

NovaSeq 6000

Guia do Sistema de Sequenciamento



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

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

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

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

© 2020 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

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

Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v14	Setembro de 2020	Atualizados os números de catálogo dos kits disponíveis para refletir as ofertas atuais dos kits de reagentes v1.0 e v1.5.
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v13	Julho de 2020	Adicionadas informações ao suporte do kit de reagentes NovaSeq 6000 v1.5 e do software v1.7, o que permite o detalhamento das métricas por cavidade em determinados campos de dados de métricas de execução.
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v12	Fevereiro de 2020	Movidas as informações de desnaturação e diluição do Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351).
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v11	Fevereiro de 2019	Atualizada a tabela Complexidade do pool de bibliotecas para o fluxo de trabalho Xp.
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v10	Janeiro de 2019	Adicionadas informações da lâmina de fluxo SP Atualizadas as tabelas de complexidade recomendada do pool de bibliotecas para os fluxos de trabalho padrão e Xp.
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v09	Novembro de 2018	Corrigido o link para a página de suporte do NovaSeq 6000. Corrigida advertência ausente.
Material n.º 20020483 Documento n.º 1000000019358 v08	Setembro de 2018	Adicionadas informações do kit NovaSeq 6000 S4 (200 ciclos). Adicionadas informações sobre a conta do usuário. Adicionadas concentrações de carregamento de lâminas simples. Atualizadas instruções para o início escalonado de execuções. Atualizadas instruções de acesso ao BaseSpace. Atualizadas instruções da verificação pré-execução. Adicionadas observações sobre o requisito de confirmar o desligamento ou a reinicialização. Adicionada observação sobre limpeza após a execução incompleta. Esclarecidas informações da limpeza de manutenção. Esclarecidas informações de atualização de software.

Documento	Data	Descrição da alteração
Material n.º 20020483 Documento n.º 1000000019358 v07	Abril de 2018	<p>Esclarecido o uso do tubo da biblioteca para misturar reagentes na etapa de melhoria antes do sequenciamento.</p> <p>Adicionada uma tabela de descrições dos símbolos localizados nos materiais de consumo ou nas respectivas embalagens.</p> <p>Acrescentadas informações sobre o serviço de monitoramento Illumina Proactive na seção Modos de configuração de execuções.</p> <p>Adicionadas informações sobre a API do NovaSeq LIMS .</p> <p>Atualizadas as descrições sobre o NovaSeq Control Software v1.4.0.</p> <p>Atualizado o número típico de leituras que passam pelo filtro para lâminas de fluxo S2.</p> <p>Atualizadas as concentrações de carregamento recomendadas para o fluxo de trabalho NovaSeq Xp.</p> <p>Atualizadas as instruções para abertura do pacote da lâmina de fluxo.</p> <p>Esclarecido o procedimento para carregar bibliotecas na lâmina de fluxo.</p> <p>Adicionada observação sobre a disponibilidade do instrumento iniciar uma limpeza de manutenção.</p> <p>Adicionadas informações sobre o temporizador da contagem regressiva do início escalonado.</p> <p>Atualizadas instruções sobre como adicionar ou remover regras de SRP.</p>
Documento n.º 1000000019358 v06	Fevereiro de 2018	<p>Adicionada observação na seção Lâmina de fluxo para indicar que a versão 1.3.1 do software é necessária quando for usada uma lâmina de fluxo S1.</p> <p>Atualizadas as descrições e o volume padrão na tabela em <i>Métodos de carregamento de bibliotecas</i>.</p> <p>Adicionado cuidado em <i>Componentes do kit de reagentes</i>.</p> <p>Adicionados tubos de 0,5 e 1,5 ml e pontas de pipetas para pipetas de 20, 200, 1000 ul na tabela Materiais de consumo. Adicionado cilindro graduado à tabela Equipamentos.</p> <p>Adicionada a seção <i>Preparar a lâmina de fluxo</i> aos Capítulos 4 e 5, transferidas as etapas do Capítulo 6 para estas seções.</p> <p>Atualizado o volume total para a lâmina de fluxo S1 no Capítulo 4.</p> <p>Adicionada a tabela Complexidade recomendada do pool de bibliotecas a <i>Criar um pool de bibliotecas normalizadas</i> no Capítulo 4.</p> <p>Atualizadas as etapas <i>Descongelar cartuchos de SBS e de cluster</i> nos Capítulos 4 e 5.</p> <p>Esclarecidas as instruções de descongelamento em <i>Preparar lâmina de fluxo</i>.</p> <p>Atualizadas as informações de congelamento em <i>Concentrações de carregamento recomendadas para o NovaSeq Xp</i>.</p> <p>Atualizada a tabela Complexidade recomendada do pool de bibliotecas em <i>Criar um pool de bibliotecas normalizadas</i> no Capítulo 5.</p> <p>Acrescentada uma frase especificando que a lâmina de fluxo deve ser usada em até 12 horas após a respectiva remoção da embalagem em <i>Resumo do fluxo de trabalho do NovaSeq Xp e Preparar lâmina de fluxo</i>.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000019358 v05	Dezembro de 2017	<p>Adicionado esclarecimento sobre tubo de biblioteca vazio para Xp no diagrama de Fluxo de trabalho de sequenciamento.</p> <p>Em Desnaturar biblioteca e controle de PhiX opcional para o fluxo de trabalho padrão, atualizados os volumes de Tris-HCl na tabela para a etapa 5.</p> <p>Em Preparar o ExAmp Master Mix para o fluxo de trabalho NovaSeq Xp, adicionada observação após a etapa 4 para indicar que é necessário agitar para a obtenção de melhores resultados.</p> <p>Em Carregar bibliotecas na lâmina de fluxo para o fluxo de trabalho NovaSeq Xp, adicionado lembrete após a etapa 3 para carregar as amostras lentamente.</p>
Material n.º 20023471 Documento n.º 1000000019358 v04	Outubro de 2017	<p>Adicionado carregamento de cavidades individuais à lista de recursos do instrumento.</p> <p>Materiais de consumo - adicionados o Kit NovaSeq Xp com 2 cavidades e o Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades. Adicionados o Pacote do coletor do NovaSeq Xp com 2 cavidades e o Pacote do coletor do NovaSeq Xp com 4 cavidades.</p> <p>Equipamento - acrescentadas a plataforma de lâmina de fluxo NovaSeq Xp e a pipeta P200 para fluxo de trabalho do NovaSeq Xp.</p> <p>Acrescentado um capítulo Preparação de materiais de consumo para o fluxo de trabalho do NovaSeq Xp.</p> <p>Transferido Esvaziar frascos de reagentes usados do capítulo Sequenciamento para o início dos capítulos Fluxo de trabalho NovaSeq padrão e Fluxo de trabalho NovaSeq Xp.</p> <p>Atualizada a tabela Concentração de biblioteca agrupada e a tabela Concentração de carga recomendada para o fluxo de trabalho padrão.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
<p>Material n.º 20020483 Documento n.º 1000000019358 v03</p>	<p>Setembro de 2017</p>	<p>Atualizadas as descrições do NovaSeq Control Software v1.2, que contêm suporte para as lâminas de fluxo S1 e S4. Acrescentados requisitos de espaço em disco para uma execução de lâmina de fluxo dupla com lâminas de fluxo S1 e S4. Especificado o requisito de nomenclatura para determinados arquivos *.json. Reorganizadas as informações sobre a visão geral do kit no capítulo <i>Kits e acessórios</i>. Este capítulo trata de configurações, componentes e identificação de compatibilidade para os kits de reagentes e de carregamento de bibliotecas. Acrescentado o kit de reagentes NovaSeq 6000 aos materiais de consumo fornecidos pelo usuário. Atualizadas as instruções para agrupar e desnaturar biblioteca para conter informações de lâminas de fluxo S1 e S4. Atualizadas as instruções de descongelamento de cartuchos de reagentes para exigir um banho-maria de 2 horas para S1 e S2 e um banho-maria de quatro horas para S4. Atualizadas as descrições do tubo de biblioteca, cartuchos de reagentes e lâminas de fluxo para incluir componentes S4. Acrescentada uma seção sobre atualizações automáticas de software no capítulo <i>Manutenção</i>. Substituída a referência a <i>Redução do espaço ocupado para armazenamento de dados de genoma completo (Publicação n.º 970-2012-13)</i> pela <i>a comparação de qualidade dos dados da série NovaSeq e HiSeq X Ten (Publicação n.º 770-2017-010)</i>. Adicionada observação à etapa 3 em <i>Inserir parâmetros de execução</i> no Capítulo 6. Atualizada a seção <i>Blocos da lâmina de fluxo</i> para incluir informações de blocos S1 e S4.</p>

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

Índice

Capítulo 1 Visão geral	1
Introdução	1
Recursos adicionais	2
Visão geral do sequenciamento	2
Fluxo de trabalho de sequenciamento	3
Componentes do instrumento	5
Capítulo 2 Kits e acessórios	11
Visão geral dos kits	11
Componentes do kit de reagentes	12
Componentes do kit NovaSeq Xp	16
Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp	17
Descrições dos símbolos	18
Capítulo 3 Introdução	19
Iniciar o instrumento	19
Definir configurações	20
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	26
Capítulo 4 Fluxo de trabalho padrão: preparação dos materiais de consumo	30
Métodos	30
Descongelar cartuchos de SBS e de cluster	30
Esvaziar frascos de reagente usados	31
Preparar a lâmina de fluxo	33
Agrupar e desnaturar bibliotecas para o sequenciamento	33
Capítulo 5 Fluxo de trabalho NovaSeq Xp: preparação dos materiais de consumo	35
Resumo do fluxo de trabalho NovaSeq Xp	35
Métodos	36
Descongelar cartuchos de SBS e de cluster	36
Esvaziar frascos de reagente usados	37
Preparar a lâmina de fluxo	39
Descongelar os reagentes ExAmp	39
Agrupar, desnaturar e carregar bibliotecas para o sequenciamento	39
Capítulo 6 Sequenciamento	44
Configurar uma execução de sequenciamento	44
Monitorar o andamento da execução	50
Início escalonado de execuções	52
Excluir a execução	53
Remover a posição n.º 30	53
Limpeza automática após a execução	54

Capítulo 7 Manutenção	55
Manutenção preventiva	55
Realizar uma limpeza de manutenção	55
Atualizações de software	59
Apêndice A Solução de problemas	61
Recursos de solução de problemas	61
Arquivos de solução de problemas	61
Erros de verificação antes da execução	61
Solução de problemas de gestão de processos	62
Falha de execução antes da clusterização	63
Encerrar uma execução	64
Desligar o instrumento	64
Apêndice B Real-Time Analysis	66
Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	66
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	68
Apêndice C Arquivos e pastas de saída	71
Estrutura da pasta de saída de sequenciamento	71
Arquivos de saída de sequenciamento	72
Apêndice D Segurança do Windows	73
Configurações de segurança	73
Requisitos da senha	73
Firewall do Windows	73
Kit de ferramentas aprimorado da experiência de mitigação	73
Políticas de restrição de software	74
Índice	77
Assistência técnica	81

Capítulo 1 Visão geral

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

Introdução

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

Recursos

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

Recursos adicionais

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

Recurso	Descrição
Seletores de protocolo personalizado	Um assistente para gerar documentação personalizada de todo o processo, que é adaptado ao método de preparação de biblioteca, aos parâmetros de execução e ao método de análise utilizado para a execução de sequenciamento.
Guia de preparação do local da série NovaSeq (documento n.º 1000000019360)	Fornecer especificações para a área do laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais e de rede.
Guia de conformidade e segurança da série NovaSeq (documento n.º 1000000019357)	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e rotulagem de instrumentos.
Guia de conformidade do Leitor RFID (documento n.º 1000000002699)	Fornecer informações sobre o leitor RFID no instrumento, incluindo certificações de conformidade e considerações de segurança.
Guia de primers personalizados da série NovaSeq (documento n.º 1000000022266)	Fornecer informações sobre a substituição de primers de sequenciamento da Illumina por primers de sequenciamento personalizados.
Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351)	Fornecer instruções de desnaturação e diluição de bibliotecas preparadas para uma execução de sequenciamento e para a preparação de um controle de PhiX opcional.

Visão geral do sequenciamento

Clusterização

Durante a clusterização, moléculas de DNA simples são ligadas à superfície da lâmina de fluxo e amplificadas simultaneamente para formar clusters. No fluxo de trabalho padrão, o ExAmp master mix é misturado com as bibliotecas no instrumento antes da clusterização. No fluxo de trabalho NovaSeq Xp, os reagentes ExAmp e as bibliotecas são misturados e colocados na lâmina de fluxo fora do instrumento. Os volumes variam por tipo de lâmina de fluxo e por fluxo de trabalho.

Sequenciamento

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

Análise

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

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

Fluxo de trabalho de sequenciamento



Descongele os cartuchos de reagentes de SBS e cluster.



Agrupe e desnature as bibliotecas. Para o fluxo de trabalho padrão, adicione as bibliotecas ao tubo da biblioteca. Para o fluxo de trabalho NovaSeq Xp, carregue a mistura ExAmp/biblioteca na lâmina de fluxo.

Para ambos os fluxos de trabalho, carregue o tubo da biblioteca no cartucho de cluster descongelado. Para obter mais informações, consulte o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351).



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

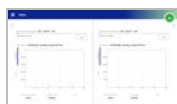


Descarregue os materiais de consumo da execução anterior e carregue os novos materiais de consumo da execução atual.



Na tela Run Setup (Configuração de execução), especifique os parâmetros de execução. Se o BaseSpace Sequence Hub estiver configurado, acesse-o na tela Log In (Login).

Após a conclusão das verificações de pré-execução, a execução é iniciada automaticamente.



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



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

Métodos de carregamento das bibliotecas

As bibliotecas são carregadas em uma lâmina de fluxo NovaSeq 6000 usando um dos dois métodos a seguir, dependendo do fluxo de trabalho selecionado. A configuração de uma execução de sequenciamento é diferente para cada fluxo de trabalho. Sempre siga as instruções do seu método. Consulte *Fluxo de trabalho padrão: preparação dos materiais de consumo* na página 30 e *Fluxo de trabalho NovaSeq Xp: preparação dos materiais de consumo* na página 35.

Tabela 1 Métodos de carregamento das bibliotecas

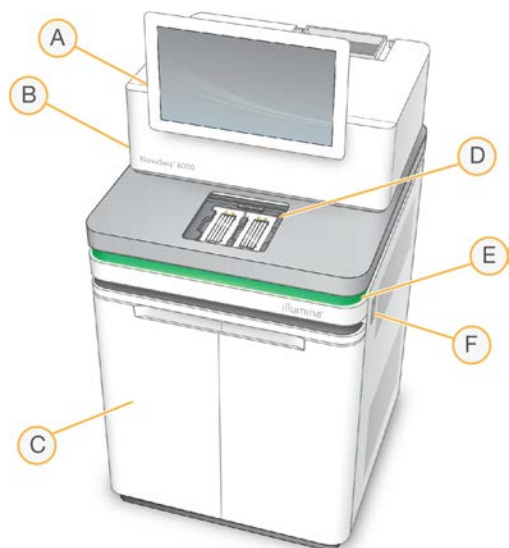
Fluxo de trabalho	Método de carregamento de pool de bibliotecas e método de mixagem ExAmp	Capacidade de endereçamento de cavidades individuais e análise de dados	Volume de carga* Modos SP/S1-S2-S4 (µl)
Padrão	Um pool de biblioteca única é carregado no tubo de biblioteca, misturado dentro do aparelho no tubo de biblioteca com os reagentes ExAmp, e distribuído automaticamente à lâmina de fluxo para clusterização e sequenciamento. Uma etapa de melhoria antes do sequenciamento usa reagentes no cartucho de cluster e no tubo da biblioteca para criar uma mistura condicionadora que ajuda a aumentar a eficiência da clusterização.	Um único pool de bibliotecas é distribuído e sequenciado em todas as cavidades da lâmina de fluxo. As leituras de todas as cavidades são analisadas em conjunto.	150–225–465 µl (lâmina de fluxo inteira)
NovaSeq Xp	Uma ou mais bibliotecas (o número corresponde ao número de cavidades de lâminas de fluxo) são misturadas manualmente com reagentes ExAmp fora do instrumento e diretamente carregadas nas cavidades individuais da lâmina de fluxo usando a plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp. Em seguida, a lâmina de fluxo preenchida é carregada no instrumento para clusterização e sequenciamento. Uma etapa de melhoria antes do sequenciamento usa o tubo de biblioteca vazio para misturar os reagentes do cartucho de cluster para criar uma mistura condicionadora que ajuda a aumentar a eficiência da clusterização.	Cada biblioteca é carregada em uma cavidade separada da lâmina de fluxo que é, então, sequenciada. Diferentes pools, alíquotas do mesmo pool ou combinações arbitrárias podem ser usadas. As leituras de diferentes cavidades são analisadas individualmente ou em conjunto, conforme for adequado.	27–33–45 µl (cavidade individual)

*O fluxo de trabalho NovaSeq Xp exige uma concentração de bibliotecas desnaturadas 25–50% mais baixa do que no fluxo de trabalho padrão.

Componentes do instrumento

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

Figura 1 Componentes externos



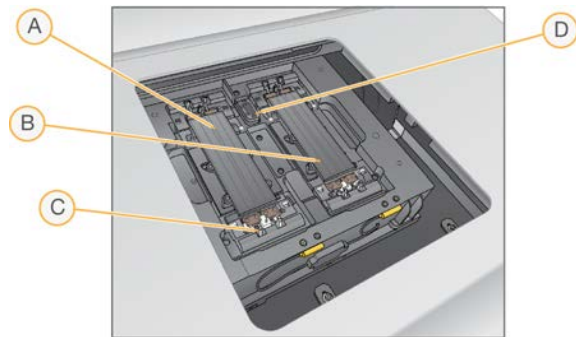
- A **Monitor com tela sensível ao toque** — exibe a interface do NVCS para configuração do sistema e configuração e monitoramento da execução.
- B **Compartimento óptico** — contém os componentes ópticos que permitem a geração de imagens de superfície dupla de lâminas de fluxo.
- C **Compartimento de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

Compartimento da lâmina de fluxo

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

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

Figura 2 Estágio da lâmina de fluxo



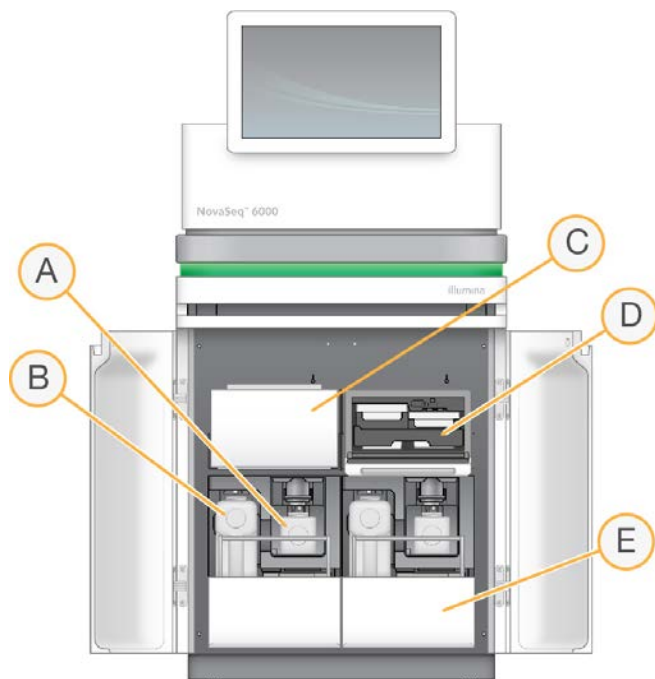
- A Suporte da lâmina de fluxo do Lado A
- B Suporte da lâmina de fluxo do Lado B
- C Fixação da lâmina de fluxo (uma de quatro por lado)
- D Alvo do alinhamento óptico

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

Compartimento de líquidos

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

Figura 3 Componentes do compartimento de líquidos



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

Reagentes usados

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



OBSERVAÇÃO

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

Software do sistema

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





- ▶ **NovaSeq Control Software (NVCS)** (Software de controle NovaSeq) — guia você pelas etapas para configurar uma execução de sequenciamento, controla as operações do instrumento e exibe as estatísticas conforme a execução continua. Para demonstrar o carregamento e o descarregamento adequados dos materiais de consumo, o NVCS reproduz vídeos instrutivos durante a configuração de execução.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** — realiza análise de imagens e identificação de bases durante uma execução. O NovaSeq 6000 usa o RTA3, que incorpora arquitetura, segurança e outras melhorias de recursos para otimizar o desempenho. Para obter mais informações, consulte *Real-Time Analysis na página 66*.
- ▶ **Serviço de cópia universal (UCS)** — copia arquivos de produção de RTA3 e NVCS para a pasta de saída durante uma execução. Se aplicável, o serviço também transfere dados para o BaseSpace Sequence Hub. Se o Serviço de cópia universal for interrompido durante uma execução, ele fará várias tentativas para reconectar e restabelecer a transferência de dados automaticamente.

Ícones de status

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

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

Tabela 2 Ícones de status do NVCS







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

Gerenciamento de processos

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

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

Tabela 3 Ícones de status da gestão de processos

Processo	Ícone	Descrição
Status de execução	 Running	A execução está em andamento.
	 Complete	A execução concluiu o sequenciamento.
Rede	 Copying	Os arquivos estão sendo copiados para a pasta de saída na rede.
	 Complete	Todos os arquivos foram copiados para a pasta de saída na rede.
	N/A	Não aplicável porque a execução não está configurada para fazer o upload para uma pasta de saída na rede ou o status de upload é desconhecido. Para solucionar problemas, consulte Solução de problemas de gestão de processos na página 62 .
BaseSpace	 Uploading	Os arquivos estão sendo carregados para o BaseSpace Sequence Hub.
	 Complete	Todos os arquivos foram enviados para o BaseSpace Sequence Hub.
	N/A	Não aplicável porque a execução não está configurada para fazer upload para o BaseSpace Sequence Hub ou o status de upload é desconhecido. Para solucionar problemas, consulte Solução de problemas de gestão de processos na página 62 .

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



OBSERVAÇÃO

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

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

Lâmina de fluxo	Espaço do CE por ciclo	Espaço do C:\ por par de lâminas de fluxo
SP	0,5 Gb	5 Gb
S1	1,35 Gb	20 Gb
S2	2,7 Gb	20 Gb
S4	4,3 Gb	40 Gb

Para calcular o espaço total exigido no CE para a execução, multiplique o valor abaixo de "CE Space per cycle" (Requisito mínimo de espaço do CE por ciclo) pela soma dos valores de duração da Leitura 1, Leitura 2, Índice 1 e Índice 2 (consulte *Inserir parâmetros de execução na página 48*). Por exemplo, para uma execução de 150 ciclos tipo paired-end de lâmina de fluxo dupla S4 em que ambos os índices têm comprimento de 8 bases, o espaço exigido no CE é $(151 * 2 + 8 * 2) * 4,3 = 1,37$ Tb.

Para obter informações sobre a limpeza do disco rígido, consulte *Excluir a execução na página 53*.

Capítulo 2 Kits e acessórios

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

Visão geral dos kits

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

Selecione o tamanho apropriado do kit para o projeto do seu experimento. A Illumina recomenda o uso dos kits de 500 ciclos somente em execuções com duração acima de 300 ciclos.

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

Tabela 5 Configurações do kit





Nome do kit	Reagentes v1.0 N.º do catálogo Illumina	Reagentes v1.5 N.º do catálogo Illumina
Kit de reagentes NovaSeq 6000 S4 (300 ciclos) – pacote com 40	20039236	N/A
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (300 ciclos) – pacote com 20	20039234	N/A
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (300 ciclos) – pacote com 10	20039233	N/A
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012866	20028312
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20027466	20028313
Kit de reagentes S4 NovaSeq 6000 (35 ciclos)	N/A	20044417
Kit de reagentes S2 NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012860	20028314
Kit de reagentes S2 NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20012861	20028315
Kit de reagentes S2 NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20012862	20028316
Kit de reagentes S1 NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20012863	20028317
Kit de reagentes S1 NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20012864	20028318
Kit de reagentes S1 NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20012865	20028319
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (500 ciclos)	20029137	20028402
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (300 ciclos)	20027465	20028400
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (200 ciclos)	20040326	20040719
Kit de reagentes SP NovaSeq 6000 (100 ciclos)	20027464	20028401
Kit NovaSeq Xp com 2 cavidades	20021664	20043130
Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades	20021665	20043131

Identificação de compatibilidade

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

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

Não é permitido misturar cartuchos SBS/CPE v1.0 e cartuchos v1.5. Caso isso seja feito, será gerada uma mensagem de erro.

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

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

Componentes do kit de reagentes

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

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

Tabela 6 Componentes do kit

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



CUIDADO

Evite que os cartuchos caiam. Podem ocorrer danos, se eles caírem. Pode ocorrer irritação cutânea se houver vazamento dos cartuchos. Inspeção os cartuchos antes de usar quanto à existência de rachaduras.

Tubo da biblioteca

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

Figura 4 Tubo da biblioteca



O tubo da biblioteca é usado de duas maneiras, dependendo do fluxo de trabalho:

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

Lâmina de fluxo

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

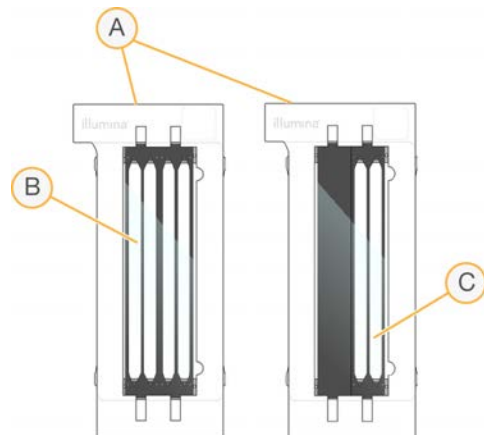
Cada lâmina de fluxo tem várias cavidades para fazer o sequenciamento de bibliotecas em pool. As lâminas de fluxo SP, S1e S2 possuem duas cavidades cada e a lâmina de fluxo S4 possui quatro. Cada cavidade é captada em várias faixas e, em seguida, o software divide a imagem de cada faixa em porções menores chamadas de blocos. Para obter mais informações, consulte *Blocos da lâmina de fluxo na página 67*.



OBSERVAÇÃO

Se você estiver usando uma lâmina de fluxo S1, deverá usar NVCS v1.3.1 ou posterior. Se você estiver usando uma lâmina de fluxo SP, deverá usar NVCS v1.6 ou posterior.

Figura 5 Lâminas de fluxo



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

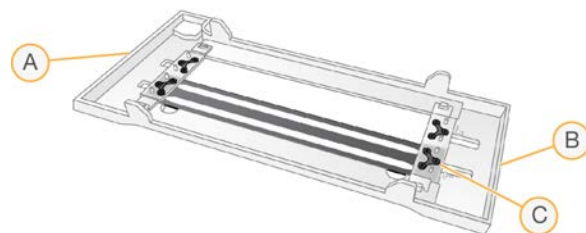
O lado inferior de cada lâmina de fluxo tem quatro juntas. As bibliotecas e os reagentes entram nas cavidades da lâmina de fluxo através das juntas situadas na extremidade de entrada da lâmina de fluxo. Os reagentes usados são expelidos das cavidades através das juntas situadas na extremidade de saída.



OBSERVAÇÃO

Evite tocar nas juntas ao manusear a lâmina de fluxo.

Figura 6 Lâmina de fluxo invertida



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




Cartuchos de solução tampão, de cluster e de SBS

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

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

O rótulo do cartucho de reagente inclui os modos compatíveis, como S1/S2 ou SP/S1/S2. Os cartuchos só podem ser usados para os modos indicados no rótulo.

Tabela 7 Cartuchos de reagentes

Cartucho	Descrição
<p>Cartucho de solução tampão do NovaSeq 6000</p> 	<p>Pré-carregado com soluções tampão de sequenciamento e pesa até 6,8 kg. Uma alça de plástico facilita o transporte, o carregamento e o descarregamento. Reentrâncias na parte superior da chapa permitem que os cartuchos sejam empilhados.</p>
<p>Cartucho de cluster do NovaSeq 6000</p> 	<p>Pré-carregado com reagentes do tipo paired-end, de clusterização e de indexação, além de solução de limpeza. Inclui uma posição destinada ao tubo da biblioteca. A rotulagem cor de laranja distingue o cartucho de cluster do cartucho de SBS.</p>
<p>Cartucho de SBS do NovaSeq 6000</p> 	<p>Pré-carregado com reagentes de sequenciamento em volumes específicos para o número de ciclos que o kit suporta (500, 300, 200, 100 ou 35). Cada uma das três posições de reagente tem uma posição adjacente reservada para a limpeza automática após a execução. A rotulagem cinza diferencia o cartucho de SBS do cartucho de cluster.</p>

Reservatórios de cartuchos de cluster

Reservatório removível

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



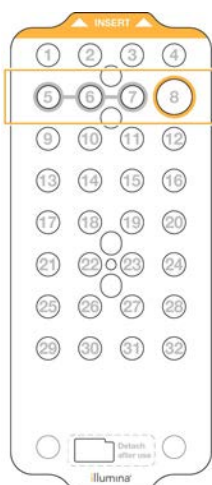
OBSERVAÇÃO

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

Reservatórios reservados

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

Figura 7 Reservatórios numerados



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

Para obter mais informações sobre primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados da série NovaSeq* (documento nº 100000022266).

Componentes do kit NovaSeq Xp

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



OBSERVAÇÃO

Os materiais de consumo DPX1 e DPX2 podem ser identificados como JPX1 e JPX2. Ambos são compatíveis com kits de reagentes v1.0 ou v1.5.

Tabela 8 Componentes do kit NovaSeq Xp

Quantidade	Componente do kit	Temperatura de armazenamento
1	DPX1/JPX1	-25 °C a -15 °C
1	DPX2/JPX2	-25 °C a -15 °C
1	DPX3	-25 °C a -15 °C
1	Coletor do NovaSeq Xp	Deixe com o kit ou armazene à temperatura ambiente.

Reagentes do kit Xp

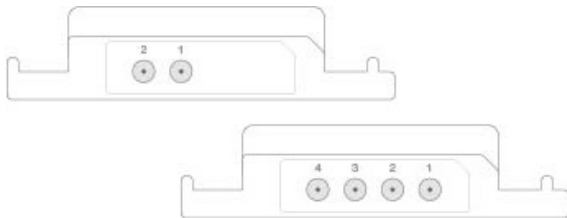
DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3 são reagentes ExAmp fornecidos em tubos individuais para o fluxo de trabalho NovaSeq Xp. A combinação desses reagentes cria o ExAmp master mix, que é misturado com pools de bibliotecas antes do carregamento na lâmina de fluxo.

Coletor do NovaSeq Xp

O coletor do NovaSeq Xp é colocado na plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp para permitir o carregamento direto dos pools de bibliotecas em cada cavidade de lâmina de fluxo. Os braços de cada lado do coletor do NovaSeq Xp se destinam à fácil colocação da plataforma.

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

Figura 8 Coletores do NovaSeq Xp com poços numerados

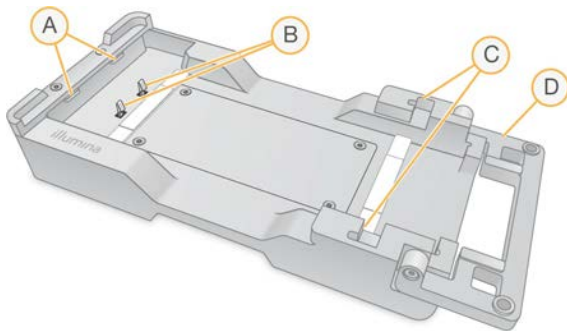


Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp

A plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp é um acessório reutilizável para carregar bibliotecas diretamente em uma lâmina de fluxo. A lâmina de fluxo é invertida e carregada na doca e o coletor do NovaSeq Xp é encaixado acima da lâmina de fluxo.

Duas saliências (sob o suporte) e duas molas guiam a inserção da lâmina de fluxo e garantem a orientação adequada. Ranhuras sustentam os braços do coletor do NovaSeq Xp na orientação correta e encaixados de maneira uniforme. Uma fixação magnética gira 180° para prender o coletor do NovaSeq Xp acima da lâmina de fluxo.

Figura 9 Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp



- A Saliências (sob o suporte) para guiar o carregamento
- B Molas para alinhar a lâmina de fluxo
- C Ranhuras para sustentar os braços do coletor do NovaSeq Xp
- D Fixação para prender a lâmina de fluxo e o coletor do NovaSeq Xp

Descrições dos símbolos

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

Símbolo	Descrição
	A data em que o material de consumo expira. Para obter um resultado melhor, use o material de consumo antes dessa data.
	Indica o fabricante (Illumina).
	O uso previsto é uso restrito em pesquisa (URP).
	Indica o número da peça para que o material de consumo possa ser identificado. ¹
	Indica o código do lote para identificar o lote de fabricação do material de consumo. ¹
	Indica o número de série.
	Indica que é necessária proteção contra luz ou calor. Armazene protegido da luz solar.
	Indica um risco à saúde.
	Indica uma advertência de risco.
	Faixa de temperatura de armazenamento em graus Celsius. Armazene o material de consumo na faixa de temperatura indicada. ²

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

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

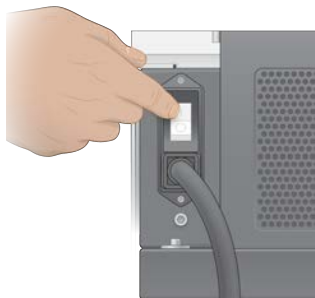
Capítulo 3 Introdução

Iniciar o instrumento	19
Definir configurações	20
Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário	26

Iniciar o instrumento

- 1 Coloque o interruptor situado na parte traseira do instrumento na posição | (on) (ligado)

Figura 10 Localização do interruptor



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

Figura 11 Localização do botão de energia



Contas de usuário

No NVCS v1.5 e nas versões mais recentes existem dois tipos de contas: administrador e usuário. As permissões para cada tipo de conta são mostradas na tabela a seguir.

Permissões	Administrador	Usuário
Configurar, iniciar e monitorar execuções de sequenciamento	X	X
Fazer o download e atualizar software	X	
Ver o status de uma execução ativa iniciada por outro usuário	X	
Finalizar processos de UCS que não responderem	X	

Os arquivos de dados de aplicativos são armazenados em **C:/ProgramData**. Os aplicativos são instalados em **C:/Program Files**. O NVCS é iniciado como aplicativo de tela inteira para ambos os tipos de conta.

Fazer logon no sistema

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

O NVCS é iniciado como aplicativo de usuário. Se você tentar usar um recurso que exija permissões de apresentador, como Atualização de software, e você não estiver conectado como administrador, será solicitado a fazer login como administrador.

Para permanecer informado sobre o progresso de uma execução de sequenciamento, fique conectado durante a execução do NVCS e enquanto a execução de sequenciamento estiver em andamento.

Definir configurações

O NVCS inclui configurações para o seguinte:

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



OBSERVAÇÃO

Antes de continuar a seleção do fluxo de trabalho ou as verificações automáticas das atualizações de software, configure Mode Selection (Seleção de modo).

Modos de configuração da execução

- ▶ **Manual** — o modo padrão que envia dados a uma pasta de saída especificada para análise posterior.
- ▶ **File-Based** (Com base em arquivo) — modo alternativo que usa arquivos do BaseSpace Clarity LIMS ou de outro sistema LIMS para definir parâmetros de execução. Para obter mais informações, consulte [Configurar a saída do LIMS na página 22](#).

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

Os dois modos de configuração da execução incluem a opção de enviar dados para o BaseSpace Sequence Hub para análise.

Configurar o modo manual

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

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

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

Esse serviço:

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

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

Configurar modo com base em arquivo

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

6 Selecione **Save** (Salvar).

Configurar a saída do LIMS

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

Um software LIMS externo pode usar a API do LIMS do NovaSeq para interagir com o NovaSeq 6000. Para obter mais informações sobre endpoints de API, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Nome do campo	Valor
run_name	Um nome de execução preferencial, que pode conter caracteres alfanuméricos, hífens e sublinhados
run_mode	Um dos seguintes modos: <ul style="list-style-type: none"> • SP • S1 • S2 • S4
workflow_type	NoIndex, SingleIndex ou DualIndex
librarytube_ID	O RFID do tubo da biblioteca
rehyb*	Verdadeiro ou falso
sample_loading_type	NovaSeqStandard ou NovaSeqXp
Flowcell_ID	Identificação da lâmina de fluxo
paired_end	Verdadeiro ou falso
read1	Valor até 251 (ciclos adicionais de leituras de UMI possíveis até 259)
read2	Valor até 251 (ciclos adicionais de leituras de UMI possíveis até 259)
index_read1	Qualquer valor
index_read2	Qualquer valor
output_folder	O caminho para a pasta de saída com duas barras invertidas para uma sequência de escape
samplesheet	O caminho para uma planilha de amostra ou outro arquivo no formato *.csv com duas barras invertidas para uma sequência de escape
use_basespace	Verdadeiro ou falso
basespace_mode	RunMonitoringOnly ou RunMonitoringAndStorage
use_custom_read1_primer	Verdadeiro ou falso
use_custom_read2_primer	Verdadeiro ou falso
use_custom_index_read1_primer	Verdadeiro ou falso
use_custom_index_read2_primer	Verdadeiro ou falso

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

Exemplo: arquivo *.json nomeado como H6655DMXX.json:

```
{
  "run_name": "2x151_PhiX",
```

```

"run_mode": "S2",
"workflow_type": "NoIndex",
"sample_loading_type": "NovaSeqXp",
"librarytube_ID": "NV1236655-LIB", "flowcell_ID": "H6655DMXX",
"rehyb": falso,
"paired_end": verdadeiro,
"read1": 151,
"read2": 151,
"index_read1": 0,
"index_read2": 0,
"output_folder": "\\sgnt-prd-isi01\\NovaSEQ\\SeqRuns",
"attachment": "\\sgnt-prd-isi01\\NVSQ\\SampleSheet.csv",
"use_basespace": falso,
"basespace_mode": nulo,
"use_custom_read1_primer": falso,
"use_custom_read2_primer": falso,
"use_custom_index_read1_primer": falso
}

```

Configurar ciclos de índice padrão

Você pode configurar o número padrão de ciclos de índice do fluxo de trabalho padrão conforme mostrado a seguir.

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

Fluxos de trabalho NovaSeq padrão e NovaSeq Xp

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

- ▶ Fluxo de trabalho padrão

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

- ▶ Preparação do ExAmp master mix
- ▶ Distribuição do Master Mix na lâmina de fluxo

A preparação e a distribuição do Master Mix dentro do instrumento minimizam a interação do usuário e reduzem a variabilidade na mistura preparada.

Como parte da configuração da execução do fluxo de trabalho padrão, um tubo de biblioteca contendo o pool de bibliotecas desnaturadas e neutralizadas na concentração recomendada é inserido na posição n.º 8 do cartucho de cluster. Para obter mais informações sobre as concentrações recomendadas, consulte o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351). Após o início da execução, as etapas subsequentes ocorrem dentro do instrumento e não necessitam de interferência do usuário. Isso abrange a transferência dos reagentes ExAmp do cartucho de cluster para o tubo de biblioteca, a preparação dos reagentes e a mistura do pool de biblioteca e a distribuição da mistura preparada para todas as cavidades da lâmina de fluxo.

Após a clusterização dentro do instrumento, é conduzida uma série de etapas comuns a ambos os fluxos de trabalho. Essas etapas incluem a aplicação de uma mistura condicionadora à lâmina de fluxo com clusterização e etapas adicionais de química para a preparação dos clusters para sequenciamento por síntese. A mistura condicionadora é preparada durante o processo de clusterização usando reagentes no cartucho de cluster e no tubo de biblioteca inserido durante a configuração da execução. A mistura condicionadora ajuda a aumentar a eficiência da clusterização no instrumento NovaSeq.

▶ Fluxo de trabalho NovaSeq Xp

O fluxo de trabalho NovaSeq Xp permite o carregamento de diferentes bibliotecas ou pools de bibliotecas em cavidades individuais na lâmina de fluxo NovaSeq usando a plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp e um kit de materiais de consumo específico para a lâmina de fluxo (kit NovaSeq Xp com 2 cavidades ou kit NovaSeq Xp com 4 cavidades). O kit NovaSeq Xp contém reagentes ExAmp que são necessários para a clusterização e o coletor do NovaSeq Xp, que é necessário para o carregamento na cavidade.

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

Após o início da execução, é conduzida uma série de etapas comuns a ambos os fluxos de trabalho. Essas etapas incluem a aplicação de uma mistura condicionadora à lâmina de fluxo com clusterização e etapas adicionais de química para a preparação dos clusters para sequenciamento por síntese. A mistura condicionadora é preparada durante o processo de clusterização usando reagentes no cartucho de cluster e misturada no tubo de biblioteca vazio inserido durante a configuração da execução. A mistura condicionadora ajuda a aumentar a eficiência da clusterização no instrumento NovaSeq.

Configurar o fluxo de trabalho NovaSeq Xp

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Selecione a guia **Workflow Selection** (Seleção de fluxo de trabalho).

- 3 Para habilitar o fluxo de trabalho NovaSeq Xp, selecione **Enable Workflow Selection** (Habilitar Seleção de fluxo de trabalho).
- 4 [Opcional] Para fazer com que o NovaSeq Xp seja o fluxo de trabalho padrão, selecione **NovaSeq Xp**.
- 5 Selecione **Save** (Salvar).

Configurar o BaseSpace Sequence Hub

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

- 1 No menu principal, selecione **Settings** (Configurações).
A tela Settings (Configurações) é aberta na guia Mode Selection (Seleção de modo).
- 2 Marque a caixa de seleção **BaseSpace Sequence Hub**.
- 3 Selecione uma opção de configuração:
 - ▶ **Run Monitoring and Storage** (Monitoramento de execução e armazenamento) — envia dados de execução para o BaseSpace Sequence Hub para monitoramento remoto e análise de dados. Esta opção requer o carregamento de uma planilha de amostra com a execução.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Somente monitoramento de execução) — envia arquivos InterOp, arquivos de registro e outros arquivos de execução não CBCL para o BaseSpace Sequence Hub para que as execuções possam ser monitoradas remotamente.
- 4 No menu suspenso Hosting Location (Local de host), selecione **EU (Frankfurt)** (UE, Frankfurt) ou **USA (N. Virginia)** (EUA, norte da Virgínia).
Essa opção determina onde os dados são carregados.
- 5 Se você é assinante do BaseSpace Enterprise:
 - a Marque a caixa de seleção **Private Domain** (Domínio privado).
 - b Digite o nome do domínio utilizado para logon único no BaseSpace Sequence Hub.
- 6 Selecione **Save** (Salvar).

Nome da planilha da amostra

Quando o NVCS v1.3.1 ou anterior estiver sendo executado, uma planilha de amostra usada para uma execução do NovaSeq 6000 e enviada para o BaseSpace Sequence Hub deve ser nomeada SampleSheet.csv (diferencia maiúsculas de minúsculas). Se a planilha de amostra for nomeada incorretamente e Run Monitoring and Storage (Monitoramento de execução e armazenamento) estiver ativado, o BaseSpace Sequence Hub marcará a execução para revisão. Uma execução marcada para revisão pode ser colocada na fila para a geração de FASTQ ao selecionar **More (Mais) | Fix Sample Sheet and Requeue** (Corrigir planilha de amostra e recolocar na fila) e inserir a planilha de amostra apropriada. Até a planilha de amostra ser fornecida, os dados de sequenciamento não podem ser convertidos em arquivos FASTQ.

Se você estiver executando o NVCS v1.4 ou posterior, não existem limitações quanto aos nomes das planilhas de amostra.

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

Configurar atualizações de software

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

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

Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário

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

Materiais de consumo

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
NaOH 1 N	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição a 0,2 N para a desnaturação de bibliotecas.
Frasco de centrífuga, 500 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de Tween 20 para uma limpeza de manutenção.
Tubo de centrífuga, 30 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de NaOCl para uma limpeza de manutenção.
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral.
Compressas com álcool isopropílico 70% ou Compressas com álcool etanol 70%	VWR, catálogo n.º 95041-714 ou equivalente Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Componentes de limpeza antes de uma execução e finalidade geral.
Lenço para laboratório com poucos fiapos	VWR, catálogo n.º 21905-026 ou equivalente	Secagem do estágio da lâmina de fluxo e para finalidade geral.
Tubo de microcentrífuga, 1,5 ml	VWR, catálogo n.º 20170-038 ou equivalente	Combinação de volumes ao diluir NaOH e bibliotecas.

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
NaOCl com grau de reagente, 5%	Sigma-Aldrich, catálogo n.º 239305	Realização de uma limpeza de manutenção.
Kit de reagentes NovaSeq 6000	llumina, consulte Visão geral dos kits na página 11	Realização de uma execução de sequenciamento.
Pontas de pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 1000 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Álcool isopropílico reagente ou de grau espectrofotométrico (99%), frasco de 100 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza dos componentes ópticos periodicamente e apoio ao cartucho de limpeza da objetiva.
Tween 20	Sigma-Aldrich, catálogo n.º P7949	Realização de uma limpeza de manutenção.
Água, aprovada para uso em laboratório	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de NaOH para a desnaturação de bibliotecas. Diluição de Tween 20 e de hipoclorito de sódio para uma limpeza de manutenção.
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Um dos seguintes kits: • Kit NovaSeq Xp com 2 cavidades • Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades	llumina: • catálogo n.º 20021664 • catálogo n.º 20021665	Carregar bibliotecas manualmente na lâmina de fluxo: • Kit de duas cavidades para lâminas de fluxo SP, S1 e S2 • Kit de quatro cavidades para lâminas de fluxo S4
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Um dos seguintes kits: • Kit NovaSeq Xp com 2 cavidades v1.5 • Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades v1.5	llumina: • catálogo n.º 20043130 • catálogo n.º 20043131	Carregar bibliotecas manualmente na lâmina de fluxo: • Kit de duas cavidades para lâminas de fluxo SP, S1 e S2 • Kit de quatro cavidades para lâminas de fluxo S4
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Tubos de 0,5 ml e 1,7 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Necessário para mistura de ExAmp.
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] [Opcional] Um dos seguintes conjuntos do coletor: • Conjunto do coletor de duas cavidades do NovaSeq Xp • Conjunto do coletor de quatro cavidades do NovaSeq Xp	llumina: • catálogo n.º 20021666 • catálogo n.º 20021667	Coletores de reposição do NovaSeq Xp para carregamento manual de bibliotecas em uma lâmina de fluxo.
[Opcional] Controle de PhiX v3	llumina, n.º do catálogo FC-110-3001	Fazer spike-in em um controle de PhiX.

Materiais de consumo nos kits Illumina

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

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

Material de consumo (um de cada)	Finalidade
Cartucho de solução tampão	Fornecer soluções tampão de sequenciamento para a execução.
Cartucho de cluster	Fornecer reagentes de clusterização, indexação e do tipo paired-end para a execução.
Lâmina de fluxo	A reação de clusterização e sequenciamento ocorre na lâmina de fluxo.
Cartucho de SBS	Fornecer reagentes de sequenciamento para a execução.
Tubo da biblioteca	Tubo vazio usado para conter as bibliotecas agrupadas e desnaturadas (fornecidas pelo cliente) para o sequenciamento ou para preparar a mistura condicionadora para aumentar a eficiência da clusterização no sequenciamento.

Se você estiver seguindo o fluxo de trabalho NovaSeq Xp para carregar as bibliotecas diretamente na lâmina de fluxo, suplemente cada kit de reagentes com um kit NovaSeq Xp. Cada kit NovaSeq Xp é composto dos materiais de consumo a seguir.



OBSERVAÇÃO

Os materiais de consumo DPX1 e DPX2 podem ser identificados como JPX1 e JPX2. Ambos são compatíveis com kits de reagentes v1.0 ou v1.5.

Tabela 10 Materiais de consumo em um kit NovaSeq Xp

Material de consumo (um de cada)	Finalidade
DPX1/JPX1	Preparação do ExAmp Master Mix.
DPX2/JPX2	
DPX3	
Coletor do NovaSeq Xp	Carregar bibliotecas na lâmina de fluxo.

Orientações para água aprovada para uso em laboratório

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

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

Equipamento

Item	Origem
Congelador, -25 °C a -15 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Cilindro graduado, 500 ml, estéril	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Balde de gelo	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipeta, 1000 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Refrigerador, 2 °C a 8 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Banheira, banhos-maria*	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
[Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp] Plataforma da lâmina de fluxo NovaSeq Xp	Illumina, n.º do catálogo 20021663

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

Capítulo 4 Fluxo de trabalho padrão: preparação dos materiais de consumo

Métodos	30
Descongelar cartuchos de SBS e de cluster	30
Esvaziar frascos de reagente usados	31
Preparar a lâmina de fluxo	33
Agrupar e desnaturar bibliotecas para o sequenciamento	33

Métodos

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

Tabela 11 Requisitos mínimos de software

Lâmina de fluxo	Versão mínima do software do kit de reagentes v1.0	Versão mínima do software do kit de reagentes v1.5
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Todas	1.7
S4	1.2.0	1.7

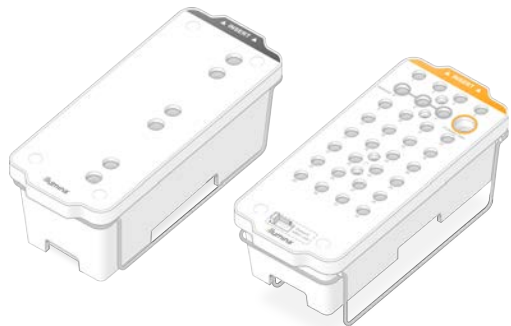
- ▶ Verifique se você tem os equipamentos e os materiais de consumo necessários. Consulte *Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário* na página 26.
- ▶ Sempre verifique a etiqueta ao preparar materiais de consumo para garantir a compatibilidade entre os componentes. Não misture nem combine os componentes SP, S1, S2 e S4.
- ▶ Não misture versões do kit de reagentes.
 - ▶ Os cartuchos de SBS e CPE v1.0 só devem ser emparelhados juntos.
 - ▶ Os cartuchos de SBS e CPE v1.5 só devem ser emparelhados juntos.
- ▶ Siga as instruções na ordem mostrada, usando os volumes, as concentrações, as temperaturas e as durações especificadas.
- ▶ A menos que um ponto de parada esteja especificado nas instruções, prossiga imediatamente para a etapa seguinte.

Descongelar cartuchos de SBS e de cluster

- 1 Se uma execução de sequenciamento estiver em andamento, certifique-se de que ambos os lados do instrumento estejam disponíveis quando o descongelamento estiver concluído.
- 2 Remova os cartuchos de SBS e de cluster do armazenamento de -15 °C a -25 °C.

- Coloque cada cartucho em um rack de descongelamento com fios. Os racks são fornecidos com o instrumento e evitam que ele vire no banho-maria.

Figura 12 Cartuchos em racks de descongelamento com fios



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



CUIDADO

Usar água quente para descongelar os reagentes pode causar redução na qualidade dos dados ou falha na execução.

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

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

Esvaziar frascos de reagente usados

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

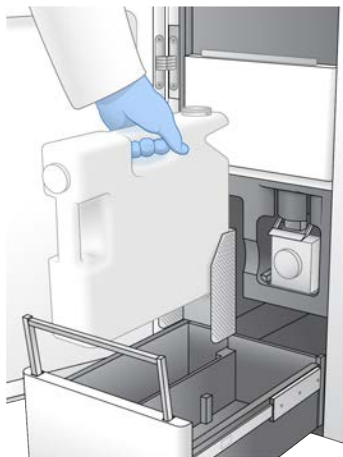


ADVERTÊNCIA

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

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

Figura 13 Devolver o frasco vazio



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



ADVERTÊNCIA

O não esvaziamento dos frascos de reagente usados pode resultar no encerramento de uma execução e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

Preparar a lâmina de fluxo

- 1 Retire um novo pacote da lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- 2 Coloque o pacote da lâmina de fluxo à parte em temperatura ambiente por 10–15 minutos até a lâmina de fluxo atingir a temperatura ambiente.
Use a lâmina de fluxo em até 12 horas após a respectiva remoção do pacote.

Agrupar e desnaturar bibliotecas para o sequenciamento

A concentração de carga pode variar dependendo dos métodos de preparação, quantificação e normalização da biblioteca. Para obter instruções, consulte o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351). Quando a biblioteca agrupada estiver pronta, vá para [Preparar os cartuchos de SBS e de cluster na página 43](#).



CUIDADO

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

Preparar os cartuchos de SBS e de cluster

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

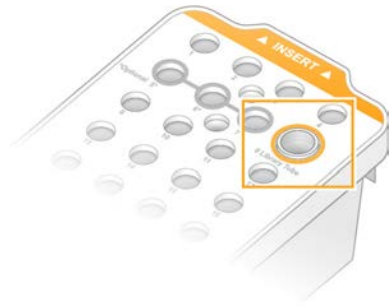
Preparar primers personalizados

Se sua biblioteca precisar de primers personalizados, prepare-os segundo as instruções do Guia de primers personalizados da série NovaSeq (documento n.º 1000000022266).

Carregar tubo da biblioteca

- 1 Sem perturbar a biblioteca na parte inferior, insira o tubo da biblioteca destampado que contém o pool de bibliotecas desnaturadas e diluídas na posição do **tubo da biblioteca** (n.º 8) do cartucho de cluster.

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



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

Resumo do fluxo de trabalho NovaSeq Xp	35
Métodos	36
Descongelar cartuchos de SBS e de cluster	36
Esvaziar frascos de reagente usados	37
Preparar a lâmina de fluxo	39
Descongelar os reagentes ExAmp	39
Agrupar, desnaturar e carregar bibliotecas para o sequenciamento	39

Resumo do fluxo de trabalho NovaSeq Xp

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

Tabela 12 Requisitos mínimos de software

Lâmina de fluxo	Versão mínima do software do kit de reagentes v1.0	Versão mínima do software do kit de reagentes v1.5
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Todas	1.7
S4	1.2.0	1.7



OBSERVAÇÃO

O NVCS oferece suporte ao início escalonado de novas execuções. Consulte *Início escalonado de execuções* na página 52.

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



OBSERVAÇÃO

As etapas 1 a 4 podem ser concluídas em paralelo e devem ser concluídas antes da etapa 5.

- 1 Descongele os cartuchos SBS e de cluster.
- 2 Esvazie frascos de reagente usados.
- 3 Coloque o pacote da lâmina de fluxo à parte por 10–15 minutos até a lâmina de fluxo atingir a temperatura ambiente. Use a lâmina de fluxo em até 12 horas após a respectiva remoção do pacote.
- 4 Normalize e agrupe as bibliotecas e, opcionalmente, adicione controle de PhiX segundo o protocolo apropriado para suas bibliotecas, de acordo com o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351).



OBSERVAÇÃO

Execute as etapas 5 a 11 na ordem especificada.

- 5 Descongele os reagentes ExAmp.
- 6 Prepare uma diluição fresca de NaOH de acordo com o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351).

- 7 Desnature e neutralize o pool de bibliotecas de acordo com o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351).
- 8 Prepare a lâmina de fluxo e a plataforma.
- 9 Prepare o ExAmp master mix.
- 10 Carregue a mistura ExAmp/biblioteca na lâmina de fluxo.
- 11 Carregue um tubo de biblioteca vazio na posição n.º 8 do cartucho de cluster.

Métodos

- ▶ Verifique se você tem os equipamentos e os materiais de consumo necessários. Consulte *Materiais de consumo e equipamentos fornecidos pelo usuário* na página 26.
- ▶ Certifique-se de que o instrumento esteja ligado e tenha espaço de armazenamento suficiente para a execução. Consulte *Gerenciamento de processos* na página 9.
- ▶ Certifique-se de que a limpeza automática após a execução em ambos os lados do instrumento esteja concluída antes de iniciar a etapa *Descongelar os reagentes ExAmp* do *Resumo do fluxo de trabalho NovaSeq Xp* na página 35.
- ▶ Sempre verifique a etiqueta ao preparar materiais de consumo para garantir a compatibilidade entre os componentes. Não misture componentes SP, S1, S2 e S4 ou componentes de duas cavidades e quatro cavidades em um lado do instrumento.
- ▶ Não misture versões do kit de reagentes.
 - ▶ Os cartuchos de SBS e CPE v1.0 só devem ser emparelhados juntos.
 - ▶ Os cartuchos de SBS e CPE v1.5 só devem ser emparelhados juntos.
- ▶ Siga as instruções na ordem mostrada, usando os volumes, as temperaturas e as durações especificadas.
- ▶ Quando não estiver misturando ativamente, coloque todos os reagentes e bibliotecas em gelo.
- ▶ A menos que um ponto de parada esteja especificado nas instruções, prossiga imediatamente para a etapa seguinte.
- ▶ Para iniciar o sequenciamento com sucesso em uma lâmina de fluxo de duas cavidades, ambas as cavidades devem estar cheias. Para iniciar o sequenciamento com sucesso em uma lâmina de fluxo de quatro cavidades, uma cavidade deve estar parcialmente cheia ou vazia.
- ▶ As causas mais comuns de variações nos resultados quando os reagentes ExAmp são misturados manualmente são a distribuição inexata dos volumes dos componentes ExAmp e mistura insuficiente. Não misture de forma insuficiente.



OBSERVAÇÃO

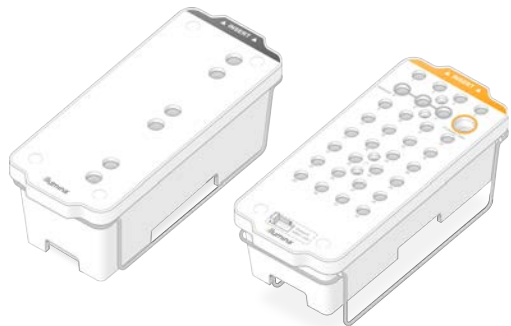
Inicie a execução de sequenciamento imediatamente após o carregamento de bibliotecas na lâmina de fluxo, preferencialmente em até 30 minutos.

Descongelar cartuchos de SBS e de cluster

- 1 Se uma execução de sequenciamento estiver em andamento, certifique-se de que ambos os lados do instrumento estejam disponíveis quando o descongelamento estiver concluído.
- 2 Remova os cartuchos de SBS e de cluster do armazenamento de -15 °C a -25 °C.

- Coloque cada cartucho em um rack de descongelamento com fios. Os racks são fornecidos com o instrumento e evitam que ele vire no banho-maria.

Figura 15 Cartuchos em racks de descongelamento com fios



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



CUIDADO

Usar água quente para descongelar os reagentes pode causar redução na qualidade dos dados ou falha na execução.

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

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

Esvaziar frascos de reagente usados

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



ADVERTÊNCIA

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

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

Figura 16 Devolver o frasco vazio



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



ADVERTÊNCIA

O não esvaziamento dos frascos de reagente usados pode resultar no encerramento de uma execução e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

Preparar a lâmina de fluxo

- 1 Retire um novo pacote da lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
- 2 Coloque o pacote da lâmina de fluxo à parte em temperatura ambiente por 10–15 minutos até a lâmina de fluxo atingir a temperatura ambiente.
Use a lâmina de fluxo em até 12 horas após a respectiva remoção do pacote.

Descongelar os reagentes ExAmp

- 1 Remova um tubo de cada reagente DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3 do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
- 2 Descongele em temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 3 Reserve em gelo.



OBSERVAÇÃO

Se você precisar congelar novamente reagentes ExAmp que não foram abertos, faça isso imediatamente depois de descongelá-los. Os reagentes ExAmp só podem ser congelados novamente uma vez. Resíduos de reagentes não podem ser congelados nem combinados.

Agrupar, desnaturar e carregar bibliotecas para o sequenciamento

A concentração de carga pode variar dependendo dos métodos de preparação, quantificação e normalização da biblioteca. Para obter instruções, consulte o Guia de desnaturação e diluição NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000106351). Quando a biblioteca agrupada estiver pronta, vá para *Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma*, na página 39.

Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma.

- 1 Coloque a plataforma de lâmina de fluxo em uma superfície plana. Mantenha a lâmina de fluxo nivelada até ser carregada no instrumento.
- 2 Inspeccione a plataforma e certifique-se de que ela esteja livre de material particulado.
- 3 Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície de vidro da lâmina de fluxo.
- 4 Com a embalagem metálica da lâmina de fluxo sobre uma superfície plana, abra-a pela ponta com vedação angular.
- 5 Remova o retentor plástico transparente que cobre a lâmina de fluxo.
- 6 Remova a lâmina de fluxo da embalagem. Segure a lâmina de fluxo pelas laterais para evitar tocar o vidro ou as vedações inferiores.
- 7 Se houver material particulado visível em cada uma das superfícies do vidro, limpe a respectiva superfície com uma compressa sem fiapos com álcool e seque com um lenço para laboratório com poucos fiapos.
- 8 Descarte o pacote adequadamente.

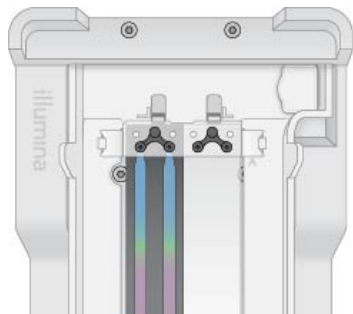


OBSERVAÇÃO

Alguns arranhões e outros defeitos cosméticos menores na lâmina de fluxo são normais e não devem comprometer a qualidade dos dados e o rendimento. A Illumina recomenda usar essas lâminas de fluxo da forma normal.

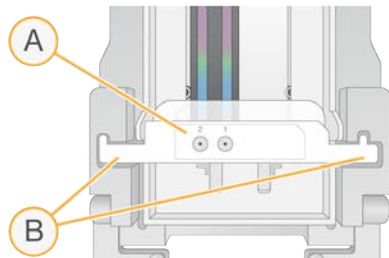
- 9 Inverta a lâmina de fluxo para que a superfície superior fique virada para **baixo**.
- 10 Deslize a extremidade de saída da lâmina de fluxo debaixo do suporte e coloque-a sobre a plataforma. Consulte *Lâmina de fluxo na página 13* e *Plataforma para lâminas de fluxo NovaSeq Xp na página 17*.

Figura 17 Colocação da lâmina de fluxo



- 11 Com os poços virados para cima, carregue o coletor do NovaSeq Xp acima da extremidade de entrada da lâmina de fluxo. Certifique-se de que os braços do coletor do NovaSeq Xp se encaixem firmemente nas ranhuras da plataforma.

Figura 18 Colocação do coletor do NovaSeq Xp



- A Poços do coletor do NovaSeq Xp virados para cima
- B Braços do coletor do NovaSeq Xp nas ranhuras da plataforma

- 12 Feche a fixação para prender a lâmina de fluxo e o coletor do NovaSeq Xp e vede as juntas.
- 13 Descarte o coletor do NovaSeq Xp depois de carregar os pools das bibliotecas na lâmina de fluxo. O coletor do NovaSeq Xp é somente para uso único.

Preparar o ExAmp master mix

Quando preparar o ExAmp master mix, use um tubo de microcentrífuga que acomode pelo menos duas vezes o volume necessário:

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

As causas mais comuns de variação nos resultados quando os reagentes ExAmp são misturados manualmente são a distribuição inexacta dos volumes e mistura insuficiente. Não misture de forma insuficiente.



OBSERVAÇÃO

Os materiais de consumo DPX1 e DPX2 podem ser identificados como JPX1 e JPX2. Ambos são compatíveis com kits de reagentes v1.0 ou v1.5.

- 1 Inverta ou agite ligeiramente para misturar DPX1/JPX1 e DPX2/JPX2.
- 2 Agite ligeiramente o DPX3 para misturar.
Os reagentes ExAmp podem ter se separado durante o armazenamento. Eles são viscosos, principalmente DPX2/JPX2 e DPX3. O DPX3 não mistura com facilidade quando invertido, devido à sua viscosidade.
- 3 Centrifugue brevemente DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3.
- 4 Combine os seguintes volumes em um tubo de microcentrifuga adequado na ordem especificada.

Ordem de adição	Reagente*	Volume para lâminas de fluxo de duas cavidades (SP/S1/S2) (µl)	Volume para lâminas de fluxo de quatro cavidades (S4) (µl)
1	DPX1/JPX1	126	315
2	DPX2/JPX2	18	45
3	DPX3	66	165

*As tampas dos tubos de reagente DPX/JPX podem ser codificadas por cores (vermelho, amarelo e azul para DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 e DPX3, respectivamente). Preserve a codificação de cores ao substituir as tampas dos tubos.

Esses volumes originam 210 µl de ExAmp master mix para o modo SP, S1 ou S2, ou 525 µl de Master Mix para o modo S4. Esses volumes são suficientes para o modo aplicável. É incluído um volume adicional para compensar erros de pipetagem quando as bibliotecas forem carregadas na lâmina de fluxo.

- 5 Pipete e distribua lentamente para evitar a formação de bolhas e se certificar de que todo o volume seja expelido pela ponta.
- 6 Agite por 20–30 segundos ou até que a solução esteja completamente misturada.



OBSERVAÇÃO

O ExAmp master mix é estável ao ser agitado.

A mistura pode ter uma aparência turva, o que é normal.

- 7 Centrifugue até 280 × g por até um minuto.
- 8 **Para um melhor desempenho no sequenciamento, vá imediatamente para a próxima etapa. Se necessário, o armazenamento ideal do master mix é de até uma hora em gelo. Use em até 30 minutos se o armazenamento for na temperatura ambiente.**

Carregar bibliotecas na lâmina de fluxo.

Para melhores resultados, faça o seguinte:

- ▶ Mantenha a lâmina de fluxo carregada em temperatura ambiente. Não refrigere nem coloque em gelo.
- ▶ A incubação prolongada pode reduzir o percentual de clusters que passam pelo filtro (%PF).
- ▶ Inicie a execução em até 30 minutos a contar do carregamento dos pools de biblioteca na lâmina de fluxo.
- ▶ O uso imediato da mistura ExAmp/biblioteca fornece os melhores resultados.

- 1 Adicione ExAmp Master Mix a cada pool de bibliotecas desnaturadas conforme descrito a seguir e agite por 20–30 segundos para misturar.
Se estiver usando tiras de tubos, pipete para misturar até que a solução fique homogênea.

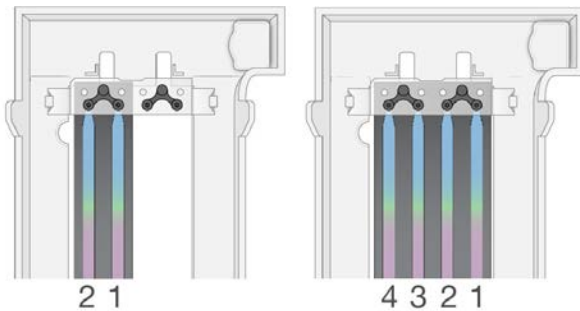
Modo	Pool de bibliotecas desnaturadas (µl)	ExAmp Master Mix (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 2 Centrifugue até 280 × g por até um minuto.
- 3 Usando uma pipeta de 200 µl, adicione o volume apropriado de mistura ExAmp/biblioteca a cada poço do coletor do NovaSeq Xp.
 - ▶ Para evitar a criação de bolhas, carregue as amostras lentamente.
 - ▶ Certifique-se de adicionar a mistura de pool de bibliotecas ao poço que corresponde à cavidade prevista.
 - ▶ Evite contato com o filtro no fundo do poço durante a pipetagem.
 - ▶ Não é necessário esperar que a cavidade esteja totalmente cheia antes de adicionar a mistura aos demais poços do coletor.

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

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

Figura 19 Numeração invertida da cavidade



- 4 Depois de adicionar a mistura ExAmp/biblioteca a todos os poços do coletor, aguarde cerca de 2 minutos para que a mistura atinja a extremidade oposta de cada cavidade.
É normal o surgimento de uma pequena bolha de ar na extremidade de saída da cavidade. Um pequeno volume da mistura poderá permanecer nos poços do coletor depois que a cavidade estiver cheia.



CUIDADO

Não incline a lâmina de fluxo quando tentar determinar se as cavidades estão cheias ou se houver bolhas. Isso pode causar vazamento da mistura ExAmp/biblioteca da lâmina de fluxo. Se uma cavidade não estiver totalmente cheia, não tente corrigi-la. O rendimento dos dados da cavidade parcialmente preenchida pode ser reduzido. Não tente retirar a amostra da lâmina de fluxo.



OBSERVAÇÃO

Não incline a lâmina de fluxo quando transportá-la.

Preparar os cartuchos de SBS e de cluster

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

Preparar primers personalizados

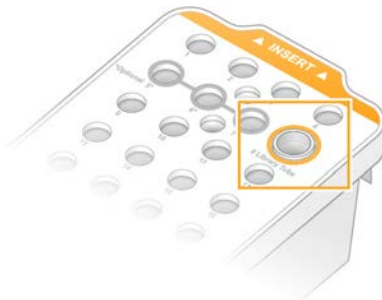
Se sua biblioteca precisar de primers personalizados, prepare-os segundo as instruções do Guia de primers personalizados da série NovaSeq (documento n.º 1000000022266).

Carregar tubo de biblioteca vazio

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

O tubo de biblioteca vazio deve estar presente para a leitura do RFID e a mistura de reagentes dentro do aparelho. O código de barras do tubo da biblioteca não confere com o código de barras especificado no arquivo LIMS. O RFID é validado para garantir que o tubo não tenha sido usado.

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



Capítulo 6 Sequenciamento

Configurar uma execução de sequenciamento	44
Monitorar o andamento da execução	50
Início escalonado de execuções	52
Excluir a execução	53
Remover a posição n.º 30	53
Limpeza automática após a execução	54

Configurar uma execução de sequenciamento

A Illumina recomenda que você permaneça conectado enquanto o NVCS está sendo executado e durante uma execução de sequenciamento.

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



OBSERVAÇÃO

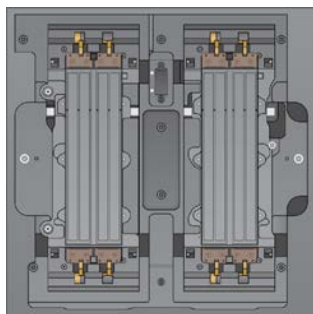
O início escalonado de novas execuções é compatível. O temporizador do início escalonado indica quando uma execução escalonada pode ser iniciada. Para obter mais informações, consulte *Início escalonado de execuções* na página 52.

- 2 Na tela Home (Início), selecione **Sequence** (Sequência) e, em seguida, selecione uma execução de lâmina de fluxo simples ou dupla:
 - ▶ **A+B** — configura uma execução de lâmina de fluxo duplo.
 - ▶ **A** — configura uma execução de lâmina de fluxo simples no lado A.
 - ▶ **B** — configura uma execução de lâmina de fluxo simples no lado B.O software inicia a série de telas de configuração de execução, começando com Load (Carregar).
- 3 Selecione **OK** para reconhecer o aviso e abrir a porta da lâmina de fluxo.

Carregar a lâmina de fluxo no instrumento

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

Figura 21 Estágio da lâmina de fluxo



- 3 **[Fluxo de trabalho padrão]** Remova a lâmina de fluxo da embalagem como mostrado a seguir.

- a Coloque um novo par de luvas sem pó para evitar contaminar a superfície de vidro da lâmina de fluxo.
- b Com o pacote sobre uma superfície plana, abra pela ponta com vedação angular.
- c Remova o retentor plástico transparente que cobre a lâmina de fluxo.
- d Remova a lâmina de fluxo da embalagem. Segure a lâmina de fluxo pelas laterais para evitar tocar o vidro ou as vedações inferiores.
- e Se houver material particulado visível em cada uma das superfícies do vidro, limpe a respectiva superfície com uma compressa sem fiapos com álcool e seque com um lenço para laboratório com poucos fiapos.
- f Descarte o pacote adequadamente.

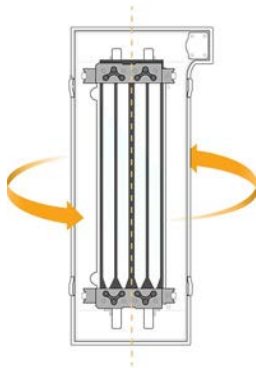


OBSERVAÇÃO

Alguns arranhões e outros defeitos cosméticos menores na lâmina de fluxo são normais e não devem comprometer a qualidade dos dados e o rendimento. A Illumina recomenda usar essas lâminas de fluxo da forma normal.

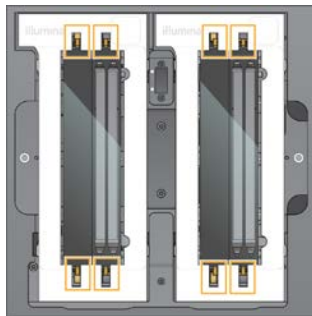
- 4 **[Fluxo de trabalho NovaSeq Xp]** Descarregue a lâmina de fluxo da plataforma conforme indicado a seguir.
 - a Abra a fixação que prende a lâmina de fluxo e o coletor.
 - b Sem deixar cair líquido na lâmina de fluxo, remova o coletor cuidadosamente e descarte-o.
 - c Se cair líquido na lâmina de fluxo, limpe com um pano sem fiapos com álcool e seque com um lenço para laboratório sem fiapos.
 - d Segure firmemente os lados da lâmina de fluxo para removê-la da plataforma. Mantenha a lâmina de fluxo nivelada.
 - e Se houver material residual nas juntas, seque as quatro juntas da lâmina de fluxo com um tecido sem fiapos. Não toque nas juntas.
 - f Inverta a lâmina de fluxo em torno do eixo longitudinal para que a superfície superior fique virada para cima.

Figura 22 Inverter a lâmina de fluxo em torno do eixo longitudinal



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

Figura 23 Lâminas de fluxo carregadas alinhadas sobre fixações



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

Carregar os cartuchos de SBS e de cluster



OBSERVAÇÃO

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

- 1 Abra as portas de compartimentos de líquidos e, em seguida, abra a porta do refrigerador de reagentes.
- 2 Remova os cartuchos usados de SBS e de cluster.
Os cartuchos usados têm selos de alumínio perfurados.
- 3 Descarte o conteúdo não utilizado de acordo com as normas aplicáveis.
Para um descarte seguro de posição n.º 30 do cartucho de cluster, consulte *Remover a posição n.º 30 na página 53*.
- 4 Carregue os cartuchos preparados na gaveta de refrigerador de reagentes de modo que as etiquetas **Insert** (Inserir) fiquem voltadas para a traseira do instrumento:
 - ▶ Coloque o cartucho de SBS (etiqueta cinza) na posição esquerda.
 - ▶ Coloque o cartucho de cluster (etiqueta laranja) que contém o tubo da biblioteca destampado na posição direita.

Figura 24 Cartuchos de reagente carregados

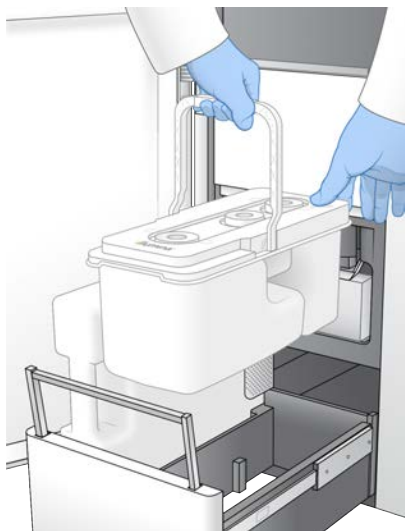


- 5 Deslize a gaveta para dentro do refrigerador e, em seguida, feche a porta do refrigerador de reagentes. Os sensores e os RFIDs são verificados. As identificações do tubo da biblioteca e os dois cartuchos são exibidos na tela.

Carregar o cartucho de solução tampão

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

Figura 25 Carregar o cartucho de solução tampão



- 4 Se ambos os frascos de reagentes tiverem sido esvaziados, marque a caixa de seleção que informa que ambos os frascos de reagente usados estão vazios.



ADVERTÊNCIA

O não esvaziamento dos frascos de reagente usados pode resultar no encerramento de uma execução e em transbordamento, o que prejudica o instrumento e representa um risco de segurança.

- 5 Selecione o botão disponível:
 - ▶ **Log In** (Fazer login) — abre a tela Log In (Fazer login) para acessar o BaseSpace Sequence Hub. Prossiga para [Acessar o BaseSpace Sequence Hub](#).
 - ▶ **Run Setup** (Configuração da execução) — pula o BaseSpace Sequence Hub e abre a tela Run Setup (Configuração da execução) para inserção dos parâmetros. Prossiga para [Inserir parâmetros de execução na página 48](#).

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

Acessar o BaseSpace Sequence Hub

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

- 1 **[Opcional]** Atualize as configurações do BaseSpace Sequence Hub para a execução atual:

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

Inserir parâmetros de execução

- 1 Se o fluxo de trabalho NovaSeq Xp estiver habilitado, selecione um tipo de fluxo de trabalho.
 - ▶ Se você selecionar **NovaSeq Xp**, certifique-se de que um tubo de biblioteca vazio esteja carregado.
 - ▶ Se você selecionar **NovaSeq Standard** (NovaSeq padrão), certifique-se de que a amostra esteja carregada no tubo da biblioteca.
- 2 No campo Run Name (Nome da execução), digite um nome de sua preferência para identificar a execução atual.
O nome da execução pode conter caracteres alfanuméricos, hifens e sublinhados.
- 3 Insira o número de ciclos para cada leitura e a duração do índice da execução de sequenciamento. Não existe um número máximo de ciclos de índice, mas a soma dos ciclos de leitura com os ciclos de índice deve ser menor do que o número de ciclos do kit.
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — Insira um valor até 151 ciclos para kits de 300 ciclos v1.0 ou até 251 para kits de 500 ciclos v1.0. Insira um valor até 159 ciclos para kits de 300 ciclos v1.5 ou até 259 para kits de 500 ciclos v1.5.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1) — Insira o número de ciclos para o primer do Índice 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Índice 2) — Insira o número de ciclos para o primer do Índice 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — Insira um valor até 151 ciclos para kits de 300 ciclos v1.0 ou até 251 para kits de 500 ciclos v1.0. Insira um valor até 159 ciclos para kits de 300 ciclos v1.5 ou até 259 para kits de 500 ciclos v1.5. Este valor é normalmente igual ao valor da Leitura 1.



OBSERVAÇÃO

O número de ciclos analisados na Leitura 1 e na Leitura 2 é um ciclo menor do que o valor inserido. Por exemplo, para realizar uma execução de 150 ciclos do tipo paired-end (execução de 2 x 150 bp), digite o valor de 151 ciclos para a Leitura 1 e a Leitura 2.

Para kits v1.0, a soma dos quatro valores inseridos pode ultrapassar o número indicado de ciclos para o kit de reagentes selecionado em até 23 ciclos para execuções do tipo paired-end e 30 ciclos para execuções de leitura única.

Para kits v1.5, a soma dos quatro valores inseridos pode ultrapassar o número indicado de ciclos para o kit de reagentes selecionado em até 38 ciclos para execuções do tipo paired-end e execuções de leitura única.

O kit S4 de 35 ciclos contém um total de 72 ciclos de sequenciamento. A soma dos quatro valores pode ultrapassar o número indicado em um máximo de 37 ciclos. Os valores de leitura padrão são editáveis e o número de ciclos pode ser distribuído por quatro leituras, p. ex., 36, 10, 10, 0.

- 4 Expanda **Advanced Options** (Opções avançadas) para aplicar as configurações à execução atual. Essas configurações são opcionais, exceto quando indicado.
 - ▶ **v1.0 Custom Primers** (Primers personalizados v1.0) — marque a caixa de seleção **Custom Primers** (Primers personalizados) e, em seguida, marque as caixas de seleção apropriadas: A preparação de DNA PCR-Free e bibliotecas de tagmentação da Illumina requerem o primer de sequenciamento de Leitura 1 personalizado (VP10) se estiverem sendo usados kits v1.0. Consulte o Guia de primers personalizados da série NovaSeq (documento n.º 1000000022266).
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — usar o primer personalizado para a Leitura 1.
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — usar o primer personalizado para a Leitura 2.
 - ▶ **Custom Index** (Índice personalizado) — usar o primer personalizado para o Índice 1.
 - ▶ **v1.5 Custom Primers** (Primers personalizados V1.5) — marque a caixa de seleção **Custom Primers** (Primers personalizados) e, em seguida, marque as caixas de seleção apropriadas: a preparação de DNA PCR-Free e bibliotecas de tagmentação da Illumina não requerem primer de sequenciamento personalizado se estiverem sendo usados kits v1.5. Consulte o Guia de primers personalizados da série NovaSeq (documento n.º 1000000022266).
 - ▶ **Read 1** (Leitura 1) — usar o primer personalizado para a Leitura 1.
 - ▶ **Read 2** (Leitura 2) — usar o primer personalizado para a Leitura 2.
 - ▶ **Custom Index** (Índice personalizado) — usar o primer personalizado para leituras de Índice 1 e Índice 2.
 - ▶ **Pasta de saída** — selecione **Browse** (Procurar) para alterar a pasta de saída para a execução atual. Uma pasta de saída é necessária quando a execução não está conectada ao BaseSpace Sequence Hub para armazenamento.
 - ▶ **Samplesheet** (Planilha de amostras) — selecione **Browse** (Procurar) para fazer upload de uma planilha de amostras, que é necessária ao usar o BaseSpace Sequence Hub para o monitoramento e armazenamento de execuções ou outro arquivo CSV. O arquivo CSV é copiado para a pasta de saída e não afeta os parâmetros de execução. Certifique-se de que a planilha de amostras obtida por upload esteja no formato adequado (direção do adaptador da Leitura de índice 2) com base nos fluxos de trabalho v1.0 e v1.5 que usam diferentes estratégias. O fluxo de trabalho da fita direta é executado com kits de reagentes v1.0. O fluxo de trabalho do complemento reverso é executado por kits de reagentes v1.5.
 - ▶ **Custom Recipe** (Receita personalizada) — selecione **Custom Recipe** (Receita personalizada) e depois **Browse** (Procurar) para usar uma receita personalizada em formato XML para esta execução. Receitas personalizadas para v1.0 não serão compatíveis com a v1.5. Entre em contato com o Suporte técnico da Illumina para obter mais informações.



OBSERVAÇÃO

Não existe compatibilidade para a mudança das etapas de clusterização em uma receita personalizada.

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

Confirmar parâmetros de execução

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

Analisar as verificações pré-execução

- 1 Aguarde cerca de 5 minutos até que as verificações pré-execução sejam concluídas.
A execução é iniciada automaticamente após uma conclusão bem-sucedida.



OBSERVAÇÃO

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

- 2 Se as verificações pré-execução falharem devido a um erro do sensor, como lâmina de fluxo não detectada, você precisará sair e reiniciar o fluxo de trabalho.
- 3 Para outras falhas na verificação pré-execução, selecione **Retry** (Repetir) para reiniciar a verificação com falha ou **Retry All** (Repetir tudo) para reiniciar todas as verificações.
A presença de erros exige resolução antes do início da execução. Consulte *Erros de verificação antes da execução na página 61* para informações sobre solução de problemas.
- 4 Selecione o ícone **Error** (Erro) para ver os detalhes do erro.
- 5 Se a verificação de alinhamento falhar, resolva o erro conforme a seguir.
 - a Selecione **Reload** (Recarregar) e, em seguida, selecione **OK** para confirmar o retorno à tela Load (Carregar).
 - b Remova todos os itens da parte de cima do instrumento e, em seguida, selecione **OK**.
 - c Recarregue a lâmina de fluxo e, em seguida, selecione **Run Setup** (Configuração de execução).
 - d Continue em cada tela para reler todos os RFIDs e retorne à tela Pre-Run Checks (Verificação pré-execução).
 - e Refaça a verificação.

Monitorar o andamento da execução

- 1 Monitore o progresso, as intensidades e as pontuações de qualidade da execução conforme as medidas são exibidas na tela.
Para obter mais informações sobre métricas de execução, consulte *Real-Time Analysis na página 66*.

Figura 26 Progresso e medidas de execução de sequenciamento



- A **Time to completion** (Hora da conclusão) — a data e a hora da conclusão da execução (aaaa-mm-dd hh:mm).
- B **Run progress** (Progresso da execução) — a etapa atual da execução. O tamanho da barra de progresso não é proporcional à taxa de execução de cada etapa.
- C **Q-Scores** — a distribuição das classificações de qualidade (Q-Scores).
- D **Intensity** (Intensidade) — o valor das intensidades de cluster do 90^o percentil para cada bloco. As cores do gráfico indicam os canais vermelho e verde.
- E **Clusters passing filter (%)** (Passagem de clusters pelo filtro) — a porcentagem da passagem de clusters pelo filtro.
- F **Projected Total Yield (Gb)** (Rendimento total projetado (Gb)) — o rendimento projetado para a execução FC. Se as métricas por cavidade forem selecionadas (H), os números exibidos indicarão o rendimento atual por cavidade e serão atualizados para cada ciclo durante a execução.
- G **Q30** — a porcentagem de identificações de bases para a execução que tiverem um Q-Score ≥ 30 .
- H **Per lane breakdown** (Detalhes por cavidade) — a seleção dos valores nos itens E, F e G exibirão um detalhamento de dados por cavidade para cada um desses campos.



OBSERVAÇÃO

Se ocorrer um desligamento ou reinício enquanto o NVCS estiver em execução, o usuário deverá confirmar esta ação antes que o desligamento ou reinício continue.

Medidas da execução

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

A clusterização leva cerca de duas horas; em seguida, o sequenciamento é iniciado com o ciclo 1. As métricas são atualizadas com o andamento do sequenciamento. A passagem de clusters pelo filtro, o rendimento e as pontuações de qualidade estão disponíveis após o ciclo 26. Antes do ciclo 26, não há valores preenchidos e é exibida a designação N/A.

Status de processamento

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

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

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

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

Início escalonado de execuções

Você pode configurar e iniciar uma execução no lado ocioso do instrumento enquanto uma execução está em andamento no outro lado. Isso é denominado início escalonado. Execuções escalonadas são configuradas em ocasiões específicas durante uma execução, segundo indicado pelos seguintes estados do temporizador de contagem regressiva do início.

- ▶ **Run Start: Available** (Início da execução: disponível) — o início escalonado está disponível, no momento. A data e a hora são exibidas quando o início escalonado fica indisponível. Selecione **Sequence** (Sequência) para iniciar uma nova execução escalonada após a conclusão do ciclo atual.
- ▶ **Run Start: Unavailable** (Início da execução: indisponível) — o início escalonado está indisponível, no momento. A data e a hora são exibidas quando o início escalonado fica disponível no outro lado do instrumento.
- ▶ **Waiting...** (Esperando...) — se for tentada uma nova execução quando o início escalonado estiver indisponível, o estado mudará para Waiting (Esperando) e a data e a hora mostrarão a hora aproximada em que o instrumento estará pronto para a nova execução. O instrumento executará a configuração da execução quando o início escalonado estiver disponível.

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

Procedimento

- 1 Na tela início, selecione **Sequence** (Sequência) e, em seguida, selecione **A** ou **B**.
O lado selecionado deve ser o lado ocioso, no momento.
- 2 Aguarde até que a execução na lâmina de fluxo adjacente seja pausada. Para cancelar a nova execução e impedir a pausa, selecione **Cancel** (Cancelar).
Se a execução adjacente estiver executando a clusterização, ressíntese do tipo paired-end, geração de imagens ou limpeza, o software concluirá a etapa atual antes da pausa.
- 3 Quando a execução adjacente for pausada e a porta da lâmina de fluxo estiver aberta, configure a nova execução.
Quando a nova execução é iniciada, a execução em pausa é retomada automaticamente e, em seguida, a nova execução começa.

Excluir a execução

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

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

Remover a posição n.º 30

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



ADVERTÊNCIA

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

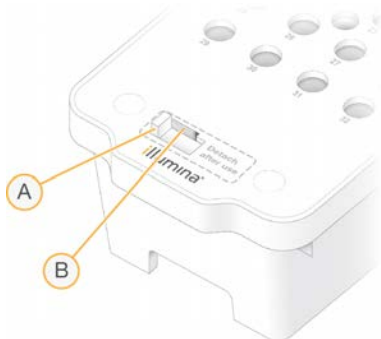
- 1 Usando luvas, empurre para a direita a aba de plástico branca rotulada **Detach after use** (Remover após o uso).
- 2 Coloque uma das mãos ou uma superfície sob o reservatório e pressione a aba de plástico transparente em direção à etiqueta da Illumina para soltar o reservatório de sua posição sob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



OBSERVAÇÃO

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

Figura 27 Posição removível n.º 30



- A Aba de plástico branca para remover
 - B Aba de plástico transparente para soltar
- 3 Descarte o reservatório segundo as normas aplicáveis.

Limpeza automática após a execução

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

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



OBSERVAÇÃO

Se ocorrer um erro durante uma limpeza automática após a execução e se a limpeza após a execução for incompleta, será necessária uma limpeza de manutenção.

Capítulo 7 Manutenção

Manutenção preventiva	55
Realizar uma limpeza de manutenção	55
Atualizações de software	59

Manutenção preventiva

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

Realizar uma limpeza de manutenção

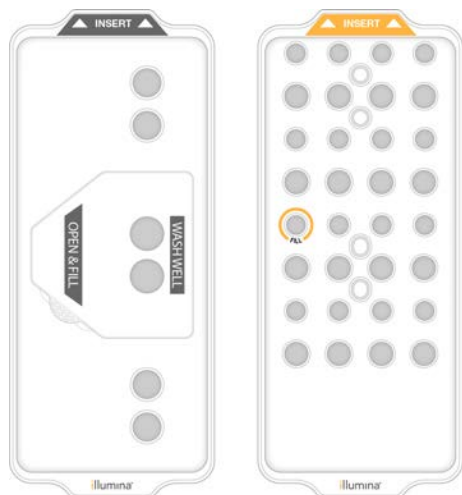
O software solicita uma limpeza de manutenção nas seguintes situações:

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

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

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

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



Preparar a solução de limpeza

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

Figura 29 Poço central cheio até a linha MIN FILL VOLUME (VOLUME DE ENCHIMENTO MÍNIMO)



- 6 Combine os seguintes volumes em um tubo de centrífuga de 30 ml para preparar 20 ml NaOCl 0,25% com grau de reagente:
 - ▶ NaOCl 5% com grau de reagente (1 ml)
 - ▶ Água deionizada (19 ml)

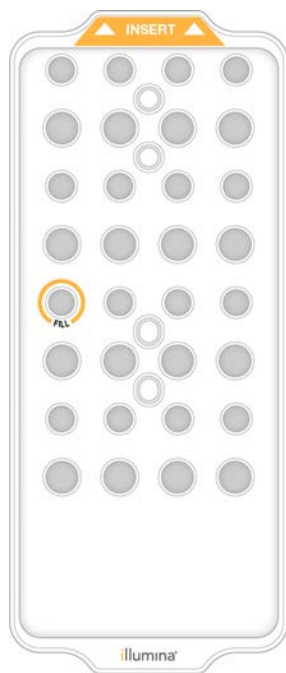


CUIDADO

Use somente NaOCl com grau de reagente. Evite produtos alvejantes de uso geral, que podem conter compostos de amônia, que podem gerar execuções com baixo percentual de leituras que passam pelo filtro.

- 7 Inverta para misturar.
- 8 Adicione 5 ml de NaOCl 0,25% com grau de reagente ao cartucho de limpeza de cluster.
O local é marcado com Fill (Encher) e tem um círculo alaranjado em torno. Todos os outros reservatórios permanecem vazios.

Figura 30 Posição para NaOCl 0,25%



Carregar a lâmina de fluxo de limpeza

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



OBSERVAÇÃO

Uma limpeza de manutenção para um único lado só pode ser iniciada quando o outro lado está ocioso ou executando ciclos de leitura SBS. A hora do início escalonado do NVCS indica a disponibilidade do instrumento para iniciar uma nova execução ou uma limpeza. Consulte *Início escalonado de execuções* na página 52.

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

Carregar os cartuchos de limpeza

Cartuchos de limpeza são necessários para uma limpeza de manutenção. Não utilize cartuchos usados de SBS e de cluster.

- 1 Abra as portas de compartimentos de líquidos e, em seguida, abra a porta do refrigerador de reagentes.
- 2 Remova os cartuchos de reagentes usados de SBS e de cluster. Descarte o conteúdo não utilizado de acordo com as normas aplicáveis.
Para um descarte seguro de posição n.º 30 do cartucho de cluster, consulte *Remover a posição n.º 30 na página 53*.
- 3 Carregue os cartuchos de limpeza na gaveta de refrigerador de reagentes de modo que as etiquetas **Insert** (Inserir) fiquem voltadas para a traseira do instrumento:
 - ▶ Coloque o cartucho de SBS (etiqueta cinza) na posição esquerda.
 - ▶ Coloque o cartucho de cluster (etiqueta laranja) na posição direita.
- 4 Deslize a gaveta para dentro do refrigerador e, em seguida, feche a porta do refrigerador de reagentes. Os sensores são verificados, e o RFID para cada cartucho é digitalizado e exibido na tela.
- 5 Abra a gaveta de solução tampão.
- 6 Se já não estiver presente, carregue um cartucho de solução tampão usado.

Esvaziar frascos de reagente usados

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



ADVERTÊNCIA

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

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

Iniciar a limpeza

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



ADVERTÊNCIA

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

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

Atualizações de software

Estão disponíveis atualizações de software para o NVCS v1.4 ou posterior. As atualizações de software podem ser obtidas por download e instaladas do Control Software. A verificação automática de atualizações de software está ativada por padrão. Você pode ativar ou desativar as atualizações automáticas em Settings (Configurações).



OBSERVAÇÃO

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

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

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

Tabela 13 Requisitos mínimos de software

Lâmina de fluxo	Versão mínima do software do kit de reagentes v1.0	Versão mínima do software do kit de reagentes v1.5
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	Todas	1.7
S4	1.2.0	1.7



OBSERVAÇÃO

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

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

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

Apêndice A Solução de problemas

Recursos de solução de problemas	61
Arquivos de solução de problemas	61
Erros de verificação antes da execução	61
Solução de problemas de gestão de processos	62
Falha de execução antes da clusterização	63
Encerrar uma execução	64
Desligar o instrumento	64

Recursos de solução de problemas

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

Para problemas de qualidade ou de desempenho de execução, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte [Assistência técnica na página 81](#). Para facilitar a solução de problemas, considere compartilhar um link do resumo da execução no BaseSpace Sequence Hub com o suporte técnico da Illumina.

Arquivos de solução de problemas

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

Erros de verificação antes da execução

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

Quando uma verificação de pré-execução falha, os RFIDs para a lâmina de fluxo, os reagentes e as soluções tampão não são bloqueados, de maneira que os materiais de consumo podem ser usados para uma execução subsequente. Quando a execução é iniciada, os aspiradores de líquido perfuram as vedações de alumínio nos cartuchos do reagente e todos os RFIDs são bloqueados.

Verificação do sistema	Motivo da falha	Ação recomendada
Sensores	A porta do compartimento está aberta, um material de consumo não foi colocado corretamente ou pelo menos um sensor não está funcionando.	Selecione Retry (Repetir) e siga as instruções na tela para solucionar o erro.
Espaço em disco	O espaço em disco é insuficiente, pois o local especificado da pasta de saída está cheio.	Use a tela Process Management (Gestão de processos) para liberar espaço em disco do local da pasta de saída especificada.
Conectividade do sistema	Ocorreu uma interrupção na conexão com o RTA3, no sistema fluídico ou em outra conexão.	Selecione Retry (Repetir) e siga as instruções na tela para solucionar o erro.
Alinhamento	A posição da lâmina de fluxo evita a criação de imagens.	Siga as solicitações na tela para recarregar a lâmina de fluxo.

Bandeja de vazamento

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

Durante a verificação pré-execução, os sensores detectam se a bandeja de vazamento contém líquidos:

- ▶ Se a bandeja de vazamento apresentar líquidos, mas não estiver cheia, a execução poderá continuar, mas você deverá entrar em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte [Assistência técnica na página 81](#).
- ▶ Se a bandeja de vazamento estiver cheia, a execução não poderá continuar e você deverá entrar em contato com o suporte técnico da Illumina.



ADVERTÊNCIA

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

Solução de problemas de gestão de processos

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

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

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

Se o ícone N/A continuar a ser exibido após a conclusão da ação para a solução do problema, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Consulte *Assistência técnica* na página 81.

Falha de execução antes da clusterização

Se o software apresentar falha na execução antes de o cluster ser iniciado, você poderá salvar os cartuchos de reagente, o tubo da biblioteca (inclusive a amostra) e, se reutilizada de imediato, a lâmina de fluxo, para uma nova execução. Quando a clusterização começa, os aspiradores de líquidos perfuram as vedações de alumínio e os reagentes são transferidos para o tubo da biblioteca e a lâmina de fluxo. Portanto, os materiais de consumo e as bibliotecas não podem ser usados em outra execução.

Você tem duas opções para a configuração de uma nova execução usando os cartuchos reagentes, o tubo da biblioteca e a lâmina de fluxo preservados da execução que apresentou falha:

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



OBSERVAÇÃO

Para obter os resultados ideais em um fluxo de trabalho NovaSeq Xp, inicie a nova execução o mais rapidamente possível.

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



OBSERVAÇÃO

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

Configurar uma nova execução imediatamente

Se uma execução com falha tiver usado o fluxo de trabalho NovaSeq Xp, inicie a nova execução o mais rapidamente possível.

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

Configurar uma nova execução posteriormente

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

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

Encerrar uma execução

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

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

Desligar o instrumento

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

Em circunstâncias normais, é desnecessário desligar o instrumento.

Um ciclo completo de desligamento e ativação do instrumento deve ser executado sempre que ocorrer um evento de falha do software.

Se ocorrer um desligamento ou reinício enquanto o NVCS estiver em execução, o usuário deverá confirmar esta ação antes que o desligamento ou reinício continue.

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



CUIDADO

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

Apêndice B Real-Time Analysis

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)	66
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	68

Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)

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

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

Entradas do RTA3

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

Saídas do RTA3

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

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

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

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

Tratamento de erros

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

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

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

Blocos da lâmina de fluxo

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

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

Tabela 14 Blocos da lâmina de fluxo

Componente da lâmina de fluxo	SP	S1	S2	S4	Descrição
Cavidades	2	2	2	4	Uma cavidade é um canal físico com portas de entrada e de saída.
Superfícies	1	2	2	2	As lâminas de fluxo S1, S2 e S4 são captadas em duas superfícies: superior e inferior. A imagem da superfície superior de um bloco é captada primeiro. A imagem da lâmina de fluxo SP é captada somente na superfície inferior.
Feixes por cavidade	2	2	4	6	Uma faixa é uma coluna em uma cavidade da lâmina de fluxo que a câmera capta como uma imagem.
Blocos por faixa	78	78	88	78	Um bloco é uma porção de uma faixa e apresenta uma área com imagens na lâmina de fluxo.
Total de blocos gerados	312	624	1.408	3.744	Cavidades × superfícies × faixas × blocos por faixa é igual ao número total de blocos.

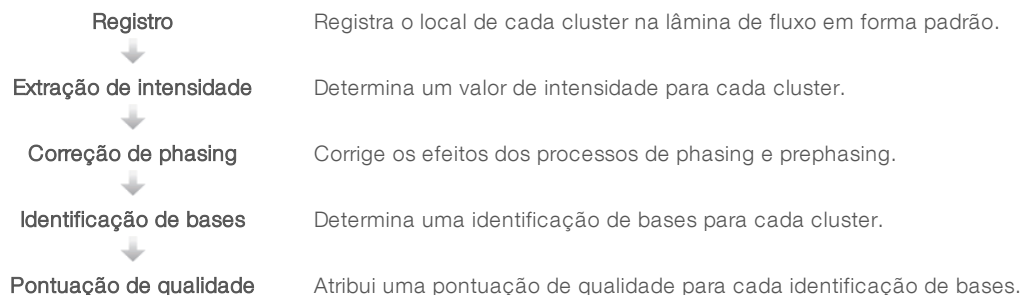
Nomenclatura do bloco

O nome do bloco é um número de cinco dígitos que representa a posição do bloco na lâmina de fluxo. Por exemplo, o nome do bloco 1_1205 indica cavidade 1, superfície superior, faixa 2, bloco 5.

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

Para a lâmina de fluxo SP, o segundo dígito sempre é 2, pois esta lâmina de fluxo só tem a superfície inferior.
- ▶ O terceiro dígito representa o número da faixa:
 - ▶ 1 ou 2 para uma lâmina de fluxo SP ou S1.
 - ▶ 1, 2, 3 ou 4 para uma lâmina de fluxo S2.
 - ▶ 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 para uma lâmina de fluxo S4.
- ▶ Os últimos dois dígitos representam o número do bloco. A numeração começa com 01 na extremidade de saída da lâmina de fluxo e vai até 88 ou 78 na extremidade de entrada.
 - ▶ 01 a 78 para uma lâmina de fluxo SP, S1 ou S4.
 - ▶ 01 a 88 para uma lâmina de fluxo S2.

Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis



Registro

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

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

Extração de intensidade

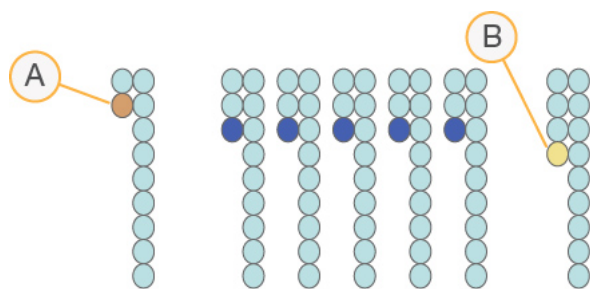
Após o registro, a extração de intensidade calcula um valor de intensidade para cada nanoporo em uma determinada imagem. Se o registro falhar, a intensidade para aquele bloco não poderá ser extraída.

Correção de phasing

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

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

Figura 31 Phasing e prephasing



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

O RTA3 corrige os efeitos do phasing e do prephasing, o que potencializa a qualidade dos dados em cada ciclo ao longo da execução.

Identificação de bases

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

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

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

Figura 32 Visualização de intensidades de clusters

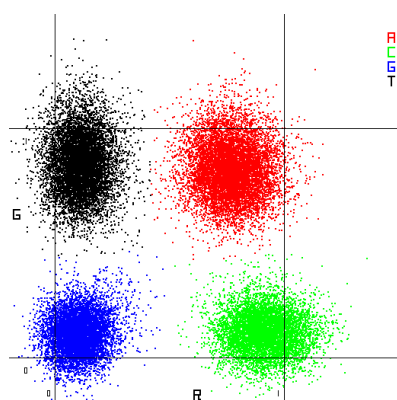


Tabela 15 Identificações de bases em sequenciamento de dois canais

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

Passagem de clusters pelo filtro

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

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

Pontuações de qualidade

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

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

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

Pontuação de qualidade e relatórios

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



OBSERVAÇÃO

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

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

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

Apêndice C Arquivos e pastas de saída

Estrutura da pasta de saída de sequenciamento	71
Arquivos de saída de sequenciamento	72

Estrutura da pasta de saída de sequenciamento

O NVCS gera o nome da pasta de saída automaticamente.


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

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

 **Data** (Dados)

 **Intensities** (Intensidades)


 **BaseCalls** (Identificações de bases)

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

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

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

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

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

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

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 Samplesheet.csv — planilha de amostra ou outro arquivo anexado, se aplicável.

 SequenceComplete.txt

Arquivos de saída de sequenciamento

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

Apêndice D Segurança do Windows

Configurações de segurança	73
Requisitos da senha	73
Firewall do Windows	73
Kit de ferramentas aprimorado da experiência de mitigação	73
Políticas de restrição de software	74

Configurações de segurança

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

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



CUIDADO

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

Requisitos da senha

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

Tabela 16 Políticas de senha padrão

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

Firewall do Windows

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

Kit de ferramentas aprimorado da experiência de mitigação

O Kit de ferramentas aprimorado da experiência de mitigação (EMET) impede a exploração de vulnerabilidades de software e fornece o recurso Confiança certificada. O recurso detecta e interrompe ataques que usam certificados mal-intencionados.

Políticas de restrição de software

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

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



CUIDADO

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

Regras de SRP permitidas

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

Certificados

DigitalSystems
Illumina, Inc.
NovaSeq

Arquivos executáveis

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

Extensões de arquivos

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

Diretórios

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

Diretórios

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

Adicionar e remover regras de SRP

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



CUIDADO

A desativação das SRP cancela as proteções padrão.

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

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

- 9 Restabeleça o SRP *imediatamente*:
 - a Navegue até o diretório C:\Illumina\Security.
 - b Clique duas vezes em Enable.reg.
- 10 Se as regras de SRP tiverem sido modificadas pela primeira vez, faça logoff e depois faça login novamente para que as regras tenham efeito.

Índice

%

% PF 69

A

advertências 8
ajuda 61
 documentação 2
algoritmo Phred 70
alvo de alinhamento óptico 5
alvo do alinhamento óptico 44
amplificação 2
análise 25
aplicações 1
armazenamento 16
armazenamento de kits de reagentes 12
arquivos
 específico para a execução 61
arquivos CBCL 2, 52, 70
arquivos de filtro 66, 72
arquivos de identificação de bases 66
arquivos de identificações de bases 72
arquivos de log 61
arquivos de registro 66
arquivos InterOp 8, 61, 66, 72
arranhões, lâminas de fluxo 39, 44
assistência técnica 81
ativação 19
atividades após a execução 54
ausência de identificações 68

B

bandeja coletora 62
banhos-maria 30, 36
barra de luzes 5, 64
barra de status 5, 64
BaseSpace Enterprise 25
BaseSpace Sequence Hub 1, 25
 conexão e desconexão 47
 suporte 2
bcl2fastq2 25, 66
bibliotecas
 armazenamento 63
blocos 2, 13, 66
boletins de suporte 61
bolhas 42

C

câmeras 1, 5, 67
canal verde 69
canal vermelho 69
cartucho de cluster 13
cartucho de solução tampão 47, 58
cartuchos
 empilhamento 15
cartuchos de empilhamento 15
cartuchos de limpeza 55-56, 58
cartuchos de reagente
 armazenamento 63
 descarga 46
cartuchos de reagentes
 armazenamento 12
 etiquetagem 12
 preparação 30, 36
 rotulagem 14
cavidade individualmente endereçável 3
cavidades 13, 67
cavidades individualmente endereçáveis 17
CE 9, 66
ciclos de sequenciamento 51
código do lote 18
coletores do NovaSeq Xp 39
 armazenamento 16
compartimento de líquidos 14
compartimento de solução tampão 47
compartimentos 5
componentes do kit 28
computador de controle 73
Compute Engine 9, 53, 66
concentração de carga 2
condições de armazenamento 18
conectividade do sistema 61
conexões de entrada 73
conexões de saída 73
Confiança certificada 73
configuração de análise 20
configuração do LIMS 21
configurações de execução 20
configurações de segurança 73
configurações do kit 11
configurações padrão 20, 25
configurações, segurança 73
conta de administrador 75
contaminação cruzada 7, 54
conversão de FASTQ 25

conversão FASTQ 66
 cores do gráfico 50

D

dados de armazenamento 47
 dados de desempenho do instrumento 20-21
 dados de integridade 20-21
 datas de vencimento 18
 descarga de cartuchos de reagente 46
 descarte de formamida 15, 53
 desligamento 64
 diagnóstico 5
 disco rígido 9, 20-21, 53
 dock
 components 17
 documentação 2, 81
 domínio, BaseSpace Sequence Hub 25
 duração da clusterização 51
 duração da execução 50
 durações
 clusterização 51
 execução de sequenciamento 50
 limpeza automática após a execução 54
 limpeza de manutenção 55

E

eliminação de reagentes usados 7
 EMET 73
 energia 19
 erros 8, 61
 probabilidade 70
 espaço em disco 9, 61
 especificações 12
 Especificações de congeladores 29
 especificações de refrigeradores 29
 estágio da lâmina de fluxo 5, 44
 Etapas do sequenciamento 2
 etiquetas, componentes do kit 12
 ExAmp Master Mix 2, 42
 execuções 25
 escalonamento 52
 exclusão 9
 métricas 50
 monitoramento 47
 pausando 52
 retomada 64
 execuções de leitura única 48
 execuções de sequenciamento
 exclusão 53

F

fabricante 18
 faixas 2, 13, 67
 falha de alinhamento 61
 falhas de registro 68
 fichas de dados de segurança 7
 filtragem de clusters 69
 filtro de pureza 69
 firewalls 73
 fixações, lâmina de fluxo 5
 fluxo de trabalho 23
 fluxo de trabalho NovaSeq Xp 23
 Fluxo de trabalho padrão 23
 formato da planilha de amostra 25
 fornecedores 26

G

geração de imagens 2, 13, 66-67
 geração de modelo 68
 Gestão de processos 52
 GPO 74

H

hipoclorito de sódio 54, 56

I

ícone 18
 ícones 9
 ícones piscantes 8
 ícones, piscantes 8
 imagens 66
 inicialização 19
 instrumentos que se movem 64
 intensidades de cluster 68

J

juntas 13, 39, 44
 juntas, transbordamento 42

L

lâmina de fluxo de limpeza 55
 lâminas de fluxo
 armazenamento 12, 39

- arranhões 39, 44
- especificações 12
- etiquetagem 12
- limpeza 39, 44
- lâminas de fluxo de duas cavidades 13
- lâminas de fluxo de quatro cavidades 13
- lâminas de fluxo em padrão 1, 13
- leitura 2
- Leitura 1 64
- leituras de índice 48
- leituras, números de 12
- limpezas
 - duração 54-55
 - frequência 55
- limpezas de manutenção
 - materiais de consumo 26, 55
 - soluções de limpeza 56
- LIMS 1, 20
- LIMS de terceiros 22
- lista de exceções, SRP 74
- loais de cluster 66, 72
- loais de host 25
- luvas, troca 31, 37, 58

M

- manutenção preventiva 55
- manutenção, preventiva 55
- materiais de consumo
 - água aprovada para uso em laboratório 28
 - descarga 53-54
 - descarregamento 59
 - embalagem 18
 - limpezas de manutenção 55
- materiais de consumo de sequenciamento 26
- métodos de análise 2
- métricas de execuções 66
- miniaturas 72
- modos 12
- modos de execução 20
- monitoramento 25

N

- nanopoços 68
- NaOCl 54, 56
- nome da pasta de saída 71
- nova hibridização 22
- NovaSeq Xp, definido 3
- nucleotídeos 69
- numeração das cavidades 17, 42

- numeração de bloco 67
- numeração de superfície 67
- numeração dos poços 42
- numeração, poços 17
- número de catálogo 26
- número de ciclos 48
- números de catálogo 11
 - materiais de consumo fornecidos pelo usuário 26
- números de ciclo 51
- números de peça 18

O

- objeto de política de grupos 74
- óptica 5
- orientações para água aprovada para uso em laboratório 28

P

- pacote do software 8
- Padrão, definido 3
- padrões SRP 74
- páginas de suporte 61
- parâmetros de execução, LIMS 22
- passagem de clusters pelo filtro 50
- passagem pelo filtro (PF) 69
- pasta de configuração da execução 20-22
- pasta de saída 20-21
- pausando execuções 52
- phasing e prephasing 68
- PhiX 26
 - alinhamento 66
- pipetas 29
- planilhas de amostra 25, 48
- planilhas de amostras 47
- plataforma 39, 44
- plataforma NovaSeq Xp 39, 44
- poços de entrada 17
- poços do coletor do NovaSeq Xp,
 - numeração 17
- políticas de senha 73
- portas USB 5
- posição n.º 30 53, 58
- posições do aspirador de líquidos 54, 59
- preparação do local 2, 73
- preservar tubos de biblioteca 63
- primers personalizados 2, 15, 48
- privilégios, conta de administrador 75
- problemas fluídicos 62

produtos químicos perigosos 7, 18

Q

Q-scores 50

Q-Scores 70

qualidade dos dados 69

R

racks com fios 30, 36

racks de descongelamento 30, 36

rastreamento de amostra 15

reagente JPX, armazenamento 16

reagentes DPX, armazenamento 16

reagentes DPX/JPX, compatibilidade 16

reagentes ExAmp 13

armazenamento 16

métodos de mistura 3

Reagentes ExAmp 41

descongelamento 39

reagentes usados 7, 31, 37, 46

Real-Time Analysis 1, 8

refrigerador 7

refrigerador de reagentes 7

registros de erro 66

reinício após o desligamento 64

relocação de instrumento 64

rendimento 50

retomada de execuções 64

RFID 12, 61

RunInfo.xml 61, 72

S

salvar cartuchos de reagentes 63

segurança 74

personalização 75

sem identificações 69

sensores 5, 58, 61

sequenciamento de dois canais 2, 69

Sequencing Analysis Viewer 66, 68

Serviço de cópia universal 8-9, 52

Serviço de monitoramento Illumina Proactive 21

sistema de fluidos 7

sistema fluídico 56

sistema operacional 19, 73

site, suporte 61

software de controle 8

solução de limpeza 14

suporte ao cliente 81

suporte da lâmina de fluxo 44

suportes da tampa 31, 37

T

tabelas de qualidade 70

técnica, ajuda 81

tela de sequenciamento 50

transbordamento 31, 37, 62

transferência de dados 9, 53

treinamento on-line 2

tubos da biblioteca

armazenamento no cartucho 63

tubos de biblioteca 15, 63

armazenamento 12, 63

Tween 20 56

V

valores de intensidade 68

vazamentos 62

verificações automatizadas 61

verificações pré-execução 61

volume de carga 2

W

white papers 70

Windows

segurança 74

Assistência técnica

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

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

Telefones do suporte ao cliente da Illumina

Região	Ligação gratuita	Regional
América do Norte	+1(800) 809-4566	
Alemanha	+49 8001014940	+49 8938035677
Austrália	1-800-775-688	
Áustria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Coreia do Sul	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
Espanha	+34 911899417	+34 800300143
Finlândia	+358 800918363	+358 974790110
França	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong, China	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Itália	+39 800985513	+39 236003759
Japão	0800-111-5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nova Zelândia	0800.451.650	
Países Baixos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapura	1-800-579-2745	
Suécia	+46 850619671	+46 200883979
Suíça	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, China	00806651752	
Outros países	+44-1799-534000	

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122, EUA

+1 (800) 809-ILMN (4566)

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

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2020 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]