienen reactivos "paired-end", de indexado y de generación de grupos. Todos los reactivos se utilizan en HiSeq y son suficientes para la generación de grupos para una celda de flujo. Todos los kits de generación de grupos contienen juntas de celda de flujo y están disponibles en versiones "paired-end" (PE) y de lectura individual (SR).

Kits de reactivos para el modo HiSeq v4

Nombre del kit	N.º de catálogo
HiSeq SBS Kit v4 (250 ciclos)	FC-401-4003
HiSeq SBS Kit v4 (50 ciclos)	FC-410-4002
HiSeq SR Cluster Kit v4	GD-401-4001
HiSeq PE Cluster Kit v4	PE-401-4001

Kits de SBS para secuenciación de doble índice

Los kits de SBS HiSeq contienen el volumen de reactivos suficiente para llevar a cabo experimentos de doble índice:

- ▶ Un kit de SBS de 250 ciclos proporciona reactivos para hasta 275 ciclos de secuenciación.
- ▶ Un kit de 50 ciclos proporciona reactivos para hasta 75 ciclos de secuenciación.
- ▶ En el caso de los experimentos con más de 275 ciclos en total, utilice varios kits de 50 ciclos.

En la siguiente tabla figura el número de ciclos efectuados en los experimentos de doble índice de diversas longitudes. Para experimentos "paired-end" de doble índice, se calculan siete ciclos de solo química en el número total de ciclos.

Tipo de experimento	Longitud del experimento	Ciclos de experimento	Ciclos totales
"Paired-end" de doble índice	2 × 125	126 + 10 + (7) + 10 + +126	279
	2 × 100	101 + 10 + (7) + 10 + +101	229
	2 × 75	76 + 10 + (7) + 10 + +76	179
	2 × 50	51 + 10 + (7) + 10 + +51	129
	2 × 35	36 + 10 + (7) + 10 + +36	99
"Single-read" (de lectura individual) de doble índice	1 × 125	126 + 10 + 10	146
	1 × 75	76 + 10 + 10	96
	1 × 50	51 + 10 + 10	71
	1 × 35	36 + 10 + 10	56

Kits de reactivos para el modo TruSeq v3

Nombre del kit	N.º de catálogo
Kit TruSeq SBS v3 (200 ciclos)	FC-401-3001
Kit TruSeq SBS v3 (50 ciclos)	FC-401-3002
TruSeq SR Cluster Kit v3	GD-401-3001
TruSeq PE Cluster Kit v4	PE-401-3001

Kits de SBS para secuenciación de doble índice

En la siguiente tabla figura el número de ciclos efectuados en los experimentos de doble índice de diversas longitudes. Para experimentos "paired-end" de doble índice, se calculan siete ciclos de solo química en el número total de ciclos.

- ▶ Un kit de 200 ciclos proporciona reactivos suficientes para hasta 209 ciclos de secuenciación.
- ▶ Un kit de 50 ciclos proporciona reactivos suficientes para 58 ciclos de secuenciación.
- ▶ En el caso de los experimentos que tengan en total más de 209 ciclos y, a fin de aprovechar todo lo posible los reactivos con otras longitudes de lectura, utilice varios kits de 50 ciclos.

Tipo de experimento	Longitud del experimento	Ciclos de experimento	Ciclos totales
"Paired-end" de doble índice	2 × 100	101 + 10 + (7) + 10 + +101	229
	2 × 92	93 + 10 + (7) + 10 + +93	213
	2 × 75	76 + 10 + (7) + 10 + +76	179
	2 × 50	51 + 10 + (7) + 10 + +51	129
	2 × 35	36 + 10 + (7) + 10 + +36	99
"Single-read" (de lectura individual) de doble índice	1 × 100	101 + 10 + 10	121
	1 × 75	76 + 10 + 10	96
	1 × 50	51 + 10 + 10	71
	1 × 35	36 + 10 + 10	56

Cebadores de secuenciación para bibliotecas de Nextera

El cebador de secuenciación de Índice 1 (HP8) y el de Lectura 2 (HP7) que se suministran en los kits de generación de grupos de TruSeq v3 no son compatibles con las bibliotecas de Nextera. Al secuenciar bibliotecas de Nextera, utilice el cebador de secuenciación de Índice 1 (HP12) y el cebador de secuenciación

de Lectura 2 (HP11) que se suministran en la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Para hacer un experimento de doble índice en una celda de flujo de lectura individual es necesario el HP9, que se incluye en la versión SR del kit.

Nombre del kit	N.º de catálogo
Caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, SR	FC-121-1003
Caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, PE	PE-121-1003

Kits de reactivos para experimento rápido

Nombre del kit	N.º de catálogo
HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500 ciclos)	FC-402-4023
HiSeq Rapid SBS Kit v2 (200 ciclos)	FC-402-4021
HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 ciclos)	FC-402-4022
HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2	GD-402-4002
HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2	PE-402-4002

Kits de SBS para secuenciación de doble índice

Los kits de SBS Rapid contienen el volumen de reactivos suficiente para llevar a cabo experimentos de doble índice:

- ▶ Un kit de SBS de 500 ciclos proporciona reactivos para hasta 525 ciclos de secuenciación.
- ▶ Un kit de SBS de 200 ciclos proporciona reactivos para hasta 225 ciclos de secuenciación.
- ▶ Un kit de SBS de 50 ciclos proporciona reactivos para hasta 74 ciclos de secuenciación.
- ▶ En el caso de los experimentos cuyo número de ciclos supere el máximo de los de un kit y, a fin de aprovechar todo lo posible los reactivos con otras longitudes de lectura, utilice varios kits de 50 ciclos.

En la siguiente tabla figura el número de ciclos efectuados en los experimentos de doble índice de diversas longitudes. Para experimentos "paired-end" de doble índice, se calculan siete ciclos de solo química en el número total de ciclos.

Tipo de experimento	Longitud del experimento	Ciclos de experimento	Ciclos totales
"Paired-end" de doble índice	2 × 250	251 + 10 + (7) + 10 + 251	529
	2 × 100	101 + 10 + (7) + 10 + +101	229
	2 × 92	93 + 10 + (7) + 10 + +93	213
	2 × 75	76 + 10 + (7) + 10 + +76	179
	2 × 50	51 + 10 + (7) + 10 + +51	129
	2 × 35	36 + 10 + (7) + 10 + +36	99
"Single-read" (de lectura individual) de doble índice	1 × 250	251 + 10 + 10	241
	1 × 100	101 + 10 + 10	121
	1 × 92	93 + 10 + 10	113
	1 × 75	76 + 10 + 10	96
	1 × 50	51 + 10 + 10	71
	1 × 35	36 + 10 + 10	56

Capítulo 2 Primeros pasos

Inicio de HiSeq 2500	9
Personalización de los ajustes del sistema	10
Visualización y envío de datos del instrumento	11
Consumibles proporcionados por el usuario	11

Inicio de HiSeq 2500

- 1 Inicie el ordenador de control del instrumento.
- 2 Espere a que el sistema se cargue y, a continuación, inicie sesión en el sistema operativo. De ser necesario, póngase en contacto con el administrador de las instalaciones para conocer el nombre de usuario y la contraseña.
- 3 Localice el interruptor de alimentación en la parte izquierda del instrumento y muévelo a la posición ON (Encendido).
- 4 Espere al menos tres minutos a que los dispositivos del instrumento se hayan configurado y a que se inicialice la unidad del instrumento llamada DoNotEject.
- 5 Cierre la ventana que se abre cuando se inicializa DoNotEject. Si la ventana no se abre, utilice MyComputer para comprobar esta unidad.



NOTA

No extraiga nunca la unidad flash DoNotEject ubicada dentro del chasis del instrumento ni modifique los archivos dentro de dicha unidad. Esta unidad contiene archivos de configuración del hardware y se inicia cada vez que el instrumento está encendido.

- 6 Para asegurarse de que queda espacio suficiente en el disco, archive en una ubicación de red los datos de experimentos anteriores que están guardados en el ordenador del instrumento. Realice un reformato rápido de las unidades D:\ y E:\ para borrar todos los datos restantes. Los discos duros deben estar vacíos para el correcto funcionamiento del software.
- 7 Abra HCS mediante el icono de acceso rápido situado en el escritorio del ordenador. Cuando se inicializa el software, se abre la pantalla Mode Select (Selección de modo) y aparece el icono de inicialización en la esquina inferior derecha de la pantalla.

Prácticas recomendadas del instrumento y el ordenador de control

- ▶ No encienda el ordenador mientras el instrumento está en funcionamiento. Encienda siempre el ordenador antes de encender el instrumento.
- ▶ No apague nunca el instrumento mientras se esté ejecutando el software de control del instrumento.
- ▶ Espere un minuto tras apagar el instrumento para volver a encenderlo.
- ▶ Conecte los cables USB del instrumento, del monitor y del teclado en la parte trasera del ordenador antes de encender este último.
- ▶ Conecte el lector de códigos de barras y el ratón en los puertos USB de la parte delantera del ordenador.

Personalización de los ajustes del sistema

El software de control recoge la configuración personalizable del sistema para las preferencias de LIMS y las carpetas de experimentos. En la ventana Menu Options (Opciones del menú) se encuentran los parámetros para definir el modelo de ID del experimento, las ubicaciones predeterminadas de las carpetas, si se debe enviar o no información sobre el estado del instrumento a Illumina y la autenticación en el LIMS.

Para personalizar la vista de la interfaz, seleccione **Menu | View** (Menú | Vista). Puede elegir entre ver la interfaz en pantalla completa o en una ventana, o minimizarla.

Si desea activar el comando para inicializar manualmente el software, seleccione **Menu | Scanner** (Menú | Lector).

Definición de la configuración de las carpetas de experimentos

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Menu | Tools | Options** (Menú | Herramientas | Opciones) para abrir la ventana Menu Options (Opciones del menú).
- 2 Para personalizar la convención de nomenclatura de los nombres de las carpetas de experimentos, modifique la configuración del campo **Run ID Template** (Modelo de ID del experimento). Seleccione **Reset** (Restablecer) para borrar el campo.
- 3 Para determinar las ubicaciones de resultados predeterminadas, introduzca una ubicación para cada una de las carpetas siguientes:
 - ▶ **Default Output Folder** (Carpeta de resultados predeterminada): Carpeta de resultados predeterminada para los experimentos realizados en la celda de flujo A.
 - ▶ **Default Output Folder2** (Carpeta de resultados predeterminada2): Carpeta de resultados predeterminada para los experimentos realizados en la celda de flujo B.



NOTA

Estas ubicaciones se pueden cambiar para cada experimento.

- 4 Para definir la ubicación en la que se escriben los archivos temporales durante un experimento, introduzca una ubicación en el campo **Default Temp Folder 1** (Carpeta temporal predeterminada 1).
- 5 Para establecer la ubicación de los formularios de muestras de LIMS, introdúzcala en el campo **Run Setup Folder** (Carpeta de configuración del experimento).
- 6 Seleccione **OK** (Aceptar) para guardar el trabajo y cerrar la ventana Menu Options (Opciones del menú). Seleccione **Cancel** (Cancelar) para cerrar sin guardar.

Establecimiento de las preferencias de LIMS

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Menu | Tools | Options** (Menú | Herramientas | Opciones) para abrir la ventana Menu Options (Opciones del menú).
- 2 Introduzca la siguiente configuración para LIMS:
 - ▶ **LIMS Server** (Servidor LIMS): El nombre del servidor para interacciones con LIMS de Illumina compatibles.
 - ▶ **LIMS User Name** (Nombre de usuario de LIMS): El nombre de usuario utilizado para la autenticación en LIMS de Illumina.
 - ▶ **LIMS Password** (Contraseña de LIMS): La contraseña de LIMS utilizada para la autenticación en LIMS de Illumina.

- 3 Seleccione **OK** (Aceptar) para guardar el trabajo y cerrar la ventana Menu Options (Opciones del menú). Seleccione **Cancel** (Cancelar) para cerrar sin guardar.

Visualización y envío de datos del instrumento

El botón Menu (Menú) de la pantalla Welcome (Bienvenida) y la ventana Menu Options (Opciones del menú) ofrecen opciones para la visualización y el envío de datos del instrumento.

- ▶ Para ver la información sobre el hardware del instrumento, las versiones de software y la información de contacto del servicio de asistencia técnica, seleccione **Menu | About** (Menú | Acerca de).
- ▶ **Send instrument health information to Illumina to aid technical support** (Enviar información sobre el estado del instrumento a Illumina para ayudar al servicio de asistencia técnica): seleccione esta opción para activar el Servicio de supervisión proactiva de Illumina. El nombre del ajuste en la interfaz de software puede diferir del nombre que figura en esta guía, dependiendo de la versión de HCS que se esté utilizando.

Con este ajuste activado, los datos del rendimiento del instrumento se envían a Illumina. Estos datos ayudan a Illumina a solucionar problemas de forma más sencilla y a detectar posibles fallos, lo que permite llevar a cabo tareas de mantenimiento proactivo y maximizar el tiempo de actividad del instrumento. Para obtener más información sobre las ventajas de este servicio, consulte la *nota técnica del Servicio de supervisión proactiva de Illumina (n.º de documento 1000000052503)*.

Tenga en cuenta lo siguiente en relación con este servicio:

- ▶ No envía datos de secuenciación.
- ▶ Requiere que el instrumento esté conectado a una red con acceso a Internet.
- ▶ Está activado de manera predeterminada. Para desactivar este servicio, desactive el ajuste **Send instrument health information to Illumina to aid technical support** (Enviar información sobre el estado del instrumento a Illumina para ayudar al servicio de asistencia técnica).



NOTA

Este ajuste se vuelve a activar tras una actualización de software. Si no desea enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina, desactive este servicio cada vez que se actualice el software.

Consumibles proporcionados por el usuario

Consumible	Proveedor	Finalidad
Paños humedecidos en alcohol isopropilo al 70 % o en etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714 Proveedor de laboratorio general	Limpieza de la celda de flujo y de la platina de la celda de flujo.
Bidón, 6 litros mínimo	Proveedor de laboratorio general	Preparación de una solución de lavado de mantenimiento.
Tubos de centrifugado, 250 ml	Corning, n.º de catálogo 430776	Gradillas de reactivos SBS, posiciones que contienen PW1. Lavado del instrumento.
Tubos cónicos de 15 ml	Corning, n.º de catálogo 430052	Gradilla de reactivos PE, posiciones que contienen PW1. Lavado del instrumento. Recogida y medición de volúmenes de residuos.

Consumible	Proveedor	Finalidad
Tubos cónicos, 50 ml, autónomos (opcional)	Corning, n.º catálogo 430921	Almacenamiento de celdas de flujo.
Guantes desechables sin talco	Proveedor de laboratorio general	Uso general.
Toallita de laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026	Limpieza del soporte de la celda de flujo.
Papel para lentes, 4 × 6 pulgadas	VWR, n.º de catálogo 52846-001	Limpieza de la celda de flujo.
Puntas de pipeta, 200 µl	Proveedor de laboratorio general	División de los volúmenes de reactivos.
Puntas de pipeta, 1000 µl	Proveedor de laboratorio general	División de los volúmenes de reactivos.
ProClin 300, 50 ml	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 48912-U	Lavado de mantenimiento.
Tween 20, líquido viscoso, 100 ml	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Lavado de mantenimiento.
Pinzas de plástico con punta cuadrada	McMaster-Carr, n.º de catálogo 7003A22	Eliminación de las juntas de celda de flujo.
Agua de laboratorio, 18 MΩ	Millipore	Gradillas de reactivos SBS y PE, posiciones que contienen PW1. Lavado del instrumento.

Tubos de microcentrifugado para el modo de experimento rápido

Consumible	Proveedor
Tubo de microcentrifugado, 1,5 ml	VWR, n.º de catálogo 20170-038, 20170-650 u 89000-028 Axygen, n.º de catálogo MCT-150-C
Tubo de microcentrifugado, 1,7 ml	VWR, n.º de catálogo 20170-575 Axygen, n.º de catálogo MCT-175-C Sorenson BioScience, n.º de catálogo 16070

Capítulo 3 Secuenciación en el modo HiSeq v4

Introducción	13
Preparación de reactivos	14
Introducir parámetros del experimento	16
Carga y cebado de reactivos	19
Carga de la celda de flujo de secuenciación	24
Supervisión del experimento	27
Descarga de reactivos	28
Realización de un lavado con agua	28

Introducción

Para realizar un experimento de secuenciación en el modo HiSeq v4 en HiSeq 2500, prepare todos los reactivos y, a continuación, siga las indicaciones del software para configurar el experimento. Los pasos para la configuración del experimento incluyen la introducción de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de reactivos, la carga de la celda de flujo y la realización de una comprobación de fluidica.

Visite la página de especificaciones de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para obtener información sobre la duración del experimento y otras especificaciones de rendimiento.

Escalonamiento de experimentos

Puede iniciar un nuevo experimento en la celda de flujo A o en la celda de flujo B si hay un experimento en curso en la celda de flujo adyacente. Para obtener más información, consulte *Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B* en la página 81.

Tipos de experimentos para química de HiSeq v4

En la siguiente tabla se muestran los tipos de experimentos de secuenciación y el número de ciclos posibles para cada lectura cuando se utiliza la química de HiSeq v4. Consulte esta información cuando configure el experimento.

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura del índice 1 (i7)	Ciclos de lectura del índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
Single-Read (Lectura individual), no indexada	≤ 126	--	--	--	≤ 126
Single-Read (Lectura individual), de índice individual	≤ 126	6 o 7 ¹ 10 ²	--	--	≤ 133 ¹ ≤ 136 ²
Single-Read (Lectura individual), de doble índice	≤ 126	10	10	--	≤ 146
"Paired-end", no indexada	≤ 126	--	--	≤ 126	≤ 252
"Paired-end", de índice individual	≤ 126	7 ¹ 10 ²	--	≤ 126	≤ 259 ¹ ≤ 262 ²
"Paired-end", de doble índice	≤ 126	10	7 + 10 ³	≤ 126	≤ 279

¹ Número de ciclos para bibliotecas de índice individual.

² Número de ciclos para bibliotecas de doble índice.

³ La lectura del índice 2 de un experimento de doble índice "paired-end" incluye siete ciclos suplementarios de solo química.

Preparación de reactivos

Antes de configurar el experimento, prepare todos los reactivos para la secuenciación: los reactivos SBS, los reactivos de indexado y los reactivos "paired-end", si procede. Cargue todos los reactivos cuando se lo solicite el software de control. Si utiliza la química de HiSeq v4, no hace falta que vuelva al instrumento durante el experimento para cargar los reactivos.

Los reactivos se pueden preparar durante la generación de grupos. Para obtener instrucciones sobre cómo preparar reactivos de generación de grupos y realizar la generación de grupos, consulte la *Guía del sistema cBot* (n.º de documento 15006165).

División de reactivos

Se puede dividir un kit de 250 ciclos en dos juegos de reactivos para realizar experimentos más breves. Para obtener más información, consulte *División de kits SBS en la página 82*.

Preparación de los reactivos SBS

Los reactivos SBS se cargan en el instrumento al inicio del experimento. Para la preparación de reactivos, siga estas instrucciones para descongelar reactivos SBS.

Descongelación de los reactivos SBS

- 1 Extraiga los reactivos CRM, IRM y USM, almacenados a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proteja IRM de la luz.
- 2 Descongélalos a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante unas 16 horas. También puede descongelar los reactivos IRM y USM mediante un baño en agua desionizada a temperatura ambiente durante unos 90 minutos. Descongele CRM en un baño de agua *independiente*.



NOTA

Cámbiese siempre de guantes después de manipular el reactivo CRM.

- 3 Voltee cada botella para mezclarlos.
- 4 Deje reposar en hielo los reactivos IRM y USM. Deje reposar en hielo el reactivo CRM *por separado* para evitar la contaminación cruzada.
- 5 Utilice PW1, SB1, SB2 y SB3 directamente de su almacenamiento.

Preparación de los reactivos de indexado

Se utilizan reactivos de indexado durante las lecturas de índices de un experimento de secuenciación indexado.

Los kits de generación de grupos PE y SR incluyen HP12, que se utiliza para la Lectura 1 del índice 1 (i7), independientemente del tipo de celda de flujo. Solo el kit de generación de grupos SR incluye HP9, que es necesario para un experimento de doble índice en una celda de flujo de lectura individual.

Tipo de experimento	Tipo de celda de flujo	Índice 1 (i7)	Índice 2 (i5)
"Paired-end" de índice individual	PE	HP12	--
"Single-read" (de lectura individual) de índice individual	SR	HP12	--
"Paired-end" de doble índice*	PE	HP12	--
"Single-read" (de lectura individual) de doble índice	SR	HP12	HP9

* Los experimentos "paired-end" de doble índice utilizan FRM, un reactivo "paired-end", para el índice 2.

Descongelación de los reactivos de indexado

- 1 Extraiga los reactivos siguientes, almacenados a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:
 - ▶ Para todos los experimentos indexados en una celda de flujo "paired-end": FDR y HP12
 - ▶ Para los experimentos de un solo índice en una celda de flujo de lectura individual: FDR y HP12
 - ▶ Para los experimentos de doble índice en una celda de flujo de lectura individual: FDR, HP9 y HP12
- 2 Introduzca los reactivos en un baño de agua desionizada a temperatura ambiente durante unos 20 minutos hasta que se descongelen.

Preparación de FDR y HP12

- 1 Voltee los tubos para mezclar la solución.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 3 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Preparación de HP9

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue brevemente para recoger las gotas.
- 3 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Preparación de reactivos "paired-end"

Los reactivos "paired-end" se emplean durante el paso de resíntesis de la Lectura 2 de un experimento de secuenciación "paired-end".



ADVERTENCIA

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

Descongelación de los reactivos "paired-end"

- 1 Extraiga los reactivos siguientes, almacenados a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:
 - ▶ Para los experimentos no indexados: AMS, FDR, FLM2, FPM, FRM y HP11
 - ▶ Para los experimentos indexados: AMS, FLM2, FPM, FRM y HP11

- 2 Descongele los reactivos en un vaso de precipitados lleno de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.
- 3 Ponga en hielo los reactivos AMS, FLM2 y FRM.

Preparación de AMS, FDR, FLM2, FPM, FRM y HP11

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 3 Deje reposar en hielo los reactivos AMS, FLM2 y FRM.
- 4 Deje reposar a temperatura ambiente los reactivos FDR, FPM y HP11.

Introducir parámetros del experimento

Configure el experimento introduciendo los parámetros en las pantallas de la ficha Run Configuration (Configuración del experimento). El software le guía por las sucesivas pantallas para que especifique la conectividad de BaseSpace Sequence Hub, introduzca los ID de los consumibles, seleccione las opciones de indexación y registre otros parámetros.

Pantalla de integración

La pantalla de integración permite conectar el experimento a BaseSpace Sequence Hub.

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence | New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento) para abrir la pantalla de integración.
- 2 **[Opcional]** Conéctese a BaseSpace Sequence Hub o BaseSpace Onsite Sequence Hub como se indica a continuación.
 - a Seleccione **BaseSpace** o **BaseSpace Onsite**.
 - b Si ha seleccionado BaseSpace, elija una de las opciones siguientes:
 - ▶ **Storage and Analysis** (Almacenamiento y análisis): Envía los datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota y el análisis de los datos. Con esta opción, se precisa una hoja de muestras.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Solo supervisión del experimento): Envía solamente los archivos InterOp a BaseSpace Sequence Hub, lo que le permite supervisar el experimento de forma remota.
 - c Inicie sesión en BaseSpace Sequence Hub o en BaseSpace Onsite Sequence Hub con su correo electrónico y la contraseña de la cuenta de Myllumina.
- 3 **[Opcional]** Para continuar sin conexión a BaseSpace Sequence Hub, seleccione **None** (Ninguno).
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de almacenamiento

- 1 Seleccione la casilla de verificación **Save to an output folder** (Guardar en una carpeta de salida) y, después, seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de red deseada.
Si el experimento está conectado a BaseSpace Sequence Hub para almacenamiento y análisis, este paso es opcional.
- 2 Seleccione **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) para reducir el espacio de almacenamiento necesario.
Si el experimento está conectado a BaseSpace Sequence Hub, la opción **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) está seleccionada de forma predeterminada.



NOTA

El parámetro **Bin Q-Scores** (Agrupar puntuaciones Q) está activado de forma predeterminada para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Este parámetro agrupa las puntuaciones de calidad de un rango de valores más amplio sin repercutir en la precisión ni el rendimiento.

- 3 Seleccione una de las siguientes opciones de Save Auxiliary Files (Guardar archivos auxiliares):
 - ▶ **Save All Thumbnails** (Guardar todas las vistas en miniatura): Guarda todas las imágenes en miniatura. Una imagen en miniatura es una muestra de imágenes de muchas placas de cada columna de placas o sector, combinada en una imagen en miniatura.
 - ▶ **Save Tile Thumbnails** (Guardar vistas en miniatura de placa): Guarda las vistas en miniatura de las placas. Las vistas en miniatura de las placas representan una sola placa en lugar de una muestra de placas en un sector.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración de la celda de flujo

La pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo) registra información acerca de la celda de flujo utilizada en el experimento. Todos los campos son obligatorios.

- 1 Lea o introduzca el ID de celda de flujo (número de código de barras) de la celda de flujo que se ha de secuenciar.
El ID de la celda de flujo determina el tipo de celda de flujo y la compatibilidad de los reactivos.
- 2 Confirme que el tipo de celda de flujo sea **HiSeq Flow Cell v4**.
- 3 Introduzca el nombre del experimento que aparecerá en cada pantalla y que ayudará a identificar el experimento en curso.
- 4 Introduzca un nombre de usuario y, después, seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración avanzada

- 1 **[Opcional]** Seleccione la casilla de verificación **Confirm First Base** (Confirmar primera base).
Se genera un informe de primera base automáticamente para cada experimento. Al seleccionar esta opción, se abre el informe de primera base antes de que el experimento continúe.
- 2 **[Opcional]** Anule la selección de la casilla de verificación **Align to PhiX** (Alinear a PhiX) para cualquier carril que no contenga PhiX.
También puede optar por seleccionar los carriles de la imagen de la celda de flujo para añadir o eliminar carriles para la alineación de PhiX.
De forma predeterminada, se seleccionan todos los carriles para la alineación.



NOTA

Con HCS v2.2 y RTA v1.18, no es necesario usar un carril de control específico ni tampoco es una opción.

- 3 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de fórmulas

- 1 En Index Type (Tipo de índice), seleccione una de las siguientes opciones:
 - ▶ **No Index** (Sin índice): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" no indexado.

- ▶ **Single Index** (Índice individual): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con una lectura del índice.
 - ▶ **Dual Index** (Índice doble): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con dos lecturas del índice.
 - ▶ **Custom** (Personalizado): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con un número de ciclos personalizado de lecturas del índice.
- 2 Si se especifica la opción Dual Index (Índice doble) o Custom (Personalizado), seleccione un formato de celda de flujo: bien **Single Read** (Lectura individual) o bien **Paired End**.
 - 3 Introduzca el número de ciclos para la Lectura 1 y la Lectura 2, según sea necesario.
El número de ciclos realizados en una lectura es de un ciclo más que el número de ciclos analizados.
Por ejemplo, para realizar 125 ciclos para la Lectura 1, introduzca 126.
 - 4 Para la opción de indexado **Custom** (Personalizado), introduzca el número de ciclos para las lecturas del índice.



NOTA

No es necesario que las longitudes de lectura sean idénticas.

- 5 Confirme los siguientes parámetros de química rellenos automáticamente:
 - ▶ **SBS: Kit HiSeq SBS v4**
 - ▶ **Index** (Índice): **HiSeq v4 Single Index** (Índice individual de HiSeq v4) o **HiSeq v4 Dual Index** (Índice doble de HiSeq v4)
 - ▶ **PE turnaround: HiSeq PE Cluster Kit v4** (Kit de generación de grupos PE de HiSeq v4)
- 6 **[Opcional]** Seleccione la casilla de verificación **Use Existing Recipe** (Usar fórmula existente) para utilizar una fórmula personalizada.

Pantalla de hoja de muestras

Las hojas de muestras son opcionales salvo si utiliza BaseSpace Sequence Hub para realizar análisis de datos o un experimento indexado.



NOTA

HCS v2.2 permite un esquema de indexado diferente en cada carril.

- 1 Seleccione **Browse** (Examinar) para localizar la hoja de muestras.
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de reactivos

La pantalla Reagents (Reactivos) registra información sobre los kits de reactivos utilizados para el experimento. El ID del kit de reactivos (el número de código de barras que comienza por **RGT**) determina el tipo del kit de reactivos y la compatibilidad con los modos de experimento.

- 1 Lea o introduzca el ID del kit de reactivos SBS.
- 2 En el caso de los experimentos "paired-end", lea o introduzca el ID del kit de reactivos del kit de generación de grupos "paired-end".
- 3 Seleccione el kit de reactivos SBS para el experimento:
 - ▶ Seleccione **250 Cycles** (250 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 275 de forma predeterminada.
 - ▶ Seleccione **50 Cycles** (50 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 74 de forma predeterminada.

- ▶ Seleccione **Custom** (Personalizado) para un kit parcial o varios kits de 50 ciclos. En el campo Cycles Remaining (Ciclos restantes), introduzca el número de ciclos SBS que se espera que duren los reactivos.



NOTA

En el caso de los kits parciales, el software cuenta el número de ciclos introducidos. Cuando los ciclos están en un nivel bajo, el software le solicita que cargue reactivos nuevos.

- 4 Seleccione **Prime SBS Reagents** (Cebiar reactivos SBS) para cebiar los reactivos.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla Review (Revisar)

- 1 Revise los parámetros del experimento en la pantalla Review (Revisión).
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar o **Back** (Atrás) para modificar los parámetros.

Carga y cebado de reactivos

Tras introducir los parámetros del experimento, cargue los reactivos SBS, de indexado y "paired-end" para el experimento y, a continuación, cebe los reactivos mediante el sistema de fluidica. El software le guía a través de estos pasos mediante una serie de pantallas en la ficha Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento).

Carga de reactivos SBS

- 1 Voltee cada botella de reactivo varias veces para mezclarlo.



PRECAUCIÓN

A fin de evitar la contaminación cruzada, sustituya la tapa de la botella de CRM en último lugar, tras haber cargado el resto de los reactivos. Cámbiese siempre de guantes después de manipular el reactivo CRM.

- 2 Vuelva a tapar cada botella con una tapa de embudo.
- 3 Abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 4 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 5 Deslice la gradilla de reactivos para extraerla del compartimento.
- 6 Coloque cada una de las botellas de reactivo en la gradilla, en la posición numerada correspondiente. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

Posición	Reactivo	Descripción
1	IRM	Reactivo de mezcla maestra para incorporación
2	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
3	USM	Mezcla de lectura universal
4	Tampón de SBS 1 (SB1)	Tampón de alto contenido en sal

Posición	Reactivo	Descripción
5	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
6	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
7	CRM	Reactivo de mezcla para clivaje
8	Tampón de SBS 3 (SB3)	Tampón de clivaje

- 7 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.
- 8 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 9 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe que los dispensadores no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.
- 10 Seleccione la casilla de verificación **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] cargada).

Carga de reactivos de indexado

- 1 Asegúrese de que la gradilla "paired-end" no se esté utilizando en la celda de flujo adyacente para la resíntesis de la Lectura 2, la preparación de la lectura del índice 1 (i7) o la preparación de la lectura del índice 2 (i5).
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" según se indica a continuación:
 - a Tire del mango hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.
- 4 Retire las tapas de todos los tubos de reactivo y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Tabla 1 Celdas de flujo de lectura individual

Posición	Reactivo	Descripción
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP9*	Cebador de secuenciación del índice i5
17	HP12	Cebador de secuenciación del índice i7

* HP9 es necesario solamente en experimentos de doble índice. Si no se utiliza HP9, cargue un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en la posición 16.

Tabla 2 Celdas de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	FRM*	Mezcla para resíntesis rápida
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
17	HP12	Cebador de secuenciación del índice i7

* Cargue FRM en la posición 10 para experimentos de doble índice en una celda de flujo "paired-end". Se debe colocar FRM en la posición 10 para todos los experimentos "paired-end", independientemente de la opción de indexado.

- 5 Si está realizando un experimento "paired-end", omita los pasos 6–9.
- 6 Coloque tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en posiciones que no se estén utilizando de la gradilla "paired-end".
- 7 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 8 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
 - a Tire del mango hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.
- 9 Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de reactivos "paired-end"

- 1 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" según se indica a continuación:
 - a Tire del mango hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 2 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.
- 3 Retire las tapas de todos los tubos de reactivo y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Posición	Reactivo	Descripción
10	FRM*	Mezcla para resíntesis rápida
11	FLM2	Mezcla para linealización rápida 2
13	AMS	Mezcla para amplificación rápida
14	FPM	Premezcla de amplificación rápida
15	FDR*	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP11	Cebador de secuenciación de la Lectura 2

* Si ha cargado reactivos de indexado para un experimento de índice individual, FRM ya se habrá cargado en la posición 10. Si ha cargado reactivos de indexado para un experimento de doble índice, FRM y FDR ya se habrán cargado.

- 4 Coloque tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en posiciones que no se estén utilizando de la gradilla "paired-end".
- 5 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 6 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
 - a Tire del mango hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.
- 7 Seleccione **Next** (Siguiente).

Cebado de reactivos

Entre los pasos para el cebado de reactivos figuran la carga de una celda de flujo para el cebado, la confirmación del flujo correcto y, a continuación, el inicio del cebado.



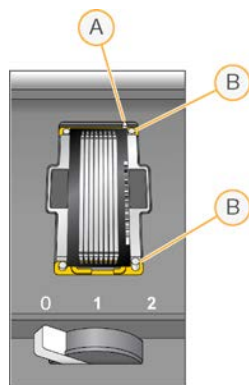
PRECAUCIÓN

Utilice siempre una celda de flujo *usada* para cebar los reactivos. Puede utilizar la celda de flujo de un experimento anterior para el cebado de reactivos en un experimento posterior o para un lavado posterior al experimento.

Carga de una celda de flujo para el cebado

- 1 Enjuague la celda de flujo para el cebado con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes o una toallita sin pelusa.
- 2 Límpiela con toallitas con alcohol y con una toallita para limpiar lentes.
- 3 Colóquela en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia **abajo** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
- 4 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y de la parte derecha, hasta que se detenga.

Figura 6 Celda de flujo encastrada entre los pasadores guía superiores y de la parte derecha



- A Pasador guía superior
- B Pasadores guía derechos

- 5 Retire la mano de la celda de flujo para evitar que se desalinee.
- 6 Lentamente, mueva la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo.
Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee en color verde, el vacío está activado. Si la palanca no es verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos en la página 77*.
- 7 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo se puede usar.
- 8 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación del flujo adecuado

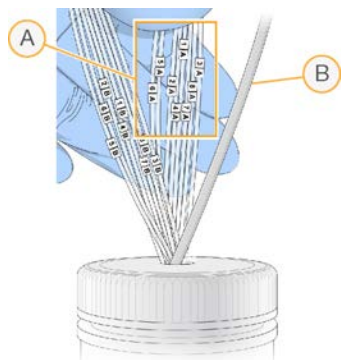
Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y que el distribuidor está acoplado.

- 1 Lea o introduzca el ID de celda de flujo para el cebado (número de código de barras) de dicha celda de flujo.
- 2 Seleccione la posición **2** en la lista desplegable.
- 3 Confirme los siguientes valores predeterminados:
 - ▶ Volume (Volumen): **125**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
- 4 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 5 Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 6 Si detecta una presencia excesiva de burbujas, realice lo siguiente:
 - a Compruebe si las juntas están obstruidas.
 - b Reduzca la velocidad de aspiración a 100.
 - c Dispense otros 125 µl de agua a la celda de flujo.
 - d Si el problema persiste, retire la celda de flujo, repita los pasos de limpieza y vuelva a cargarla.

Colocación de los tubos e inicio del cebado

- 1 Extraiga los ocho tubos de residuos correspondientes a la celda de flujo adecuada del contenedor de residuos.

Figura 7 Colocación de los tubos



- A Tubos de residuos de la celda de flujo para las posiciones de los reactivos 1-8
- B Tubos de la bomba de condensación

- 2 Coloque cada tubo de residuos en un tubo independiente y vacío de 15 ml. El residuo se recoge y se mide cuando finaliza el cebado.
- 3 Seleccione **Start Prime** (Iniciar cebado). Supervise el progreso del cebado en la pantalla de cebado.
- 4 Al finalizar el cebado, mida el residuo y compruebe que el volumen de cada tubo sea de 1,75 ml para un total de **14 ml**.

El total se calcula de la siguiente forma:

- ▶ 250 µl por cada posición SBS salvo la posición 2 ($250 \times 7 = 1,75 \text{ ml}$)
- ▶ 1,75 ml por carril ($1,75 \times 8 = 14 \text{ ml}$)

- 5 Devuelva los tubos de residuos al contenedor de residuos.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de la celda de flujo de secuenciación

Cargar la celda de flujo para la secuenciación implica eliminar la celda de flujo para el cebado, limpiar el soporte de la celda de flujo, cargar la celda de flujo agrupada y confirmar el flujo adecuado.

Retirada de la celda de flujo usada

- 1 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para desacoplar los distribuidores.
- 2 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 0 para desacoplar la junta de vacío y desbloquear la celda de flujo.
- 3 Levante la celda de flujo usada del soporte de la celda de flujo.

Limpieza del soporte de la celda de flujo

- 1 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.
- 2 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita sin pelusa humedecida con agua de laboratorio para eliminar las sales.
- 3 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita humedecida con alcohol o con una toallita sin pelusa humedecida con etanol o isopropanol. Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío o alrededor de los distribuidores.
- 4 Seque la platina con una toallita de laboratorio sin pelusa si fuera necesario.
- 5 Compruebe que el soporte de la celda de flujo no tiene pelusas y que los orificios de vacío no están obstruidos.

Figura 8 Inspección de los orificios de vacío



Limpieza de la celda de flujo

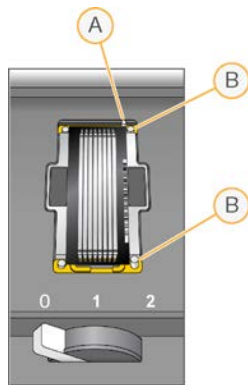
- 1 Extraiga la celda de flujo agrupada del contenedor con un par de pinzas hemostáticas de plástico.
- 2 Enjuague la celda de flujo con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes.
- 3 Doble un paño humedecido en alcohol hasta que tenga el tamaño aproximado de la celda de flujo.

- 4 Sujete los extremos de la celda de flujo con dos dedos de forma que los puertos de entrada y salida miren hacia **arriba**.
- 5 Limpie cada lado de la celda de flujo con un solo movimiento de arrastre. Repita el procedimiento hasta que quede limpia, doblando el paño después de cada pasada.
- 6 Séquela con una toallita para limpiar lentes seca.
- 7 Proteja la celda de flujo del polvo hasta que vaya a cargarla en el instrumento.

Carga de la celda de flujo de secuenciación

- 1 Coloque la celda de flujo en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia **abajo** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
- 2 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y de la parte derecha, hasta que se detenga.

Figura 9 Celda de flujo encastrada entre los pasadores guía superiores y de la parte derecha



- A Pasador guía superior
- B Pasadores guía derechos

- 3 Retire la mano de la celda de flujo para evitar que se desalinee posteriormente.
- 4 Lentamente, mueva la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo.
Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee en color verde, el vacío está activado. Si la palanca no es verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos en la página 77*.
- 5 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo se puede usar.
- 6 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación del flujo adecuado

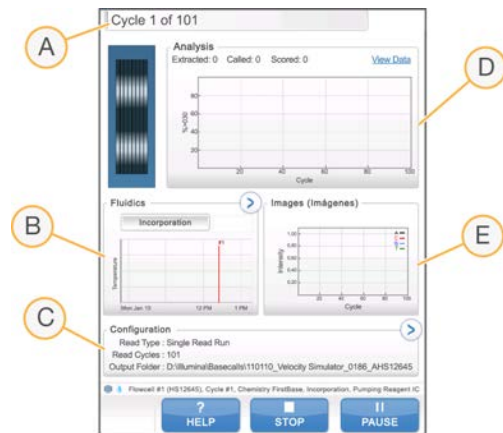
Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y que el distribuidor está acoplado.

- 1 Seleccione la posición **5** en la lista desplegable.
- 2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
 - ▶ Volume (Volumen): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
- 3 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 4 Inspeccione la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
- 5 Si detecta una presencia excesiva de burbujas, realice lo siguiente:
 - a Compruebe si las juntas del distribuidor están obstruidas.
 - b Repita la dispensación con la solución 6 para evitar que se vacíe la posición 5.
 - c Reduzca la velocidad de aspiración a 100.
 - d Dispense otros 250 µl en la celda de flujo.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiendo).
- 7 Asegúrese de que la palanca de la celda de flujo muestra el color verde y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo.
- 8 Compruebe que las casillas de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y **Door Closed** (Puerta cerrada) estén seleccionadas y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiendo).
- 9 En la pantalla Read Barcode (Leer código de barras), espere a que finalice la adquisición de imágenes. El ID de la celda de flujo se lee para confirmar que coincida con el ID de la celda de flujo introducido en la pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo). La adquisición de imágenes dura unos tres minutos, o siete en el caso de un experimento con celda de flujo doble.
- 10 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el experimento de secuenciación.

Supervisión del experimento

- 1 Supervise los criterios de medición del experimento desde la pantalla de resumen del experimento.

Figura 10 Pantalla de resumen del experimento



- A **Barra de progreso:** Supervise el número de ciclos finalizados.
- B **Gráfico del sistema de fluidica:** Amplíe la sección del sistema de fluidica para supervisar los pasos del proceso químico.
- C **Configuración del experimento:** Consulte los parámetros del experimento actual.
- D **Gráfico de análisis:** Supervise las puntuaciones de calidad por ciclo.
- E **Gráfico de imágenes:** Supervise las intensidades por ciclo.

Informe de primera base

Si ha elegido la opción de confirmar primera base durante la configuración del experimento, se abrirá el cuadro de diálogo de confirmación de primera base automáticamente después de que finalice la adquisición de imágenes del primer ciclo. El experimento se pone en pausa en este momento.

- 1 Revise el informe de primera base en el cuadro de diálogo de confirmación.
- 2 Si los resultados son satisfactorios, seleccione **Continue** (Continuar).

Visualización de los criterios de medición

Cuando los criterios de medición estén disponibles, Sequencing Analysis Viewer (SAV) se abrirá automáticamente y los mostrará. Los datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas. Si desea obtener más información, consulte la *Guía del usuario del visor del análisis de secuenciación (n.º de documento 15020619)*.

- 1 Para ver los datos actualizados, seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento.

Descarga de reactivos

- 1 Cuando finalice el experimento, abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS y "paired-end" correspondientes según se indica a continuación.
 - a Tire del mango del dispensador hacia fuera.
 - b Levante el mango del dispensador hacia arriba mientras tira de él hacia fuera.
 - c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos utilizando los mangos de la gradilla.
- 4 Retire todas las botellas de cada gradilla de reactivos.



ADVERTENCIA

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

Realización de un lavado con agua

Es necesario efectuar un lavado con agua después de cada experimento de secuenciación para limpiar el sistema y comprobar el sistema de flúidica. Existe la opción de realizar un lavado de mantenimiento como alternativa al lavado con agua posterior al experimento. Para obtener instrucciones, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento en la página 69*.

Si el instrumento ha permanecido inactivo durante un día o más, realice un lavado con agua antes de empezar un nuevo experimento de secuenciación.

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Wash | Water** (Lavado | Agua).
- 2 Seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de los reactivos "paired-end" y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
- 3 Cargue el instrumento con agua de laboratorio:
 - a Llene 8 botellas de SBS con 250 ml de agua de laboratorio.
 - b Llene 10 tubos de PE con 12 ml de agua de laboratorio.



NOTA

Los tubos y las botellas de lavado se suelen sustituir cada seis meses. No obstante, el agua se cambia aproximadamente una vez a la semana.

- 4 Asegúrese de que hay cargada una celda de flujo usada. Si es necesario, cargue una celda de flujo usada.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiente).

- 6 Realice una comprobación del sistema de fluidica de la siguiente manera:
 - a Seleccione la solución 2 en la lista desplegable.
 - b Acepte los valores predeterminados de la bomba.
 - c Seleccione **Pump** (Dispensar).
 - d Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 7 Retire los tubos de residuos de la celda de flujo correspondiente del contenedor de residuos.
- 8 Ate los tubos de residuos con papel Parafilm y mantenga todos los extremos al mismo nivel.
- 9 Introduzca los extremos de los tubos agrupados en una botella de 250 ml.
- 10 Seleccione **Next** (Siguiete) para iniciar el lavado con agua.

Posiciones	Tiempo aproximado del experimento
Ocho posiciones SBS	20 minutos
Ocho posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	60 minutos

- 11 Al finalizar el lavado, mida el volumen administrado.

Posiciones	Volumen total administrado	Volumen administrado por carril
Ocho posiciones SBS	32 ml	4 ml
Ocho posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	72 ml	9 ml

- 12 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos a la botella de residuos.

Capítulo 4 Secuenciación en el modo TruSeq v3

Introducción	30
Preparación de reactivos para la Lectura 1	31
Introducir parámetros del experimento	35
Carga y cebado de reactivos	38
Carga de la celda de flujo de secuenciación	42
Supervisión del experimento	45
Preparación de reactivos para la Lectura 2	46
Descarga de reactivos	50
Realización de un lavado con agua	50

Introducción

Para llevar a cabo un experimento de secuenciación en el modo TruSeq v3 en HiSeq 2500, prepare los reactivos SBS para la Lectura 1 y los reactivos de indexado antes de configurar el experimento. Siga las indicaciones del software para configurar el experimento. La configuración del experimento incluye la introducción de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de reactivos, la carga de la celda de flujo y la realización de una comprobación de fluidica. Tras finalizar la Lectura 1 y cualquier lectura del índice, prepare y cargue los reactivos SBS y "paired-end" para la Lectura 2.

Visite la página de especificaciones de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para obtener información sobre la duración del experimento y otras especificaciones de rendimiento.

Escalonamiento de experimentos

Puede iniciar un nuevo experimento en la celda de flujo A o en la celda de flujo B si hay un experimento en curso en la celda de flujo adyacente. Para obtener más información, consulte [Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B](#) en la página 81.

Tipos de experimentos para química de TruSeq v3

En la siguiente tabla se muestran los tipos de experimentos de secuenciación y el número de ciclos posibles para cada lectura cuando se utiliza la química de TruSeq v3. Consulte esta información cuando configure el experimento.

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura del índice 1 (i7)	Ciclos de lectura del índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
Single-Read (Lectura individual), no indexada	≤ 101	--	--	--	≤ 101
Single-Read (Lectura individual), de índice individual	≤ 101	6 o 7 ¹ 8 ²	--	--	≤ 108 ¹ ≤ 109 ²
Single-Read (Lectura individual), de doble índice	≤ 101	8	8	--	≤ 117
"Paired-end", no indexada	≤ 101	--	--	≤ 101	≤ 202
"Paired-end", de índice individual	≤ 101	7 ¹ 8 ²	--	≤ 101	≤ 209 ¹ ≤ 210 ²
"Paired-end", de doble índice	≤ 101	8	7 + 8 ³	≤ 101	≤ 225

¹ Número de ciclos para bibliotecas de índice individual.

² Número de ciclos para bibliotecas de doble índice.

³ La lectura del índice 2 de un experimento de doble índice "paired-end" incluye siete ciclos suplementarios de solo química.

Preparación de reactivos para la Lectura 1

Antes de configurar el experimento, prepare los reactivos para la Lectura 1 y cualquier lectura de índices. Cargue los reactivos preparados cuando se lo solicite el software de control.

Los reactivos para la Lectura 1 se pueden preparar durante la generación de grupos. Para obtener instrucciones sobre cómo preparar reactivos de generación de grupos y realizar la generación de grupos, consulte la *Guía del sistema cBot* (n.º de documento 15006165).



NOTA

Los reactivos para la Lectura 2 se preparan durante la Lectura 1.

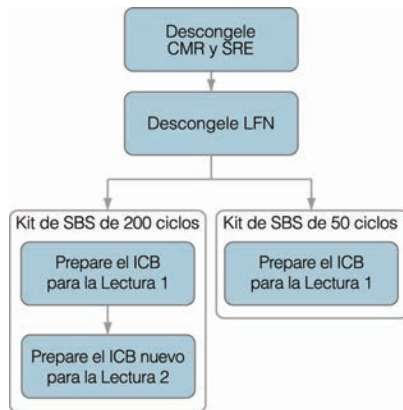
División de reactivos

Se puede dividir un kit de 200 ciclos en dos juegos de reactivos para realizar experimentos más breves. Para obtener más información, consulte *División de kits SBS en la página 82*.

Preparación de los reactivos SBS

La preparación de reactivos SBS incluye los pasos de descongelar CMR, LFN y SRE, y, después, preparar ICB con LFN y EDP. Para utilizar el kit de SBS de 200 ciclos, hay que dividir ICB en 2 partes durante la preparación: una parte para la Lectura 1 y otra para la Lectura 2. En el caso de experimentos de doble índice, el paso de preparación de ICB incluye el cálculo de los volúmenes de reactivos adecuados.

Figura 11 Flujo de trabajo de preparación de reactivos SBS



Descongelación de los reactivos SBS

- 1 Extraiga los reactivos CMR y SRE, almacenados a una temperatura de entre -25°C y -15°C .
- 2 Descongélalos a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante unas 16 horas.
También puede introducir el reactivo SRE en un baño de agua desionizada a temperatura ambiente durante unos 90 minutos hasta que se descongele. Descongele CMR en un baño de agua *independiente*.



NOTA

Cámbiese siempre de guantes después de manipular el reactivo CMR.

- 3 Voltee los reactivos para mezclarlos.
- 4 Deje reposar en hielo el reactivo SRE. Deje reposar en hielo el reactivo CMR *por separado* para evitar la contaminación cruzada.
- 5 Extraiga el reactivo LFN, almacenado a una temperatura de entre -25°C y -15°C :
 - ▶ Kit de SBS de 50 ciclos: Extraiga un tubo.
 - ▶ Kit de SBS de 200 ciclos: Extraiga dos tubos.
- 6 Descongele LFN en un vaso de precipitados lleno de agua desionizada a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.
- 7 Utilice ICB, SB1, SB2 y SB3 directamente a la temperatura de entre 2°C y 8°C a la que están almacenados.

Preparación de ICB para Lectura 1 (no indexada o con índice individual) (kit de 50 ciclos)

- 1 Añada el contenido de un tubo de LFN a la botella de ICB.
- 2 Enjuague el tubo de LFN con ICB para garantizar la transferencia de todo el LFN.
- 3 Añada el contenido del tubo de EDP a la solución de ICB y LFN.
- 4 Enjuague el tubo de EDP con la solución de ICB y LFN para asegurarse de que se transfiera todo el EDP.
- 5 Cierre la botella que contiene EDP, ICB y LFN, y voltéela para mezclarlos.
- 6 Déjela reposar en hielo.

Preparación de ICB para Lectura 1 (no indexada o con índice individual) (kit de 200 ciclos)

- 1 Añada 47 ml de ICB a una botella de 250 ml vacía para obtener dos botellas de ICB.
- 2 Deje reposar la botella que contiene 47 ml de ICB a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C para la Lectura 2.
- 3 Añada el contenido de dos tubos de LFN a la botella original de ICB.
- 4 Enjuague cada tubo de LFN con ICB para garantizar la transferencia de todo el LFN.
- 5 Añada 1,1 ml de EDP a la solución de ICB y LFN.
- 6 Almacene la parte sin usar de EDP a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.
- 7 Cierre la botella que contiene EDP, ICB y LFN, y voltéela para mezclarlos.
- 8 Déjela reposar en hielo.

Preparación de ICB para Lectura 1 (con doble índice)

Utilice las siguientes instrucciones para calcular y preparar el volumen de ICB necesario para la Lectura 1 de un experimento de doble índice.

- 1 Mida los siguientes volúmenes de EDP, ICB y LFN para cada 10 ciclos de la secuenciación que vaya a realizar en la Lectura 1.

Reactivo	Volumen por 10 ciclos	Almacenamiento
ICB	4,57 ml	Entre 2 °C y 8 °C
LFN	0,6 ml	Entre -25 °C y -15 °C
EDP	0,11 ml	Entre -25 °C y -15 °C

- 2 Transfiera el volumen de ICB medido a una botella de 250 ml vacía.
- 3 Añada el volumen de LFN medido a la nueva botella de ICB.
- 4 Enjuague cada tubo de LFN con ICB para garantizar la transferencia de todo el LFN.
- 5 Añada el volumen de EDP medido a la solución de ICB y LFN.
- 6 Enjuague el tubo de EDP con la solución de ICB y LFN para asegurarse de que se transfiera todo el EDP.
- 7 Cierre la botella que contiene EDP, ICB y LFN, y voltéela para mezclarlos.
- 8 Déjela reposar en hielo.

Ejemplo de cálculo

Un experimento "paired-end" de doble índice de 101 ciclos tiene un total de 225 ciclos:

- ▶ 124 ciclos (101 + 8 + 7 + 8) para la Lectura 1 y las lecturas del índice
- ▶ 101 ciclos para la Lectura 2

Lectura 1 y lecturas del índice (124 ciclos)	Lectura 2 (101 ciclos)
124 ciclos / 10 ciclos = 12,4 • ICB: 12,4 × 4,57 ml = 56,9 ml • LFN: 12,4 × 0,6 ml = 7,44 ml • EDP: 12,4 × 0,11 ml = 1,36 ml	101 ciclos / 10 ciclos = 10 • ICB: 10 × 4,57 ml = 45,7 ml • LFN: 10 × 0,6 ml = 6 ml • EDP: 10 × 0,11 ml = 1,1 ml

Utilice el mismo cálculo para cualquier experimento de doble índice. Base el cálculo en el número total de ciclos en la Lectura 1 y las lecturas del índice, y el número total de ciclos en la Lectura 2. En el caso de experimentos "paired-end" de doble índice, incluya los siete ciclos de solo química en la Lectura de índice 2.

Preparación de los reactivos de indexado

Se utilizan reactivos de indexado durante las lecturas de índices de un experimento de secuenciación indexado. Prepare los reactivos adecuados para el tipo de experimento y el tipo de biblioteca.

Tipo de experimento	Tipo de biblioteca	Índice 1 (i7)	Índice 2 (i5)
Índice individual	Todas las bibliotecas, excepto Nextera	HP8	--
	Bibliotecas de Nextera	HP12*	--
"Paired-end" de doble índice	Todas las bibliotecas, excepto Nextera	HP8	RMR
	Bibliotecas de Nextera	HP12*	RMR
"Single-read" (de lectura individual) de doble índice	Todas las bibliotecas, excepto Nextera	HP8	HP9*
	Bibliotecas de Nextera	HP12*	HP9*

* Se suministra en la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Descongelación de los reactivos de indexado

- 1 Extraiga los reactivos siguientes, almacenados a una temperatura de entre -25°C y -15°C :
 - ▶ Para todos los experimentos indexados: HP3, HP12 o HP8, y HT2
 - ▶ Para los experimentos de doble índice en una celda de flujo de lectura individual: HP9
 - ▶ Para los experimentos de doble índice en una celda de flujo "paired-end": RMR
- 2 Descongele los reactivos en una jarra de laboratorio llena de agua desionizada a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.

Preparación de HT2

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 3 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Preparación de HP3 para experimentos indexados

- 1 Voltéelo para mezclarlo y, después, realice un centrifugado.
- 2 Combine los siguientes volúmenes de HP3 y PW1:
 - ▶ Para experimentos de índice individual: Transfiera 3325 μl de PW1 a un tubo cónico de 15 ml vacío y, después, añada 175 μl de HP3.
 - ▶ Para experimentos de doble índice: Transfiera 3800 μl de PW1 a un tubo cónico de 15 ml vacío y, después, añada 200 μl de HP3.
- 3 Voltee para mezclar.
- 4 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 5 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Preparación de HP8 o HP12

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 3 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Preparación de RMR

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto. *No lo agite en un mezclador vorticial.*
- 3 Déjela reposar en hielo.

Preparación de HP9

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue brevemente para recoger las gotas.
- 3 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Introducir parámetros del experimento

Configure el experimento introduciendo los parámetros en las pantallas de la ficha Run Configuration (Configuración del experimento). El software le guía por las sucesivas pantallas para que especifique la conectividad de BaseSpace Sequence Hub, introduzca los ID de los consumibles, seleccione las opciones de indexación y registre otros parámetros.

Pantalla de integración

La pantalla de integración permite conectar el experimento a BaseSpace Sequence Hub.

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence | New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento) para abrir la pantalla de integración.
- 2 **[Opcional]** Conéctese a BaseSpace Sequence Hub o BaseSpace Onsite Sequence Hub como se indica a continuación.
 - a Seleccione **BaseSpace** o **BaseSpace Onsite**.
 - b Si ha seleccionado BaseSpace, elija una de las opciones siguientes:
 - ▶ **Storage and Analysis** (Almacenamiento y análisis): Envía los datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota y el análisis de los datos. Con esta opción, se precisa una hoja de muestras.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Solo supervisión del experimento): Envía solamente los archivos InterOp a BaseSpace Sequence Hub, lo que le permite supervisar el experimento de forma remota.
 - c Inicie sesión en BaseSpace Sequence Hub o en BaseSpace Onsite Sequence Hub con su correo electrónico y la contraseña de la cuenta de Myllumina.
- 3 **[Opcional]** Para continuar sin conexión a BaseSpace Sequence Hub, seleccione **None** (Ninguno).
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de almacenamiento

- 1 Seleccione la casilla de verificación **Save to an output folder** (Guardar en una carpeta de salida) y, después, seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de red deseada.
Si el experimento está conectado a BaseSpace Sequence Hub para almacenamiento y análisis, este paso es opcional.
- 2 Seleccione **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) para reducir el espacio de almacenamiento necesario.
Si el experimento está conectado a BaseSpace Sequence Hub, la opción **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) está seleccionada de forma predeterminada.



NOTA

El parámetro **Bin Q-Scores** (Agrupar puntuaciones Q) está activado de forma predeterminada para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Este parámetro agrupa las puntuaciones de calidad de un rango de valores más amplio sin repercutir en la precisión ni el rendimiento.

- 3 Seleccione una de las siguientes opciones de Save Auxiliary Files (Guardar archivos auxiliares):
 - ▶ **Save All Thumbnails** (Guardar todas las vistas en miniatura): Guarda todas las imágenes en miniatura. Una imagen en miniatura es una muestra de imágenes de muchas placas de cada columna de placas o sector, combinada en una imagen en miniatura.
 - ▶ **Save Tile Thumbnails** (Guardar vistas en miniatura de placa): Guarda las vistas en miniatura de las placas. Las vistas en miniatura de las placas representan una sola placa en lugar de una muestra de placas en un sector.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración de la celda de flujo

La pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo) registra información acerca de la celda de flujo utilizada en el experimento.

- 1 Lea o introduzca el ID de celda de flujo (número de código de barras) de la celda de flujo que se ha de secuenciar.
El ID de la celda de flujo determina el tipo de celda de flujo y la compatibilidad de los reactivos.
- 2 Confirme que el tipo de celda de flujo sea **HiSeq Flow Cell v3**.
- 3 Introduzca el nombre del experimento que aparecerá en cada pantalla y que ayudará a identificar el experimento en curso.
- 4 Introduzca un nombre de usuario y, después, seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración avanzada

- 1 **[Opcional]** Seleccione la casilla de verificación **Confirm First Base** (Confirmar primera base).
Se genera un informe de primera base automáticamente para cada experimento. Al seleccionar esta opción, se abre el informe de primera base antes de continuar con el experimento.
- 2 **[Opcional]** Anule la selección de la casilla de verificación **Align to PhiX** (Alinear a PhiX) para cualquier carril que no contenga PhiX.
También puede optar por seleccionar los carriles de la imagen de la celda de flujo para añadir o eliminar carriles para la alineación de PhiX.
De forma predeterminada, se seleccionan todos los carriles para la alineación.



NOTA

Con HCS v2.2 y RTA v1.18, no es necesario usar un carril de control específico ni tampoco es una opción.

- 3 **[Opcional]** Seleccione **Keep Intensity Files** (Conservar archivos de intensidad) para volver a analizar posteriormente o personalizar el procesamiento.



NOTA

Si activa esta opción, aumenta de forma considerable el tamaño de la carpeta de salida de datos. No es necesario guardar archivos de intensidad para el análisis integrado en el instrumento.

- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de fórmulas

En la pantalla de fórmulas se genera automáticamente una fórmula a partir de la información introducida.

- 1 En Index Type (Tipo de índice), seleccione una de las siguientes opciones:
 - ▶ **No Index** (Sin índice): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" no indexado.
 - ▶ **Single Index** (Índice individual): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con una lectura del índice.
 - ▶ **Dual Index** (Índice doble): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con dos lecturas del índice.
 - ▶ **Custom** (Personalizado): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con un número de ciclos personalizado de lecturas del índice.
- 2 Si se especifica la opción Dual Index (Índice doble) o Custom (Personalizado), seleccione un formato de celda de flujo: bien **Single Read** (Lectura individual) o bien **Paired End**.
- 3 Introduzca el número de ciclos para la Lectura 1 y la Lectura 2, según sea necesario. El número de ciclos realizados en una lectura es un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, para realizar 125 ciclos para la Lectura 1, introduzca 126.
- 4 Para la opción de indexado **Custom** (Personalizado), introduzca el número de ciclos para las lecturas del índice.



NOTA

No es necesario que las longitudes de lectura sean idénticas.

- 5 Confirme los siguientes parámetros de química rellenos automáticamente:
 - a **SBS: TruSeq SBS Kit v3** (Kit TruSeq SBS v3)
 - b **Index** (Índice): **TruSeq Multiplex Sequencing Primer Box** o **TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box**
 - c **PE turnaround** (Respuesta PE): **TruSeq PE Cluster Kit v3** (Kit de generación de grupos PE de TruSeq v3)
- 6 **[Opcional]** Seleccione la casilla de verificación **Use Existing Recipe** (Usar fórmula existente) para utilizar una fórmula personalizada.

Pantalla de hoja de muestras

Las hojas de muestras son opcionales salvo si utiliza BaseSpace Sequence Hub para realizar análisis de datos o un experimento indexado.



NOTA

HCS v2.2 permite un esquema de indexado diferente en cada carril.

- 1 Seleccione **Browse** (Examinar) para localizar la hoja de muestras.
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de reactivos

La pantalla Reagents (Reactivos) registra información sobre los kits de reactivos utilizados para el experimento. El ID del kit de reactivos (el número de código de barras que comienza por **RGT**) se utiliza para determinar el tipo del kit de reactivos y la compatibilidad con los modos de experimento.

- 1 Lea o introduzca el ID del kit de reactivos SBS.
- 2 En el caso de los experimentos "paired-end", lea o introduzca el ID del kit de reactivos del kit de generación de grupos "paired-end".
- 3 Seleccione el kit de reactivos SBS para el experimento:
 - ▶ Seleccione **200 Cycles** (200 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 209 de forma predeterminada.
 - ▶ Seleccione **50 Cycles** (50 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 59 de forma predeterminada.
 - ▶ Seleccione **Custom** (Personalizado) para un kit parcial o varios kits de 50 ciclos. En el campo Cycles Remaining (Ciclos restantes), introduzca el número de ciclos SBS que se espera que duren los reactivos.



NOTA

En el caso de los kits parciales, el software cuenta el número de ciclos introducidos. Cuando los ciclos están en un nivel bajo, el software le solicita que cargue reactivos nuevos.

- 4 Seleccione **Prime SBS Reagents** (Cebiar reactivos SBS) para cebiar los reactivos.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla Review (Revisar)

- 1 Revise los parámetros del experimento en la pantalla Review (Revisión).
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar o **Back** (Atrás) para modificar los parámetros.

Carga y cebado de reactivos

Tras introducir los parámetros del experimento, cargue los reactivos SBS, de indexado y "paired-end" para el experimento y, a continuación, cebe los reactivos mediante el sistema de fluidica. El software le guía a través de estos pasos mediante una serie de pantallas en la ficha Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento).

Carga de reactivos SBS

- 1 Vuelva a tapar cada botella de reactivo con una tapa de embudo.



PRECAUCIÓN

A fin de evitar la contaminación cruzada, sustituya la tapa de la botella de CMR en último lugar, tras haber cargado el resto de los reactivos. Cámbiese siempre de guantes después de manipular el reactivo CMR.

- 2 Abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 3 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 4 Deslice la gradilla de reactivos para extraerla del compartimento.
- 5 Coloque cada una de las botellas de reactivo en la gradilla, en la posición numerada correspondiente. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

Posición	Reactivo	Descripción
1	ICB	Mezcla para incorporación
2	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
3	SRE	Reactivo de mezcla para lectura
4	Tampón de SBS 1 (SB1)	Tampón de alto contenido en sal
5	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
6	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
7	CMR	Reactivo de mezcla para clivaje
8	Tampón de SBS 3 (SB3)	Tampón de clivaje

- 6 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 7 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe que los dispensadores no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.
- 8 Seleccione la casilla de verificación **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] cargada).

Carga de reactivos de indexado

- 1 Asegúrese de que la gradilla "paired-end" no se esté utilizando en la celda de flujo adyacente para la resíntesis de la Lectura 2, la preparación de la lectura del índice 1 (i7) o la preparación de la lectura del índice 2 (i5).
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" según se indica a continuación:
 - a Tire del mango hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.

- 4 Retire las tapas de todos los tubos de reactivo y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Tabla 3 Experimento de índice individual

Posición	Reactivo	Descripción
17	HP8 o HP12	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 1 (i7)
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

Tabla 4 Experimento de doble índice en una celda de flujo de lectura individual

Posición	Reactivo	Descripción
16	HP9	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 2 (i5) SR
17	HP8 o HP12	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 1 (i7)
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

Tabla 5 Experimento de doble índice en una celda de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	RMR	Mezcla para resíntesis
17	HP8 o HP12	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 1 (i7)
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

- 5 Coloque tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en posiciones de la gradilla que no se estén utilizando.
- 6 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 7 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
 - a Tire del mango hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiente).

Cebado de reactivos

Entre los pasos para el cebado de reactivos figuran la carga de una celda de flujo para el cebado, la confirmación del flujo correcto y, a continuación, el inicio del cebado.



PRECAUCIÓN

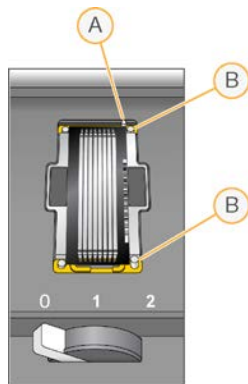
Utilice siempre una celda de flujo **usada** para cebar los reactivos. Puede utilizar la celda de flujo de un experimento anterior para el cebado de reactivos en un experimento posterior o para un lavado posterior al experimento.

Carga de una celda de flujo para el cebado

- 1 Enjuague la celda de flujo para el cebado con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes o una toallita sin pelusa.

- 2 Límpiela con toallitas con alcohol y con una toallita para limpiar lentes.
- 3 Colóquela en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia **abajo** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
- 4 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y de la parte derecha, hasta que se detenga.

Figura 12 Celda de flujo encastrada entre los pasadores guía superiores y de la parte derecha



- A Pasador guía superior
- B Pasadores guía derechos

- 5 Retire la mano de la celda de flujo para evitar que se desalinee.
- 6 Lentamente, mueva la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo.
Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee en color verde, el vacío está activado. Si la palanca no es verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos en la página 77*.
- 7 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo se puede usar.
- 8 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación del flujo adecuado

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y que el distribuidor está acoplado.

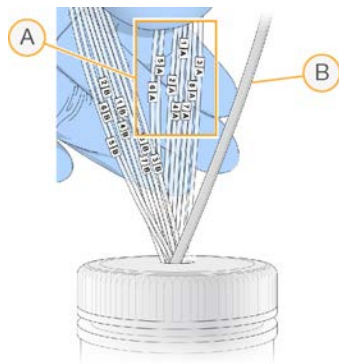
- 1 Lea o introduzca el ID de celda de flujo para el cebado (número de código de barras) de dicha celda de flujo.
- 2 Seleccione la posición **2** en la lista desplegable.
- 3 Confirme los siguientes valores predeterminados:
 - ▶ Volume (Volumen): **125**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

- 4 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 5 Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 6 Si detecta una presencia excesiva de burbujas, realice lo siguiente:
 - a Compruebe si las juntas están obstruidas.
 - b Reduzca la velocidad de aspiración a 100.
 - c Dispense otros 125 µl de agua a la celda de flujo.
 - d Si el problema persiste, retire la celda de flujo, repita los pasos de limpieza y vuelva a cargarla.

Colocación de los tubos e inicio del cebado

- 1 Extraiga los ocho tubos de residuos correspondientes a la celda de flujo adecuada del contenedor de residuos.

Figura 13 Colocación de los tubos



- A Tubos de residuos de la celda de flujo para las posiciones de los reactivos 1-8
 B Tubos de la bomba de condensación

- 2 Coloque cada tubo de residuos en un tubo independiente y vacío de 15 ml. El residuo se recoge y se mide cuando finaliza el cebado.
- 3 Seleccione **Start Prime** (Iniciar cebado). Supervise el progreso del cebado en la pantalla de cebado.
- 4 Al finalizar el cebado, mida el residuo y compruebe que el volumen de cada tubo sea de 1,75 ml para un total de **14 ml**.
 El total se calcula de la siguiente forma:
 - ▶ 250 µl por cada posición SBS salvo la posición 2 ($250 \times 7 = 1,75$ ml)
 - ▶ 1,75 ml por carril ($1,75 \times 8 = 14$ ml)
- 5 Devuelva los tubos de residuos al contenedor de residuos.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiendo).

Carga de la celda de flujo de secuenciación

Cargar la celda de flujo para la secuenciación implica eliminar la celda de flujo para el cebado, limpiar el soporte de la celda de flujo, cargar la celda de flujo agrupada y confirmar el flujo adecuado.

Retirada de la celda de flujo usada

- 1 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para desacoplar los distribuidores.
- 2 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 0 para desacoplar la junta de vacío y desbloquear la celda de flujo.
- 3 Levante la celda de flujo usada del soporte de la celda de flujo.

Limpieza del soporte de la celda de flujo

- 1 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.
- 2 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita sin pelusa humedecida con agua de laboratorio para eliminar las sales.
- 3 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita humedecida con alcohol o con una toallita sin pelusa humedecida con etanol o isopropanol. Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío o alrededor de los distribuidores.
- 4 Seque la platina con una toallita de laboratorio sin pelusa si fuera necesario.
- 5 Compruebe que el soporte de la celda de flujo no tiene pelusas y que los orificios de vacío no están obstruidos.

Figura 14 Inspección de los orificios de vacío



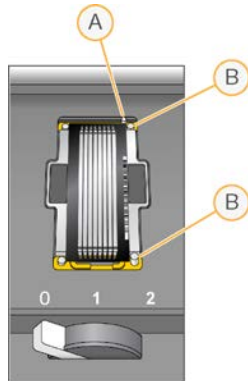
Limpieza de la celda de flujo

- 1 Extraiga la celda de flujo agrupada del contenedor con un par de pinzas hemostáticas de plástico.
- 2 Enjuague la celda de flujo con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes.
- 3 Doble un paño humedecido en alcohol hasta que tenga el tamaño aproximado de la celda de flujo.
- 4 Sujete los extremos de la celda de flujo con dos dedos de forma que los puertos de entrada y salida miren hacia **arriba**.
- 5 Limpie cada lado de la celda de flujo con un solo movimiento de arrastre. Repita el procedimiento hasta que quede limpia, doblando el paño después de cada pasada.
- 6 Séquela con una toallita para limpiar lentes seca.
- 7 Proteja la celda de flujo del polvo hasta que vaya a cargarla en el instrumento.

Carga de la celda de flujo de secuenciación

- 1 Coloque la celda de flujo en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia **abajo** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
- 2 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y de la parte derecha, hasta que se detenga.

Figura 15 Celda de flujo encastrada entre los pasadores guía superiores y de la parte derecha



- A Pasador guía superior
- B Pasadores guía derechos

- 3 Retire la mano de la celda de flujo para evitar que se desalinee posteriormente.
- 4 Lentamente, mueva la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo.
Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee en color verde, el vacío está activado. Si la palanca no es verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos en la página 77*.
- 5 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo se puede usar.
- 6 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación del flujo adecuado

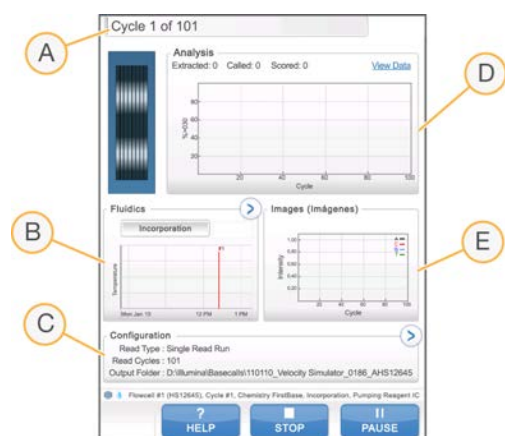
Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y que el distribuidor está acoplado.

- 1 Seleccione la posición **5** en la lista desplegable.
- 2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
 - ▶ Volume (Volumen): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
- 3 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 4 Inspeccione la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
- 5 Si detecta una presencia excesiva de burbujas, realice lo siguiente:
 - a Compruebe si las juntas del distribuidor están obstruidas.
 - b Repita la dispensación con la solución 6 para evitar que se vacíe la posición 5.
 - c Reduzca la velocidad de aspiración a 100.
 - d Dispense otros 250 µl en la celda de flujo.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiendo).
- 7 Asegúrese de que la palanca de la celda de flujo muestra el color verde y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo.
- 8 Compruebe que las casillas de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y **Door Closed** (Puerta cerrada) estén seleccionadas y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiendo).
- 9 En la pantalla Read Barcode (Leer código de barras), espere a que finalice la adquisición de imágenes. El ID de la celda de flujo se lee para confirmar que coincida con el ID de la celda de flujo introducido en la pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo). La adquisición de imágenes dura unos tres minutos, o siete en el caso de un experimento con celda de flujo doble.
- 10 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el experimento de secuenciación.

Supervisión del experimento

- 1 Supervise los criterios de medición del experimento desde la pantalla de resumen del experimento.

Figura 16 Pantalla de resumen del experimento



- A **Barra de progreso:** Supervise el número de ciclos finalizados.
- B **Gráfico del sistema de fluidica:** Amplíe la sección del sistema de fluidica para supervisar los pasos del proceso químico.
- C **Configuración del experimento:** Consulte los parámetros del experimento actual.
- D **Gráfico de análisis:** Supervise las puntuaciones de calidad por ciclo.
- E **Gráfico de imágenes:** Supervise las intensidades por ciclo.

Informe de primera base

Si ha elegido la opción de confirmar primera base durante la configuración del experimento, se abrirá el cuadro de diálogo de confirmación de primera base automáticamente después de que finalice la adquisición de imágenes del primer ciclo. El experimento se pone en pausa en este momento.

- 1 Revise el informe de primera base en el cuadro de diálogo de confirmación.
- 2 Si los resultados son satisfactorios, seleccione **Continue** (Continuar).

Visualización de los criterios de medición

Cuando los criterios de medición estén disponibles, Sequencing Analysis Viewer (SAV) se abrirá automáticamente y los mostrará. Los datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas. Si desea obtener más información, consulte la *Guía del usuario del visor del análisis de secuenciación (n.º de documento 15020619)*.

- 1 Para ver los datos actualizados, seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento.

Preparación de reactivos para la Lectura 2

Antes de finalizar la Lectura 1 y cualquier lectura de índices, prepare los reactivos para la resíntesis de la Lectura 2 y el ICB nuevo para la Lectura 2. Cargue los reactivos cuando se lo solicite el software de control.

Preparación de reactivos "paired-end"

Los reactivos "paired-end" se emplean durante el paso de resíntesis de la Lectura 2 de un experimento de secuenciación "paired-end".



NOTA

Las bibliotecas de Nextera necesitan HP11, un cebador de secuenciación incluido en la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box. Las demás bibliotecas utilizan HP7.

Descongelación de los reactivos "paired-end"

- 1 Extraiga los reactivos siguientes, almacenados a una temperatura de entre -25°C y -15°C :
 - ▶ Para los experimentos no indexados o de índice individual: AMX2, APM2, AT2, BMX, HP3, HP7 o HP11, HT2, LMX2 y RMR
 - ▶ Para los experimentos de doble índice: AMX2, APM2, AT2, BMX, HP3, HP7 o HP11, HT2 y LMX2
 - ▶ Para los experimentos "paired-end": HP3.
- 2 Descongele los reactivos en una jarra de laboratorio llena de agua desionizada a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.
- 3 Deje reposar en hielo los reactivos AMX2, BMX, LMX2 y RMR.

Preparación de AMX2, APM2, AT2, BMX, HP3, HP7, HP11, HT2 y LMX2

- 1 Voltee cada tubo para mezclar la solución.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 3 Deje reposar en hielo los reactivos AMX2, BMX y LMX2.
- 4 Deje reposar a temperatura ambiente los reactivos APM2, AT2, HP3, HP7, HP11 y HT2.

Preparación de HP3 para experimentos "paired-end"

- 1 Voltéelo para mezclarlo y, después, realice un centrifugado.
- 2 Transfiera 2,85 ml de PW1 a un tubo cónico de 15 ml vacío y, después, añada 150 μl de HP3.
- 3 Voltee para mezclar.
- 4 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 5 Déjelo reposar a temperatura ambiente.

Preparación de RMR

- 1 Voltee para mezclar.
- 2 Centrifugue a 1000 r/min durante 1 minuto. *No lo agite en un mezclador vorticial.*
- 3 Déjela reposar en hielo.

Preparación de ICB para Lectura 2 (no indexada o con índice individual)

- 1 Extraiga dos tubos de LFN, almacenados a una temperatura de entre -25°C y -15°C , y sumérjalos en un vaso de precipitados lleno de agua desionizada a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos hasta que se descongelen.
- 2 Una vez descongelados, añada el contenido de dos tubos de LFN a la botella que contiene 47 ml de ICB.
- 3 Enjuague cada tubo de LFN con ICB para garantizar la transferencia de todo el LFN.
- 4 Añada 1,1 ml de EDP a la solución de ICB y LFN.

- 5 Almacene todo lo que quede sin usar de EDP a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6 Cierre la botella que contiene EDP, ICB y LFN, y voltéela para mezclarlos.
- 7 Déjela reposar en hielo.

Preparación de ICB para Lectura 2 (con doble índice)

Utilice las siguientes instrucciones para calcular y preparar el volumen de ICB necesario para la Lectura 2 de un experimento de doble índice.

- 1 Mida los siguientes volúmenes de EDP, ICB y LFN para cada 10 ciclos de la secuenciación que vaya a realizar en la Lectura 2.

Reactivo	Volumen por 10 ciclos	Almacenamiento
ICB	4,57 ml	Entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$
LFN	0,6 ml	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$
EDP	0,11 ml	Entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$

Para obtener más información sobre cómo calcular volúmenes, consulte *Ejemplo de cálculo en la página 33*.

- 2 Transfiera el volumen de ICB medido a una botella de 250 ml vacía.
- 3 Añada el volumen de LFN medido a la nueva botella de ICB.
- 4 Enjuague cada tubo de LFN con ICB para garantizar la transferencia de todo el LFN.
- 5 Añada el volumen de EDP medido a la solución de ICB y LFN.
- 6 Enjuague el tubo de EDP con la solución de ICB y LFN para asegurarse de que se transfiera todo el EDP.
- 7 Cierre la botella que contiene EDP, ICB y LFN, y voltéela para mezclarlos.
- 8 Déjela reposar en hielo.

Carga de reactivos "paired-end"

- 1 Asegúrese de que la gradilla "paired-end" no se está utilizando en la celda de flujo opuesta para la resíntesis de la Lectura 2, la preparación de la lectura del índice 1 (i7) o la preparación de la lectura del índice 2 (i5).
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" según se indica a continuación:
 - a Tire del mango hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.
- 4 Retire la tapa de cada tubo de reactivo.
- 5 Coloque cada tubo en la gradilla, en las posiciones numeradas correspondientes.

Posición	Reactivo	Descripción
10	RMR	Mezcla para resíntesis
11	LMX2	Mezcla para linealización 2

Posición	Reactivo	Descripción
12	BMX	Mezcla para bloqueo
13	AMX2	Mezcla para amplificación 2
14	APM2	Premezcla AMX2
15	AT2	100 % formamida
16	HP7 o HP11	Cebador de secuenciación de la Lectura 2
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

- 6 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 7 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
 - a Tire del mango hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

Carga de ICB para la Lectura 2

- 1 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 2 Deslice la gradilla de reactivos para extraerla del compartimento.
- 3 Extraiga la botella de reactivo ICB de la posición 1 y retire la tapa de embudo.
- 4 Coloque la tapa de embudo en la botella de ICB nueva y cargue la botella en la posición 1. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.
- 5 Deslice la gradilla de reactivos para introducirla en el compartimento. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 6 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe que los dispensadores no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.
- 7 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiente) para reanudar el experimento.

Descarga de reactivos

- 1 Cuando finalice el experimento, abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS y "paired-end" correspondientes según se indica a continuación.
 - a Tire del mango del dispensador hacia fuera.
 - b Levante el mango del dispensador hacia arriba mientras tira de él hacia fuera.
 - c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos utilizando los mangos de la gradilla.
- 4 Retire todas las botellas de cada gradilla de reactivos.



ADVERTENCIA

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

Realización de un lavado con agua

Es necesario efectuar un lavado con agua después de cada experimento de secuenciación para limpiar el sistema y comprobar el sistema de flúidica. Existe la opción de realizar un lavado de mantenimiento como alternativa al lavado con agua posterior al experimento. Para obtener instrucciones, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento en la página 69*.

Si el instrumento ha permanecido inactivo durante un día o más, realice un lavado con agua antes de empezar un nuevo experimento de secuenciación.

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Wash | Water** (Lavado | Agua).
- 2 Seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de los reactivos "paired-end" y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
- 3 Cargue el instrumento con agua de laboratorio:
 - a Llene 8 botellas de SBS con 250 ml de agua de laboratorio.
 - b Llene 10 tubos de PE con 12 ml de agua de laboratorio.



NOTA

Los tubos y las botellas de lavado se suelen sustituir cada seis meses. No obstante, el agua se cambia aproximadamente una vez a la semana.

- 4 Asegúrese de que hay cargada una celda de flujo usada. Si es necesario, cargue una celda de flujo usada.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiente).

- 6 Realice una comprobación del sistema de fluidica de la siguiente manera:
 - a Seleccione la solución 2 en la lista desplegable.
 - b Acepte los valores predeterminados de la bomba.
 - c Seleccione **Pump** (Dispensar).
 - d Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 7 Retire los tubos de residuos de la celda de flujo correspondiente del contenedor de residuos.
- 8 Ate los tubos de residuos con papel Parafilm y mantenga todos los extremos al mismo nivel.
- 9 Introduzca los extremos de los tubos agrupados en una botella de 250 ml.
- 10 Seleccione **Next** (Siguiete) para iniciar el lavado con agua.

Posiciones	Tiempo aproximado del experimento
Ocho posiciones SBS	20 minutos
Ocho posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	60 minutos

- 11 Al finalizar el lavado, mida el volumen administrado.

Posiciones	Volumen total administrado	Volumen administrado por carril
Ocho posiciones SBS	32 ml	4 ml
Ocho posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	72 ml	9 ml

- 12 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos a la botella de residuos.

Capítulo 5 Secuenciación en el modo de experimento rápido

Introducción	52
Preparación de reactivos	53
Realización de una comprobación del volumen	54
Introducir parámetros del experimento	55
Carga y cebado de reactivos	58
Carga de la celda de flujo de secuenciación	63
Supervisión del experimento	66
Descarga de reactivos	67
Realización de un lavado con agua	67

Introducción

La secuenciación en el modo de experimento rápido proporciona la opción de realizar la generación de grupos en HiSeq 2500 o en cBot. Ejecute la generación de grupos en cBot para secuenciar una biblioteca distinta en cada carril de una celda de flujo rápida de dos carriles. Tras la hibridación de cadenas molde y la primera extensión en cBot, el resto del proceso de generación de grupos se realiza en HiSeq.

Tras la preparación de los reactivos, entre los pasos de configuración del experimento se incluyen la introducción de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de los reactivos, la carga de la celda de flujo y la realización de una comprobación de fluidica. Si la generación de grupos se realiza en HiSeq 2500, se omite el paso de cebado de los reactivos.

Visite la página de especificaciones de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para obtener información sobre la duración del experimento y otras especificaciones de rendimiento.

Escalonamiento de experimentos

Puede iniciar un nuevo experimento en la celda de flujo A o en la celda de flujo B si hay un experimento en curso en la celda de flujo adyacente. Para obtener más información, consulte *Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B* en la página 81.

Tipos de experimentos para química de HiSeq Rapid v2

En las siguientes tablas se muestran los tipos de experimentos de secuenciación y el número de ciclos posibles para cada lectura cuando se utiliza la química de HiSeq Rapid v2. Consulte esta información cuando configure el experimento.

Tabla 6 HiSeq Rapid SBS Kit v2

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura del índice 1 (i7)	Ciclos de lectura del índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
Single-Read (Lectura individual), no indexada	≤ 251	--	--	--	≤ 251
Single-Read (Lectura individual), de índice individual	≤ 251	7 ¹ 10 ²	--	--	≤ 258 ¹ ≤ 261 ²

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura del índice 1 (i7)	Ciclos de lectura del índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
Single-Read (Lectura individual), de doble índice	≤ 251	10	10	--	≤ 271
"Paired-end", no indexada	≤ 251	--	--	≤ 251	≤ 502
"Paired-end", de índice individual	≤ 251	7 ¹ 10 ²	--	≤ 251	≤ 509 ¹ ≤ 512 ²
"Paired-end", de doble índice	≤ 251	10	7 + 10 ³	≤ 251	≤ 529

¹ Número de ciclos para bibliotecas de índice individual.

² Número de ciclos para bibliotecas de doble índice.

³ La lectura de índice 2 de un experimento de doble índice "paired-end" incluye siete ciclos suplementarios de solo química.

Preparación de reactivos

Prepare los reactivos SBS y de generación de grupos antes de configurar el experimento. Cargue todos los reactivos cuando se lo solicite el software de control. Si utiliza la química de experimento rápido, no es necesario que vuelva al instrumento durante el experimento para cargar los reactivos.



NOTA

HT1 se utiliza para diluir bibliotecas antes de la secuenciación y no está cargado en el instrumento.

Preparación de los reactivos SBS

Siga estas instrucciones para descongelar los reactivos que se suministran en el kit HiSeq Rapid SBS Kit v2.

Descongelación de los reactivos SBS

- 1 Extraiga los reactivos CRM, IMT y USM, almacenados a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Descongélalos a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 16 horas.
También puede descongelar los reactivos IMT y USM en agua desionizada a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos. Descongele CRM en un baño de agua *independiente*.



NOTA

Cámbiese siempre de guantes después de manipular el reactivo CRM.

- 3 Voltee los reactivos para mezclarlos. Asegúrese de eliminar cualquier precipitado de la botella de USM.
- 4 Deje reposar los reactivos CRM, IMT y USM a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5 Utilice CWM, PW1 y USB directamente de su almacenamiento.

Preparación de reactivos de generación de grupos PE

Siga estas instrucciones para descongelar y preparar reactivos "paired-end", de indexado y de generación de grupos que se suministran en el kit de generación de grupos PE rápida de HiSeq v2.

Descongelación de reactivos

- 1 Extraiga los reactivos siguientes, almacenados a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:
 - ▶ Para todos los experimentos: AMS, FDR, FLM1, FLM2, FPM, FRM, HP10 y HP11
 - ▶ Para los experimentos indexados: HP12

- 2 Descongele los reactivos en un vaso de precipitados lleno de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.

Preparación de AMS, FDR, FLM1, FLM2, FPM, FRM, HP10, HP11 y HP12

- 1 Voltee cada tubo para mezclar la solución.
- 2 Deje reposar en hielo los reactivos AMS, FLM1, FLM2 y FRM.
- 3 Deje reposar a temperatura ambiente los reactivos FDR, FPM, HP10, HP11 y HP12.

Preparación de reactivos de generación de grupos SR

Siga estas instrucciones para descongelar y preparar los reactivos de indexado y de generación de grupos que se suministran en el kit de generación de grupos SR rápida de HiSeq v2.

Descongelación de reactivos

- 1 Extraiga los reactivos siguientes, almacenados a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:
 - ▶ Para todos los experimentos: AMS, FDR, FLS, FPM y HP10
 - ▶ Para experimentos de índice individual: HP12
 - ▶ Para los experimentos de doble índice: HP9 y HP12
- 2 Coloque los reactivos en un vaso de precipitados lleno de agua a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Preparación de AMS, FDR, FLS, FPM, HP9, HP10 y HP12

- 1 Voltee cada tubo para mezclar la solución.
- 2 Deje reposar en hielo los reactivos AMS y FLS.
- 3 Deje reposar a temperatura ambiente los reactivos FDR, FPM, HP9, HP10 y HP12.

Realización de una comprobación del volumen

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence | New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento).
- 2 Cuando se le pregunte si quiere realizar una comprobación del volumen, seleccione **Yes** (Sí).
- 3 Coloque los tubos de residuos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 de la celda de flujo actual en una botella de 1 litro llena de agua desionizada.
La colocación de los tubos en agua desionizada impide que las bombas de los reactivos se dañen.
- 4 Cargue agua de laboratorio en las ocho posiciones SBS, las 10 posiciones PE y la posición de la cadena molde de la biblioteca para la celda de flujo actual.
- 5 Cierre la estación de carga de cadenas molde.
- 6 Seleccione la casilla de verificación **Water loaded and template loading station closed** (Agua cargada y estación de carga de cadenas molde cerrada) y, después, seleccione **Next** (Siguiendo).
- 7 Asegúrese de que haya una celda de flujo rápida utilizada cargada en el instrumento.
- 8 Introduzca el ID de la celda de flujo utilizada y, después, seleccione **Next** (Siguiendo).
- 9 Seleccione **Pump** (Dispensar) para confirmar el flujo.
- 10 Coloque los tubos 4 y 5 en tubos cónicos de 15 ml vacíos individuales.

- 11 Seleccione **Next** (Siguiente) para comenzar la comprobación del volumen.
Cuando la comprobación del volumen haya finalizado, el volumen esperado será de 9,5 ml ± 10 % para cada tubo.
- 12 Devuelva todos los tubos a la botella de residuos.
- 13 Seleccione **Next** (Siguiente).

Introducir parámetros del experimento

Configure el experimento introduciendo los parámetros en las pantallas de la ficha Run Configuration (Configuración del experimento). El software le guía por las sucesivas pantallas para que especifique la conectividad de BaseSpace Sequence Hub, introduzca los ID de los consumibles, seleccione las opciones de indexación y registre otros parámetros.

Pantalla de integración

La pantalla de integración permite conectar el experimento a BaseSpace Sequence Hub.

- 1 **[Opcional]** Conéctese a BaseSpace Sequence Hub o BaseSpace Onsite Sequence Hub como se indica a continuación.
 - a Seleccione **BaseSpace** o **BaseSpace Onsite**.
 - b Si ha seleccionado BaseSpace, elija una de las opciones siguientes:
 - ▶ **Storage and Analysis** (Almacenamiento y análisis): Envía los datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota y el análisis de los datos. Con esta opción, se precisa una hoja de muestras.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Solo supervisión del experimento): Envía solamente los archivos InterOp a BaseSpace Sequence Hub, lo que le permite supervisar el experimento de forma remota.
 - c Inicie sesión en BaseSpace Sequence Hub o en BaseSpace Onsite Sequence Hub con su correo electrónico y la contraseña de la cuenta de Myllumina.
- 2 **[Opcional]** Para continuar sin conexión a BaseSpace Sequence Hub, seleccione **None** (Ninguno).
- 3 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de almacenamiento

- 1 Seleccione la casilla de verificación **Save to an output folder** (Guardar en una carpeta de salida) y, después, seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de red deseada.
Si el experimento está conectado a BaseSpace Sequence Hub para almacenamiento y análisis, este paso es opcional.
- 2 Seleccione **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) para reducir el espacio de almacenamiento necesario.
Si el experimento está conectado a BaseSpace Sequence Hub, la opción **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) está seleccionada de forma predeterminada.



NOTA

El parámetro **Bin Q-Scores** (Agrupar puntuaciones Q) está activado de forma predeterminada para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Este parámetro agrupa las puntuaciones de calidad de un rango de valores más amplio sin repercutir en la precisión ni el rendimiento.

- 3 Seleccione una de las siguientes opciones de Save Auxiliary Files (Guardar archivos auxiliares):
 - ▶ **Save All Thumbnails** (Guardar todas las vistas en miniatura): Guarda todas las imágenes en miniatura. Una imagen en miniatura es una muestra de imágenes de muchas placas de cada columna de placas o sector, combinada en una imagen en miniatura.
 - ▶ **Save Tile Thumbnails** (Guardar vistas en miniatura de placa): Guarda las vistas en miniatura de las placas. Las vistas en miniatura de las placas representan una sola placa en lugar de una muestra de placas en un sector.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración de la celda de flujo

La pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo) registra información acerca de la celda de flujo utilizada en el experimento.

- 1 En el campo Reagent Kit Type (Tipo de kit de reactivos), seleccione **HiSeq Rapid v2**.
- 2 Lea o introduzca el ID de celda de flujo (número de código de barras) de la celda de flujo que se ha de secuenciar.
El ID de la celda de flujo determina el tipo de celda de flujo y la compatibilidad de los reactivos.
- 3 Confirme que el tipo de celda de flujo sea **HiSeq Rapid Flow Cell v2**.
- 4 Introduzca el nombre del experimento que aparecerá en cada pantalla y que ayudará a identificar el experimento en curso.
- 5 Introduzca un nombre de usuario y, después, seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración avanzada

- 1 **[Opcional]** Seleccione la casilla de verificación **Confirm First Base** (Confirmar primera base).
Se genera un informe de primera base automáticamente para cada experimento. Al seleccionar esta opción, se abre el informe de primera base antes de continuar con el experimento.
- 2 **[Opcional]** Anule la selección de la casilla de verificación **Align to PhiX** (Alinear a PhiX) para cualquier carril que no contenga PhiX.
De forma predeterminada, se seleccionan todos los carriles para la alineación.
También puede optar por seleccionar los carriles de la imagen de la celda de flujo para añadir o eliminar carriles para la alineación de PhiX.



NOTA

Con HCS v2.2 y RTA v1.18, no es necesario usar un carril de control específico ni tampoco es una opción.

- 3 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de fórmulas

En la pantalla de fórmulas se genera automáticamente una fórmula a partir de la información introducida.

- 1 En Index Type (Tipo de índice), seleccione una de las siguientes opciones:
 - ▶ **No Index** (Sin índice): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" no indexado.
 - ▶ **Single Index** (Índice individual): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con una lectura del índice.
 - ▶ **Dual Index** (Índice doble): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con dos lecturas del índice.

- ▶ **Custom** (Personalizado): Realiza un experimento de lectura individual o "paired-end" con un número de ciclos personalizado de lecturas del índice.
- 2 En el caso de las opciones de doble índice o índice personalizado, seleccione un formato de celda de flujo: bien **Single Read** (Lectura individual) o bien **Paired End**.
- 3 Introduzca el número de ciclos para la Lectura 1 y la Lectura 2, según sea necesario.
El número de ciclos realizados en una lectura es un ciclo más que el número de ciclos analizados.
Por ejemplo, para realizar 100 ciclos para la Lectura 1, introduzca 101.
- 4 Para la opción de indexado **Custom** (Personalizado), introduzca hasta 10 ciclos como máximo para las lecturas del índice.



NOTA

No es necesario que las longitudes de lectura sean idénticas.

- 5 Confirme los siguientes parámetros de química rellenos automáticamente.
 - a **SBS: HiSeq Rapid SBS Kit v2**
 - b **Cluster Kit (Kit de generación de grupos): HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 o HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2**
- 6 **[Opcional]** Seleccione la casilla de verificación **Use Existing Recipe** (Usar fórmula existente) para utilizar una fórmula personalizada.

Pantalla de hoja de muestras

Una hoja de muestras es opcional salvo si utiliza BaseSpace Sequence Hub para realizar análisis de datos o un experimento indexado, o prevé supervisar el rendimiento de la demultiplexación con SAV.

- 1 Seleccione una de las siguientes opciones para especificar el método de generación de grupos:
 - ▶ **On-Board Cluster Generation** (Generación de grupos integrada): generación de grupos solo en HiSeq.
 - ▶ **Template Hybridization on cBot**(Hibridación de la cadena molde en cBot): generación de grupos iniciada en cBot 2 o cBot.
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 3 En el campo Sample Sheet (Hoja de muestras), seleccione **Browse** (Examinar) para localizar la hoja de muestras.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de reactivos

La pantalla Reagents (Reactivos) registra información sobre los kits de reactivos utilizados para el experimento.

- 1 Lea o introduzca el ID del kit de reactivos SBS (el número de código de barras que comienza por **RGT**).
- 2 En el caso de los experimentos "paired-end", lea o introduzca el ID del kit de reactivos del kit de generación de grupos.
- 3 Seleccione el kit de reactivos SBS:
 - ▶ Seleccione **500 Cycles** (500 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 525 de forma predeterminada.
 - ▶ Seleccione **200 Cycles** (200 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 225 de forma predeterminada.

- ▶ Seleccione **50 Cycles** (50 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 74 de forma predeterminada.
- ▶ Seleccione **Custom** (Personalizado) para un kit parcial o varios kits de 50 ciclos. En el campo Cycles Remaining (Ciclos restantes), introduzca el número de ciclos SBS que se espera que duren los reactivos.



NOTA

En el caso de los kits parciales, el software cuenta el número de ciclos introducidos. Cuando los ciclos están en un nivel bajo, el software le solicita que cargue reactivos nuevos.

- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla Review (Revisar)

- 1 Revise los parámetros del experimento en la pantalla Review (Revisión).
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar o **Back** (Atrás) para modificar los parámetros.

Carga y cebado de reactivos

Tras introducir los parámetros del experimento, cargue los reactivos SBS, "paired-end", de indexado y de generación de grupos para el experimento. A continuación, cebe los reactivos a través del sistema de fluidica. El software le guía a través de estos pasos mediante una serie de pantallas en la ficha Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento).



NOTA

El cebado de reactivos no es necesario para las celdas de flujo agrupadas en HiSeq.

Carga de reactivos SBS

- 1 Abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos SBS para extraerla del compartimento de reactivos.
- 4 Vuelva a tapar cada botella de reactivo con una tapa de embudo.



PRECAUCIÓN

A fin de evitar la contaminación cruzada, sustituya la tapa de la botella de CRM en último lugar, tras haber cargado el resto de los reactivos. Cámbiese siempre de guantes después de manipular el reactivo CRM.

- 5 Coloque cada una de las botellas de reactivo SBS en la gradilla, en la posición numerada correspondiente. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

Posición	Reactivo	Descripción
1	IMT	Mezcla maestra para incorporación
2	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio

Posición	Reactivo	Descripción
3	USM	Mezcla de lectura universal
4	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
5	USB	Tampón de secuenciación universal
6	USB	Tampón de secuenciación universal
7	CRM	Reactivo de mezcla maestra para clivaje
8	CWM	Mezcla de lavado para clivaje

- 6 Deslice la gradilla de reactivos SBS para introducirla en el compartimento de reactivos. Alinee la gradilla con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 7 Seleccione la casilla de verificación **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] cargada).
- 8 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos SBS como se indica a continuación:
 - a Tire del mango del dispensador hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe que los dispensadores no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

Carga de reactivos de generación de grupos

- 1 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" según se indica a continuación:
 - a Tire del mango hacia usted y levántelo.
 - b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 2 Deslice la gradilla de reactivos "paired-end" hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.
- 3 Retire la tapa de cada tubo de reactivo y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Tabla 7 Celda de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	FRM	Mezcla para resíntesis rápida
11	FLM2	Mezcla para linealización rápida 2 (Lectura 2)
12	FLM1	Mezcla para linealización rápida 1 (Lectura 1)
13	AMS	Mezcla para amplificación rápida
14	FPM	Premezcla rápida
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP11	Cebador de Lectura 2
17	HP12*	Cebador del índice i7
18	HP10	Cebador de Lectura 1
19	PW1	10 ml de PW1 o de agua de laboratorio

* HP12 solo es necesario para experimentos indexados. Si no se utiliza HP12, cargue un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de PW1 o agua de laboratorio en la posición 17.

Tabla 8 Celda de flujo de lectura individual

Posición	Reactivo	Descripción
10	PW1	10 ml de PW1 o de agua de laboratorio
11	PW1	10 ml de PW1 o de agua de laboratorio
12	PW1	10 ml de PW1 o de agua de laboratorio
13	AMS	Mezcla para amplificación rápida
14	FPM	Premezcla rápida
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP9*	Cebador del índice i5
17	HP12*	Cebador del índice i7
18	HP10	Cebador de Lectura 1
19	FLS	Solución de linealización rápida

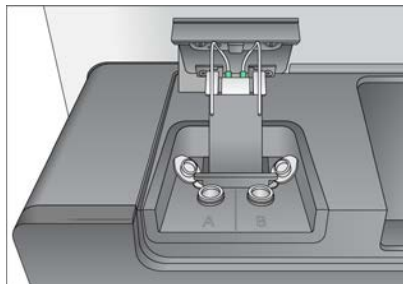
* HP9 es necesario solamente en experimentos de doble índice. HP12 es necesario en todas las opciones de indexado. Si no se utilizan HP9 ni HP12, cargue un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de PW1 o agua de laboratorio en cada posición que no se esté utilizando.

- 4 Deslice la gradilla "paired-end" para introducirla en el compartimento de reactivos. Alinee las gradillas con la guía elevada del suelo del compartimento.
- 5 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
 - a Tire del mango hacia usted y bájelo.
 - b Compruebe los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
 - c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

Carga de cadenas molde

Cargue la cadena molde de la biblioteca para la generación de grupos en HiSeq. Si se ha agrupado la celda de flujo en cBot, cargue en su lugar dos tubos Eppendorf con 1 ml de agua desionizada.

Figura 17 Estación de carga de cadenas molde



- 1 Cargue el tubo Eppendorf que contiene 420 µl de cadena molde de la biblioteca de 2-20 pM en el lado pertinente de la estación de carga como se indica a continuación.
 - a Abra la puerta de la estación de carga.
 - b Extraiga el tubo Eppendorf que contiene agua y sustitúyalo por el tubo Eppendorf que contiene las cadenas molde.
 - c Asegure las tapas por debajo de la barra de detrás de los tubos para evitar interferencias con los dispensadores.
 - d Cierre lentamente la puerta de la estación de carga. Asegúrese de que los dispensadores estén alineados con los tubos Eppendorf cuando la tapa esté cerrada.
- 2 Seleccione la casilla de verificación **Template loaded and template loading station closed** (Cadena molde cargada y estación de carga de cadenas molde cerrada) y, después, seleccione **Next** (Siguiente).

Cebado de reactivos

Cebe los reactivos únicamente si ha utilizado un kit de carga de muestras Rapid Duo para realizar la hibridación de la cadena molde en cBot. De lo contrario, omita el paso de cebado de reactivos y continúe con *Carga de la celda de flujo de secuenciación en la página 63*.

Entre los pasos de cebado de reactivos se incluyen la limpieza del soporte de la celda de flujo, la carga de una celda de flujo usada, la confirmación de flujo correcto y el inicio del cebado.

Carga de una celda de flujo para el cebado

- 1 Lave una celda de flujo *usada* con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes o una toallita sin pelusa.

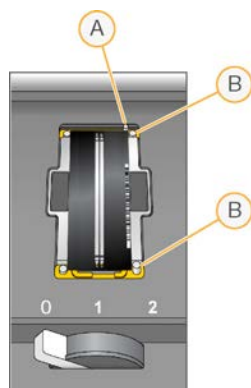


NOTA

Cebe siempre los reactivos con una celda de flujo usada. Puede utilizar la celda de flujo de un experimento anterior para el cebado de reactivos en un experimento posterior o para un lavado posterior al experimento.

- 2 Límpiela con toallitas con alcohol y con una toallita para limpiar lentes.
- 3 Colóquela en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia *abajo* y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
- 4 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y de la parte derecha, hasta que se detenga.

Figura 18 Colocación de la celda de flujo



- A Pasador guía superior
- B Pasadores guía derechos

- 5 Retire la mano de la celda de flujo para evitar que se desalinee posteriormente.
- 6 Lentamente, mueva la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo.
Cuando la palanca de la celda de flujo está verde, el vacío está activado. Si la palanca no es verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos en la página 77*.
- 7 Espere unos 5 segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo se puede usar.
- 8 En la pantalla Load Prime Flow Cell (Cargar celda de flujo para el cebado), introduzca el ID de la celda de flujo.
- 9 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y seleccione **Next** (Siguiendo).

Confirmación del flujo adecuado

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y que el distribuidor está acoplado.

- 1 Seleccione la posición 2 (agua de laboratorio) de la lista desplegable.
- 2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
 - ▶ Volume (Volumen): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **1500**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
- 3 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 4 Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 5 Si detecta una presencia excesiva de burbujas, realice lo siguiente:
 - a Compruebe si las juntas están obstruidas.

- b Reduzca la velocidad de aspiración a 1000.
- c Dispense otros 250 µl de agua a la celda de flujo.
- d Si el problema persiste, retire la celda de flujo, repita los pasos de limpieza y vuelva a cargarla.

Colocación de los tubos e inicio del cebado

- 1 Afloje los ocho tubos de residuos de la celda de flujo apropiada y retírelos del contenedor de residuos.
- 2 Coloque los tubos de residuos 4 y 5 en tubos de 15 ml individuales.
- 3 Coloque los tubos de residuos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 en una botella que contenga agua de laboratorio.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiendo) y, después, seleccione **Start Prime** (Iniciar cebado). Supervise el progreso del cebado en la pantalla de cebado.
- 5 Cuando termine de cebar, mida el residuo y compruebe que el volumen sea de 2,5 ml ± 10 %, 500 µl por reactivo y carril.
- 6 Vuelva a colocar los tubos 4 y 5 en el contenedor de residuos.
- 7 Deje los tubos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 en la botella que contiene agua de laboratorio.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiendo).

Carga de la celda de flujo de secuenciación

Para cargar una celda de flujo para la secuenciación hay que eliminar la celda de flujo para el cebado, limpiar el soporte de la celda de flujo, cargar una celda de flujo agrupada o una nueva y confirmar el flujo adecuado. Si se ha iniciado la generación de grupos en cBot, cargue la celda de flujo agrupada. Para la generación de grupos integrada en el instrumento, cargue una nueva celda de flujo.

Retirada de la celda de flujo usada

- 1 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para desacoplar los distribuidores.
- 2 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 0 para desacoplar la junta de vacío y desbloquear la celda de flujo.
- 3 Levante la celda de flujo usada del soporte de la celda de flujo.

Limpieza del soporte de la celda de flujo

- 1 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.
- 2 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita sin pelusa humedecida con agua de laboratorio para eliminar las sales.
- 3 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita humedecida con alcohol o con una toallita sin pelusa humedecida con etanol o isopropanol. Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío o alrededor de los distribuidores.
- 4 Seque la platina con una toallita de laboratorio sin pelusa si fuera necesario.
- 5 Compruebe que el soporte de la celda de flujo no tiene pelusas y que los orificios de vacío no están obstruidos.

Figura 19 Inspección de los orificios de vacío



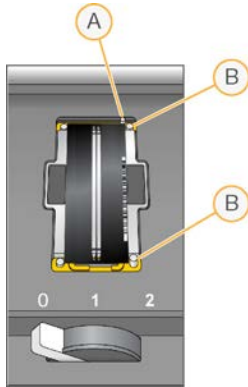
Limpieza de la celda de flujo

- 1 Extraiga la celda de flujo agrupada del contenedor con un par de pinzas hemostáticas de plástico.
- 2 Enjuague la celda de flujo con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes.
- 3 Doble un paño humedecido en alcohol hasta que tenga el tamaño aproximado de la celda de flujo.
- 4 Sujete los extremos de la celda de flujo con dos dedos de forma que los puertos de entrada y salida miren hacia **arriba**.
- 5 Limpie cada lado de la celda de flujo con un solo movimiento de arrastre. Repita el procedimiento hasta que quede limpia, doblando el paño después de cada pasada.
- 6 Séquela con una toallita para limpiar lentes seca.
- 7 Proteja la celda de flujo del polvo hasta que vaya a cargarla en el instrumento.

Carga de la celda de flujo de secuenciación

- 1 Coloque la celda de flujo en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia **abajo** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
- 2 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y de la parte derecha, hasta que se detenga.

Figura 20 Colocación de la celda de flujo



- A Pasador guía superior
- B Pasadores guía derechos

- 3 Retire la mano de la celda de flujo para evitar que se desalinee posteriormente.
- 4 Lentamente, mueva la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo.
Cuando la palanca de la celda de flujo está verde, el vacío está activado. Si la palanca no es verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos en la página 77*.
- 5 Espere unos 5 segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo se puede usar.
- 6 Asegúrese de que la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) esté marcada.

Confirmación del flujo adecuado

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y que el distribuidor está acoplado.

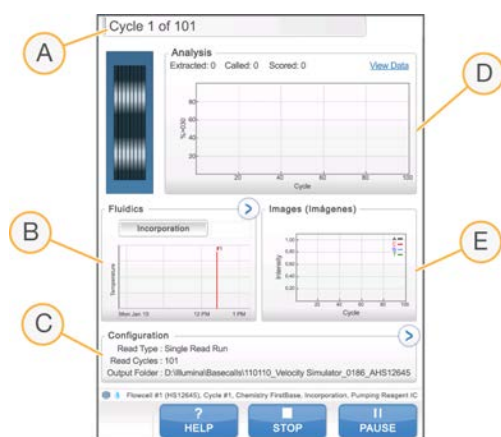
- 1 Seleccione la posición **5** en la lista desplegable.
- 2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
 - ▶ Volume (Volumen): **250**
 - ▶ Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **1500**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
- 3 Asegúrese de que los tubos de residuos estén colocados de manera adecuada:
 - ▶ Los tubos 4 y 5 se encuentran en el contenedor de residuos.
 - ▶ Los tubos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 están en una botella que contiene agua de laboratorio.
- 4 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 5 Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.

- 6 Si detecta una presencia excesiva de burbujas, realice lo siguiente:
 - a Compruebe si las juntas del distribuidor están obstruidas y repita el proceso con la posición 6 para evitar agotar la posición 5.
 - b Reduzca la velocidad de aspiración a 1000.
 - c Dispense otros 250 µl en la celda de flujo.
- 7 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 8 Asegúrese de que la palanca de la celda de flujo muestra el color verde y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo.
- 9 Compruebe que las casillas de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y **Door Closed** (Puerta cerrada) estén seleccionadas y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
- 10 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el experimento de secuenciación.

Supervisión del experimento

- 1 Supervise los criterios de medición del experimento desde la pantalla de resumen del experimento.

Figura 21 Pantalla de resumen del experimento



- A **Barra de progreso:** Supervise el número de ciclos finalizados.
- B **Gráfico del sistema de fluidica:** Amplíe la sección del sistema de fluidica para supervisar los pasos del proceso químico.
- C **Configuración del experimento:** Consulte los parámetros del experimento actual.
- D **Gráfico de análisis:** Supervise las puntuaciones de calidad por ciclo.
- E **Gráfico de imágenes:** Supervise las intensidades por ciclo.

Informe de primera base

Si ha elegido la opción de confirmar primera base durante la configuración del experimento, se abrirá el cuadro de diálogo de confirmación de primera base automáticamente después de que finalice la adquisición de imágenes del primer ciclo. El experimento se pone en pausa en este momento.

- 1 Revise el informe de primera base en el cuadro de diálogo de confirmación.
- 2 Si los resultados son satisfactorios, seleccione **Continue** (Continuar).

Visualización de los criterios de medición

Cuando los criterios de medición estén disponibles, Sequencing Analysis Viewer (SAV) se abrirá automáticamente y los mostrará. Los datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas. Si desea obtener más información, consulte la *Guía del usuario del visor del análisis de secuenciación (n.º de documento 15020619)*.

- 1 Para ver los datos actualizados, seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento.

Descarga de reactivos

- 1 Cuando finalice el experimento, abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS y "paired-end" correspondientes según se indica a continuación.
 - a Tire del mango del dispensador hacia fuera.
 - b Levante el mango del dispensador hacia arriba mientras tira de él hacia fuera.
 - c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
- 3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos utilizando los mangos de la gradilla.
- 4 Retire todas las botellas de cada gradilla de reactivos.



ADVERTENCIA

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

- 5 Retire el tubo Eppendorf de la estación de carga de cadenas molde. El líquido que queda en el tubo tras el experimento está muy diluido y no se puede volver a utilizar.

Realización de un lavado con agua

Es necesario efectuar un lavado con agua después de cada experimento rápido para limpiar el sistema y comprobar el sistema de fluidica. Si el instrumento ha permanecido inactivo durante un día o más, realice un lavado con agua antes de empezar un nuevo experimento de secuenciación.

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Wash | Water** (Lavado | Agua).
- 2 Seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de los reactivos "paired-end" y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiendo).
- 3 Cargue el instrumento con agua de laboratorio de la siguiente forma:
 - a Llene ocho botellas de SBS con 250 ml de agua de laboratorio.
 - b Llene 10 tubos de PE con 12 ml de agua de laboratorio.

- c Llene un tubo Eppendorf con 1 ml de agua de laboratorio.



NOTA

Los tubos y las botellas de lavado se suelen sustituir cada seis meses. No obstante, el agua se cambia aproximadamente una vez a la semana.

- 4 Asegúrese de que hay cargada una celda de flujo usada. Si es necesario, cargue una celda de flujo usada.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 6 Realice una comprobación del sistema de fluídica de la siguiente manera:
 - a Seleccione la posición **2** en la lista desplegable.
 - b Acepte los valores predeterminados de la bomba.
 - c Seleccione **Pump** (Dispensar).
 - d Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 7 Retire los tubos de residuos de la celda de flujo correspondiente del contenedor de residuos.
- 8 Coloque los extremos de los tubos 4 y 5 en un contenedor vacío.
- 9 Coloque los extremos de los demás tubos en una botella de agua limpia para evitar que entre aire en las bombas de jeringa.
- 10 Seleccione **Next** (Siguiente) para iniciar el lavado con agua.

Posiciones	Tiempo aproximado del experimento
Ocho posiciones SBS	20 minutos
Ocho posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	60 minutos
Ocho posiciones SBS, 10 posiciones "paired-end" y una posición de carga de cadenas molde	10 minutos

- 11 Al finalizar el lavado, mida el volumen administrado.

Posiciones	Volumen administrado
Ocho posiciones SBS, 10 posiciones "paired-end" y una posición de carga de cadenas molde	9,5 ml por carril

- 12 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos a la botella de residuos.

Capítulo 6 Mantenimiento

Introducción	69
Realización de un lavado de mantenimiento	69
Cambio de modos de secuenciación	74
Inactividad del instrumento	75
Apagado del instrumento	76

Introducción

Los procedimientos de mantenimiento garantizan un rendimiento constante del instrumento.

- ▶ Apague el instrumento o déjelo inactivo durante el tiempo que no se vaya a utilizar.
- ▶ Además de los lavados de agua tras cada experimento, lleve a cabo lavados de mantenimiento de forma periódica para cambiar de modos de secuenciación adecuadamente y mantener la fluídica. Los lavados periódicos del instrumento mantienen su rendimiento al lavar el sistema de fluídica y evitar la acumulación de sal y la contaminación cruzada de reactivos y bibliotecas.

Mantenimiento preventivo

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

Realización de un lavado de mantenimiento

Realice un lavado de mantenimiento cuando se lo solicite el software cada 10 días o al cambiar del modo de rendimiento elevado al rápido y viceversa. Tras un experimento de rendimiento elevado, se recomienda un lavado de mantenimiento como alternativa a un lavado con agua. Un lavado de mantenimiento tarda unos 90 minutos y realiza 1 o 2 flujos de trabajo. Siga el protocolo de lavado de mantenimiento adecuado en función de si dispone o no de ProClin 300.

- ▶ **Lavado con Tween 20 y ProClin 300 estándar:** Lava el sistema con una solución preparada por el usuario de Tween 20 y ProClin 300. Consulte *Lavado con Tween 20 y ProClin 300 en la página 70*.
- ▶ **Lavado con Tween 20 alternativo:** Lava el sistema con una solución preparada por el usuario de Tween 20 y requiere un lavado con agua cuando el instrumento va a estar inactivo. Consulte *Lavado con Tween 20 en la página 73*.

La pantalla Load Gasket (Cargar junta) se abre con un lavado de mantenimiento cada 10 días y al cambiar del modo de experimento rápido al de rendimiento elevado. Sustituya la junta de 10 puertos en el distribuidor delantero y la junta de ocho puertos en el distribuidor trasero antes de continuar con el lavado, aunque esta pantalla no aparezca.

Lavado de mantenimiento con Tween 20 y ProClin 300

Preparación de la solución de lavado de mantenimiento

Prepare 5 litros de solución de lavado de mantenimiento para su uso con un solo instrumento. Esta solución se puede almacenar hasta 30 días a temperatura ambiente y usar hasta tres veces durante este período.

Deseche la solución de lavado de acuerdo con las normativas gubernamentales en materia de seguridad de su región.

- 1 Combine los siguientes volúmenes, añadiendo el agua en primer lugar, para diluir Tween 20:
 - ▶ Agua de laboratorio (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)Estos volúmenes dan como resultado Tween 20 al 10 % aproximadamente.
- 2 Coloque una barra de agitación en un bidón vacío con una capacidad mínima de 6 litros.
- 3 Combine los siguientes volúmenes en el bidón, añadiendo el agua en primer lugar:
 - ▶ Agua de laboratorio (750 ml)
 - ▶ Tween 20 al 10 % (250 ml)
 - ▶ ProClin 300 (1,5 ml)Estos volúmenes dan lugar a una solución que se compone de Tween 20 al 2,5 % y de ProClin 300 al 0,15 % aproximadamente.
- 4 Mezcle bien en una placa de agitación.
- 5 Añada 4 litros de agua de laboratorio.
Estos volúmenes dan lugar a una solución que se compone de Tween 20 al 0,5 % y de ProClin 300 al 0,03 % aproximadamente.
- 6 Siga agitando hasta que esté bien mezclada.
- 7 Déjela en un contenedor cerrado a temperatura ambiente.

Lavado con Tween 20 y ProClin 300

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Wash | Maintenance** (Lavado | Mantenimiento).
- 2 Seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de los reactivos PE.
- 3 **[En los modos de rendimiento elevado]** Si un experimento incluía una lectura del índice o un procesamiento "paired-end", seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de los reactivos PE. De lo contrario, seleccione **No**.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 5 Si utiliza una solución de lavado de mantenimiento nueva, prepare los componentes de lavado como se indica a continuación.
 - a **[En el modo de experimento rápido]** Llene dos tubos Eppendorf con 1,6 ml de solución y cárguelos en la estación de carga.
 - b Llene ocho botellas de SBS con 250 ml de solución.
 - c Llene 10 tubos de PE con 12 ml de solución.
 - d Asigne cada botella y tubo a una posición en la gradilla de reactivos. Mantenga esas asignaciones para lavados posteriores con el fin de evitar que se produzca una contaminación cruzada debido a los reactivos presentes en los dispensadores.
- 6 Si ha guardado la solución de lavado de mantenimiento de un experimento anterior, prepare los componentes de lavado como se indica a continuación.
 - a Rellene con la solución almacenada y voltéela para mezclarla. No rellene el instrumento con la misma solución más de 2 veces.
 - b Cargue las botellas y los tubos en el instrumento en las posiciones asignadas de la gradilla de reactivos.



NOTA

Sustituir los tubos y las botellas de lavado cada mes suele ser suficiente.

- 7 Vacíe la botella de residuos.
- 8 Seleccione la casilla de verificación **Wash solution loaded and template loading station closed** (Solución de lavado cargada y estación de carga de cadenas molde cerrada) y, después, seleccione **Next** (Siguiente).
- 9 Retire la celda de flujo de su platina y déjela a un lado.
- 10 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.
- 11 Presione ligeramente un lado de la junta delantera hasta que se levante el otro lado. Utilice unas pinzas para coger y extraer la junta. Repita el procedimiento para retirar la junta trasera.

Figura 22 Retirada de las juntas usadas de los distribuidores



- 12 Coloque una junta nueva de 10 puertos en el distribuidor delantero y una junta nueva de ocho puertos en el distribuidor trasero.
- 13 Coloque una nueva junta de 10 puertos en la ranura delantera del soporte de la celda de flujo y una nueva junta de ocho puertos en la ranura trasera. Presiónelas ligeramente hasta que se coloquen.
- 14 Cargue de nuevo la celda de flujo que retiró para instalar las juntas nuevas.
- 15 Asegúrese de que la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) esté marcada y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
- 16 Realice una comprobación del sistema de fluidica de la siguiente manera:
 - a Seleccione la solución 2 en la lista desplegable.
 - b Acepte los valores predeterminados de la bomba y seleccione **Pump** (Dispensar).
 - c Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
 - d Si observa una corriente constante de burbujas, sustituya la junta y vuelva a comprobar el sistema de fluidica.
- 17 Retire los tubos de residuos de la celda de flujo correspondiente del contenedor de residuos.
- 18 **[En los modos de rendimiento elevado]** Agrupe los ocho tubos de residuos con papel Parafilm. Mantenga los extremos de los tubos agrupados al mismo nivel y colóquelos en una botella de 250 ml.
- 19 **[En el modo de experimento rápido]** Coloque los extremos de los tubos 4 y 5 en un contenedor vacío. Coloque los extremos de los demás tubos en una botella de agua de laboratorio para evitar que entre aire en las bombas de jeringa.
- 20 Seleccione **Next** (Siguiente) para iniciar el lavado.

21 Una vez finalizado el lavado, seleccione **Return to Start** (Volver a iniciar).

22 Mida el volumen administrado.

Posiciones	Rendimiento elevado	Rápido
Ocho posiciones SBS	82 ml	29 ml
10 posiciones "paired-end"	76 ml	30 ml
Una posición de cadena molde	--	1,2 ml
Todas las posiciones	19,75 ml por carril	30,1 ml por carril



NOTA

Todas las botellas y tubos se llenan hasta su capacidad correspondiente para garantizar que los dispensadores se enjuaguen. Sin embargo, el volumen administrado para cada posición varía de forma que las botellas y los tubos contienen volúmenes diferentes cuando ha finalizado el lavado.

23 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos al contenedor de residuos.

Lavado de mantenimiento con Tween 20

Preparación de la solución de lavado de mantenimiento

Prepare siempre una solución de lavado nueva para los lavados de mantenimiento con Tween 20. Prepare 5 litros de solución de lavado de mantenimiento. Este volumen es suficiente para lavar los dos lados de un instrumento.

Deseche la solución de lavado de acuerdo con las normativas gubernamentales en materia de seguridad de su región.

1 Combine los siguientes volúmenes, añadiendo el agua en primer lugar, para diluir Tween 20:

- ▶ Agua de laboratorio (225 ml)
- ▶ Tween 20 (25 ml)

Estos volúmenes dan como resultado Tween 20 al 10 % aproximadamente.

2 Coloque una barra de agitación en un bidón vacío con una capacidad mínima de 6 litros.

3 Combine los siguientes volúmenes en el bidón, añadiendo el agua en primer lugar:

- ▶ Agua de laboratorio (750 ml)
- ▶ Tween 20 al 10 % (250 ml)

Estos volúmenes dan lugar a una solución que se compone de Tween 20 al 2,5 % aproximadamente.

4 Mezcle bien en una placa de agitación.

5 Añada 4 litros de agua de laboratorio para conseguir una solución de Tween 20 al 0,5 % aproximadamente.

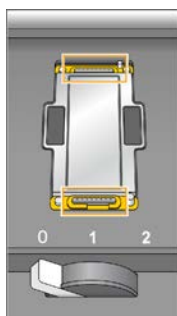
6 Siga agitando hasta que esté bien mezclada.

7 Continúe de forma inmediata con la configuración del lavado.

Lavado con Tween 20

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Wash | Maintenance** (Lavado | Mantenimiento).
- 2 Cargue el instrumento con solución de lavado de mantenimiento nueva del siguiente modo:
 - a Llene 8 botellas de SBS con 250 ml de solución de lavado nueva.
 - b Llene 10 tubos de PE con 12 ml de solución de lavado nueva.
- 3 Vacíe la botella de residuos.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiendo).
- 5 Retire la celda de flujo de su platina y déjela a un lado.
- 6 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.
- 7 Presione ligeramente un lado de la junta delantera hasta que se levante el otro lado. Utilice unas pinzas para coger y extraer la junta. Repita el procedimiento para retirar la junta trasera.

Figura 23 Retirada de las juntas usadas de los distribuidores



- 8 Coloque una junta nueva en cada ranura de los extremos delantero y trasero del soporte de la celda de flujo. Presiónelas ligeramente hasta que se coloquen.
- 9 Cargue de nuevo la celda de flujo que retiró para instalar las juntas nuevas.
- 10 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y seleccione **Next** (Siguiendo).
- 11 Lleve a cabo una comprobación del sistema de fluidica utilizando los valores predeterminados de dispensación:
 - a Seleccione la solución 2 en la lista desplegable.
 - b Seleccione **Pump** (Dispensar).
 - c Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
 - d Si observa una corriente constante de burbujas, sustituya la junta y vuelva a comprobar el sistema de fluidica.
- 12 Retire los tubos de residuos de la celda de flujo del contenedor de residuos.
- 13 Ate los ocho tubos de residuos con papel Parafilm y manténgalos al mismo nivel.
- 14 Introduzca los extremos de los tubos agrupados en una botella de 250 ml.
- 15 Seleccione **Next** (Siguiendo) para iniciar el lavado.
- 16 Una vez finalizado el lavado, seleccione **Return to Start** (Volver a iniciar).

17 Mida el volumen administrado.

Posiciones	Volumen administrado
Ocho posiciones SBS	
10 posiciones "paired-end"	
Todas las posiciones	



NOTA

Todas las botellas y tubos se llenan hasta su capacidad correspondiente para garantizar que los dispensadores se enjuaguen. Sin embargo, el volumen administrado para cada posición varía de forma que las botellas y los tubos contienen volúmenes diferentes cuando ha finalizado el lavado.

18 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos al contenedor de residuos.

Lavado con agua

Si el instrumento va a estar inactivo durante más de 5 días tras el lavado con Tween 20, realice un lavado con agua. El lavado con agua permite aclarar los restos de Tween 20 del sistema de fluidica.

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Wash | Water Wash** (Lavado | Lavado con agua).
- 2 Cargue el instrumento con agua de laboratorio de la siguiente forma:
 - a Llene ocho botellas de SBS con al menos 20 ml de agua de laboratorio.
 - b Llene 10 tubos de PE con 10 ml de agua de laboratorio.



PRECAUCIÓN

No reutilice el agua, las botellas ni los tubos utilizados para el lavado Tween 20. El agua puede estar contaminada con reactivos de los dispensadores.

- 3 Cargue las botellas y los tubos en el instrumento en la gradilla de reactivos correcta.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente) para iniciar el lavado.
- 5 Al finalizar el lavado, mida el volumen administrado.

Posiciones	Volumen administrado
Ocho posiciones SBS	32 ml
Ocho posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	72 ml

6 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos al contenedor de residuos.

Cambio de modos de secuenciación

Al cambiar del modo de secuenciación de rendimiento elevado al rápido y viceversa, es necesario llevar a cabo un lavado de mantenimiento y cambiar la junta. Para obtener instrucciones, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento en la página 69*.

Únicamente se pueden realizar de forma simultánea experimentos del mismo modo. Por lo tanto, se aplica un cambio de modo tanto a la celda de flujo A como a la celda de flujo B. Si se está utilizando una de las celdas de flujo, no se puede realizar ningún cambio de modo.

- 1 Para cambiar los modos de secuenciación, seleccione **Mode Select** (Selección de modo) en la pantalla Welcome (Bienvenida).

Del modo de rendimiento elevado al modo de experimento rápido

Al cambiar de HiSeq v4 o TruSeq v3 al modo de experimento rápido es necesario un lavado de mantenimiento en modo rápido.

Especificación	Lavado de mantenimiento rápido
Tipo de celda de flujo	Celda de flujo rápida (dos carriles)
Junta de celda de flujo	Junta de ocho puertos o junta de 10 puertos
Reactivos	Tween 20 y ProClin 300
Volúmenes esperados (ml)	60,2 ml
Tiempo de lavado aproximado	60 minutos

Del modo de experimento rápido al modo de rendimiento elevado

Al cambiar del modo de experimento rápido a HiSeq v4 o TruSeq v3 es necesario hacer un lavado de mantenimiento en modo rápido, seguido de un lavado de mantenimiento en modo de rendimiento elevado.

Especificación	Lavado de mantenimiento rápido	Lavado de mantenimiento de rendimiento elevado
Tipo de celda de flujo	Celda de flujo rápida (dos carriles)	Celda de flujo de rendimiento elevado (ocho carriles)
Junta de celda de flujo	Junta de ocho puertos o junta de 10 puertos	Junta de ocho puertos o junta de 10 puertos
Reactivos	Tween 20 y ProClin 300	Tween 20 y ProClin 300
Volúmenes esperados (ml)	60,2 ml	158 ml
Tiempo de lavado aproximado	60 minutos	130 minutos
Tiempo total de cambio de modo	~ 3 horas	

Inactividad del instrumento

Siga estas instrucciones con el objetivo de preparar el instrumento para que permanezca inactivo durante un máximo de 10 días. Para los plazos de tiempo superiores a 10 días, es mejor que apague el instrumento.

- 1 Realice un lavado de mantenimiento para lavar el sistema.
- 2 Deje la celda de flujo en la platina de la celda de flujo con la palanca de dicha celda en la posición 2. Deje los distribuidores en la posición elevada.
- 3 Cargue 10 ml de agua de laboratorio en cada posición de las gradillas de reactivos y, a continuación, baje los dispensadores.
- 4 Cargue 1 ml de agua de laboratorio en la posición de la estación de carga.
- 5 Antes de utilizar el instrumento, realice un lavado con agua.

Apagado del instrumento

Lleve a cabo el siguiente procedimiento para preparar de forma segura la flúidica y apagar el sistema. Apague el instrumento solo si no piensa utilizarlo durante los próximos 10 días o más. Si piensa utilizar el instrumento en los próximos 10 días, es mejor que lo deje en el modo inactivo.

- 1 Realice un lavado de mantenimiento para lavar el sistema.
- 2 Retire la celda de flujo de la platina.
- 3 Limpie la superficie del soporte de la celda de flujo con una toallita humedecida con alcohol o con una toallita sin pelusa humedecida con etanol o isopropanol.



PRECAUCIÓN

Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío o alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

- 4 Cargue 10 ml de agua de laboratorio en cada posición de las gradillas de reactivos y, a continuación, baje los dispensadores.
- 5 Cargue 1 ml de agua de laboratorio en cada posición de la estación de carga.
- 6 Apague el instrumento.
- 7 Para reiniciar el instrumento:
 - a Cargue agua en todas las posiciones de los reactivos.
 - b Encienda el instrumento.
 - c Lleve a cabo un lavado con agua.

Apéndice A Solución de problemas

Posibles problemas de configuración de experimentos	77
Realización de una comprobación de flúidica	78
BaseSpace no está disponible	78
Detención y reanudación de un experimento	78
Pausa de un experimento	81
Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B	81
División de kits SBS	82
Rehibridación del cebador	83

Posibles problemas de configuración de experimentos

Problema	Causa posible	Acción
El software no se ha inicializado.	El software no pudo iniciar dispositivos de hardware internos.	Cierre el mensaje de error y, a continuación, vuelva a iniciar el software del instrumento. Si el problema persiste, reinicie el ordenador del instrumento. Si va a reiniciar el ordenador, primero deberá apagar el instrumento para garantizar que la unidad DoNotEject se reconoce correctamente. Si el problema persiste después de reiniciar el ordenador del instrumento, apague el instrumento, espere un mínimo de 60 segundos y, a continuación, reinicie el instrumento.
La palanca de la celda de flujo está en naranja.	La celda de flujo no se ha asentado correctamente. No se ha sellado al vacío. Los distribuidores no se elevaron.	Retire la celda de flujo y repita los pasos de limpieza. Asegúrese de que las juntas están presentes y bien asentadas. Vuelva a cargar la celda de flujo. Si los pasos anteriores no funcionan, intente sustituir las juntas y, a continuación, vuelva a cargar la celda de flujo.
La palanca de la celda de flujo parpadea en color naranja.	Se proporciona vacío, pero no es adecuado.	Retire la celda de flujo y repita los pasos de limpieza. Asegúrese de que las juntas están presentes y bien asentadas. Vuelva a cargar la celda de flujo. Si los pasos anteriores no funcionan, intente sustituir las juntas y, a continuación, vuelva a cargar la celda de flujo.
La palanca de la celda de flujo parpadea en color verde.	La presión de vacío es adecuada.	Cambie la palanca de la celda de flujo a la posición 2.
Suministro de fluidos deficiente.	Posibles burbujas en el sistema.	Vuelva a colocar la celda de flujo y confirme que los orificios están orientados hacia abajo . Busque un precipitado blanco alrededor de las juntas. En caso de presencia de precipitado, cambie las juntas. Cambie siempre las juntas antes de realizar un lavado de mantenimiento del instrumento. Confirme que los dispensadores se encuentran totalmente bajados y que dichos dispensadores se encuentran en contacto con los reactivos.

Realización de una comprobación de fluídica

Lleve a cabo una comprobación del sistema de fluídica durante la instalación del instrumento y cuando solucione problemas relacionados con la fluídica.

- 1 Seleccione **Check** (Comprobar) en la pantalla Welcome (Bienvenida).
- 2 Realice la lectura o introduzca el ID de celda de flujo de lavado (número de código de barras) de la celda de flujo para el cebado. Asegúrese de utilizar una celda de flujo **usada** para este paso.
- 3 Cargue la celda de flujo usada en el instrumento.
- 4 Cargue ocho botellas de SBS con PW1 o con agua de laboratorio y cargue las botellas en la gradilla de reactivos SBS.
- 5 Seleccione la solución 2 en la lista desplegable.
- 6 Introduzca los valores siguientes:
 - ▶ Volume (Volumen): **250**
 - ▶ **[En los modos de rendimiento elevado]** Aspiration Rate (Velocidad de aspiración): **250**
 - ▶ **[En el modo de experimento rápido]** Aspiration Rate (Velocidad de aspiración): **1500**
 - ▶ Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
- 7 Seleccione **Pump** (Dispensar).
- 8 Compruebe que no existan burbujas en los carriles de la celda de flujo ni fugas cerca de los distribuidores.
- 9 Si detecta una presencia excesiva de burbujas:
 - a Compruebe si las juntas del distribuidor están obstruidas.
 - b Reduzca la velocidad de aspiración a 100.
 - c Dispense otros 250 µl de agua en la celda de flujo.

BaseSpace no está disponible

Si BaseSpace no está disponible, abra Servicios de Windows para confirmar que BaseSpace Broker se haya iniciado. Si no se ha iniciado, reinícielo. Si los servicios se están ejecutando y BaseSpace aún no está disponible, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Detención y reanudación de un experimento

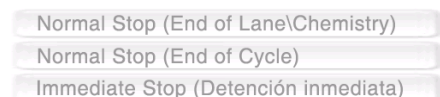
Puede que sea necesario detener un experimento si no se configuró correctamente, si la calidad de los datos es deficiente o debido a un error en el hardware. Al reanudar un experimento detenido, seleccione la opción de detención normal adecuada que permita reanudar dicho experimento.

Opción de detención	Opción de análisis en tiempo real (RTA)	¿Se puede reanudar?
Normal Stop (End of Lane\Chemistry) (Detención normal [Final de carril\química])	Keep As Is (Dejar tal cual)	Yes (Sí). El experimento se reanuda con el siguiente comando de adquisición de imágenes o de la siguiente química.
	Complete For Run (Completo para experimento)	No. El experimento no se puede reanudar.
	Complete For Read (Completo para lectura)	Yes (Sí). El experimento se reanuda al comienzo de la siguiente lectura.
Normal Stop (End of Cycle) (Detención normal [Final de ciclo])	Keep As Is (Dejar tal cual)	Yes (Sí). El experimento se reanuda en el siguiente ciclo.
	Complete For Run (Completo para experimento)	No. El experimento no se puede reanudar.
	Complete For Read (Completo para lectura)	Yes (Sí). El experimento se reanuda al comienzo de la siguiente lectura.
Immediate Stop (Detención inmediata)	No option (No hay opción)	No.

Detención de un experimento

- 1 En la pantalla de resumen del experimento, seleccione **Stop** (Detener) para abrir el menú de detención.

Figura 24 Menú de detención



- 2 Seleccione una de las siguientes opciones de detención:
 - ▶ **Normal Stop (End of Lane\Chemistry)** (Detención normal [Final de carril/química]): Detiene solo el experimento después de que se haya finalizado la química actual o el comando de adquisición de imágenes y, a continuación, coloca la celda de flujo en un estado seguro.
 - ▶ **Normal Stop (End of Cycle)** (Detención normal [Final de ciclo]): Detiene solo el experimento después de que se haya finalizado el ciclo actual y, a continuación, coloca la celda de flujo en un estado seguro.
 - ▶ **Immediate Stop** (Detención inmediata): Detiene el experimento sin finalizar la operación actual y *no* coloca la celda de flujo en un estado seguro. No se puede reanudar un experimento que se detuvo con esta opción.
- 3 Seleccione una de las siguientes opciones de RTA:
 - ▶ **Keep As Is** (Dejar tal cual): El experimento se detiene sin ninguna modificación en el RTA. El experimento puede reanudarse desde donde se ha detenido.
 - ▶ **Complete For Run** (Completo para experimento): El RTA se detiene. La información del experimento, los parámetros del experimento y los archivos de la fórmula se actualizan para reflejar el total de ciclos cuando finalizó el último ciclo. A continuación, RTA se reinicia para finalizar la llamada de bases del experimento hasta el punto en que este último se detuvo. El experimento no se puede reanudar.
 - ▶ **Complete For Read** (Completo para lectura): El RTA se detiene. La información del experimento, los parámetros del experimento y los archivos de la fórmula se actualizan para recortar la longitud de la

lectura actual hasta el último ciclo terminado. Esto no afectará a las lecturas posteriores.

A continuación, RTA se reinicia para finalizar el análisis de la lectura actual. El experimento se puede reanudar al comienzo de la siguiente lectura.

- Tras detener el experimento, seleccione **Return to Start** (Volver a iniciar) en la pantalla de resumen del experimento.
Se abre la pantalla Welcome (Bienvenida).

Reanudación de un experimento detenido

Siga estos pasos para reanudar un experimento que se detuvo con una opción de detención normal a través de una opción de RTA que permita reanudar dicho experimento.



NOTA

Si en la parte contigua se está realizando una generación de grupos o la secuenciación química "paired-end", el experimento se reanuda cuando haya finalizado el proceso en curso.

- En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence** (Secuenciar) y, después, seleccione **Resume Run** (Reanudar experimento).
- En la pantalla Resume (Reanudar), seleccione la carpeta del experimento adecuada en la lista desplegable.
El software reanuda un experimento en el punto en que se detuvo y se establece de manera predeterminada la configuración correcta en la pantalla Resume (Reanudar).
- Confirme la siguiente configuración predeterminada o seleccione el punto adecuado en el que se deba reanudar el experimento. Para obtener más información, consulte [Configuración de ejemplo para continuar con un experimento en la página 80](#).
 - ▶ **Resume At** (Reanudar en): La lectura o el punto en que se va a reanudar el experimento.
 - ▶ **Start At Cycle** (Comenzar en ciclo): El ciclo que se va a reanudar.



PRECAUCIÓN

No seleccione el momento de procesamiento de "paired-end", excepto para la rehibridación del cebador de la Lectura 2.

- Seleccione **Next** (Siguiete) para continuar.
El software le guiará a través de los pasos restantes de configuración del experimento.

Configuración de ejemplo para continuar con un experimento

Si se ha detenido el experimento tras la adquisición de imágenes del carril 1 en el ciclo 23, el software define automáticamente los ajustes de reanudación del experimento de la Lectura 1 en el ciclo 23. La pantalla Resume (Reanudar) muestra estos ajustes de la siguiente forma:

- ▶ **Resume At** (Reanudar en): Read 1 (Lectura 1)
- ▶ **Start At Cycle** (Comenzar en ciclo): 23

Figura 25 Ejemplo de reanudación en el ciclo 23

The screenshot shows a configuration window with two rows of controls. The first row has a label 'Resume At:' followed by a dropdown menu set to 'Read #1', a 'Image 1 cycl' dropdown menu, and a 'Resume' button. The second row has a label 'Start At Cycle:' followed by a text input field containing '23', an 'Imaging (no)' dropdown menu, and a 'Resume' button.

Dado que el experimento en este ejemplo se detuvo durante un paso de adquisición de imágenes, **Imaging (no chemistry)** (Imágenes [sin química]) se selecciona automáticamente.

Pausa de un experimento

Si es necesario, puede poner en pausa un experimento para comprobar sus componentes, como los volúmenes de reactivos. En condiciones normales, no es necesario ponerlo en pausa.



PRECAUCIÓN

No ponga en pausa un experimento durante la adquisición de imágenes. Utilice la detención normal, función fin de ciclo o fin de carril, para detener y reanudar un experimento.

- 1 Desde la pantalla de resumen del experimento, seleccione **Pause | Normal Pause** (Pausar | Pausa normal).
- 2 Seleccione **Yes** (Sí) para confirmar el comando.
El software finaliza los análisis químicos actuales o el comando de adquisición de imágenes y coloca la celda de flujo en un estado seguro.
- 3 Seleccione **Resume** (Reanudar) para reanudar el experimento.

Cambio de reactivos durante un experimento

Si comenzó el experimento con un volumen parcial de reactivos, utilice la función Change Reagents (Cambiar reactivos) para poner en pausa el experimento y volver a llenar los reactivos.



NOTA

No es necesario el cebado.

- 1 En la pantalla de resumen del experimento, seleccione **Pause** (Pausar) para abrir el menú de pausa.
- 2 Seleccione **Change Reagents** (Cambiar reactivos).
- 3 Seleccione **Yes** (Sí) para confirmar el comando de pausa.
El software finaliza los análisis químicos actuales o el comando de adquisición de imágenes y coloca la celda de flujo en un estado seguro. A continuación, se abre la pantalla de reactivos.
- 4 Introduzca los siguientes parámetros:
 - ▶ El ID del kit de reactivos de los nuevos reactivos.
 - ▶ El número de ciclos que se espera que duren los reactivos.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar con la carga de reactivos.

Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B

Al escalar experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B, configure un experimento nuevo para que el software detenga y reanude automáticamente el experimento en la celda de flujo adyacente según proceda. El sistema cambia a un estado seguro de forma automática.

- 1 Configure un experimento nuevo.



NOTA

Si el experimento adyacente está terminando un paso de adquisición de imágenes, el software pausa la celda de flujo adyacente antes de que pueda cargar y cebar los reactivos.

- 2 Tras cargar la celda de flujo de secuenciación para el experimento nuevo, cierre la puerta del compartimento.
- 3 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el nuevo experimento de secuenciación.

División de kits SBS

Para realizar un experimento "paired-end" de menos de 125 ciclos por lectura, divida un kit HiSeq v4 de 250 ciclos en dos juegos de reactivos. Un juego proporciona reactivos para un experimento de 126 ciclos con doble índice y un cebado. Para un experimento de menos de 67 ciclos, utilice un kit de 50 ciclos.

La división de un kit TruSeq v3 de 200 ciclos proporciona suficientes reactivos para realizar hasta 101 ciclos con un cebado. Para un experimento de menos de 101 ciclos, utilice un kit de 50 ciclos.

División de un kit de 250 ciclos

- 1 Descongele los reactivos del kit de SBS de HiSeq v4 (250 ciclos). Consulte [Descongelación de los reactivos SBS en la página 14](#).
- 2 Etiquete siete botellas de 250 ml con el número de posición y el nombre del reactivo de la siguiente forma:
 - ▶ N.º 1 IRM
 - ▶ N.º 3 USM
 - ▶ N.º 4 SB1
 - ▶ N.º 5 SB2
 - ▶ N.º 6 SB2
 - ▶ N.º 7 CRM
 - ▶ N.º 8 SB3
- 3 Añada el siguiente volumen de cada reactivo a la botella de 250 ml que corresponda para obtener un segundo juego de reactivos. Prepare CRM en último lugar y, a continuación, cambie de guantes.

Número	Nombre del reactivo	Volumen
1	IRM	72 ml
3	USM	82 ml
4	SB1	100 ml
5	SB2 (para la posición n.º 5)	62 ml
6	SB2 (para la posición n.º 6)	62 ml
7	CRM	72 ml
8	SB3	110 ml

- 4 Utilice ambos juegos de reactivos para efectuar dos experimentos simultáneamente o guarde uno de ellos a las siguientes temperaturas:
 - ▶ Almacene IRM, USM y CRM a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.
 - ▶ Almacene SB1, SB2 y SB3 a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C.

División de un kit de 200 ciclos

- 1 Descongele los reactivos del kit de SBS de TruSeq v3 (200 ciclos). Consulte [Descongelación de los reactivos SBS en la página 32](#).
- 2 Etiquete siete botellas de 250 ml con el número de posición y el nombre del reactivo de la siguiente forma:
 - ▶ N.º 1 ICB
 - ▶ N.º 3 SRE
 - ▶ N.º 4 SB1

- ▶ N.º 5 SB2
- ▶ N.º 6 SB2
- ▶ N.º 7 CMR
- ▶ N.º 8 SB3

3 Añada el siguiente volumen de cada reactivo a la botella de 250 ml que corresponda para obtener un segundo juego de reactivos. Prepare CMR en último lugar y, a continuación, cambie de guantes.

Número	Nombre del reactivo	Volumen
1	ICB	47 ml
3	SRE	107 ml
4	SB1	100 ml
5	SB2 (para la posición n.º 5)	62 ml
6	SB2 (para la posición n.º 6)	62 ml
7	CMR	107 ml
8	SB3	110 ml

4 Utilice ambos juegos de reactivos para efectuar dos experimentos simultáneamente o guarde uno de ellos a las siguientes temperaturas:

- ▶ Almacene CMR, SRE y EDP a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ▶ Almacene ICB, SB1, SB2 y SB3 a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de ICB

- 1 Añada el contenido de dos tubos de LFN a una botella de ICB.
- 2 Enjuague cada tubo de LFN con ICB para garantizar la transferencia de todo el LFN.
- 3 Añada 1,1 ml de EDP a la solución de ICB y LFN.
- 4 Almacene la parte sin usar de EDP a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5 Cierre la botella que contiene EDP, ICB y LFN, y voltéela para mezclarlos.
- 6 Déjela reposar en hielo.

Rehibridación del cebador

El experimento de rehibridación repite el paso de hibridación de cebadores de secuenciación. Si las métricas del experimento arrojan números bajos de grupos, intensidades bajas de grupos u otros, realice una rehibridación del cebador para recuperar la celda de flujo. La rehibridación del cebador no daña los grupos.

Celda de flujo de HiSeq v4

Todos los pasos de la rehibridación se realizan en HiSeq 2500. El kit incluye cebadores para Lectura 1, Lectura del índice 1, Lectura del índice 2 para celdas de flujo de lectura individual y Lectura 2.

Nombre del kit de rehibridación	Instrucciones sobre el flujo de trabajo
Kit de rehibridación de varios cebadores HiSeq v4 N.º de catálogo GD-403-4001	<i>Guía de rehibridación de cebadores de rendimiento elevado de HiSeq (n.º de referencia 15050105)</i>

Celda de flujo de TruSeq v3

La rehibridación del cebador de Lectura 1 se realiza en cBot. El kit de rehibridación incluye una placa de reactivos de cBot que contiene el cebador de secuenciación de Lectura 1 HP6. Para las bibliotecas de Nextera, utilice HP10 de la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Nombre del kit de rehibridación	Instrucciones sobre el flujo de trabajo
Kit de rehibridación de varios cebadores en cBot TruSeq v2 N.º de catálogo GD-304-2001	<i>Rehibridación del cebador de Lectura 1 en una celda de flujo TruSeq v3 o TruSeq v2 (n.º de referencia 15018149)</i>

Celda de flujo rápida

Todos los pasos de la rehibridación se realizan en HiSeq 2500. El kit incluye cebadores para Lectura 1, Lectura del índice 1, Lectura del índice 2 para celdas de flujo de lectura individual y Lectura 2.

Nombre del kit de rehibridación	Instrucciones sobre el flujo de trabajo
HiSeq Rapid Rehyb Kit N.º de catálogo GD-404-1001	<i>HiSeq Rapid Run Primer Rehybridization (Rehibridación del cebador mediante experimento rápido de HiSeq), n.º de referencia 15059379</i>

Apéndice B Análisis en tiempo real

Descripción general de Análisis en tiempo real	85
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real	86
Supervisión de métricas de experimento	89

Descripción general de Análisis en tiempo real

El análisis en tiempo real (RTA) se ejecuta en el ordenador del instrumento, en el que realiza la llamada de bases y asigna una puntuación de calidad a cada llamada de bases.

El software realiza un seguimiento del estado de cada placa y determina cuándo se debe avanzar al siguiente paso del proceso. Al avanzar una placa, RTA produce un archivo para el paso finalizado y, a continuación, inicia el paso siguiente. Por lo tanto, el software puede determinar el estado de cada placa en función de los archivos existentes. Si finaliza RTA, guarda los datos del experimento y puede reanudar el procesamiento.

Archivos de entrada

RTA precisa los archivos de entrada siguientes:

- ▶ Archivos de intensidad de grupos, que contienen resultados de análisis de imágenes.
- ▶ **RunInfo.xml**, que es un archivo que genera automáticamente el software de control al inicio del experimento. A partir de este archivo, RTA lee el nombre del experimento, el número de ciclos, si una lectura ha sido indexada y el número de placas de la celda de flujo.
- ▶ **HiSeq.Configuration.xml**, que es un archivo de configuración del instrumento en formato XML.
- ▶ **RTA.exe.config**, que es un archivo de configuración de software en formato XML.

RTA utiliza parámetros del experimento introducidos durante la configuración del experimento y recibe comandos del software de control que incluyen información sobre el momento oportuno de inicialización y la ubicación del archivo RunInfo.xml.

Archivos de resultados

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como un campo de visión por la cámara. Para cada placa que se analiza, RTA produce un conjunto de archivos de llamada de bases con puntuación de calidad y archivos de filtro como resultado principal. Con otros archivos también se pueden generar archivos de resultados elementales.

- ▶ **Archivos de llamada de bases:** Para cada placa que se analiza, se genera un archivo de llamada de bases (*.bcl) comprimido para cada placa por ciclo. El archivo de llamada de bases contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada.
- ▶ **Archivos de filtro:** Cada placa produce información de filtro que se incluye en un archivo de filtro (*.filter) para cada placa a lo largo de todo el experimento. El archivo de filtro determina si los grupos superan o no el filtro.
- ▶ **Archivos de ubicación de grupos:** Un archivo de ubicación de grupos (*.locs) contiene las coordenadas X e Y de cada grupo de la celda de flujo.
- ▶ **Archivos de estadísticas:** Se genera un archivo de estadísticas (*.stats) de cada ciclo. El archivo de estadísticas contiene las estadísticas agregadas del ciclo.

Los archivos de resultados principales se utilizan para los análisis de datos posteriores. Utilice bcl2fastq para la demultiplexación y la conversión de los archivos .bcl en archivos FASTQ, que se pueden utilizar como entrada para la alineación. Para convertir datos procedentes del sistema HiSeq, utilice el software bcl2fastq 1.8.4 o una versión posterior.

RTA proporciona criterios de medición en tiempo real sobre la calidad del experimento almacenados como archivos InterOp. Los archivos InterOp son archivos binarios que contienen criterios de medición relacionados con placas, ciclos y lecturas, y son necesarios para la visualización de criterios de medición en Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para ver los criterios de medición generados por RTA, utilice SAV v1.8.20 o una versión posterior.

Para obtener información detallada sobre cada archivo de resultados, consulte [Archivos de resultados de secuenciación en la página 91](#).

Gestionar errores

RTA almacena archivos de registro en la carpeta RTALogs. Si se produce un error, RTA crea un archivo de registro de error denominado "**Error.txt" y registra el error en cuestión.

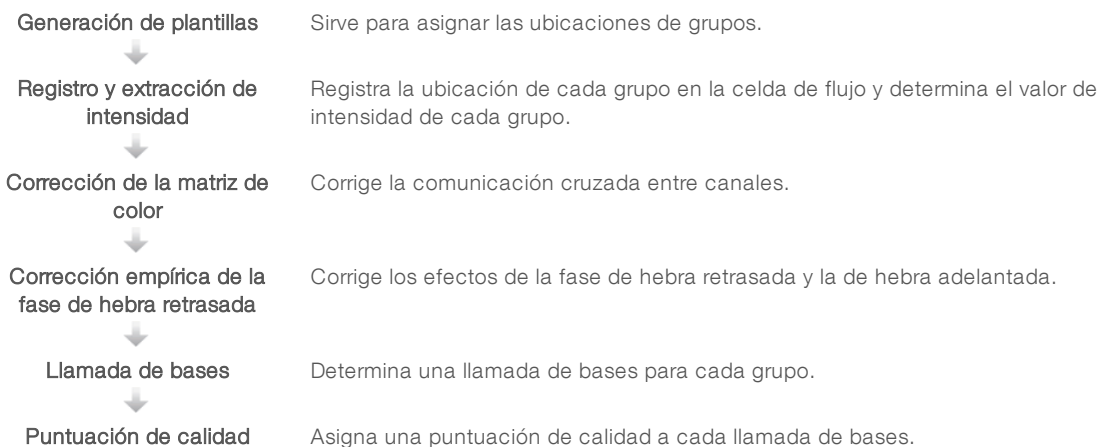
Transferencia de datos

Durante el experimento, RTA copia de manera automática los datos generados a partir de los archivos de imágenes sin procesar en la carpeta de salida. Si el análisis de imágenes se retrasa, RTA detiene el procesamiento y coloca la celda de flujo en un estado seguro. El procesamiento se reanuda cuando los datos de las imágenes están disponibles.

Si RTA deja de funcionar, el procesamiento se reanudará automáticamente durante el siguiente ciclo, en el punto adecuado de la celda de flujo. No reinicie RTA manualmente.

La transferencia de datos finaliza cuando se genera un archivo de marcador denominado `Basecalling_Netcopy_complete.txt`. Se generan uno de estos archivos para cada lectura y uno para todo el experimento.

Flujo de trabajo de análisis en tiempo real



Generación de plantillas

La generación de plantillas localiza y determina la posición de cada grupo en una placa mediante coordenadas X e Y. La plantilla se utiliza como referencia para el siguiente paso de registro y extracción de intensidad.

Dada la matriz aleatoria de los grupos de la celda de flujo, la generación de plantillas precisa de los datos de las imágenes de los primeros cinco ciclos del experimento. Tras el último ciclo de la plantilla para la adquisición de imágenes de una placa, se genera la plantilla.

Las posiciones en los grupos se escriben en un archivo de ubicación de grupos (*.locs) o en un archivo de ubicación de grupos comprimido (*.clocs) para cada placa. Para obtener más información, consulte [Archivos de resultados de secuenciación en la página 91](#).

Registro y extracción de intensidad

El registro y la extracción de intensidad se inician tras generar la plantilla de las posiciones de grupos.

- ▶ El registro alinea las imágenes generadas en cada ciclo posterior a la generación de plantillas con la plantilla.
- ▶ La extracción de intensidad determina un valor de intensidad para cada grupo de la plantilla para una imagen determinada.

Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Utilice el SAV para examinar las imágenes en miniatura e identificar las imágenes que no se han podido registrar.

Corrección de la matriz de color

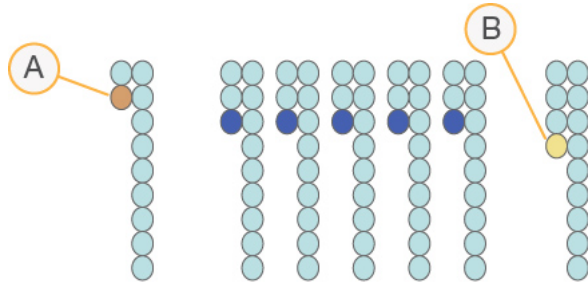
Tras el registro y la extracción de intensidad, RTA corrige las interferencias entre canales. Las interferencias se producen cuando un grupo muestra intensidad en el canal C y, al mismo tiempo, cierta intensidad en el canal A, por ejemplo. RTA utiliza una matriz de color de 4 × 4 para generar intensidades corregidas con interferencias reducidas o inexistentes, y equilibra las diferencias de intensidad global entre canales de color.

Corrección empírica de la fase de hebra retrasada

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. La fase de hebra retrasada y la de hebra adelantada se producen cuando una cadena queda fuera de su lugar con respecto al ciclo de incorporación.

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

Figura 26 Fase de hebra retrasada de hebra adelantada



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

RTA corrige los efectos de la fase de hebra retrasada y la de hebra adelantada mediante el uso del algoritmo de corrección empírica de hebras, que maximiza la calidad de los datos en cada ciclo durante el experimento.

Llamada de bases

Tras corregir las intensidades sin procesar para que no se creen interferencias, fases de hebra retrasada ni fases de hebra adelantada, el canal con mayor intensidad es la llamada correspondiente a ese grupo en ese ciclo. La llamada de bases en el sistema HiSeq 2500 mediante el uso de RTA comienza después del ciclo 12.

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. Este tipo de llamadas se guardan en archivos de llamada de bases (*.bcl), que son archivos binarios con 1 byte por llamada y puntuación de calidad. Cada archivo de llamada de bases contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada. Para realizar una llamada de bases, los grupos deben superar antes el filtro de castidad. Se denomina "ausencia de llamadas" a aquellos casos en los que los grupos no superan el filtro o no se les puede llamar porque no están dentro de la imagen o falla el registro de imagen. La ausencia de llamadas se representa como (N).

Grupos que superan el filtro

Durante los 25 primeros ciclos de Lectura 1, el filtro de castidad elimina los grupos menos fiables de los resultados del análisis. Los grupos superan el filtro si no hay más de dos llamadas de bases que presenten un valor de castidad inferior a 0,6 en los primeros 25 ciclos. La castidad es la relación de la mayor intensidad de base dividida por la suma de la mayor intensidad de base y la segunda mayor intensidad de base. Los informes de análisis representan el porcentaje de grupos que superan el filtro como % PF.

Los grupos de baja calidad se eliminan del recuento de grupos sin procesar durante la generación de plantillas, lo que genera un porcentaje relativamente mayor de grupos que superan el filtro.

Puntuación de calidad

Una puntuación de calidad, o puntuación Q, es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que la llamada de bases tiene una calidad mayor y es más probable que sea correcta.

La puntuación Q es una forma concisa de comunicar probabilidades de error pequeñas. Q(X) representa puntuaciones de calidad, donde X es la puntuación. En la siguiente tabla, figura la relación entre la puntuación de calidad y la probabilidad de error.

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



NOTA

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

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

Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en archivos de llamada de bases.

Agrupación de puntuaciones Q

RTA agrupa las puntuaciones de calidad en rangos específicos, o grupos, y asigna un valor a cada rango. La agrupación de puntuaciones Q reduce considerablemente los requisitos de espacio de almacenamiento sin que ello afecte a la precisión o al rendimiento de las aplicaciones sucesivas.

La agrupación de puntuaciones Q contribuye a la eficiencia de los procesos de análisis y a los requisitos en materia de transferencia de datos relacionados con la alta productividad del sistema HiSeq 2500. El archivo *.bcl resultante es más pequeño porque los algoritmos de compresión pueden comprimir el archivo de modo más eficaz. La cantidad de datos que se guardan en el ordenador del instrumento y que se transfieren a la ubicación de red son menores, lo que permite que el archivo se copie más rápidamente.

Supervisión de métricas de experimento

RTA genera automáticamente criterios de medición de calidad cuando comienza el análisis de imágenes. Sin embargo, no todos los criterios de medición están disponibles en los primeros ciclos porque algunos procesos necesitan varios ciclos para poder generar datos.

Datos	Ciclo
Análisis de imágenes	Después del ciclo 5. Durante los primeros cinco ciclos del experimento, RTA genera una plantilla de las ubicaciones de los grupos.
Llamadas de bases	Después del ciclo 12. La llamada de bases comienza tras estimar la matriz de color en el ciclo 12.
Cálculos de fase de hebra retrasada	Después del ciclo 25. Las correcciones en la fase de hebra retrasada para los 25 primeros ciclos determinan el cálculo de la fase de hebra retrasada.

Datos	Ciclo
Puntuaciones de calidad	Después del ciclo 25. Se genera una puntuación de calidad para las lecturas que superan el filtro de calidad. Dado que las puntuaciones de calidad requieren intensidades corregidas de futuros ciclos, la puntuación de calidad siempre sigue a la llamada de bases.
Índices de error	Después del ciclo 25. Los índices de error se generan solo cuando los grupos de PhiX están presentes y la opción Align to PhiX (Alinear a PhiX) se ha seleccionado durante la configuración del experimento.
Controles en línea	En el ciclo 52 de cada lectura o al final del experimento en el caso de los experimentos que cuentan con menos de 52 ciclos. Los controles en línea se generan únicamente para los métodos de preparación de bibliotecas de TruSeq.*
Recuento de índices	Después de que finalicen las lecturas de índices. El recuento de índices por carril se genera cuando se ofrece una hoja de muestras.

* Sequencing Analysis Viewer (SAV) v1.8.44 y las versiones posteriores no incluyen la ficha TruSeq Controls (Controles de TruSeq), en la que el SAV informa de los resultados del análisis de los controles en línea.

Apéndice C Archivos y carpetas de resultados

Archivos de resultados de secuenciación	91
Estructura de la carpeta de resultados	92
Numeración de placas	93
Imágenes en miniatura	94

Archivos de resultados de secuenciación

Tipos de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos de llamada de bases	<p>Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamada de bases, que contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan por carpetas de ciclo para cada carril.</p> <p>s_[Carril]_[Placa].bcl.gz, donde el carril es el número de carril de un dígito y la placa es el número de placa de cuatro dígitos. Los archivos de llamada de bases se comprimen mediante el uso de la compresión gzip.</p>
Archivos de ubicación de grupos	<p>Para cada placa, un archivo de ubicación de grupo contiene las coordenadas X e Y para cada grupo. Los archivos de ubicación de grupos son el resultado de la generación de plantillas.</p> <p>Data\Intensities</p>
Archivos de filtro	<p>El archivo de filtro especifica si los grupos han superado los filtros. Estos archivos se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y placa.</p> <p>s_[carril]_[placa].filter</p>
Archivos InterOp	<p>Archivos binarios de informes utilizados por Sequencing Analysis Viewer. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento.</p> <p>Carpeta InterOp</p>
Archivos de registro	<p>Registran eventos y se actualizan a lo largo del experimento.</p> <p>Data\RTALogs</p>
Archivos de desplazamientos	<p>Para cada experimento se crean dos archivos de desplazamientos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • offsets.txt: Contiene los desplazamientos de placa para cada ciclo y canal en relación con la plantilla. • SubTileOffsets.txt: Contiene el desplazamiento medido para cada cuadrante de cada imagen en relación con el marco de referencia. <p>Data\Intensities\Offsets</p>
Archivos de fase de hebra retrasada	<p>Contienen información empírica sobre la fase de hebra retrasada por placa. Los archivos de fase de hebra retrasada se crean en la primera base del ciclo de llamada y se actualizan tras cada base del ciclo de llamada.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\Phasing</p> <p>EmpiricalPhasing_[carril]_[lectura]_[placa].txt: La placa se representa con un número de cuatro dígitos que indica la superficie, el sector y la placa.</p>
Archivo de configuración del análisis en tiempo real	<p>El archivo de configuración de análisis en tiempo real se crea al inicio del experimento y contiene los parámetros de configuración de dicho experimento.</p> <p>Data\Intensities</p> <p>RTAConfiguration.xml</p>
Archivos de estadísticas	<p>Estadísticas creadas en la llamada de bases para cada ciclo.</p> <p>Data\Intensities\Basecalls\L00[X]\C[X.1]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y una subcarpeta para cada ciclo.</p>

Tipos de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si es una lectura indexada y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. [Carpeta raíz] RunInfo.xml
Archivos de vistas en miniatura	Se trata de imágenes en miniatura para cada canal y placa de cada sector en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] : Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y una subcarpeta para cada ciclo. s_[carril]_[placa]_[canal].jpg : La placa se representa con un número de cuatro dígitos que indica la superficie, el sector y la placa. Consulte <i>Numeración de placas en la página 93</i> .


Estructura de la carpeta de resultados


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

 **Data** (Datos)

 **Intensities** (Intensidades)

 **BaseCalls** (Llamada de bases)

 **L00[X]**: Archivos de llamada de bases para cada carril, agregados en un archivo por ciclo.

 **Phasing** (Fase de hebra retrasada): Archivos empíricos de la fase de hebra retrasada, un archivo por placa en cada ciclo.

 **L00[X]**: Archivos de ubicación de grupos agregados para cada carril.

 **Offsets** (Desplazamientos): Dos archivos de desplazamientos para el experimento.

 RTAConfiguration.xml

 **Images** (Imágenes)

 **Focus** (Enfoque)


 **L00[X]**: Imágenes de enfoque para cada carril.

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

 **Logs** (Registros): Archivos de registro que describen los pasos operativos.

 **Recipe** (Fórmula): Archivo de la fórmula específica del experimento con el nombre del ID del cartucho de reactivo.

 **RTALogs**: Archivos de registro que describen los sucesos de RTA.

 **Thumbnail_Images**: Imágenes en miniatura de 9 ubicaciones de cada placa, generadas para cada ciclo y base.

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

Nombre y ruta de la carpeta del experimento

La carpeta del experimento es la carpeta raíz para los resultados de un experimento de secuenciación. Durante la configuración del experimento, el software le solicita que introduzca la ruta de la carpeta del experimento. De manera predeterminada, se le asignará a la carpeta un nombre con el siguiente formato:

AAMMDD_<Nombre del ordenador>_<Número del experimento>_<Lado de la celda de flujo><ID de la celda de flujo>

Ejemplo: 110114_SN106_0716_A90095ACXX

El número del experimento aumenta de uno en uno cada vez que lleva a cabo un experimento de secuenciación en el instrumento. La colocación de la celda de flujo (A o B) y el ID de esta que se ha introducido durante los pasos de configuración del experimento se añaden al nombre de la carpeta del experimento.

La carpeta del experimento se guarda en la ruta de salida especificada durante la configuración del experimento. La carpeta temporal del experimento para la celda de flujo A se guarda en la unidad D:, y la carpeta temporal del experimento para la celda de flujo B se guarda en la unidad E:.

Numeración de placas

La celda de flujo de rendimiento elevado de HiSeq se digitaliza en 96 placas en cada carril, inferior y superior, para cada ciclo. Cada carril tiene tres sectores con 16 placas por sector. La celda de flujo rápido de HiSeq se digitaliza en 64 placas. Cada carril tiene dos sectores con 16 placas por sector.



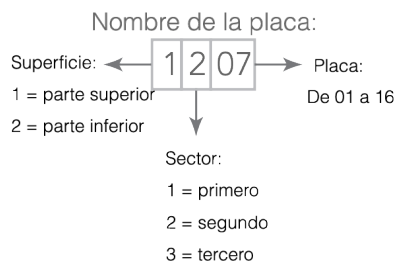
NOTA

Un sector es una columna de placas dentro de un carril de la celda de flujo.

El nombre de la placa contiene un número de cuatro dígitos que representa la posición en la celda de flujo.

- ▶ El primer dígito representa la superficie de la siguiente manera:
 - ▶ 1 corresponde a la parte superior
 - ▶ 2 corresponde a la parte inferior
- ▶ El segundo dígito representa el sector de la siguiente manera:
 - ▶ 1 corresponde al primer sector
 - ▶ 2 corresponde al segundo sector
 - ▶ 3 corresponde al tercer sector (si procede)
- ▶ Los dos últimos dígitos representan la placa, de 01 a 16. La numeración de las placas comienza por 01 en el extremo de salida de la celda de flujo hasta 16 en el extremo de entrada.

Figura 27 Numeración de placas



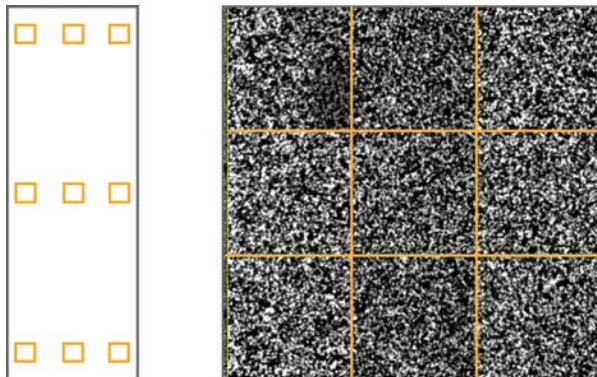
Este ejemplo indica una placa de la superficie superior de la celda de flujo, el segundo sector y la séptima placa.

Imágenes en miniatura

Puede configurar el software de control para generar imágenes en miniatura en formato de archivo *.jpg. Las imágenes en miniatura se generan para cada ciclo y base.

El software de control recoge imágenes de nueve secciones de una placa. Estas nueve imágenes se combinan en una imagen en miniatura y se pueden utilizar para solucionar problemas de un experimento. Las imágenes en miniatura no son aptas para el análisis de imágenes, pero se pueden utilizar para la solución de problemas.

Figura 28 Imagen en miniatura



Índice alfabético

%

% PF 88

A

- ajustes
 - reanudación de un experimento 80
- alertas
 - descripciones 5
 - resolución 5
- algoritmo Phred 88
- alineación de imágenes 87
- alineación de PhiX 17, 36, 56
- alineación a PhiX 17, 36, 56
- almacenamiento de datos 6, 16, 36, 55
- almacenamiento de imágenes en miniatura 17, 36, 56
- almacenamiento de kits de reactivos
 - divididos 82-83
- almacenar solución de lavado de
 - mantenimiento 69, 72
- aplicaciones, instaladas 4
- archivo de configuración 91
- archivo de información del experimento 91
- archivos de llamada de bases 88-89
- archivos de marcador 86
- archivos de registro 91
- archivos InterOp 86
- Archivos InterOp 91
- asignación de nombres
 - experimentos 17, 36, 56
- asignar nombre
 - carpetas de experimentos 93
- asignar nombres
 - carpetas de experimento 10
- asistencia al cliente 100
- asistencia en línea 2
- ausencia de llamadas (N) 88
- ayuda
 - desnaturalización y dilución de bibliotecas 2
 - documentación de HiSeq 2
 - generación de grupos 14, 31
 - rehibridación del cebador 83
 - SAV 27, 46, 67
 - técnica 100

B

- BaseSpace
 - conexión de un experimento 16, 35, 55
 - hojas de muestras 57
 - solución de problemas 78
- BaseSpace Onsite
 - conexión de un experimento 16, 35, 55
- BaseSpace Onsite Sequence Hub
 - integración 1
- BaseSpace Sequence Hub
 - hojas de muestras 18, 37
 - integración 1
- bcl2fastq, versión 86
- bibliotecas
 - carga en instrumento 60
- bibliotecas de Nextera, cebadores 7, 47
- bibliotecas de Nextera, rehibridación de
 - cebadores 84
- burbujas 23, 26, 42, 45, 62, 65

C

- cables USB, conectar 9
- caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box
 - finalidad 7
- cálculo de volúmenes de ICB 33, 48
- calidad de los grupos 88
- cambio de modo 74
- cambio de modos 74
- cambio de reactivos durante un experimento 81
- capacidad de almacenamiento
 - optimización 16, 36, 55, 89
- carpetas de experimento, temporales 93
- carpetas de resultados
 - estructura 92
 - ubicaciones 10
- carpetas temporales 93
- carriles de control 17, 36, 56
- cBot
 - documentación 14, 31
 - kit de carga de muestras Rapid Duo 61
 - kits de generación de grupos 6
 - rehibridación de Lectura 1 84
- celda de flujo para el cebado 22, 40, 61
- celdas de flujo
 - adquisición de imágenes 93-94
 - cebado 22, 40, 61
 - colocación 3, 22, 25, 41, 44, 61, 64
 - inspeccionar 23, 26, 42, 45, 62, 65

- ubicaciones de grupos 87
- ciclos posibles
 - química de HiSeq v4 13
 - química de TruSeq v3 30
 - química rápida 52
- ciclos predeterminados 18, 38, 57
- ciclos restantes
 - experimento rápido 57
 - HiSeq v4 18
 - TruSeq v3 38
- colocar las celdas de flujo 22, 25, 41, 44, 61, 64
- colores de la barra de estado 3
- colores, barra de estado 3
- compartimentos 2
- conectar cables USB 9
- configuración, reanudación de experimentos 80
- consumibles
 - Illumina 6
 - proporcionados por el usuario 11
- contaminación cruzada, prevención 70
- criterios de medición del experimento
 - disponibilidad por ciclo 89
 - visualización 27, 45, 66

D

- datos
 - compresión 89
 - envío a Illumina 11
 - por ciclo 89
 - servicio proactivo de Illumina 11
- denominación
 - placas 93
- detención normal frente a detención
 - inmediata 79
- dilución de bibliotecas 53
- división de ICB 31
- división de kits de reactivos 82
- documentación 100

E

- encender el instrumento 9
- errores 86, 90
 - probabilidad 88
- especificaciones de rendimiento 13, 30, 52
- especificaciones, rendimiento 13, 30, 52
- esquema de indexación 18, 37, 57
- estación de carga 60
- estratificación de experimentos 81
- estructura de carpetas 92

- experimento rápido 57
- experimentos simultáneos 81

F

- fase de hebra adelantada 87
- fase de hebra retrasada 87, 89
- ficha TruSeq Controls (Controles de TruSeq) 90
- filtro de castidad 88
- flúidica
 - mantenimiento 28, 50
- fórmulas personalizadas 18, 37, 57
- fórmulas, personalizadas 18, 37, 57
- fugas 23, 26, 42, 45, 62, 65
- funciones de hardware 1

G

- generación de grupos
 - cBot frente a HiSeq 52
 - celda de flujo rápida 60
 - instrucciones 14, 31
- gradillas de reactivos 4
- gradillas, reactivos 4

H

- HCS 4
 - abrir 9
- hoja de muestras 90
- hojas de muestras, necesarias 18, 37, 57
- HP7 frente a HP11 47
- HP8 frente a HP12 34
- HP9 frente a HP12 14
- HP9 frente a RMR 34
- HT1 53

I

- ICB
 - cálculo de volúmenes 33, 48
 - división 31
 - ejemplo de preparación 33
- iconos 5
- ID de la celda de flujo, registro 17, 56
- ID del kit de reactivos, registro 18, 38, 57
- imágenes, almacenamiento 17, 36, 56
- inactividad, duración aceptable 75
- incorporación de primera base 27, 46, 66

indexado
 número de ciclos 13, 30, 52
 reactivos necesarios 14, 34
 informe de primera base 17, 36, 56
 informes, incorporación de primera base 27, 46, 66
 inicializar el software 9
 inicializar software, solucionar problemas 77
 instalación, comprobación de fluidica 78
 intensidades bajas de grupos, solución de problemas 83
 intensidades, supervisión 27, 45, 66
 interferencias 87

J

juntas 6, 69, 75
 juntas, solucionar problemas 77

K

kit de carga de muestras Rapid Duo 61
 kits de reactivos 6
 kits de reactivos de Illumina, números de catálogo 6
 kits de reactivos, experimento rápido 8
 kits, reactivos 6
 kits, reactivos para experimento rápido 8

L

lado de celda de flujo 93
 lado de la celda de flujo 4
 lado de las celdas de flujo 3
 lavado posterior al experimento 28, 50
 lavados
 agua frente a mantenimiento 69
 beneficios 69
 requisitos del sistema 28, 50, 69
 solución de lavado de mantenimiento 69, 72
 lavados con agua
 duración y frecuencia 28, 50
 volúmenes administrados 29, 51, 68
 lavados de mantenimiento 69-70
 duración 75
 frecuencia 69
 reutilización de una solución 70
 reutilizar la solución 69, 72
 volúmenes administrados 72, 74-75

LIMS

configuración 10
 servidor 10

M

mantenimiento del instrumento
 preventivo 69
 más documentación, HiSeq 2
 módulo óptico 2

N

nombre del experimento 17, 36, 56
 número de ciclos 82
 cálculo de volúmenes de ICB 34
 predeterminados 18, 38, 57
 química de HiSeq v4 13
 química de TruSeq v3 30
 química rápida 52
 realizados frente a introducidos 18, 37, 57
 números bajos de grupos, solución de problemas 83
 números de catálogo
 consumibles proporcionados por el usuario 11
 kits de reactivos de Illumina 6
 kits de rehibridación de Illumina 83

O

opciones de detención 78
 opciones de generación de grupos 57
 opciones de generación de grupos para experimentos rápidos 52, 57
 opciones de generación de grupos, experimento rápido 52
 opciones de pausa 81
 opciones de reanudación 78

P

palanca de la celda de flujo 3
 intermitente 77
 naranja 77
 palanca de la celda de flujo intermitente 77
 palanca de la celda de flujo naranja 77
 pantalla de resumen del experimento 27, 45, 66
 parámetros de química 18, 37, 57
 parámetros del experimento, revisión 19, 38, 58

pasadores guía 22, 25, 41, 44, 61, 64
 pasos de secuenciación, descripción general
 RTA 86
 pasos del proceso químico, supervisión 27, 45,
 66
 placas 85, 93
 posiciones de los reactivos
 gradilla PE 20-21, 40, 48, 59
 gradilla SBS 19, 39, 58
 posiciones de los reactivos de generación de
 grupos 59
 posiciones de los reactivos de indexado 20, 40
 posiciones de los reactivos PE 21, 48
 posiciones de los reactivos SBS 19, 39, 58
 posiciones, reactivos
 generación de grupos 59
 indexado 20, 40
 PE 21, 48
 SBS 19, 39, 58
 preparación de HP3, SI frente a DI 34
 preparación de reactivos, flujo de trabajo de
 TruSeq v3 31
 preparar el cebado 23, 42, 63
 prevención, mantenimiento 69
 problemas técnicos, asistencia 100
 puntuaciones de calidad
 supervisión 27, 45, 66
 puntuaciones Q 88, 90

R

reactivos
 cambio durante un experimento 81
 experimentos más breves 82
 manipulación posterior al experimento 28, 50,
 67
 reactivos de indexado
 HiSeq v4 14
 TruSeq v3 34
 reactivos, almacenamiento de kits divididos 82-
 83
 reactivos, SBS
 creación de dos juegos 82
 flujo de trabajo de TruSeq v3 31
 reanudación de experimentos, configuración 80
 refrigerador de reactivos, temperatura 4
 registro de los ID de las celdas de flujo 17, 56
 registro de los ID de los kits de reactivos 18, 38,
 57
 registro, solucionar problemas 87
 registros de errores 86

rehibridación 83
 reiniciar el instrumento 76
 residuo de cebado 23, 42, 63
 reutilización de una solución de lavado de
 mantenimiento 70
 RTA 4, 85
 archivos de entrada 85
 experimentos detenidos 78, 86
 opciones de detención 79
 reanudación 80

S

SAV 4
 archivos InterOp 91
 documentación 27, 46, 67
 versión 86
 sectores 17, 36, 56, 93
 sensores 6
 Servicio de supervisión proactiva de Illumina 11
 sistema de fluidica 3
 acceso 3
 mantenimiento 69
 solucionar problemas 77-78
 sistema de vacío 3
 software
 aplicaciones instaladas 4
 funciones 1
 solucionar problemas 77
 solución de lavado de mantenimiento 69, 72
 supervisión remota 16, 35, 55

T

tablas de calidad 88
 tamaño de la carpeta de experimentos 6
 tapas de embudo 19
 temperatura, refrigerador de reactivos 4
 TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box
 reactivos necesarios 14
 tubos de residuos 23, 42, 54, 63, 71, 73

U

ubicación de grupos 87, 89
 ubicación de la carpeta del experimento 93
 ubicaciones de archivo 92
 ubicaciones de archivos 91
 ubicaciones de carpeta 10, 92-93
 ubicaciones de carpeta predeterminadas 10

ubicaciones de grupos 87, 89

V

valores de intensidad 87

vistas en miniatura 91, 94

almacenamiento 17, 36, 56

volúmenes administrados

cebado 23, 42, 63

comprobaciones del volumen 55

lavados con agua 29, 51, 68

lavados de mantenimiento 72, 74-75

volúmenes de reactivos, división de kits de

SBS 82-83

volúmenes esperados

cebado 23, 42, 63

comprobaciones del volumen 55

lavados con agua 29, 51, 68

lavados de mantenimiento 72, 74-75

volúmenes para comprobación del volumen 55

volúmenes, división de kits de SBS 82-83

Asistencia técnica

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

Sitio web: www.illumina.com
 Correo electrónico: techsupport@illumina.com

Números del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Regional
Norteamérica	+1 800 809 4566	
Alemania	+49 800 101 49 40	+49 893 803 56 77
Australia	+1 800 77 56 88	
Austria	+43 800 00 62 49	+43 19 28 65 40
Bélgica	+32 80 07 71 60	+32 34 00 29 73
China	400 066 58 35	
Corea del Sur	+82 80 234 53 00	
Dinamarca	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
España	+34 911 89 94 17	+34 800 30 01 43
Finlandia	+358 800 91 83 63	+358 974 79 01 10
Francia	+33 805 10 21 93	+33 170 77 04 46
Hong Kong (China)	800 96 02 30	
Irlanda	+353 180 093 66 08	+353 016 95 05 06
Italia	+39 800 98 55 13	+39 236 00 37 59
Japón	0 800 111 50 11	
Noruega	+47 800 168 36	+47 219 396 93
Nueva Zelanda	080 045 16 50	
Países Bajos	+31 800 022 24 93	+31 207 13 29 60
Reino Unido	+44 800 012 60 19	+44 207 305 71 97
Singapur	+1 800 579 2745	
Suecia	+46 850 61 96 71	+46 200 88 39 79
Suiza	+41 565 80 00 00	+41 800 20 04 42
Taiwán, China	008 066 517 52	
Otros países	+44 179 953 40 00	

Hojas de datos de seguridad (SDS): disponibles en el sitio web de Illumina, support.illumina.com/sds.html.

Documentación del producto: Disponible para su descarga de support.illumina.com.

20000451

N.º de documento 15035786, v03 ESP

N.º de material 20000451



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 (EE. UU.)

+1 800 809 ILMN (4566)

+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2020 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

illumina®