

Este documento e seu conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e 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 serão usados ou distribuídos para nenhuma outra finalidade e/ou comunicados, divulgados ou reproduzidos em nenhuma forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não transmite nenhuma licença sob seus direitos de patente, marca registrada, direitos autorais ou lei comum nem direitos semelhantes de terceiros por este documento.

O Software é licenciado para você sob os termos e condições do Contrato de licença de software de sequenciamento da Illumina em um documento separado. Se você não concorda com os termos e condições deste documento, a Illumina não licenciará o Software a você, e você não deverá usar ou instalar o Software.

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 AOS PRODUTOS, FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUINDO USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME NENHUMA RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INDEVIDA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO SUAS PARTES OU SEU SOFTWARE) OU DE QUALQUER USO DE TAIS PRODUTOS FORA DO ESCOPO DAS LICENÇAS EXPRESSAS POR ESCRITO OU PERMISSÕES CONCEDIDAS PELA ILLUMINA EM CONEXÃO COM A AQUISIÇÃO DE TAIS PRODUTOS POR PARTE DO CLIENTE.

SOMENTE PARA PESQUISA

© 2014 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAIIX, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, ForenSeq, MiSeq, MiSeqDx, MiSeq FGx, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, a cor abóbora e o desenho de fluxo de bases são marcas registradas da Illumina, Inc. e/ou suas afiliadas nos EUA e/ou outros países. Todos os outros nomes, logotipos e marcas são de propriedade de seus respectivos proprietários.

Este software contém a Biblioteca SeqAn, que está licenciada para a Illumina e é distribuída sob a seguinte licença:

Copyright © 2010, Knut Reinert, FU Berlin, Todos os direitos reservados. A redistribuição e utilização das formas de origem e binária, com ou sem modificações, são permitidas desde que as seguintes condições sejam atendidas:

- 1 As redistribuições do código-fonte devem manter o aviso de direitos autorais acima, esta lista de condições e o seguinte termo de responsabilidade.
- 2 As redistribuições em formato binário devem reproduzir o aviso de direitos autorais acima, esta lista de condições e o seguinte termo de responsabilidade na documentação e/ou em outros materiais fornecidos com a distribuição.
- 3 O nome da FU Berlin ou da Knut Reinert e os nomes de seus colaboradores não podem ser usados para endossar ou promover produtos derivados deste software sem permissão prévia específica por escrito.

ESTE SOFTWARE É FORNECIDO PELOS DETENTORES DOS DIREITOS AUTORAIS E COLABORADORES "COMO ESTÁ", E QUAISQUER GARANTIAS EXPRESSAS OU IMPLÍCITAS, INCLUINDO, MAS NÃO LIMITADAS A, GARANTIAS IMPLÍCITAS DE COMERCIALIZABILIDADE E ADEQUAÇÃO A UMA FINALIDADE ESPECÍFICA, SÃO NEGADAS. EM HIPÓTESE ALGUMA O DETENTOR DOS DIREITOS AUTORAIS OU COLABORADORES SERÃO RESPONSÁVEIS POR QUALQUER DANO DIRETO, INDIRETO, INCIDENTAL, ESPECIAL, EXEMPLAR OU CONSEQUENCIAL (INCLUINDO, MAS NÃO LIMITADOS A, AQUISIÇÃO DE BENS OU SERVIÇOS; PERDA DE USO, DADOS OU LUCROS; OU INTERRUPÇÃO DE NEGÓCIOS) CAUSADO E POR QUALQUER TEORIA DE RESPONSABILIDADE, SEJA EM CONTRATO, RESPONSABILIDADE OBJETIVA OU ATO ILÍCITO (INCLUINDO NEGLIGÊNCIA OU NÃO) DECORRENTE DE ALGUMA FORMA FORA DO USO DESTES SOFTWARE, MESMO SE AVISADOS DA POSSIBILIDADE DE TAIS DANOS.

Leia antes de usar o produto

Este Produto, seu uso e descarte estão sujeitos aos seguintes termos e condições. Caso não concorde com estes termos e condições, o Comprador não tem autorização da Illumina para usar o Produto, de modo que não deverá usá-lo.

- 1 Definições.** "**PI de Aplicação Específica**" significa os direitos de propriedade intelectual da Illumina ou controlados por ela que se aplicam a este Produto (e a seu uso) somente no que diz respeito a campos ou aplicações específicas. A PI de Aplicação Específica exclui toda a propriedade intelectual da Illumina ou controlada por ela que abranja características ou recursos deste Produto (ou seu uso) comuns a todas as aplicações e campos de uso possíveis (a "**PI Principal**"). A PI de Aplicação Específica e a PI Principal são subconjuntos independentes que não se sobrepõem de toda a propriedade intelectual da Illumina ou controlada por ela. A título de exemplos não taxativos, os direitos de propriedade intelectual da Illumina para métodos de diagnósticos específicos, métodos forenses específicos ou biomarcadores, sequências ou combinações de biomarcadores e sequências de ácido nucleico específicos são casos de PI de Aplicação Específica. "**Materiais de Consumo**" significa reagentes e itens de consumo da marca Illumina desenvolvidos para serem usados com o Hardware e consumidos por meio do uso do Hardware. "**Documentação**" significa o manual do usuário desenvolvido pela Illumina para este Produto, incluindo, entre outros, encartes e qualquer outra documentação que acompanhe este Produto ou seja mencionada por ele ou em sua embalagem e que esteja em vigor na data de envio pela Illumina. A Documentação inclui este documento. "**Hardware**" significa instrumentos, acessórios ou periféricos da marca Illumina. "**Illumina**" significa Illumina, Inc. ou uma de suas afiliadas, conforme o caso. "**Produto**" significa o produto que acompanha este documento (por exemplo, Hardware, Materiais de Consumo ou Software). "**Comprador**" é a pessoa física ou jurídica que adquire jurídica e legitimamente o Produto da Illumina ou de um revendedor autorizado. "**Software**" significa software da marca Illumina (por exemplo, software de operação de Hardware, software de análise de dados). Todo Software é licenciado, e não vendido, e pode estar sujeito a outros termos encontrados em contratos de licença de usuário final específicos de um Software. "**Especificações**" significa especificações escritas da Illumina para esse Produto em vigor na data em que o Produto é enviado pela Illumina.
- 2 Direitos para uso exclusivo em pesquisas.** Sujeito a estes termos e condições, e salvo se acordado em contrário por escrito por um representante da Illumina, o Comprador recebe apenas um direito não exclusivo, intransferível, pessoal e impávido de sublicenciamento na PI Principal da Illumina existente na data em que essa envia o Produto, apenas para o uso deste Produto nas instalações do Comprador e para fins de suas pesquisas internas (que incluem serviços de pesquisa prestados a terceiros), atendo-se apenas à Documentação deste Produto, **mas excluindo especificamente qualquer uso que** (a) exigiria direitos ou uma licença da Illumina para PI de Aplicação Específica, (b) seja um reúso de um Material de Consumo, (c) seja a desmontagem, engenharia reversa, compilação reversa ou montagem reversa deste Produto, (d) seja a separação, a extração ou o isolamento de componentes deste Produto ou outras análises não autorizadas deste Produto, (e) obtenha acesso ou determine os métodos de operação deste Produto, (f) seja o uso de materiais de consumo/reagentes de outra marca que não Illumina com Hardware da Illumina (não se aplicam se a Documentação ou as Especificações deste Produto definirem em contrário), ou (g) seja a transferência ou o sublicenciamento para um terceiro de um Software ou de qualquer software de outra empresa. Todo Software, não importando se é fornecido separadamente, instalado em um Produto ou integrado a ele, é licenciado ao Comprador, e não vendido. Salvo conforme expressamente declarado nesta Seção, nenhum direito ou licença previstos nos direitos de propriedade intelectual da Illumina é concedido de forma expressa, implícita ou ato contraditório.

O Comprador é o único responsável por determinar se detém todos os direitos de propriedade intelectual necessários para os fins a que pretende destinar este Produto, incluindo, dentre outros, eventuais direitos de terceiros ou direitos a PI de Aplicação Específica. A Illumina não oferece nenhuma garantia de que os usos específicos pretendidos do Comprador não violarão os direitos de propriedade intelectual de terceiros ou da PI de Aplicação Específica.
- 3 Regulamentação.** Este Produto não foi aprovado, liberado ou licenciado pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos nem por qualquer outro órgão regulador nacional ou estrangeiro para um uso pretendido específico, seja



ele de pesquisa, comercial, diagnóstico ou de outra natureza. Este Produto tem a etiqueta For Research Use Only (Somente para pesquisa). O Comprador deve garantir que tem todas as aprovações regulatórias necessárias para o uso que pretende dar a este Produto.

- 4 **Usos não autorizados.** O Comprador concorda em: (a) usar apenas um Material de Consumo por vez, e (b) usar apenas materiais de consumo/reagentes da Illumina com Hardware da Illumina. As restrições nos itens (a)-(b) não se aplicam se a Documentação ou as Especificações deste Produto definirem em contrário. O Comprador concorda em não se envolver e em não autorizar o envolvimento de terceiros em nenhuma das atividades a seguir: (i) desmontagem, engenharia reversa, compilação reversa ou montagem reversa do Produto, (ii) separação, extração ou isolamento de componentes deste Produto ou sujeição deste Produto ou seus componentes a qualquer análise que não esteja expressamente autorizada na Documentação deste Produto, (iii) obtenção de acesso ou tentativa de determinar os métodos de operação deste Produto, ou (iv) transferência ou sublicenciamento a terceiros de qualquer Software ou software de outra empresa. O Comprador concorda ainda que o conteúdo e os métodos de operação deste Produto são exclusivos da Illumina e, portanto, este Produto contém ou reúne segredos comerciais da Illumina. As condições e restrições constantes destes termos e condições são negociadas até chegar às condições de venda e, depois, ao controle da venda e do uso deste Produto pelo Comprador.
- 5 **Responsabilidade limitada.** NO LIMITE PERMITIDO PELA LEI, EM NENHUMA HIPÓTESE A ILLUMINA OU SEUS FORNECEDORES SERÃO RESPONSÁVEIS PERANTE O COMPRADOR OU QUALQUER TERCEIRO POR CUSTOS DE AQUISIÇÃO DE PRODUTOS OU SERVIÇOS DE SUBSTITUIÇÃO, LUCROS CESSANTES, PERDA DE DADOS OU NEGÓCIOS, NEM POR NENHUM DANO INDIRETO, ESPECIAL, INCIDENTAL, EXEMPLAR, OU PUNITIVO DE QUALQUER NATUREZA DECORRENTE OU RELACIONADO, DENTRE OUTRAS HIPÓTESES, À VENDA DESTES PRODUTOS, AO SEU USO, AO CUMPRIMENTO DAS OBRIGAÇÕES DA ILLUMINA NOS TERMOS DESTES DOCUMENTOS OU DE QUALQUER DESTES TERMOS E CONDIÇÕES, POR MAIS QUE DECORRA OU SEJA CAUSADO POR ALGUMA TEORIA DE RESPONSABILIDADE CIVIL (SEJA ELA CONTRATUAL, PROVENIENTE DE ATO ILÍCITO (INCLUINDO CULPA), RESPONSABILIDADE CIVIL OBJETIVA OU OUTRA HIPÓTESE).
- 6 **A RESPONSABILIDADE TOTAL E CUMULATIVA DA ILLUMINA PERANTE O COMPRADOR OU QUALQUER TERCEIRO DECORRENTE OU RELACIONADA A ESTES TERMOS E CONDIÇÕES, INCLUINDO, DENTRE OUTRAS COISAS, ESTE PRODUTO (E SEU USO) E O CUMPRIMENTO DAS OBRIGAÇÕES DA ILLUMINA NOS TERMOS DESTES DOCUMENTOS, SEJA ELA CONTRATUAL, PROVENIENTE DE ATO ILÍCITO (INCLUINDO CULPA), RESPONSABILIDADE CIVIL OBJETIVA OU OUTRA HIPÓTESE, EM NENHUM CASO EXCEDERÁ O VALOR PAGO À ILLUMINA POR ESTE PRODUTO.**
- 7 **Limitações das garantias oferecidas pela Illumina.** NO LIMITE PERMITIDO POR LEI E SUJEITA À GARANTIA EXPRESSA DO PRODUTO DAQUI CONSTANTE, A ILLUMINA NÃO APRESENTA NENHUMA GARANTIA (E EXPRESSAMENTE AFASTA TODAS ELAS), SEJA EXPRESSA, IMPLÍCITA OU LEGAL, EM RELAÇÃO A ESTE PRODUTO, INCLUINDO, DENTRE OUTRAS COISAS, QUALQUER GARANTIA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZABILIDADE, ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO FIM, INVIOABILIDADE DE DIREITOS OU DECORRENTE DE CURSO DO CUMPRIMENTO DE CONTRATOS, NEGOCIAÇÕES, COSTUMES OU TRANSAÇÕES. SEM LIMITAR A GENERALIDADE DO PRECEDENTE, A ILLUMINA NÃO APRESENTA NENHUMA REIVINDICAÇÃO, DECLARAÇÃO OU GARANTIA DE QUALQUER NATUREZA QUANTO À UTILIDADE DESTES PRODUTOS PARA OS USOS PRETENDIDOS DO COMPRADOR.
- 8 **Garantia do Produto.** Todas as garantias são exclusivas do Comprador e não podem ser transferidas ou cedidas a terceiros, incluindo uma afiliada do Comprador. Todas as garantias são específicas para um local e não são transferidas se o Produto for transferido para outra instalação do Comprador, a menos que a Illumina conduza tal transferência.
 - a **Garantia de Materiais de Consumo.** A Illumina garante que Materiais de Consumo que não sejam personalizados atenderão às suas Especificações até o mais tardar entre (i) 3 meses a contar da data de envio pela Illumina, e (ii) qualquer data de expiração ou validade impressa pela Illumina em tais Materiais de Consumo, mas em nenhum caso

em mais de 12 meses a contar da data de envio. Em relação aos Materiais de Consumo personalizados (isto é, Materiais de Consumo feitos de acordo com especificações ou projetos do Comprador ou fornecidos à Illumina pelo Comprador ou em nome dele), a Illumina garante apenas que os Materiais de Consumo personalizados serão feitos e testados de acordo com os seus processos padrão de fabricação e controle de qualidade. A Illumina não apresenta nenhuma garantia de que Materiais de Consumo personalizados funcionarão conforme a pretensão do Comprador ou para os usos pretendidos por ele.

- b **Garantia de Hardware.** A Illumina garante que o Hardware, que não os Componentes Atualizados, atenderão às suas Especificações por um período de 12 meses após a data de envio da Illumina, salvo se o Hardware incluir instalação feita pela Illumina, caso no qual o período de garantia se inicia na data da instalação ou em 30 dias após a data de entrega, o que ocorrer primeiro ("Garantia Base de Hardware"). "Componentes Atualizados" significa componentes, modificações ou melhorias fornecidos pela Illumina ao Hardware previamente adquirido pelo Comprador. A Illumina garante que os Componentes Atualizados cumprirão suas Especificações por um período de 90 dias a contar da data de instalação dos Componentes Atualizados. Os Componentes Atualizados não estendem a garantia do Hardware, salvo se a atualização for conduzida pela Illumina, em suas instalações, caso no qual o Hardware atualizado enviado ao Comprador será acompanhado da Garantia Base de Hardware.
- c **Exclusões da cobertura da garantia.** As garantias supracitadas não se aplicam se um descumprimento for decorrente de (i) abuso, uso incorreto, descuido, negligência, acidente, armazenamento inapropriado ou uso que vá de encontro à Documentação ou às Especificações, (ii) inadequação de manuseio, instalação, manutenção ou reparo (que não tenha sido executado por pessoal da Illumina), (iii) modificações não autorizadas, (iv) casos de Força Maior, ou (v) uso com um bem de terceiro não fornecido pela Illumina (salvo se a Documentação ou as Especificações do Produto definirem expressamente que tal bem de terceiro é para ser usado com o Produto).
- d **Procedimento para cobertura da garantia.** Para ter direito a reparo ou substituição previstos nesta garantia, o Comprador deverá (i) entrar em contato imediato com o departamento de suporte da Illumina para informar a não conformidade, (ii) cooperar com a Illumina para confirmar ou diagnosticar a não conformidade, e (iii) devolver este Produto à Illumina, com os encargos de transporte pré-pagos, seguindo as instruções da Illumina ou, se acordado entre a Illumina e o Comprador, conceder acesso ao Produto a pessoal autorizado de assistência técnica da Illumina a fim de confirmar a não conformidade e realizar os reparos.
- e **Único recurso previsto na garantia.** A Illumina, a seu critério, reparará ou substituirá Produto fora de conformidade que ela confirme estar coberto por esta garantia. Os Materiais de Consumo reparados ou substituídos têm garantia de 30 dias. O Hardware poderá ser reparado ou substituído por Hardware ou componentes com funcionamento equivalente, reconicionados ou novos (se apenas um componente do Hardware não estiver em conformidade). Se o Hardware for totalmente substituído, o período de garantia da substituição é de 90 dias a contar da data do envio ou o período remanescente da garantia original do Hardware, o que for mais curto. Se apenas um componente for reparado ou substituído, o período de garantia de tal componente é de 90 dias a contar da data do envio ou o período remanescente da garantia original do Hardware, o que tiver maior validade. O precedente define o único recurso do Comprador e as únicas obrigações da Illumina previstos nesta garantia.
- f **Produtos e garantia de terceiros.** A Illumina não tem obrigações de garantia com relação a eventuais produtos de terceiros e fornecidos ao Comprador nos termos deste documento. Produtos de terceiros são aqueles com etiquetas ou marcas com o nome de um terceiro. A garantia para bens de terceiros, se houver, é fornecida pelo fabricante original. Mediante solicitação por escrito, a Illumina tentará repassar eventuais garantias para o Comprador.

9 Indenização.

- a **Indenização por violação paga pela Illumina.** Sujeita a estes termos e condições, incluindo, dentre outros, as Exclusões às obrigações de indenização da Illumina (Seção 9(b) abaixo) e as Condições para obrigações de indenização (Seção 9(d) abaixo), a Illumina (i) defenderá, indenizará e manterá indene o Comprador contra eventuais reivindicações ou ações de terceiros que aleguem que este Produto, quando usado apenas para fins de pesquisa, de acordo com estes termos e condições e com a Documentação e as Especificações deste Produto, viola direitos de propriedade intelectual válidos e legítimos de um terceiro, e (ii) pagará todos os acordos firmados, todas

as decisões definitivas e todos os custos (inclusive honorários advocatícios razoáveis) definidos em face do Comprador em relação a tal ação de violação de direitos. Caso este Produto ou qualquer parte dele seja ou, a critério da Illumina, venha a ser objeto de uma ação de violação de direitos, a Illumina terá o direito, a seu critério de (A) providenciar ao Comprador o direito de continuar usando este Produto, (B) modificar ou substituir este Produto por outro substancialmente equivalente e que não viole direitos, ou (C) solicitar a devolução deste Produto, extinguindo os direitos, a licença e qualquer outra permissão dada ao Comprador com relação a este Produto e reembolsando ao Comprador o valor depreciado (conforme os registros oficiais do Comprador) do Produto devolvido no momento de tal devolução; fica estabelecido que nenhum reembolso será feito para Materiais de Consumo usados ou vencidos. Esta Seção define a responsabilidade total da Illumina por qualquer violação de direitos de terceiros.

- b **Exclusões às obrigações de indenização da Illumina.** A Illumina não é obrigada a defender, indenizar ou manter indene o Comprador por eventuais Ações de violação de direitos da Illumina desde que tal violação decorra: (i) do uso deste Produto de qualquer forma ou para qualquer finalidade fora do escopo de uso em pesquisa, (ii) do uso deste Produto de qualquer forma que não esteja de acordo com suas Especificações, sua Documentação, os direitos expressamente aqui concedidos ao Comprador, ou qualquer violação cometida pelo Comprador em relação a estes termos e condições, (iii) do uso deste Produto junto com qualquer outro produto, material ou serviço não fornecido ou prestado pela Illumina, (iv) do uso deste Produto para executar um ensaio ou outro processo não fornecido pela Illumina ou (v) conformidade da Illumina com especificações ou instruções para este Produto fornecida pelo Comprador ou em nome dele (sendo cada um dos itens (i) – (v) mencionado como uma "Reivindicação excluída").
- c **Indenização paga pelo Comprador.** O Comprador defenderá, indenizará e manterá indene a Illumina, suas afiliadas e seus colaboradores e parceiros de desenvolvimento não afiliados que contribuíram para o desenvolvimento deste Produto, e seus respectivos representantes, diretores, agentes e empregados contra eventuais ações, responsabilidades, danos, multas, sanções, causas de pedir e perdas de qualquer natureza, incluindo, entre outras coisas, ações por lesões corporais ou morte e violação dos direitos de propriedade intelectual de um terceiro decorrente ou relacionado (i) à violação de qualquer destes termos e condições por parte do Comprador, (ii) ao uso deste Produto pelo Comprador fora do escopo dos fins de pesquisa, (iii) a qualquer uso deste Produto que não esteja de acordo com as Especificações ou com a Documentação deste Produto, ou (iv) a qualquer Reivindicação excluída.
- d **Condições para obrigações de indenização.** As obrigações de indenização das partes ficam condicionadas à parte que busca a indenização tomar as seguintes providências: (i) notificar imediatamente a outra parte por escrito sobre tal reivindicação ou ação, (ii) dar à outra parte controle exclusivo e autoridade sobre a defesa e ao acordo de tal reivindicação ou ação, (iii) não admitir violação de nenhum direito de propriedade sem o consentimento prévio da outra parte, (iv) não firmar qualquer acordo ou compromisso em tal reivindicação ou ação sem o prévio consentimento por escrito da outra parte e (v) prestar a assistência razoável à outra parte na defesa da reivindicação ou ação; fica estabelecido que a parte reembolsará a parte indenizada por suas despesas diversas incorridas em tal assistência.
- e **Produtos e indenização de terceiros.** A Illumina não tem obrigações de indenização com relação a eventuais produtos de terceiros e fornecidos ao Comprador. Produtos de terceiros são aqueles com etiquetas ou marcas com o nome de um terceiro. Os direitos de indenização do Comprador, se houver, em relação a produtos de terceiros serão de acordo com a indenização do fabricante ou licenciante original. Mediante solicitação por escrito, a Illumina tentará repassar tal indenização, se houver, para o Comprador.

Histórico das revisões

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617_PTB	O	Setembro de 2014	<p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none">• Novo em MCS v 2.5, opção de limpeza pós-execução atualizada para incluir uma limpeza da linha padrão• Orientações atualizadas para limpeza pós-execução da linha padrão com hipoclorito de sódio• Acrescentado o volume de limpeza esperado para as limpezas pós-execução <p>Acrescentadas informações sobre o fluxo de trabalho do VeriSeq relativas a recursos adicionais, opções de execução, opções de análise secundária, limpezas do instrumento e cor da tampa da lâmina de fluxo.</p>
15027617	N	Junho de 2014	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Foram adicionadas informações aplicáveis ao fluxo de trabalho do VeriSeq.</p> <p>Foram atualizadas as informações sobre métricas de execução para clusterização e densidade.</p> <p>Foram removidas as informações sobre o software antivírus. Consulte <i>Guia de preparação do local do sistema MiSeq</i>.</p>
15027617_PTB	M	Janeiro de 2014	<p>Atualização para a mudança introduzida no MCS v2.4:</p> <p>Adicionado o recurso Bundle logs (Agrupar logs) para o envio de arquivos para a solução de problemas.</p>

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617	L	Outubro de 2013	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Adicionada a reinicialização do software do sistema como uma etapa pré-execução.</p> <p>Adicionados os tubos de microcentrífuga à lista de materiais de consumo fornecidos pelo usuário.</p> <p>Eliminado o <i>MiSeq Software</i> como um capítulo separado, e o conteúdo foi distribuído ao longo do guia.</p> <p>Removidas informações sobre pastas para receitas personalizadas.</p> <p>Removidas informações sobre as faixas recomendadas de densidade de clusters para os kits de reagentes do MiSeq.</p> <p>Removidos detalhes sobre os kits de reagentes do MiSeq e adicionada uma visão geral das características do kit de reagentes. Para obter informações, consulte a documentação de preparação de reagentes do kit que você está usando.</p> <p>Adicionado conteúdo ao aviso sobre marcas registradas.</p>
15027617_PTБ	K	Agosto de 2013	Erros de formatação corrigidos.
15027617	J	Agosto de 2013	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Adicionadas descrições de execução para o MCS v2.3 e o kit de reagentes do MiSeq v3.</p> <p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kit de reagentes e compatibilidade de versão para incluir o kit de reagentes do MiSeq v3 • Descrição da pasta Receitas personalizadas para incluir uma subpasta v3 • Faixa de densidade de agrupamento alterada para v2; faixa adicionada para v3 • Caminho de saída para os arquivos de imagem <p>Códigos de barra corrigidos da lâmina de fluxo para nanolâminas de fluxo (D) e microlâminas de fluxo (G).</p> <p>Informações removidas sobre o kit de reagentes do MiSeq, incluindo conteúdo e tipos de lâmina de fluxo. Para mais informações, consulte <i>Guia de preparação de reagentes do MiSeq (nº de catálogo 15044983)</i>.</p>

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617_PTB	H	Março de 2013	<p>Foi adicionada uma seção intitulada <i>Conceitos do MiSeq</i> que introduz o fluxo de trabalho de análise, o arquivo de manifesto e a planilha de amostras.</p> <p>Foram removidas as informações sobre a geração de arquivos FASTQ, formatos de arquivos de manifesto, detalhes sobre o fluxo de trabalho de análise e detalhes sobre as planilhas de amostras. Para informações sobre esses tópicos, veja o <i>Guia do usuário do MiSeq Reporter</i>, nº do catálogo 15028784 ou o <i>Guia de referência rápida de planilhas de amostra do MiSeq</i>, nº do catálogo 15028392.</p> <p>Foram removidas as instruções para a preparação de primers personalizados. Para mais informações, consulte <i>Como utilizar manuais personalizados no MiSeq</i>, nº do catálogo 15041638.</p>
15027617	G	Janeiro de 2013	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Foram removidas as instruções para desnaturação e diluição de bibliotecas de DNA e preparação de um controle do Illumina Phix. Consulte <i>Como preparar bibliotecas de DNA para o sequenciamento no MiSeq</i>, nº do catálogo 15039740.</p> <p>As instruções para lavagem do instrumento foram atualizadas para adicionar 25 ml de solução de 10% de Tween 20 em 475 ml de água de qualidade de laboratório, ao invés de 500 ml de água de qualidade de laboratório.</p>
15027617_PTB	F	Novembro de 2012	<p>Adicionadas as seguintes novas informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foram adicionadas as descrições dos novos kits de reagentes para o MiSeq: Nano Kit de reagentes para o MiSeq e Micro Kit de reagentes para o MiSeq • Adicionada visão geral dos tipos de lâmina de fluxo • Adicionada descrição do fluxo de trabalho de análise de enriquecimento <p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Novidades no MCS v2.1, atualizada a tela Perform Wash (Realizar limpeza) para adicionar uma opção de limpeza pós-execução e comando para levantar os aspiradores de líquidos • Tabela de compatibilidade de versão atualizada para incluir dependências de kits nano e micro • Informações de compatibilidade de versão atualizadas para incluir novos kits de reagentes

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617	E	Outubro de 2012	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corrigidas as instruções de preparação do controle PhiX e densidade esperada de clusterização do controle de PhiX preparado para 1000–1200 K/mm² • Observou-se que o processo de desnaturação e diluição de bibliotecas, <i>Preparação das bibliotecas</i>, não se aplica a bibliotecas Nextera XT nem a bibliotecas de Amplicon TruSeq • Alterado o nome de atualização; de pacote de expansão do MiSeq para atualização de hardware do MiSeq • Foi adicionado o <i>Guia do usuário do MiSeq Reporter</i> à lista de recursos adicionais.

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617	D	Julho de 2012	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Atualizadas as descrições do software para MCS v2.0</p> <p>Adicionadas as seguintes novas informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foi adicionada uma seção intitulada <i>Novidades no MCS</i> para descrever novos recursos do programa, mudanças na interface e alterações no fluxo de trabalho • Adicionados descrição e número de catálogo do kit de reagente do MiSeq v2, 500 ciclos • Adicionada a seção Compatibilidade de versões e requisitos • Adicionada a descrição do pacote de expansão do MiSeq, que é necessário para a geração de imagens de lâmina de fluxo de superfície dupla de 14 blocos • Adicionada a descrição da numeração dos blocos da lâmina de fluxo de superfície dupla • Adicionado o fluxo de trabalho de análise de Amplicon de PCR para bibliotecas Nextera XT • Adicionado o uso de 10% de Tween 20 em procedimentos de limpeza e volumes de limpeza esperados • Adicionada a versão do cartucho de reagentes para o procedimento de falha de leitura RFID <p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alterados os acrônimos de reagentes para IMF, CMF e AMX para nomes de reagente v2 IMS, CMS e AMS, respectivamente • Alterada a concentração de PhiX de 8 pM para 12,5 pM • Alterada a concentração máxima recomendada de NaOH para 1 mM na solução final • Observou-se que é necessária uma limpeza de manutenção para remover o instrumento do modo de espera e começar as etapas de configuração para uma próxima execução • Foi retirada a seção Parâmetros da planilha de amostras e a etapa de configuração da planilha de amostra no fluxo de trabalho; a Illumina recomenda criar a planilha de amostras antes da preparação das amostras (consulte o <i>Guia de referência rápida de planilhas de amostras do MiSeq</i>, nº do catálogo 15028392, e o <i>Guia do usuário do Illumina Experiment Manager</i>, nº do catálogo 15031335)

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617	C	Abril de 2012	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Atualizadas as descrições do software para MCS v1.2</p> <p>Foram adicionados os seguintes novos procedimentos e seções: Visão geral do BaseSpace, Uso de primers personalizados, Geração de arquivos FASTQ, Solução de problemas de erro de taxa de fluxo, Realização de um teste de volume, Realização de uma limpeza de manutenção e Desativação do instrumento, que inclui uma limpeza para standby.</p> <p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atualizado o nome do fluxo de trabalho de Amplicon para Amplicon personalizado; atualizado o nome do fluxo de trabalho DenovoAssembly para conjunto; adicionado o fluxo de trabalho GenerateFASTQ • Adicionadas descrições de pastas e arquivos de execução; atualizada a nomenclatura da pasta de execução; adicionado o tamanho da pasta de dados da execução • Listada a pasta de genoma como necessária para o sequenciamento de Amplicon em Parâmetros da planilha de amostra • Adicionadas instruções para diluição de NaOH para desnaturar bibliotecas • Atualizada a seção Resolução da falha de leitura RFID para incluir instruções de autosserviço do MiSeq • Listados os arquivos e as pastas usados para solucionar problemas de desempenho da execução

Nº de peça	Revisão	Data	Descrição da mudança
15027617	B	Dezembro de 2011	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Atualizadas as descrições do software para MCS v1.1</p> <p>Adicionadas informações sobre proteção antivírus</p> <p>Atualizadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instruções para resolver falhas de RFID • Preparação de bibliotecas — alterada para 0,2 N de NaOH • Convenção de nomenclatura para pasta da execução • Espaço em disco e capacidade de armazenamento necessários • Etapas de configuração da execução — adicionadas mais informações à seção Configuração da planilha de amostra • Etapas de configuração da execução — adicionada observação para a eliminação do PR2 restante • Duração da análise — adicionada quando a análise for superior a duas horas • Requisitos de entrada de análise — listados os arquivos de manifesto conforme o necessário para as bibliotecas de Amplicon personalizado TruSeq • Corrigido o tamanho do tubo HT1 em Conteúdo do kit de reagente do MiSeq • Alteradas as referências de iCom para Myllumina
15027617	A	Setembro de 2011	<p>Apenas disponível em inglês.</p> <p>Lançamento inicial</p>

Índice

Histórico das revisões	vii
Índice	xv
Capítulo 1 Introdução	1
Introdução	2
Componentes	5
Visão geral do kit de reagentes do MiSeq	10
Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	11
Iniciar o MiSeq	13
Conceitos do MiSeq	14
Software MiSeq	15
Opções de análise secundária	29
Pastas da execução	32
Espaço em disco necessário	35
Capítulo 2 Realização de uma execução	37
Introdução	38
Fluxo de trabalho do MiSeq	39
Carregar bibliotecas de amostras	41
Configurar uma execução usando o MSC	43
Limpar a lâmina de fluxo	44
Carregamento da lâmina de fluxo	47
Carregamento de reagentes	49
Início da execução	53
Monitorar a execução	55
Geração do modelo de posições	57
Capítulo 3 Procedimentos de manutenção	61
Introdução	62
Limpezas do instrumento	65
Realizar uma limpeza pós-execução	67
Realizar uma limpeza de manutenção	73
Realizar uma limpeza de espera	77
Atualizações de software	80
Desligar o instrumento	81

Capítulo 4 Solução de problemas	83
Introdução	84
Agrupar logs para solução de problemas	85
Configurações do software	87
Pausar ou interromper uma execução	91
Resolver os erros de configuração da execução	94
Resolver a falha de leitura de RFID	96
Solucionar erro da taxa de fluxo	98
Realizar um teste de volume	99
Medir os volumes de limpeza esperados	103
Índice	105
Assistência técnica	109

Introdução

Introdução	2
Componentes	5
Visão geral do kit de reagentes do MiSeq	10
Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	11
Iniciar o MiSeq	13
Conceitos do MiSeq	14
Software MiSeq	15
Opções de análise secundária	29
Pastas da execução	32
Espaço em disco necessário	35



Introdução

O sistema MiSeq® da Illumina combina a comprovada tecnologia de sequenciamento por síntese (SBS) com um fluxo de trabalho revolucionário que permite ir do DNA até os dados analisados em apenas oito horas. O MiSeq integra a clusterização, o sequenciamento e a análise de dados em um único instrumento.

Recursos

- ▶ **Automação Walkaway**—Depois de configurar a execução, o que inclui carregar o cartucho de reagentes previamente preenchido, o frasco do tampão e a lâmina de fluxo, não é necessária nenhuma outra atividade prática.
- ▶ **Cartucho de reagentes previamente preenchido**—Um cartucho descartável de reagentes previamente preenchido, projetado especialmente, fornece reagentes para a clusterização e o sequenciamento, incluindo reagentes de sequenciamento do tipo paired-end e reagentes de indexação. O rastreamento integrado de identificação de radiofrequência (RFID) permite o rastreamento preciso dos materiais de consumo.
- ▶ **Controles de interface**—A interface do MiSeq Control Software (MCS) oferece controles para configurar o instrumento, configurar e monitorar as execuções e executar procedimentos de manutenção.
- ▶ **Carregamento simples da lâmina de fluxo**—Um mecanismo de fixação posiciona automaticamente a lâmina de fluxo quando ela é carregada no instrumento. O rastreamento integrado de identificação de radiofrequência (RFID) permite o rastreamento preciso dos materiais de consumo.
- ▶ **Arquitetura do fluxo de reagentes inovadora**—O sistema do fluxo de reagentes do MiSeq permite uma eficiência incomparável no tempo de ciclo químico durante o sequenciamento.
- ▶ **Análise em tempo real (Real Time Analysis - RTA)**—O software integrado de análise primária realiza a análise de dados no instrumento em tempo real, durante a execução do sequenciamento, o que inclui a análise de imagens e a chamada de base, e economiza um tempo valioso na análise posterior.
- ▶ **MiSeq Reporter**—O software integrado de análise secundária processa dados da análise primária para realizar alinhamento e fornecer informações sobre cada amostra analisada.

Recursos adicionais

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

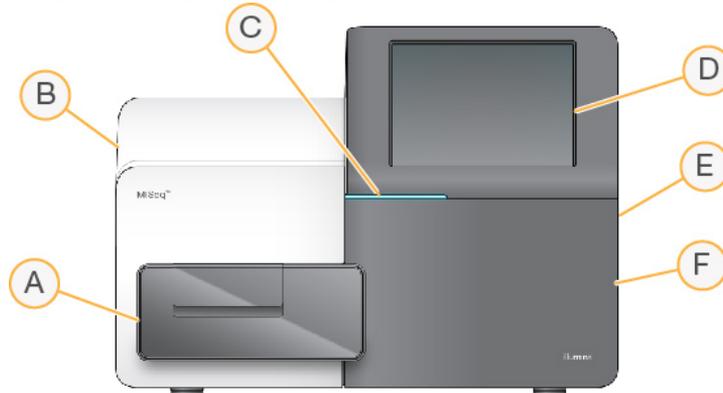
Recurso	Descrição
Guia de preparação do local do sistema MiSeq	Fornecer especificações para espaço de laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais.
Guia de conformidade e segurança do sistema MiSeq	Fornecer informações sobre rotulagem de instrumentos, certificações de conformidade e considerações de segurança.
Cartões de referência rápida do fluxo de trabalho do MiSeq	Proporciona uma representação gráfica de duas páginas do fluxo de trabalho para o usuário experiente. Os cartões de referência rápida resumem a preparação da amostra, a configuração da execução e o monitoramento da execução, assim como fornecem uma visão geral da análise realizada pelo MiSeq Reporter.
Guia do usuário do Illumina Experiment Manager	Fornecer instruções para a criação de placas de amostras e planilhas de amostras para diferentes fluxos de trabalho e tipos de bibliotecas. A Illumina recomenda que você crie sua planilha de amostras durante a etapa de preparação das amostras.
Guia de referência para o gerenciamento do fluxo de trabalho BlueFuse	Fornecer instruções para a criação de placas e planilhas de amostras para clientes que executam o fluxo de trabalho do VeriSeq. A Illumina recomenda que a planilha de amostras seja criada durante a etapa de preparação das amostras.
Guia de referência rápida de planilha de amostras do MiSeq	Apresenta informações sobre a adição de configurações da planilha de amostras à sua planilha de amostras.
Guia de preparação de reagentes do MiSeq	Fornecer uma descrição do conteúdo do kit e instruções para a preparação do cartucho de reagentes antes do início da execução de sequenciamento.
Como preparar bibliotecas de DNA para sequenciamento no MiSeq	Fornecer instruções para a desnaturação e a diluição das bibliotecas de amostras preparadas antes do sequenciamento no MiSeq, e para a preparação de um controle do PhiX. Essa etapa se aplica à maioria dos tipos de bibliotecas.

Recurso	Descrição
Uso de primers personalizados no MiSeq	Fornecer instruções para preparação e carregamento de primers personalizados, e para edição da planilha de amostras para primers personalizados.
Guia do usuário do MiSeq Reporter	Fornecer uma visão geral sobre processos de análise, fluxos de trabalho de análise e arquivos de saída gerados pelo MiSeq Reporter, e também requisitos de computação, instruções de instalação fora do instrumento e informações sobre solução de problemas.
Guia de referência do BlueFuse Multi	Para clientes que executam o fluxo de trabalho do VeriSeq, fornece uma visão abrangente dos procedimentos de análise, fluxos de trabalho de análise e arquivos gerados pelo BlueFuse Multi, bem como sobre seus requisitos computacionais e informações sobre solução de problemas.
Ajuda on-line do MiSeq Reporter	Apresenta instruções de uso do software MiSeq Reporter.
Ajuda on-line do BaseSpace	Fornecer instruções de uso do BaseSpace e descrições dos gráficos gerados para cada fluxo de trabalho de análise.

Visite a página de suporte do Sistema MiSeq no site da Illumina para ter acesso à documentação, downloads de software, treinamento on-line e perguntas mais frequentes.

Componentes

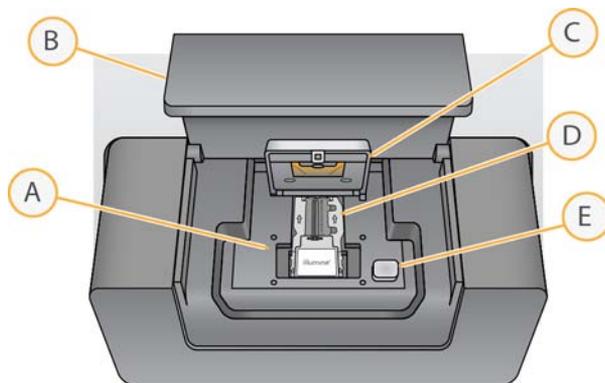
O MiSeq tem os seguintes componentes externos:



- A** **Compartimento da lâmina de fluxo**—Contém a plataforma que abriga a lâmina de fluxo durante a execução. Os motores da plataforma da lâmina de fluxo movem a plataforma para fora do módulo óptico para o carregamento da lâmina de fluxo e retorna-a quando a execução é iniciada.
- B** **Módulo óptico fechado**—Contém componentes ópticos que permitem a aquisição da imagem da lâmina de fluxo.
- C** **Barra de status**—Usa três cores para indicar o status do instrumento. A cor azul indica que o instrumento está processando, laranja indica que o instrumento precisa de atenção e verde indica que o instrumento está pronto para começar a próxima execução.
- D** **Monitor da tela de toque**—Permite a configuração no instrumento e a configuração da execução com o uso da interface do software.
- E** **Portas USB externas**—Facilitam a transferência de arquivos e dados para o computador do instrumento a partir do monitor da tela de toque.
- F** **Compartimento de reagentes**—Contém reagentes em temperaturas adequadas, soluções de limpeza e o frasco de resíduos. A porta do compartimento de reagentes é protegida por uma trava magnética.

A interface do MiSeq orienta você nas etapas de configuração da execução usando o monitor da tela de toque. Para carregar os componentes da execução, é preciso acessar o compartimento de reagentes e o compartimento da lâmina de fluxo.

Compartimento da lâmina de fluxo

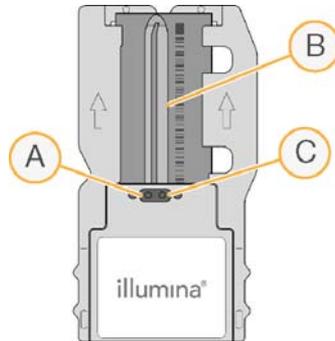


- A Plataforma da lâmina de fluxo
- B Porta do compartimento da lâmina de fluxo
- C Trava da lâmina de fluxo
- D Lâmina de fluxo
- E Botão para liberação da trava da lâmina de fluxo

O compartimento da lâmina de fluxo abriga a plataforma da lâmina de fluxo, a estação térmica e as conexões de fluxo de reagentes para a lâmina de fluxo. A plataforma da lâmina de fluxo segura a lâmina de fluxo, e a trava da lâmina de fluxo prende e posiciona a lâmina de fluxo. Quando a trava da lâmina de fluxo é fechada, dois pinos próximos à dobradiça da trava posicionam a lâmina de fluxo automaticamente.

A estação térmica, localizada sob a plataforma da lâmina de fluxo, controla as alterações na temperatura da lâmina de fluxo, necessárias para a clusterização e o sequenciamento.

Lâmina de fluxo



- A Porta de saída
- B Área de imagem
- C Porta de entrada

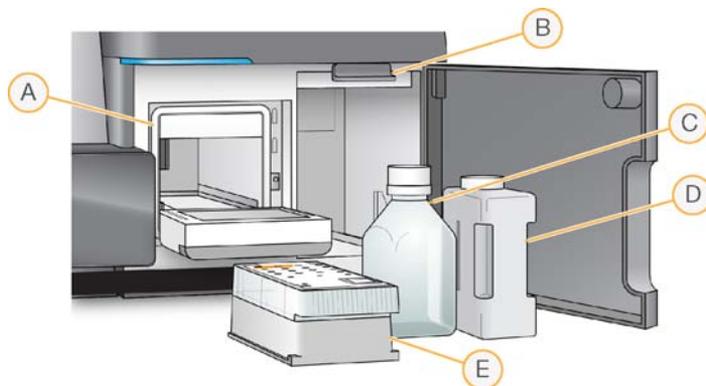
A lâmina de fluxo do MiSeq é um substrato descartável com base em vidro no qual são gerados os clusters e é executada a reação de sequenciamento.

Os reagentes entram na lâmina de fluxo através da porta de entrada, passam pela área de imagem de canaleta única e, em seguida, saem da lâmina de fluxo pela porta de saída. Os resíduos que saem da lâmina de fluxo são colocados no frasco de resíduos.

As amostras são carregadas no cartucho de reagentes antes de configurar a execução, e em seguida são automaticamente transferidas para a lâmina de fluxo depois do início da execução.

Durante a execução de sequenciamento, são feitas imagens da canaleta única em pequenas áreas chamadas de blocos. Todas as lâminas de fluxo do MiSeq têm uma canaleta única, mas o número de blocos difere, dependendo do tipo de lâmina de fluxo utilizada.

Compartimento de reagentes



- A Refrigerador dos reagentes
- B Alça dos aspiradores de líquidos (mostrada na posição levantada)
- C Frasco de PR2
- D Frasco de resíduos
- E Cartucho de reagentes

O compartimento de reagentes contém o refrigerador de reagentes e as posições do frasco do tampão de limpeza (PR2) e do frasco de resíduos.

Durante a execução, o refrigerador de reagentes mantém um cartucho de reagentes descartável. Durante a limpeza do instrumento, o refrigerador de reagentes sustenta a bandeja de limpeza. O programa automaticamente abaixa os aspiradores de líquidos em cada reservatório do cartucho de reagentes no momento apropriado durante uma execução, dependendo do processo que está sendo executado.

À direita do refrigerador de reagentes há duas aberturas, uma para o frasco de PR2 e outra para o frasco de resíduos. A alça dos aspiradores de líquidos mantém as garrafas no lugar e abaixa o aspirador de líquidos apropriado em cada frasco. Os reagentes são bombeados pelos aspiradores de líquidos e pelas linhas de fluxo de reagentes e seguem para a lâmina de fluxo. Os resíduos dos reagentes são colocados no frasco de resíduos durante todo o processo.

Cartucho de reagentes

O cartucho de reagentes MiSeq é um material de consumo descartável que consiste em reservatórios selados preenchidos com reagentes de clusterização e sequenciamento suficientes para o sequenciamento de uma lâmina de fluxo.

Cada reservatório do cartucho é numerado. As bibliotecas de amostras são carregadas no cartucho na posição 17, que é rotulada como **Load Samples** (Carregamento de amostras).

Visão geral do kit de reagentes do MiSeq

Para realizar uma execução no MiSeq, é necessário um kit de reagentes descartável do MiSeq, disponível em diferentes tipos e tamanhos. Cada tipo de kit de reagentes do MiSeq inclui um tipo de lâmina de fluxo específico do kit e todos os reagentes necessários para a realização de uma execução.

A lâmina de fluxo, o frasco de PR2 e o cartucho de reagentes fornecidos no kit usam identificação por radiofrequência (RFID) para rastreamento e compatibilidade precisos dos materiais de consumo.

É preciso usar o cartucho de reagentes associado ao seu tipo de lâmina de fluxo. Se o cartucho de reagentes não for compatível, uma mensagem aparecerá durante a configuração da execução solicitando que você carregue um cartucho de reagentes compatível.

Para obter uma descrição dos kits de reagentes disponíveis, acesse o site da Illumina: support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.ilmn.

Para obter informações sobre o conteúdo e os requisitos do kit, consulte a documentação de preparação de reagentes do kit que você está usando.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

Os materiais de consumo a seguir, fornecidos pelo usuário, devem estar disponíveis antes do início de uma execução.

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
1.0 N NaOH, qualidade de biologia molecular	Fornecedor de itens de uso comum de laboratório	Desnaturação de bibliotecas de amostras e DNA de controle de PhiX
Compressa com álcool, 70% isopropílico ou 70% etílico	VWR, nº do catálogo 95041-714* Fornecedor de itens de uso comum de laboratório	Limpeza do suporte da lâmina de fluxo
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral
Lenço de papel de laboratório, poucos fiapos	VWR, nº do catálogo 21905-026*	Limpeza da plataforma da lâmina de fluxo e do selo que cobre o reservatório de carregamento das amostras
Lenço de papel para lentes, 4 x 6 pol.	VWR, nº do catálogo 52846-001*	Limpeza da lâmina de fluxo
Tubos de microcentrífuga	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Desnaturação e diluição de bibliotecas de amostras e DNA de controle de PhiX
Hipoclorito de sódio	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza da linha padrão para uso com o fluxo de trabalho do VeriSeq (opcional para outros fluxos de trabalho)
Tween 20	Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949	Limpeza do instrumento

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
Pinças, plásticas com ponta quadrada (opcional)	McMaster-Carr, nº do catálogo 7003A22*	Remoção da lâmina de fluxo do recipiente de transporte da lâmina de fluxo
Água, qualidade de laboratório	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza do instrumento

* ou equivalente

Orientações para água de qualidade de laboratório

Utilize sempre água de qualidade de laboratório para realizar os procedimentos com o instrumento. Nunca use água da torneira ou água desionizada.

Abaixo estão exemplos de águas com qualidade aceitável para laboratório:

- ▶ Illumina PW1
- ▶ Água de 18 Megohm (M Ω)
- ▶ Água Milli-Q
- ▶ Água Super-Q
- ▶ Água de qualidade de biologia molecular

Iniciar o MiSeq

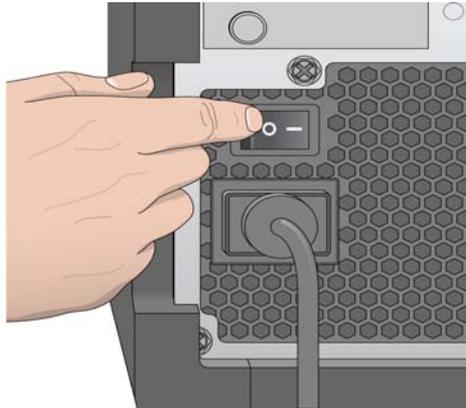


OBSERVAÇÃO

A Illumina recomenda que você deixe o instrumento ligado continuamente. No entanto, se o instrumento tiver que ser desligado, siga o procedimento descrito em *Desligar o instrumento* na página 81. Espere no **mínimo** 60 segundos antes de colocar o interruptor na posição ON (ligado).

- 1 Se o MiSeq não estiver já ligado, localize o interruptor localize o interruptor no lado direito do instrumento, no painel traseiro. Ele está localizado no canto inferior, logo acima do cabo de energia.

Figura 1 Localização do interruptor



- 2 Coloque o interruptor na posição **ON (ligado)**. O computador do instrumento integrado será iniciado.
- 3 Faça login no sistema operacional usando o nome de usuário e a senha predefinidos:
 - Nome de usuário: sbsuser
 - Senha: sbs123

Espere até que o sistema operacional termine de carregar. Quando o sistema estiver pronto, o MiSeq Control Software (MCS) será ativado e inicializará o sistema automaticamente.

Depois que a inicialização for concluída, a tela Welcome (Boas-vindas) será exibida.

Conceitos do MiSeq

Os seguintes conceitos e termos são comuns a todas as etapas de configuração da execução no MiSeq.

Conceito	Descrição
Fluxo de trabalho de análise	Um procedimento de análise secundária realizado pelo MiSeq Reporter. O fluxo de trabalho de análise para cada execução é especificado na planilha de amostras.
Manifesto	O arquivo que especifica um genoma de referência e as regiões de referência buscadas para serem usadas na etapa de alinhamento. Para fluxos de trabalho que necessitem de um manifesto, o arquivo de manifesto é especificado na planilha de amostras e copiado para a pasta de manifesto designada no MCS.
Genoma de referência	Arquivo no formato FASTA que contém as sequências de genoma usadas durante a análise. Para a maioria dos fluxos de trabalho de análise, o arquivo do genoma de referência está especificado na planilha de amostras.
Pasta da execução	A estrutura de pastas preenchida pelo software de análise primária RTA (pasta MiSeqOutput) ou a pasta preenchida pelo MiSeq Reporter (MiSeq Analysis). Para obter mais informações, consulte <i>Pastas da execução</i> na página 32.
Planilha de amostras	Um arquivo de valores separados por vírgula (*.csv) que contém as informações necessárias para configurar e analisar uma execução de sequenciamento, incluindo uma lista de amostras e suas sequências de índices. A planilha de amostras deve ser fornecida durante as etapas de configuração da execução no MiSeq. Após o início da execução, a planilha de amostras é renomeada para SampleSheet.csv e copiada nas pastas de execução: MiSeqTemp, MiSeqOutput e MiSeqAnalysis.

Para obter mais informações sobre os fluxos de trabalho da análise e os formatos do arquivo de manifesto, consulte o *Guia do usuário do MiSeq Reporter* (nº de catálogo 15042295).

Para obter mais informações sobre as planilhas de amostras, consulte o *Guia de referência rápida de planilhas de amostras do MiSeq* (nº de catálogo 15028392).

Software MiSeq

Três aplicativos são pré-instalados no computador do instrumento:

- ▶ **MiSeq Control Software (MCS)**—Controla a operação do instrumento. A interface do MiSeq Control Software (MCS) orienta você nas etapas para carregar a lâmina de fluxo e os reagentes antes de iniciar a execução. Uma visão geral das estatísticas de qualidade aparece conforme a execução avança. Durante a execução, o MCS opera a plataforma da lâmina de fluxo, dispensa os reagentes, controla as temperaturas da lâmina de fluxo e captura as imagens de clusters na lâmina de fluxo. O MCS realiza a execução de acordo com os parâmetros especificados na planilha de amostras.
- ▶ **Real Time Analysis (RTA)**—Executa a análise primária. O Real Time Analysis (RTA), um software integrado de análise primária, realiza a chamada de base e a análise de imagens, e atribui uma pontuação de qualidade a cada base para cada ciclo. As imagens são armazenadas temporariamente na pasta da execução para processamento pelo RTA e depois automaticamente excluídas quando a análise do RTA é concluída.
- ▶ **MiSeq Reporter**—Executa a análise secundária. O software de análise MiSeq Reporter processa as chamadas de base geradas durante a análise primária e produz informações sobre o conjunto de elementos contíguos, alinhamento e variantes para cada genoma solicitado. O fluxo de trabalho de análise especificado na planilha de amostras determina o tipo de análise realizado. Para obter mais informações, consulte *Visão geral do MiSeq Reporter* na página 31.

Os programas opcionais usados fora do instrumento incluem o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para obter mais informações, consulte *Sequencing Analysis Viewer* na página 27.

Tela Welcome (Boas-vindas)

A interface do MCS abre a tela Welcome (Boas-vindas) quando o software é iniciado.

Figura 2 Tela Welcome (Boas-vindas)



- ▶ **Sequence (Sequenciar)**—Esta opção abre uma série de telas que guiam você pelas etapas de configuração para a execução. Consulte *Telas Run Setup (Configuração da execução)* na página 18.
- ▶ **Perform Wash (Realizar limpeza)**—Fornece opções para iniciar dois tipos de limpeza no instrumento: limpeza de manutenção ou limpeza de espera. Consulte *Limpezas do instrumento* na página 65.
- ▶ **Manage Files (Gerenciar arquivos)**—Oferece controles para mover, excluir e fazer upload de arquivos no computador do instrumento. Consulte *Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)* na página 19.
- ▶ **Run Options (Opções de execução)**—Fornece opções para a limpeza pós-execução, a alteração da localização padrão de pastas de dados e a especificação de preferências de notificação por e-mail. Consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 22.
- ▶ **Manage Instrument (Gerenciar instrumento)**—Fornece opções para ir para as configurações do sistema, executar uma verificação no sistema, atualizar manualmente o software, reiniciar ou desligar o instrumento. Consulte *Tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento)* na página 26.
- ▶ **Updates Available (Atualizações disponíveis)**—Esta opção só aparecerá na tela Welcome (Boas-vindas) se uma atualização de software estiver disponível. O MiSeq deve estar conectado a uma rede com acesso à Internet para ativar esta opção. Consulte *Atualizações de software* na página 80.

Indicadores de atividade

Vários ícones estão localizados no canto inferior direito de cada tela da interface. Cada ícone é um indicador de atividade que mostra qual atividade está sendo executada pelo instrumento.

Figura 3 Indicadores de atividade



Da esquerda para a direita, os indicadores de atividade representam as seguintes atividades:

- ▶ Movimentação do estágio Y
- ▶ Movimentação do estágio Z
- ▶ Ativação da funcionalidade eletrônica
- ▶ Uso da câmera
- ▶ Bombeamento através do sistema de fluxo de reagentes

Indicadores de sensor

Quatro indicadores de sensor na base de cada tela de interface representam o status de um componente do instrumento.

Figura 4 Indicadores de sensor



Da esquerda para a direita, os indicadores de sensor representam os seguintes componentes:

- ▶ Porta do compartimento da lâmina de fluxo na posição aberta ou fechada
- ▶ Temperatura do refrigerador dos reagentes em °C
- ▶ Temperatura da lâmina de fluxo em °C
- ▶ Status da conexão do BaseSpace® (mostrado como não conectado)

Ícones de status

No canto superior direito da tela Welcome (Boas-vindas), há um ícone de status que indica as eventuais mudanças nas condições durante a configuração da execução ou durante a execução.

Ícone de status	Nome do status	Descrição
	Status OK	Nenhuma mudança. O sistema está normal.
	Atenção	Informação importante. Uma ação é recomendada.
	Advertência	As advertências não interrompem uma execução, mas podem exigir uma ação antes de prosseguir.
	Erro	Os erros geralmente interrompem uma execução e normalmente exigem uma ação antes de prosseguir com a execução.

Quando ocorre uma alteração em uma condição, o ícone muda para a imagem associada e pisca para alertar. Selecione o ícone para abrir a janela de status e exibir uma descrição da condição.

- ▶ Selecione qualquer item listado para ver uma descrição detalhada da condição e instruções para resolver a condição, se for o caso.
- ▶ Selecione **Acknowledge (Confirmar)** para aceitar a mensagem e **Close (Fechar)** para fechar a caixa de diálogo.

É possível filtrar os tipos de mensagens que aparecem na janela de status, selecionando os ícones ao longo da margem superior da janela. A seleção de um ícone alterna entre exibir ou ocultar a condição.

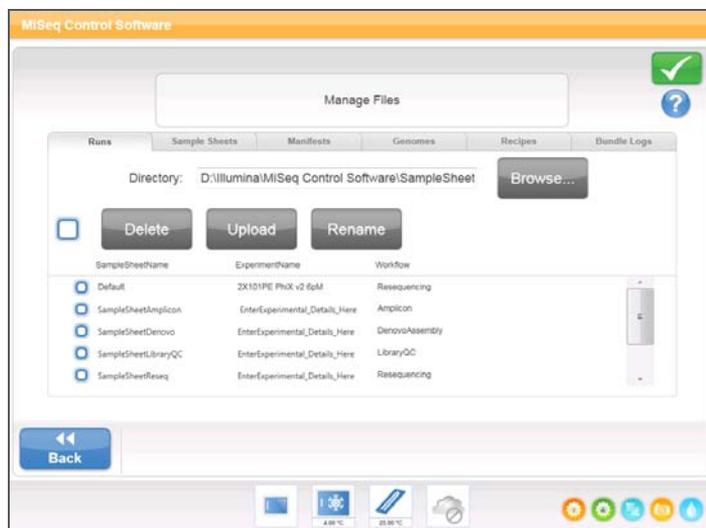
Telas Run Setup (Configuração da execução)

Quando você seleciona **Sequence (Sequenciar)** na tela Welcome (Boas-vindas), várias telas de configuração da execução se abrem na seguinte ordem: BaseSpace Option (Opção do BaseSpace), Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo), Load Reagents (Carregar reagentes), Review (Revisão) e Pre-Run Check (Verificação pré-execução). Para obter mais informações, consulte *Configurar uma execução usando o MSC* na página 43.

Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)

Use o recurso Manage Files (Gerenciar arquivos) para mover, carregar ou apagar arquivos do computador do instrumento. A tela é dividida em seis guias: Runs (Execuções), Sample Sheets (Planilhas de amostra), Manifests (Manifestos), Genomes (Genomas), Recipes (Receitas) e Bundle Logs (Agrupar logs).

Figura 5 Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)



Opções do Manage Files (Gerenciar arquivos)

Em qualquer guia da tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione **Browse (Procurar)** para ir para os arquivos acessíveis ao instrumento.

Guia	Recursos
Runs (Execuções)	Delete (Excluir) ou Move (Mover)
Sample Sheets (Planilhas de amostras)	Delete (Excluir), Upload (Carregar) ou Rename (Renomear)
Manifests (Manifestos)	Delete (Excluir) ou Upload (Carregar)
Genomes (Genomas)	Delete (Excluir) ou Upload (Carregar)
Recipes (Receitas)	Delete (Excluir) ou Upload (Carregar)
Bundle Logs (Agrupar logs)	Bundle Logs (Agrupar logs)

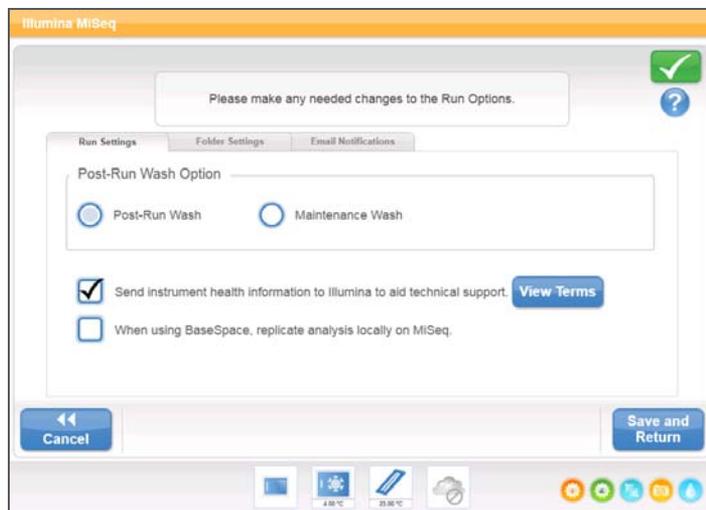
- ▶ **Delete (Excluir)**—Selecione a caixa de seleção ao lado do arquivo ou da pasta listados e selecione **Delete (Excluir)**. O recurso Delete (Excluir) está disponível em todas as guias, com exceção da guia Bundle Logs (Agrupar logs).
- ▶ **Move (Mover)**—Disponível apenas para pastas de execução. Marque a caixa de seleção ao lado do nome da pasta, selecione **Move (Mover)** e vá até um local apropriado. A opção **Move (Mover)** *copia* a pasta de execução para um novo local e *exclui* a pasta do local anterior.
- ▶ **Select All Files (Selecionar todos os arquivos)**—Marque a caixa de seleção à esquerda do botão Delete (Excluir) e selecione uma ação: Delete (Excluir) ou Move (Mover). A ação é aplicada a todos os arquivos ou pastas.
- ▶ **Upload Files (Carregar arquivos)**—disponível para planilhas de amostras, manifestos, genomas e receitas. Se o MiSeq não estiver conectado a uma rede, use este recurso para carregar os arquivos no computador do instrumento a partir de uma unidade USB. Selecione **Upload (Carregar)** e vá até o local em que o arquivo está, dentro de uma unidade USB. O arquivo é carregado para a pasta indicada no campo Directory (Diretório).
- ▶ **Rename (Renomear)**—Disponível apenas para planilhas de amostras. Marque a caixa de seleção ao lado do arquivo de planilha de amostras e selecione **Rename (Renomear)**. Use o teclado da tela para renomear a planilha de amostras.

- ▶ **Bundle Logs (Agrupar logs)**—Esse comando combina e compacta grupos de arquivos solicitados pelo suporte técnico da Illumina para fins de solução de problemas. Para obter mais informações, consulte *Agrupar logs para solução de problemas* na página 85.

Tela Run Options (Opções de execução)

A tela Run Options (Opções de execução) tem três guias para especificar as configurações padrão para uma execução: Run Settings (Configurações da execução), Folder Settings (Configurações de pasta) e Email Notifications (Notificações por e-mail).

Figura 6 Guia Run Settings (Configurações de execução) da tela Run Options (Opções de execução)



Guia Run Settings (Configurações de execução)

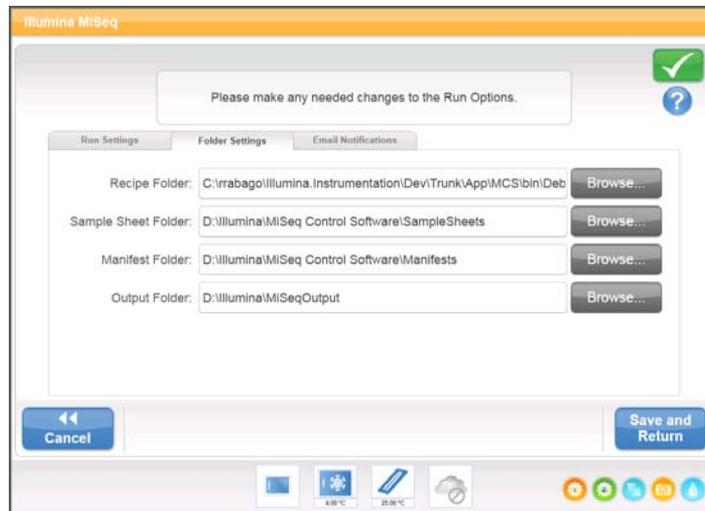
- ▶ **Opção Post-Run Wash (Limpeza pós-execução)**—É necessária uma limpeza no instrumento após cada execução. O programa exige que a lavagem seja feita antes de configurar uma execução subsequente. É possível especificar qual tipo de limpeza será executada por padrão. Cada limpeza pós-execução dura aproximadamente 30 minutos. Cada limpeza de manutenção dura aproximadamente 1 hora.
- ▶ **Send Instrument Health (Enviar integridade do instrumento)**—A Illumina recomenda marcar esta opção para ajudar o suporte técnico da Illumina na solução de possíveis problemas. Os únicos arquivos enviados para a Illumina são os arquivos de log (arquivos de interoperabilidade e arquivos de log). O instrumento deve estar conectado a uma rede com acesso à Internet para usar este recurso.

- ▶ **Replicate Analysis Locally (Replicar análise localmente)**—Esta configuração oferece a opção de realizar a análise localmente no instrumento e no BaseSpace.
 - Se você estiver usando o BaseSpace e selecionar esta opção, o MiSeq Reporter será iniciado automaticamente após a execução e realizará a análise localmente.
 - Se você estiver usando o BaseSpace e não selecionar esta opção, o MiSeq Reporter não será iniciado automaticamente após a execução e a análise só será realizada no BaseSpace.
 - Selecione esta opção se estiver executando o fluxo de trabalho do VeriSeq com o BlueFuse Multi.

Guia Folder Settings (Configurações de pasta)

É possível especificar os locais das pastas na guia Folder Settings (Configurações de pasta). As pastas podem estar em uma rede local ou no computador do instrumento.

Figura 7 Guia Folder Settings (Configurações de pasta)



- ▶ **Recipes (Receitas)**—define o local padrão para as receitas. Receitas são arquivos XML que o software usa para realizar a execução de sequenciamento. Uma receita é criada no início da execução com base nos parâmetros da planilha de amostras, e em seguida a receita é copiada para a pasta de saída.

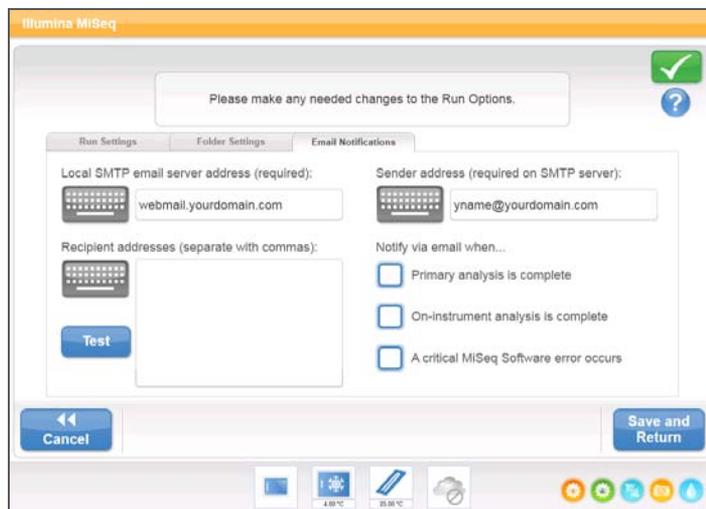
- ▶ **Sample Sheets (Planilhas de amostras)**—Define o local padrão para as planilhas de amostras. As planilhas de amostras são criadas antes da preparação das bibliotecas e contêm os parâmetros para a execução.
- ▶ **Manifests (Manifestos)**—Define o local padrão para os arquivos de manifesto. Os arquivos de manifesto são necessários para alguns tipos de biblioteca. Consulte a documentação de preparação de amostras para seu kit de preparação de amostras, bem como o *Guia de referência rápida de planilha de amostras (nº do catálogo 15028392)*.
- ▶ **MiSeqOutput**—Define o local padrão para os arquivos de saída da análise. A Illumina recomenda alterar a pasta de saída padrão para um local de rede para fins de compartilhamento, armazenamento a longo prazo e, opcionalmente, para usar o MiSeq Reporter off-line.

Para obter mais informações, consulte *Pastas da execução* na página 32.

Guia Email Notifications (Notificações por e-mail)

O MiSeq pode ser configurado para enviar um e-mail de notificação quando a análise primária for concluída, quando a análise secundária no instrumento for concluída ou se ocorrer um erro de software crítico no MiSeq.

Figura 8 Guia Email Notifications (Notificações por e-mail)



- ▶ **Local SMTP email server address (Endereço de servidor de e-mail SMTP local)**—Use o teclado da tela para digitar o endereço de servidor de e-mail SMTP local.

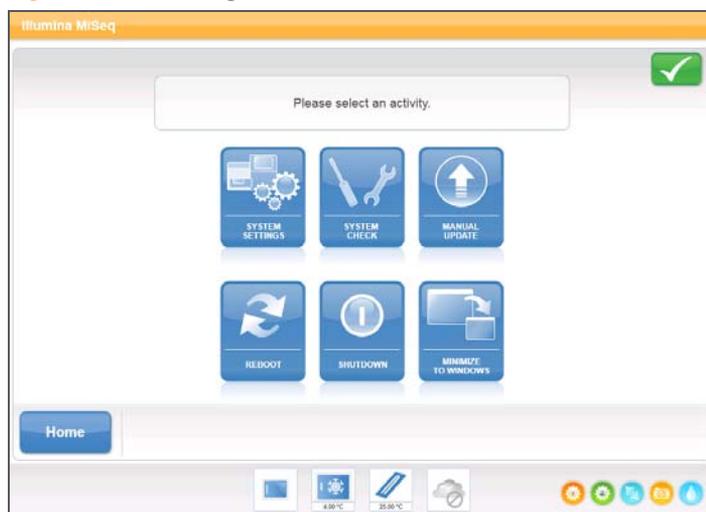
Se necessário, entre em contato com o administrador da instalação para obter essa informação.

- ▶ **Sender email address (Endereço de e-mail do remetente)**—Use o teclado da tela para digitar o endereço de e-mail do remetente. Pode ser seu endereço de e-mail ou um endereço diferente especificado para o envio de notificações por e-mail. O endereço de e-mail do remetente deve ter o mesmo nome de domínio que o endereço do servidor de e-mail.
- ▶ **Email addresses (Endereços de e-mail)**—Use o teclado da tela para digitar os endereços de e-mail de cada destinatário que irá receber notificações. Separe cada endereço de e-mail com uma vírgula. Selecione **Test (Teste)** para enviar um e-mail de teste aos destinatários das notificações.
- ▶ **Notify via email when (Notificar por e-mail quando)**—Marque a caixa de seleção para os eventos da execução que vão gerar uma notificação.

Tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento)

A tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) contém controles para as configurações do sistema, solução de problemas, atualizações manuais do software, reinício ou finalização do software do instrumento.

Figura 9 Tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento)



- ▶ **System Settings (Configurações do sistema)**—Fornece a opção para alterar as configurações IP, o nome da máquina ou o domínio. Consulte *Tela System Settings (Configurações do sistema)* na página 87.
- ▶ **System Check (Verificação do sistema)**—Fornece opções de solução de problemas para verificar o status operacional de componentes do instrumento. Consulte *Tela System Check (Verificação do sistema)* na página 89.
- ▶ **Manual Update (Atualização manual)**—Fornece a opção para atualizar o software de forma manual no computador do instrumento. Consulte *Tela Manual Update (Atualização manual)* na página 80.
- ▶ **Reboot (Reiniciar)**—Use o comando Reboot para reiniciar o software do sistema.
- ▶ **Shut Down (Finalizar)**—Use o comando Shut Down (Finalizar) para finalizar o software de controle e o Windows no computador do instrumento. Consulte *Desligar o instrumento* na página 81.

- ▶ **Minimize to Windows (Minimizar para Windows)**—Fornece acesso rápido ao sistema operacional do instrumento e quaisquer pastas localizadas no computador do instrumento quando o MCS estiver sendo executado no modo de quiosque, oposto ao modo Windows.

Sequencing Analysis Viewer

É possível monitorar a execução de forma mais detalhada sem interferir com ela usando o Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV). O MiSeq deve estar conectado para exibir os resultados da análise primária com o SAV.

O SAV permite analisar as métricas durante uma execução conforme elas são geradas, e também mais tarde, depois da conclusão da execução. Instale o SAV em um computador independente do MiSeq, com acesso à mesma rede conectada ao instrumento. Após a inicialização do software, vá para a pasta de saída de sua execução.

Após a geração do modelo, o SAV fornece as métricas geradas pelo RTA e organiza-as em lotes, gráficos e tabelas.



OBSERVAÇÃO

O SAV é universal para os sistemas de sequenciamento da Illumina; a maioria deles utiliza uma lâmina de fluxo de oito canaletas. Algumas exibições incluem listas suspensas que mostram as canaletas 1–8. A lâmina de fluxo do MiSeq é uma lâmina de fluxo de canaleta única, portanto, os dados dela aparecem quando você seleciona **All (Todos)** ou **Lane 1 (Canaleta 1)**.

Para obter mais informações, consulte o *Guia do usuário do Sequencing Analysis Viewer* (nº de catálogo 15020619).

Duração da execução

A duração da execução depende do número de ciclos realizados. Com o MCS v2.3, é possível realizar uma execução do tipo paired-end de até 2 x 301 ciclos de sequenciamento, além das leituras de índice.

Além disso, a duração da execução depende da versão dos reagentes do MiSeq usados e das atualizações de melhoria de desempenho instaladas no instrumento.

Para obter informações sobre as durações previstas e outras especificações, visite a página de especificações do sistema MiSeq no site da Illumina (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn).

Número de ciclos em uma leitura

O número de ciclos realizados em uma leitura é um ciclo a mais do que o número de ciclos analisados. O ciclo extra é necessário para os cálculos de phasing e prephasing.

Por exemplo, uma execução de 300 ciclos do tipo paired-end realiza duas leituras de 301 ciclos (2×301) para um total de 602 ciclos. No final da execução, 2×300 ciclos são analisados.

Opções de análise secundária

Os dados de sequenciamento do MiSeq podem ser analisados no computador do instrumento por meio do MiSeq Reporter, ou na nuvem, por meio do BaseSpace. Se estiver executando o fluxo de trabalho do VeriSeq, utilize o software BlueFuse Multi para análise. O BaseSpace e o MiSeq Reporter produzem informações sobre alinhamento, variantes e o conjunto de elementos contíguos para cada genoma solicitado e para cada amostra de uma execução com várias amostras.

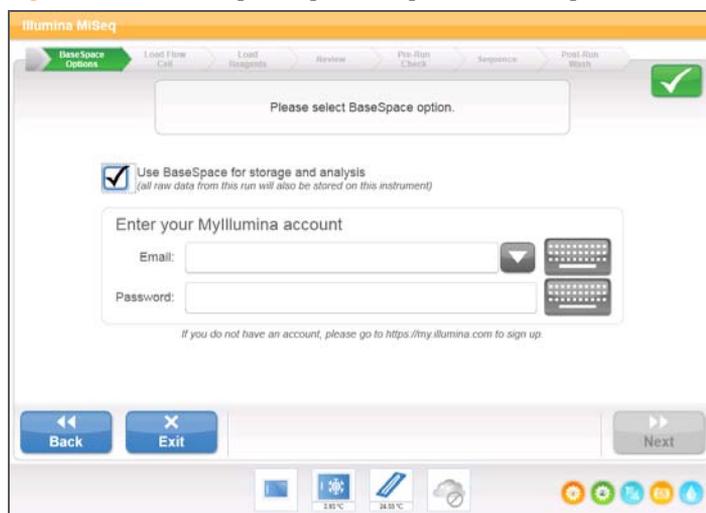
Visão geral do BaseSpace

O BaseSpace é um ambiente de computação em nuvem da Illumina. Usar o BaseSpace para armazenar e analisar os dados de execução oferece as seguintes vantagens:

- ▶ Elimina a necessidade de computação e armazenamento no local
- ▶ Permite a análise e o gerenciamento de dados com base na Web
- ▶ Permite que uma nova execução de sequenciamento seja iniciada enquanto os dados estão sendo analisados
- ▶ Fornece ferramentas para compartilhamento e colaboração global

Você pode fazer login no BaseSpace ao configurar a execução de sequenciamento. Ao usar o BaseSpace, você pode configurar sua execução para que os dados brutos da execução também sejam armazenados localmente. Para obter mais informações, consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 22.

Figura 10 Tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace)



Quando você começar a execução de sequenciamento, o ícone do BaseSpace é alterado para indicar que o MiSeq está conectado ao BaseSpace e que os arquivos de dados estão sendo transferidos para seu local seguro. Os arquivos de dados são criptografados durante o processo, descriptografados durante a análise e criptografados novamente ao serem armazenados.

Figura 11 Ícone indicando conexão ao BaseSpace



O BaseSpace se desconecta automaticamente do MiSeq no fim da execução ou assim que o upload de todos os arquivos da análise primária termina. Se a conexão com a Internet for interrompida, o upload dos arquivos de análise continuará depois que a conexão for restaurada, a partir do ponto em que ocorreu a interrupção.

Assim que o último arquivo de chamada de base for carregado no BaseSpace, a análise secundária dos dados é iniciada. Os mesmos fluxos de trabalho de análise têm suporte no BaseSpace, assim como a análise no instrumento usando o MiSeq Reporter.

Vários genomas são fornecidos com a instalação do MiSeq Reporter. O BaseSpace é compatível apenas com os genomas incluídos com o MiSeq Reporter.

É possível se conectar ao BaseSpace no site basespace.com. Faça o login usando sua conta MyIllumina.

Para obter mais informações sobre como usar o BaseSpace, consulte a ajuda on-line do BaseSpace no site da Illumina:
www.illumina.com/help/BaseSpaceHelp/BaseSpaceHelp.htm.

Visão geral do MiSeq Reporter

O MiSeq Reporter é um aplicativo de serviço do Windows que processa as chamadas de base geradas pela análise primária. O MiSeq Reporter inicia a análise secundária imediatamente após a conclusão da análise primária da execução de sequenciamento.

O MiSeq Reporter é executado no computador do instrumento. No entanto, a interface do software deve ser exibida por um navegador em outro computador conectado à mesma rede do MiSeq Reporter.

Quando a análise secundária é concluída, um arquivo chamado `CompletedJobInfo.xml` é gravado na pasta de execução. Para mais informações, consulte o *Guia do usuário do MiSeq Reporter* (nº de catálogo 15042295).

Sequenciamento durante a análise

Os recursos de computação do sistema MiSeq são dedicados ao sequenciamento ou à análise. Se uma nova execução de sequenciamento for iniciada no MiSeq antes de a análise secundária de uma execução anterior ser concluída, a análise secundária será interrompida automaticamente.

Será possível reiniciar a análise secundária usando o recurso Requeue (Recolocar na fila) na interface do MiSeq Reporter depois que a nova execução de sequenciamento for concluída. Nesse ponto, a análise secundária começa do início.

Pastas da execução

Cada execução no MiSeq gera três pastas de execução, cada uma com uma finalidade específica:

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp**—Quando a execução é iniciada, uma pasta temporária de execução é criada no disco local do computador do instrumento e usada como uma área de trabalho para o MCS e o RTA. Não é necessário acessar a pasta MiSeqTemp. O conteúdo dessa pasta é excluído após sete dias.
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqOutput**—O RTA copia os arquivos da pasta MiSeqTemp para a pasta MiSeqOutput. Conforme os arquivos de análise primária são gerados, o RTA os copia para a pasta MiSeqTemp e preenche a pasta MiSeqAnalysis. As imagens de foco e as imagens em miniatura não são copiadas para a pasta MiSeqAnalysis. É possível alterar a localização da pasta de saída no campo Output Folder (Pasta de saída) na tela Run Options (Opções de execução). Para obter mais informações, consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 22.
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis**—Quando a análise primária é concluída, o MiSeq Reporter acessa a pasta MiSeqAnalysis no disco local do instrumento para começar a análise secundária. Todos os arquivos gravados na pasta MiSeqAnalysis são copiados de volta para a pasta MiSeqOutput. Para obter mais informações, consulte *Conteúdo da Pasta MiSeqOutput* na página 33.
Se você estiver usando o BaseSpace para a análise sem replicá-la localmente, a pasta MiSeqAnalysis no disco local do instrumento ficará vazia.

Nomenclatura da pasta principal

O nome da pasta principal da execução identifica a data da execução, o número do instrumento e a lâmina de fluxo usada para a execução. Para qualquer execução, cada pasta de execução segue o mesmo formato de nomenclatura.

Por padrão, o nome da pasta usa o seguinte formato:

AAMMDD_<Número do instrumento>_<Número da execução>_A<Código de barras da lâmina de fluxo>

O número da execução aumenta em um cada vez que uma execução é realizada em um determinado instrumento.

Conteúdo da Pasta MiSeqOutput

Após a análise primária, a pasta MiSeqOutput é preenchida com os arquivos necessários para a análise secundária pelo MiSeq Reporter. Quando a análise secundária estiver concluída, as pastas MiSeqOutput e MiSeqAnalysis serão idênticas, com exceção da pasta MiSeqOutput, que contém duas subpastas para arquivos de imagem: Images e Thumbnail_Images. Essas subpastas não são necessárias para a análise secundária.

Arquivos

Os arquivos que são copiados para as pastas de saída e análise incluem os seguintes:

- ▶ **SampleSheet.csv**—Fornece parâmetros para a execução e a análise posterior. No início da execução, a planilha de amostras é copiada para a pasta raiz e renomeada como SampleSheet.csv. São gravadas cópias em Data\Intensities e Data\Intensities\BaseCalls.
- ▶ **runParameters.xml**—Contém um resumo dos parâmetros de execução e informações sobre componentes da execução, como a RFID da lâmina de fluxo e os reagentes associados à execução.
- ▶ **RunInfo.xml**—Contém informações de alto nível da execução, tais como o número de leituras e ciclos na execução de sequenciamento, e se existe uma leitura indexada.

Pastas

As pastas que são copiadas para as pastas de saída e análise incluem as seguintes pastas geradas durante a execução do sequenciamento:

- ▶ <Nome da pasta da execução>\Config—Contém arquivos de configuração para a execução.
- ▶ <Nome da pasta da execução>\Data—Contém as subpastas Intensities, BaseCalls e Alignment. Os dados gerados no MiSeq Reporter estão localizados na subpasta Alignment.
- ▶ <Nome da pasta da execução>\Data\RTA Logs—Contém arquivos de log que descrevem cada etapa realizada pelo RTA para cada leitura.
- ▶ <Nome da pasta de execução>\Data\Intensities\BaseCalls—Contém subpastas com os arquivos de chamada de base (*.bcl), arquivos de phasing e matrix. O MiSeq Reporter grava os arquivos FASTQ nessa pasta durante a análise secundária. Para mais informações, consulte o *Guia do usuário do MiSeq Reporter (nº de catálogo 15042295)*.
- ▶ <Nome da pasta da execução>\Recipe—Contém a receita utilizada para a execução.

- ▶ <Nome da pasta da execução>\Logs—Contém arquivos de log que descrevem cada etapa realizada pelo instrumento para cada ciclo.
- ▶ <Nome da pasta de execução>\InterOp—Contém os arquivos binários usados pelo Sequencing Analysis Viewer (SAV) para resumir várias métricas de análise primária, como a densidade dos clusters, intensidades, pontuações de qualidade e qualidade geral da execução.

Os outros arquivos e pastas criados na pasta temporária da execução não são copiados para as pastas de saída e análise. Eles contêm arquivos temporários que não são necessários para a análise ou para a solução de problemas.

O MiSeq Reporter adiciona outras pastas, como a pasta Alignment (alinhamento), durante a análise secundária. Para mais informações, consulte o *Guia do usuário do MiSeq Reporter* (nº de catálogo 15042295).

Espaço em disco necessário

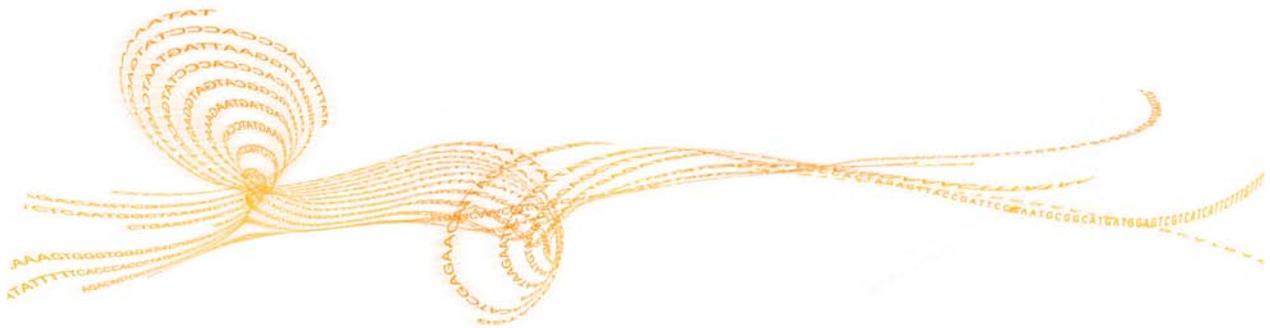
O computador integrado ao instrumento tem capacidade de armazenamento de aproximadamente 550 GB.

Antes de iniciar uma execução, o programa verifica o espaço em disco disponível. Se não houver espaço em disco suficiente para a execução, aparecerá um aviso. A mensagem indica quanto espaço em disco é necessário para a execução e quanto espaço em disco deve ser liberado para que a execução possa prosseguir.

Se você for solicitado a liberar espaço em disco, vá para a tela Welcome (Boas-vindas) e selecione **Manage Files** (Gerenciar arquivos). Na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione a guia **Runs** (Execuções). Mova ou exclua as pastas de execuções mais antigas, conforme o caso. Para mais informações, consulte *Tela Manage Files (Gerenciar arquivos)* na página 19. Depois de liberar o espaço adequado em disco, selecione **Restart Check** (Reiniciar verificação).

Realização de uma execução

Introdução	38
Fluxo de trabalho do MiSeq	39
Carregar bibliotecas de amostras	41
Configurar uma execução usando o MSC	43
Limpar a lâmina de fluxo	44
Carregamento da lâmina de fluxo	47
Carregamento de reagentes	49
Início da execução	53
Monitorar a execução	55
Geração do modelo de posições	57



Introdução

Para realizar uma execução no MiSeq, siga as etapas de configuração descritas neste capítulo. Depois do início da execução, não é necessária nenhuma intervenção do usuário.

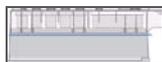
A execução do sequenciamento pode ser monitorada na tela Sequencing (Sequenciamento) ou remotamente com o uso do Sequencing Analysis Viewer (SAV), um aplicativo opcional que pode ser baixado no site da Illumina.

Uma vez concluída a execução do sequenciamento, faça a limpeza do instrumento.

Fluxo de trabalho do MiSeq



Desnature e dilua as bibliotecas (não se aplica a todos os tipos de bibliotecas). Consulte *Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq (Como preparar bibliotecas para sequenciamento no MiSeq - n^o do catálogo 15039740)*.



Prepare o cartucho de reagentes previamente preenchido para uso. Consulte o guia de preparação dos reagentes aplicável ao cartucho de reagentes MiSeq utilizado.



Coloque a mistura das bibliotecas no cartucho de reagentes no reservatório designado.



Na interface do software, selecione **Sequence** (Sequenciar) para iniciar as etapas de configuração da execução.
[Opcional] Conecte-se ao BaseSpace.



Limpe e seque cuidadosamente a lâmina de fluxo.
Carregue a lâmina de fluxo.



Carregue o frasco de PR2 e certifique-se de que o frasco de resíduos esteja vazio.
Carregue o cartucho de reagentes.



Revise os parâmetros da execução e os resultados da verificação pré-execução.
Selecione **Start Run** (Iniciar execução).



Monitore a execução com a interface do MCS ou com outro computador, usando o Sequencing Analysis Viewer (SAV).



Realize uma limpeza pós-execução.

Clusterização

Durante a clusterização, moléculas de DNA em fita simples são ligadas à superfície da lâmina de fluxo, e em seguida amplificadas por ponte para formar clusters.

Sequenciamento

Após a clusterização, são geradas imagens dos clusters por meio de combinações de filtro e LED específicas para cada um dos quatro dideoxinucleotídeos marcados através de fluorescência. Após a conclusão da geração da imagem de um bloco da lâmina de fluxo, a lâmina de fluxo é movida para expor o próximo bloco. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento. Após a análise das imagens, o programa realiza a análise primária, que inclui chamada de base, filtragem e pontuação de qualidade.

Análise

Uma vez concluída a execução, o programa de análise MiSeq Reporter é iniciado automaticamente para executar a análise secundária, que inclui o alinhamento e a chamada variante. É possível monitorar a análise secundária usando uma conexão à Internet em outro computador. Para obter mais informações, consulte *Visão geral do MiSeq Reporter* na página 31.

Carregar bibliotecas de amostras



OBSERVAÇÃO

Se for necessário para o seu tipo de biblioteca, desnature e dilua as bibliotecas, e adicione o controle opcional do PhiX. Consulte *Como preparar as bibliotecas de DNA para o sequenciamento no MiSeq (nº do catálogo 15039740)*.

Essa etapa não se aplica a todos os tipos de bibliotecas. Alguns métodos de preparação de amostras Illumina resultam em uma concentração normalizada de bibliotecas agrupadas pronta para uso. Consulte o guia de preparação de amostras do kit utilizado para preparar bibliotecas de amostras.



OBSERVAÇÃO

Se você estiver usando primers personalizados, prepare os primers e a planilha de amostras conforme descrito em *Uso de primers personalizados no MiSeq (nº de catálogo 15041638)*.

Quando o Cartucho de reagentes estiver completamente descongelado e pronto para uso, você estará pronto para carregar bibliotecas preparadas dentro do cartucho.

- 1 Utilize um lenço de papel de laboratório com poucos fiapos para limpar a vedação que cobre o reservatório rotulado como **Load Samples** (Carregamento de amostras).
- 2 Use a ponta de uma pipeta limpa de 1 ml para perfurar a vedação que cobre o reservatório rotulado **Load Samples** (Carregamento de amostras).

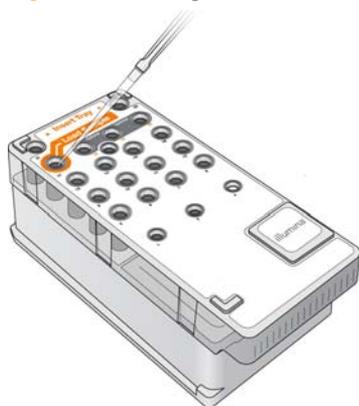


OBSERVAÇÃO

Não fure nenhuma outra posição dos reagentes. Outras posições dos reagentes são furadas automaticamente durante a execução de sequenciamento.

- 3 Com a pipeta, adicione 600 µl das bibliotecas preparadas no reservatório **Load Samples (Carregar amostras)**. Evite tocar na vedação enquanto a amostra é colocada.

Figura 12 Carregamento de bibliotecas



- 4 Vá diretamente para as etapas de configuração da execução usando a interface do MiSeq Control Software (MCS).

Configurar uma execução usando o MSC

- 1 Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Manage Instrument (Gerenciar instrumento)**.
- 2 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **Reboot (Reiniciar)** para reiniciar o software do sistema.
- 3 [Opcional] Na tela Run Options (Opções de execução), verifique os locais de pasta para receitas, planilhas de amostras, manifestos e a pasta MiSeqOutput. Para obter mais informações, consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 22.
- 4 Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Sequence (Sequenciar)** para iniciar as etapas de configuração da execução. A tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace) se abrirá.

Quando você seleciona **Sequence (Sequenciar)** na tela Welcome (Boas-vindas), várias telas de configuração de execução se abrem na seguinte ordem: BaseSpace Option (Opção do BaseSpace), Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo), Load Reagents (Carregar reagentes), Review (Revisão) e Pre-Run Check (Verificação pré-execução).

Configuração da opção BaseSpace

Para permitir o acesso ao BaseSpace, é preciso ter uma conexão de rede e uma conta no Myllumina.

- 1 Na tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace), siga um destes procedimentos:
 - a Marque a caixa de seleção **Use BaseSpace for storage and analysis (Usar o BaseSpace para armazenamento e análise)**. A análise será realizada no BaseSpace.
 - b Desmarque a caixa de seleção **Use BaseSpace for storage and analysis (Usar o BaseSpace para armazenamento e análise)**. A análise será realizada no instrumento.
- 2 Selecione **Next (Próximo)**. A tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo) se abrirá.

Limpar a lâmina de fluxo

A lâmina de fluxo está imersa no tampão de armazenamento em um recipiente de lâmina de fluxo.

A cor da tampa do recipiente indica o tipo de lâmina de fluxo:

- ▶ A tampa do recipiente da lâmina de fluxo padrão é clara.
- ▶ A tampa do recipiente da lâmina de fluxo PGS é transparente.
- ▶ A tampa do recipiente da microlâmina de fluxo é verde.
- ▶ A tampa do recipiente da nanolâmina de fluxo é amarela.

- 1 Coloque um novo par de luvas sem pó.
- 2 Usando uma pinça plástica, segure a lâmina de fluxo pela base do cartucho plástico e retire-a do recipiente.

Figura 13 Remoção da lâmina de fluxo



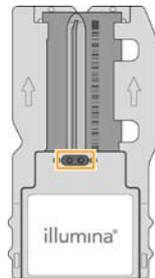
- 3 Enxágue levemente a lâmina de fluxo com água de qualidade de laboratório, tirando cuidadosamente o excesso de sais do vidro e do cartucho plástico. O excesso de sais pode afetar o assentamento da lâmina de fluxo no instrumento. Se os sais secarem na área de imagem, a imagem também pode ser afetada.

Figura 14 Enxágue da lâmina de fluxo



- 4 Com cuidado em torno da junta preta das portas da lâmina de fluxo, seque completamente a lâmina de fluxo e o cartucho plástico usando um tecido para limpeza de lentes sem fiapos. Seque delicadamente a área da junta e o vidro adjacente.

Figura 15 Junta e portas da lâmina de fluxo



- 5 Usando um tecido com álcool, limpe o vidro da lâmina de fluxo. Verifique se há manchas ou impressões digitais no vidro e se há fiapos ou fibras de tecido. Evite usar a compressa com álcool na junta das portas da lâmina de fluxo.

Figura 16 Secagem da lâmina de fluxo

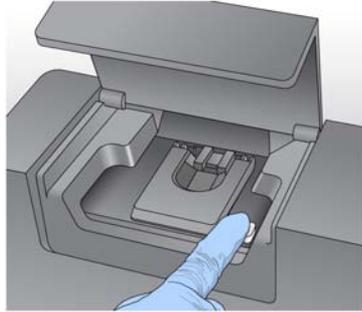


- 6 Seque o excesso de álcool com um tecido de limpeza de lentes sem fiapos. Inspeccione visualmente para se certificar de que as portas da lâmina de fluxo não tenham obstruções e que a junta esteja bem assentada em torno das portas da lâmina de fluxo. Se a junta parecer estar desalojada, pressione-a suavemente de volta no lugar até que esteja bem em volta das portas da lâmina de fluxo.

Carregamento da lâmina de fluxo

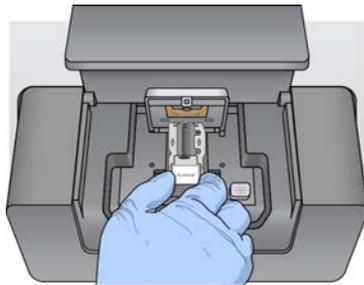
A tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo) solicita o carregamento da lâmina de fluxo.

Figura 17 Abertura da trava da lâmina de fluxo



- 1 Inspeção visualmente a plataforma da lâmina de fluxo para verificar se há fiapos. Caso haja fiapos ou outros detritos, limpe a plataforma da lâmina de fluxo usando uma compressa com álcool ou um tecido sem fiapos umedecido com etanol ou isopropanol. Limpe cuidadosamente a superfície da plataforma da lâmina de fluxo até que ela esteja limpa e seca.
- 2 Levante a porta do compartimento da lâmina de fluxo e depois aperte o botão de liberação à direita da trava da lâmina de fluxo. A trava da lâmina de fluxo se abrirá.
- 3 Segurando a lâmina de fluxo pelas bordas do cartucho da lâmina de fluxo, coloque a lâmina na plataforma.

Figura 18 Colocação da lâmina de fluxo na plataforma

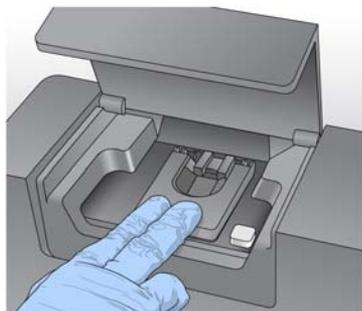


- 4 Pressione delicadamente a trava para fechá-la sobre a lâmina de fluxo.

**OBSERVAÇÃO**

Quando a trava da lâmina de fluxo está fechada, dois pinos de alinhamento próximos à dobradiça da trava se alinham e posicionam a lâmina de fluxo. Um clique audível indica que a trava da lâmina de fluxo está firme.

Figura 19 Fechamento da trava da lâmina de fluxo



- 5 Verifique o canto inferior esquerdo da tela para confirmar se a RFID da lâmina de fluxo foi lida com sucesso.

**OBSERVAÇÃO**

Se não for possível ler a RFID, o software guiará você pelas etapas para obter um código de desvio temporário e prosseguir com a configuração da execução. Para obter mais informações, consulte *Resolver a falha de leitura de RFID* na página 96.

- 6 Feche a porta do compartimento da lâmina de fluxo.
- 7 Selecione **Next (Próximo)** na tela Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo). A tela Load Reagents (Carregar reagentes) se abrirá.

Carregamento de reagentes

Há duas etapas para carregar os reagentes. Primeiro, carregue o frasco de PR2, verifique se o frasco de resíduos está vazio, e em seguida carregue o cartucho de reagentes.



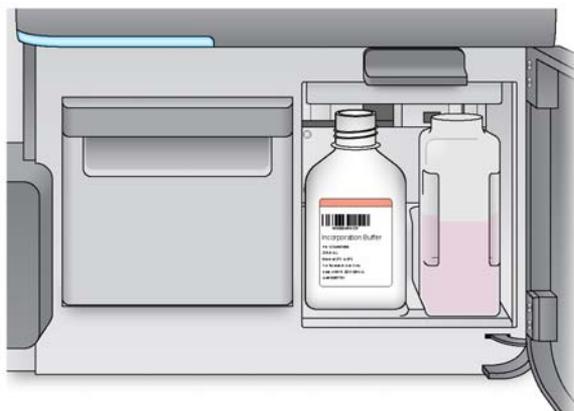
OBSERVAÇÃO

É preciso usar o cartucho de reagentes associado ao tipo de lâmina de fluxo carregado. Se o cartucho de reagentes não for compatível, uma mensagem aparecerá na tela. Selecione **Back (Voltar)** para carregar o cartucho de reagentes apropriado ou **Exit (Sair)** para voltar à tela Welcome (Boas-vindas).

Carregamento de PR2 e verificação do frasco de resíduos

- 1 Remova o frasco de PR2 do armazenamento de 2 °C a 8 °C. Inverta suavemente o frasco de PR2 para misturar e, depois, remova a tampa.
- 2 Abra a porta do compartimento de reagentes.
- 3 Levante a alça dos aspiradores de líquidos até que ela trave.
- 4 Coloque o frasco de PR2 na reentrância situada à direita do refrigerador de reagentes.

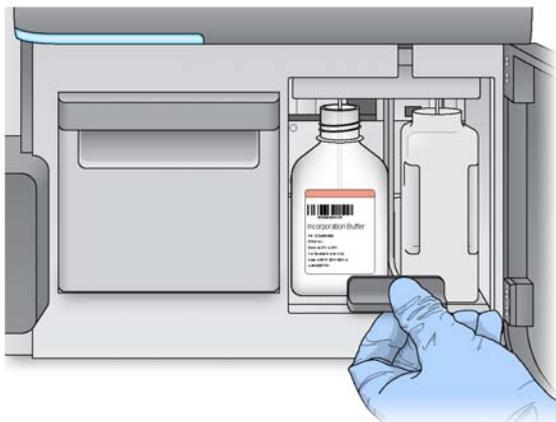
Figura 20 Carregamento do frasco de PR2



- 5 Verifique se o frasco de resíduos está vazio. Se ele não estiver vazio, esvazie o conteúdo dentro do recipiente para resíduos adequado.

- 6 Abaixe lentamente a alça dos aspiradores de líquidos. Os aspiradores de líquidos devem descer até os frascos de resíduos e de PR2.

Figura 21 Abaixe a alça dos aspiradores de líquidos



- 7 Verifique o canto inferior esquerdo da tela para confirmar se o RFID do frasco de PR2 foi lida com sucesso.



OBSERVAÇÃO

Se não for possível ler a RFID, o software guiará você pelas etapas para obter um código de desvio temporário e prosseguir com a configuração da execução. Para obter mais informações, consulte *Resolver a falha de leitura de RFID* na página 96.

- 8 Selecione **Next (Próximo)** na tela de carregamento de reagentes.

Carregamento do cartucho de reagentes



OBSERVAÇÃO

Não deixe a porta do refrigerador de reagentes aberta por longos períodos de tempo.

- 1 Abra a porta do refrigerador de reagentes.
- 2 Segure o cartucho de reagentes na extremidade com o rótulo da Illumina e introduza-o no refrigerador de reagentes até o fundo.

Figura 22 Carregamento do cartucho de reagentes



- 3 Feche a porta do refrigerador de reagentes.
- 4 Verifique o canto inferior esquerdo da tela para confirmar se o RFID do cartucho de reagentes foi lido com sucesso.



OBSERVAÇÃO

Se não for possível ler a RFID, o software guiará você pelas etapas para obter um código de desvio temporário e prosseguir com a configuração da execução. Para obter mais informações, consulte *Resolver a falha de leitura de RFID* na página 96.

Se o cartucho de reagentes não for compatível com a lâmina de fluxo, uma mensagem será exibida. Selecione **Back (Voltar)** para carregar um cartucho compatível, ou selecione **Exit (Sair)** para retornar à tela Welcome (Boas-vindas).

- 5 Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 6 Selecione **Next (Próximo)** na tela Load Reagents (Carregar reagentes). A tela Review (Revisão) se abrirá.

Alteração da planilha de amostras

Cada execução deve ter uma planilha de amostras. Por padrão, o programa procura por um arquivo de planilha de amostras com um nome que corresponda ao número do código de barras do cartucho de reagentes carregado no instrumento. Se não for encontrada uma planilha de amostras, aparecerá uma mensagem que solicita que você mostre o local da planilha de amostras correta para a execução.

Para fazer com que o programa consiga localizar a planilha de amostras, use o comando **Change Sample Sheet (Alterar planilha de amostras)** na tela Load Reagents (Carregar reagentes) para direcionar o software para a devida planilha de amostras.

Início da execução

Depois de carregar a lâmina de fluxo e os reagentes, revise os parâmetros da execução e realize uma verificação pré-execução antes de iniciar a execução.

Revisão de parâmetros de execução

- 1 Revise o nome do experimento, o fluxo de trabalho da análise e o tamanho da leitura. Esses parâmetros são especificados na planilha de amostras.
- 2 Revise os locais de pasta no canto inferior esquerdo. Se forem necessárias alterações, selecione **Change Folders (Alterar pastas)**. Quando as alterações forem concluídas, selecione **Save (Salvar)** e depois **Next (Próximo)**.
- 3 Selecione **Next (Próximo)**. A tela Pre-Run Check (Verificação pré-execução) se abrirá.

Alteração de pastas

Os locais das pastas atuais para receitas, planilha de amostras, manifestos e pastas de saída são listados no canto inferior esquerdo da tela Review (Revisão). Para alterar os locais das pastas, selecione **Change Folders (Alterar pastas)** e vá até o local de sua preferência. Usar esta opção na tela Review (Revisão) altera os locais das pastas somente para a execução atual.

Análise da verificação pré-execução

Antes de iniciar a execução, o sistema executa uma verificação de todos os componentes, espaço em disco e conexões de rede da execução.

Se algum item não passar na verificação pré-execução, uma mensagem com instruções sobre como corrigir o erro aparece na tela. Para obter mais informações, consulte *Resolver os erros de configuração da execução* na página 94.

Quando todos os itens passarem na verificação pré-execução, selecione **Start Run (Iniciar execução)**.

Observações importantes antes do início da execução



ADVERTÊNCIA

O MiSeq é sensível à vibração. Tocar no instrumento depois de iniciar uma execução pode afetar negativamente os resultados do sequenciamento.

Depois de selecionar **Start Run (Iniciar execução)**, não abra o compartimento da lâmina de fluxo ou as portas do compartimento de reagentes nem toque no monitor do instrumento, exceto para pausar a execução. Para obter mais informações, consulte *Pausar uma execução* na página 91.



ADVERTÊNCIA

Feche todos os arquivos do MiSeq antes de iniciar uma execução. Não abra nenhum arquivo durante uma execução.

Monitorar a execução

- 1 Durante a execução, monitore o progresso, as intensidades e as pontuações de qualidade que aparecem na tela Sequencing (Sequenciamento). A tela Sequencing (Sequenciamento) é somente para exibição.

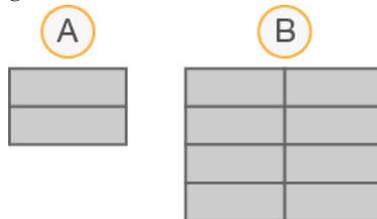
Para monitorar a execução com maiores detalhes, use o Sequencing Analysis Viewer (SAV) instalado em outro computador independente do computador do instrumento. É necessária uma conexão de rede.

Como alternativa, se você estiver conectado ao BaseSpace, você pode monitorar a execução usando o SAV no BaseSpace.

- ▶ **Run Progress (Andamento da execução)**—mostra o andamento da execução em uma barra de status e lista o número de ciclos concluídos.
- ▶ **Intensity (Intensidade)**—mostra o valor das intensidades de clusters do 90º percentil para cada bloco.

O gráfico na área de intensidade representa o número de blocos e o número de superfícies cujas imagens estão sendo criadas:

- Se a imagem da lâmina de fluxo for criada somente na superfície superior, um gráfico com uma coluna será exibido.
- Se a imagem da lâmina de fluxo for criada nas superfícies superior e inferior, um gráfico com duas colunas será exibido.



- A Indica dois blocos, apenas na superfície superior
- B Indica quatro blocos, superfícies superior e inferior

- ▶ **Q-Score All Cycles (Q-Score de todos os ciclos)**—mostra a porcentagem média de bases superiores a Q30, que é uma medição da pontuação de qualidade (Q-score). Uma Q-score é uma previsão da probabilidade de uma chamada de base errada. As Q-scores são calculadas após o ciclo 25.

Q-Score	Probabilidade da chamada de base errada
Q40	1 em 10.000
Q30	1 em 1.000
Q20	1 em 100
Q10	1 em 10

- ▶ **Cluster Density (Densidade de clusters) (K/mm²)**—mostra o número de clusters por milímetro quadrado para a execução.
- ▶ **Clusters Passing Filter (Clusters que passam o filtro) (%)**—mostra a porcentagem de clusters que passam o filtro com base no filtro de pureza da Illumina, que mede a qualidade. Estes dados aparecem somente após o ciclo 25.



OBSERVAÇÃO

A pureza de uma chamada de base é a relação entre a intensidade do maior sinal dividido pela soma dos dois maiores sinais. Se houver mais de uma chamada de base com pureza inferior a 0,6 nos primeiros 25 ciclos, as leituras não passarão no filtro de qualidade

- ▶ **Estimated Yield (Rendimento estimado) (Mb)**—mostra o número projetado de bases chamadas para a execução, medido em megabases. Estes dados aparecem somente após o ciclo 25.
- 2 Quando a execução for concluída, aparecerá o botão Next (Próximo). Revise os resultados na tela Sequencing (Sequenciamento) antes de prosseguir.



OBSERVAÇÃO

A tela Sequencing (Sequenciamento) permanece visível até que o botão Next (Próximo) seja selecionado. Depois que o botão Next (Próximo) é selecionado, não é possível retornar à tela Sequencing (Sequenciamento).

- 3 Selecione **Next (Próximo)** para sair da tela Sequencing (Sequenciamento) e prosseguir para uma limpeza pós-execução.
- Para monitorar a execução com maiores detalhes, use o Sequencing Analysis Viewer (SAV) instalado em outro computador independente do computador do instrumento. É necessária uma conexão de rede.
- Como alternativa, se você estiver conectado ao BaseSpace, você pode monitorar a execução usando o SAV no BaseSpace.

Geração do modelo de posições

A geração de modelos é o processo pelo qual as posições dos clusters em toda a superfície da lâmina de fluxo são definidas de acordo com a posição das coordenadas X e Y. A análise em tempo real (RTA) usa os primeiros ciclos de uma execução para a geração de modelos.

Após o modelo das posições dos clusters ser gerado, as imagens produzidas ao longo de cada ciclo subsequente da geração de imagens são alinhadas em comparação com o modelo. As intensidades individuais dos clusters em todos os quatro canais de cor de nucleotídeos extraídos e as chamadas de base são produzidas a partir das intensidades normalizadas dos clusters.

Métricas de execução

As métricas de execução aparecem na tela Sequencing (Sequenciamento) em pontos diferentes em uma execução. Durante as etapas de clusterização, não aparece nenhuma métrica.

Após o início do sequenciamento, as seguintes métricas aparecem nos ciclos indicados:

Métrica	Kit	Ciclo
Intensidade	Kit de reagentes do MiSeq v3	Ciclo 1-7
	Kit de reagentes do MiSeq v2	Ciclo 1-4
	Kit de reagentes do MiSeq v1	Ciclo 1-4
Intensidade e densidade dos clusters	Kit de reagentes do MiSeq v3	Ciclo 8-25
	Kit de reagentes do MiSeq v2	Ciclo 5-25
	Kit de reagentes do MiSeq v1	Ciclo 5-25
Intensidade, densidade dos clusters % PF, rendimento e pontuações Q	Kit de reagentes do MiSeq v3	Ciclo 26 até a conclusão da execução
	Kit de reagentes do MiSeq v2	
	Kit de reagentes do MiSeq v1	

Para obter especificações de execução do MiSeq, visite a página de especificações do sistema MiSeq, no site da Illumina (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn).

Resultados da análise primária

A produção da análise primária de uma execução de sequenciamento é um conjunto de arquivos de chamada de base avaliados por qualidade (*.bcl), gerados a partir dos arquivos de imagem bruta.

A tabela a seguir descreve as pastas e os arquivos gerados pelo Real Time Analysis (RTA) durante a análise primária. Muitos desses arquivos são usados para a análise secundária pelo software MiSeq Reporter.

Arquivo principal	Subpasta	Descrição
RTAComplete.txt	Pasta principal	Um arquivo de marcação gerado quando a análise da chamada de base for concluída. A presença deste arquivo desencadeia o início da análise secundária.
SampleSheet.csv	Pasta principal	Este arquivo é lido e copiado para a pasta da execução antes da execução e é usado mais tarde para a análise secundária.
RunInfo.xml	Pasta principal	Identifica os limites das leituras (incluindo as leituras de índices) e a tabela de qualidade selecionada para a execução.
Arquivos *.bcl	Data \ Intensities \ BaseCalls \ L001 \ CX.X	Cada arquivo *.bcl contém resultados de avaliação de qualidade de base e chamada de base RTA para um ciclo, um bloco.
Arquivos *.stats	Data \ Intensities \ BaseCalls \ L001 \ CX.X	Os arquivos *.stats contém estatísticas de chamada de base RTA para um determinado ciclo/bloco.
Arquivos *.filter	Data \ Intensities \ BaseCalls	Os arquivos *.filter contém resultados de filtro por bloco.
*.txt	Data \ RTALogs	Arquivos de log da análise primária.
Arquivos *.cif	Data \ Intensities \ L001 \ CX.X	Cada arquivo binário *.cif contém resultados da análise de imagem RTA para um ciclo, um bloco. Para obter mais informações, consulte <i>Numeração de blocos da lâmina de fluxo</i> na página 60.
Arquivos *.locs	Data \ Intensities \ BaseCalls \ L001	Informa as coordenadas dos clusters. Cada arquivo *.locs representa um bloco.

Arquivo principal	Subpasta	Descrição
Arquivos *.jpg	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	Imagens em miniatura geradas para cada ciclo e base, que podem ser usadas para solucionar problemas de uma execução. Esses arquivos não são necessários para a análise secundária e não são copiados para a pasta Análise.

Numeração de blocos da lâmina de fluxo

Quando são feitas imagens dos blocos durante a execução do sequenciamento, um arquivo de saída é gerado para cada bloco e nomeado com o número do bloco em um formato de quatro dígitos.

Uma imagem da lâmina de fluxo padrão da v3 é criada em 19 blocos na superfície superior e 19 blocos na superfície inferior, que resulta no seguinte formato da numeração de blocos:

- ▶ Os arquivos de imagem nomeados de 1101 a 1119 são os blocos 1-19 na superfície superior.
- ▶ Os arquivos de imagem nomeados de 2101 a 2119 são os blocos 1-19 na superfície inferior.

Uma imagem da lâmina de fluxo da v2 padrão é criada em 14 blocos na superfície superior e 14 blocos na superfície inferior, que resulta no seguinte formato da numeração de blocos:

- ▶ Os arquivos de imagem nomeados de 1101 a 1114 são os blocos 1-14 na superfície superior.
- ▶ Os arquivos de imagem nomeados de 2101 a 2114 são os blocos 1-14 na superfície inferior.

O mesmo formato de numeração de blocos é usado com as lâminas de fluxo micro:

- ▶ Os arquivos de imagem nomeados de 1101 a 1104 são os blocos 1-4 na superfície superior.
- ▶ Os arquivos de imagem nomeados de 2101 a 2114 são os blocos 1-4 na superfície inferior.

Para as lâminas de fluxo nano, os arquivos de imagem são nomeados como blocos um e dois na superfície superior, 1101 e 1102.

Os arquivos de saída para cada bloco estão localizados na pasta de execução em `Data\Intensities\BaseCalls\L001`.

Procedimentos de manutenção

Introdução	62
Limpezas do instrumento	65
Realizar uma limpeza pós-execução	67
Realizar uma limpeza de manutenção	73
Realizar uma limpeza de espera	77
Atualizações de software	80
Desligar o instrumento	81



Introdução

Sempre realize uma limpeza no instrumento depois de completar a execução de um sequenciamento.

Limpezas regulares no instrumento garantem um desempenho contínuo das seguintes formas:

- ▶ Remove eventuais reagentes remanescentes das linhas de fluxo de reagentes e dos aspiradores de líquidos
- ▶ Impede o acúmulo e a cristalização de sal nas linhas de fluxo de reagentes e nos aspiradores de líquidos
- ▶ Impede a contaminação cruzada com a execução anterior



OBSERVAÇÃO

Se estiver executando o fluxo de trabalho do VeriSeq, siga as orientações referentes à frequência de manutenção da VeriSeq. Consulte *Frequência de manutenção para o fluxo de trabalho do VeriSeq* na página 63.

Frequência da manutenção

Realize os seguintes procedimentos de manutenção nos intervalos recomendados.

Tabela 1 Manutenção durante o funcionamento normal

Atividade	Frequência
Limpeza pós-execução	Após cada execução
Limpeza de manutenção	Mensal
Limpeza de espera	Para preparar para o modo ocioso (sem utilização por ≥ 7 dias)
Desligamento do instrumento	Conforme necessário

Tabela 2 Manutenção durante o modo ocioso
(sem utilização por ≥ 7 dias)

Atividade	Frequência
Limpeza de espera	Mensal
Desligamento do instrumento	Conforme necessário

Frequência de manutenção para o fluxo de trabalho do VeriSeq

Se estiver executando o fluxo de trabalho do VeriSeq, execute os procedimentos de manutenção a seguir, nos intervalos recomendados.

Tabela 3 Manutenção durante o funcionamento normal

Atividade	Frequência
Limpeza pós-execução	Após cada execução
Limpeza de manutenção	Mensal
Limpeza pós-execução, a partir da tela Perform Wash (Realizar limpeza)	Depois de um tempo em modo ocioso (sem utilização por > 3 dias)
Limpeza de espera	Para preparar para o modo ocioso (sem utilização por ≥ 7 dias)
Desligamento do instrumento	Conforme necessário

Tabela 4 Manutenção durante o modo ocioso
(sem utilização por ≥ 7 dias)

Atividade	Frequência
Limpeza de espera	Mensal
Desligamento do instrumento	Conforme necessário



OBSERVAÇÃO

Para o fluxo de trabalho do VeriSeq, certifique-se de realizar as limpezas pós-execução, que incluem a limpeza do padrão. Consulte *Procedimento com limpeza da linha padrão* na página 69.

Limpezas do instrumento

É possível iniciar três tipos de limpezas na tela Perform Wash (Realizar limpeza): limpeza de manutenção, limpeza de espera e limpeza pós-execução.

- ▶ **Limpeza de manutenção**—A limpeza de manutenção consiste em três ciclos de limpeza consecutivos que limpam o sistema minuciosamente. Realize uma limpeza de manutenção pelo menos a cada 30 dias. Consulte *Realizar uma limpeza de manutenção* na página 73.

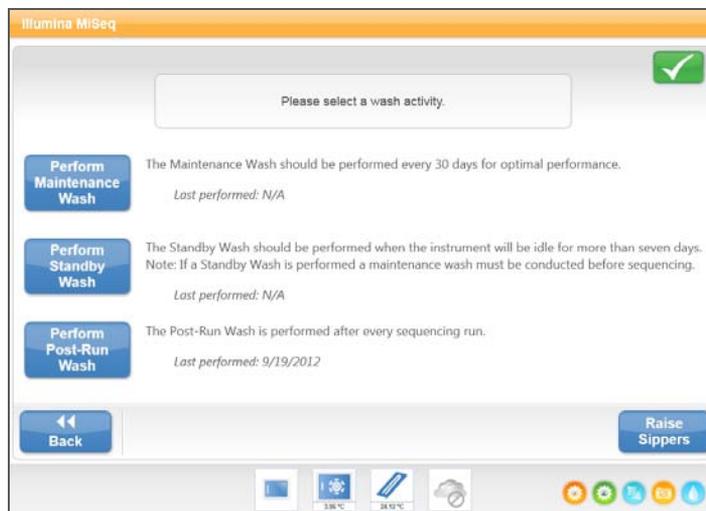
Você pode configurar seu equipamento para efetuar uma limpeza de manutenção entre as execuções. Para obter mais informações, consulte *Tela Run Options (Opções de execução)* na página 22.

- ▶ **Limpeza de espera**—A limpeza de espera prepara as linhas de fluxo de reagentes de maneira adequada para que fiquem ociosas e consiste em duas limpezas consecutivas. Realize uma limpeza de espera se o instrumento ficar ocioso por até sete dias. Consulte *Realizar uma limpeza de espera* na página 77. Quando o equipamento é colocado em estado ocioso, é necessário fazer uma limpeza de manutenção antes de fazer uma nova execução de sequenciamento.

Os clientes que executam o fluxo de trabalho do VeriSeq devem consultar *Frequência de manutenção para o fluxo de trabalho do VeriSeq* na página 63 para obter orientações sobre quando realizar uma limpeza de espera.

- ▶ **Post-Run Wash**—A limpeza pós-execução (post-run wash) é a limpeza padrão do equipamento, realizada entre as execuções de sequenciamento. Para executar uma limpeza pós-execução em um momento que não seja diretamente após uma execução, use o comando na tela Perform Wash (Realizar limpeza) para iniciar a limpeza.

Figura 23 Tela Perform Wash (Realizar limpeza)



Selecione **Raise Sippers (Levantar aspiradores de líquido)** para levantar os aspiradores de líquido do cartucho de reagentes para que o cartucho possa ser removido do instrumento. Use este comando se a execução for interrompida inesperadamente ou se ocorrer um erro durante a execução. Nessas condições, os aspiradores de líquido não se levantam automaticamente.

Realizar uma limpeza pós-execução

Sempre realize uma limpeza no instrumento depois de completar uma execução de sequenciamento. Siga as instruções do programa para carregar os componentes e realizar a limpeza. A limpeza pós-execução dura aproximadamente 20 minutos.

A Illumina recomenda que você realize a limpeza imediatamente após a conclusão de uma execução. Uma lavagem do instrumento é necessária antes que você possa configurar uma execução posterior.



OBSERVAÇÃO

Deixe a lâmina de fluxo usada no instrumento. Uma lâmina de fluxo deve ser carregada no instrumento para a realização de uma limpeza.

Os clientes que executam MCS v 2.5 ou superior podem optar por uma limpeza pós-execução que inclua uma limpeza da linha padrão. Essa opção é selecionada na tela Post-Run wash (Limpeza pós-execução). A opção de limpeza pós-execução é recomendada para clientes que executam o fluxo de trabalho do VeriSeq ou outras aplicações altamente sensíveis, como a chamada de variante somática.

A limpeza pós-execução que inclui uma limpeza da linha padrão requer hipoclorito de sódio e um tubo MiSeq (nº do catálogo MS-102-9999). A limpeza dura aproximadamente 30 minutos. Consulte *Procedimento com limpeza da linha padrão* na página 69.



OBSERVAÇÃO

Não use hipoclorito de sódio em uma limpeza de manutenção ou em uma limpeza de espera.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949)
- ▶ Água de qualidade de laboratório
- ▶ Hipoclorito de sódio (para uso em uma limpeza pós-execução que inclua uma limpeza da linha padrão)

Procedimento

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte forma:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
 - 2 Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
 - a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
 - 3 Quando a execução for concluída, selecione **Start Wash (Iniciar limpeza)**. O programa levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.
 - 4 *Não* selecione **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza da linha padrão, opcional) na tela de limpeza pós-execução. A limpeza da linha padrão requer um procedimento diferente. Consulte *Procedimento com limpeza da linha padrão* na página 69.
 - 5 Abra a porta do compartimento de reagentes, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagentes usado do refrigerador.
 - 6 Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo e feche a porta do refrigerador de reagentes.
 - 7 Levante a alça dos aspiradores de líquidos na frente do frasco de PR2 e do frasco de limpeza até que ela trave.
 - 8 Remova o frasco de PR2 e substitua-o pelo frasco de limpeza.
-  **OBSERVAÇÃO**
Descarte o frasco de PR2 após cada execução. Não reutilize sobras de PR2.
- 9 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.

**ADVERTÊNCIA**

Este conjunto de reagentes contém formamida, uma amida alifática que é uma provável toxina para o sistema reprodutivo. Podem ocorrer lesões por inalação, ingestão e contato com a pele e com os olhos. Descarte os recipientes e todo eventual conteúdo não utilizado em conformidade com as normas de segurança governamentais locais aplicáveis. Para obter mais informações, consulte o SDS para este kit em support.illumina.com/sds.html.

- 10 Abaixe lentamente a alça dos aspiradores de líquidos, deixando que o aspiradores desçam até os frascos de limpeza e de resíduos.
- 11 Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 12 Selecione **Next (Próximo)**. A limpeza pós-execução iniciará.

Quando a limpeza estiver concluída, deixe no instrumento a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante.

**OBSERVAÇÃO**

Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e que entre ar no sistema.

Procedimento com limpeza da linha padrão

**OBSERVAÇÃO**

É necessário o MCS v2.5 ou superior para realizar o procedimento de limpeza pós-execução, que inclui uma limpeza da linha padrão. Para obter mais informações, consulte *Realizar uma limpeza pós-execução* na página 67.

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte maneira:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
- 2 Prepare uma solução de limpeza fresca com hipoclorito de sódio e água de qualidade de laboratório, da seguinte forma:

- a Adicione 30 μ l de hipoclorito de sódio 6% a 870 μ l de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma diluição 1:30 do hipoclorito de sódio.
- b Adicione 50 μ l da diluição 1:30 de hipoclorito de sódio a 950 μ l de água de qualidade de laboratório em um tubo MiSeq fornecido pela Illumina (nº do catálogo MS-102-9999).



OBSERVAÇÃO

É importante usar a concentração correta de hipoclorito de sódio. Verifique a porcentagem de hipoclorito de sódio no rótulo do produto. Se a concentração for alta demais, ela pode levar à falha da clusterização nas execuções subsequentes. Se não dispuser de hipoclorito de sódio 6%, prepare uma solução de 1 ml de hipoclorito de sódio 0,01% em água de qualidade de laboratório.

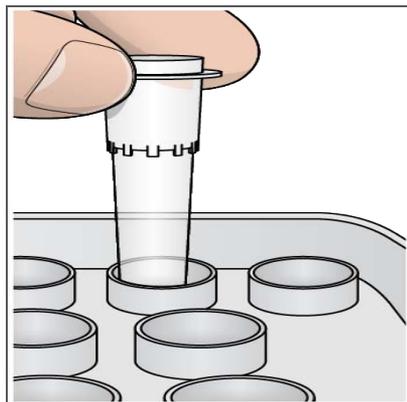


OBSERVAÇÃO

Não use hipoclorito de sódio em uma limpeza de manutenção ou em uma limpeza de espera.

- 3 Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
 - a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
- 4 Insira o tubo MiSeq contendo solução de limpeza com hipoclorito de sódio 0,01% na posição 17 da bandeja de limpeza até que o gargalo do tubo esteja nivelado com a bandeja. O tubo desloca o Tween 20 e a solução de limpeza com água de qualidade de laboratório da posição 17.

Figura 24 Tubo MiSeq na posição 17 da bandeja de limpeza



**OBSERVAÇÃO**

Só coloque o tubo MiSeq com hipoclorito de sódio na posição 17 da bandeja. A colocação do tubo em outra posição pode levar à falha na clusterização nas execuções subsequentes e danificar o sistema de fluxo de reagentes do instrumento MiSeq.

- 5 Quando a execução estiver concluída, selecione **Start Wash** (Iniciar limpeza). O software eleva automaticamente os aspiradores de líquidos no refrigerador de reagentes.
- 6 Selecione **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza da linha padrão, opcional) na tela Post-Run Wash (Limpeza pós-execução).

**OBSERVAÇÃO**

Para os clientes que executam o fluxo de trabalho do VeriSeq, a opção **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza da linha padrão, opcional) já é pré-selecionada. O MCS verifica o tipo de limpeza pós-execução realizado após cada execução. Se **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza da linha padrão, opcional) não estiver selecionada para a limpeza pós-execução, uma mensagem na tela Run Review (Revisão da execução) irá lembrá-lo(a) na próxima vez que for iniciada uma execução de sequenciamento.

- 7 Abra a porta do compartimento de reagentes, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagentes usado do refrigerador.
- 8 Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo e feche a porta do refrigerador de reagentes.
- 9 Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco de PR2 e do frasco de limpeza até que ela trave.
- 10 Remova o frasco de PR2 e substitua-o pelo frasco de limpeza.

**OBSERVAÇÃO**

Descarte o frasco de PR2 após cada execução. Não reutilize nenhum PR2 que sobrar.

- 11 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.

**ADVERTÊNCIA**

Este conjunto de reagentes contém formamida, uma amida alifática que é uma provável toxina para o sistema reprodutivo. Podem ocorrer lesões por inalação, ingestão e contato com a pele e com os olhos. Descarte os recipientes e todo eventual conteúdo não utilizado em conformidade com as normas de segurança governamentais locais aplicáveis. Para obter mais informações, consulte o SDS para este kit em support.illumina.com/sds.html.

- 12 Abaixar lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
- 13 Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 14 Selecione **Next** (próximo). A limpeza pós-execução iniciará.

Quando a limpeza estiver concluída, deixe a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante no instrumento.



OBSERVAÇÃO

Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e que entre ar no sistema.

Realizar uma limpeza de manutenção

Realize uma limpeza de manutenção a cada 30 dias para garantir o melhor desempenho. A limpeza de manutenção inclui uma série de três etapas de limpeza, usando uma solução de limpeza de água de qualidade de laboratório misturada com Tween 20. A limpeza dura aproximadamente 90 minutos.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949)
- ▶ Água de qualidade de laboratório

Procedimento

- 1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
- 2 Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza).
- 3 Na tela Perform Wash (Realizar limpeza), selecione **Maintenance Wash** (Limpeza de manutenção). O software eleva automaticamente os aspiradores de líquidos no refrigerador de reagentes.

Realização da primeira limpeza

- 1 Prepare uma solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte maneira:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
- 2 Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
 - a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
- 3 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento:

- a Abra a porta do compartimento de reagentes e a porta do refrigerador de reagentes e remova do refrigerador o cartucho de reagentes usado ou a bandeja de limpeza usada.
- b Insira a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes fazendo-a deslizar até ela parar. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
- c Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco de resíduos e do frasco de PR2 até que ela trave, e substitua o frasco de PR2 pelo frasco de limpeza.



OBSERVAÇÃO

Descarte o frasco de PR2 após cada execução. Não reutilize nenhum PR2 que sobrar.

- d Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.
 - e Abaixar lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
 - f Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 4 Selecione **Next** (próximo). A primeira limpeza é iniciada.

Realização da segunda limpeza



OBSERVAÇÃO

Utilize sempre uma solução de limpeza fresca para cada etapa de limpeza. A reutilização da solução de limpeza anteriores pode devolver resíduos para as linhas de fluxo de reagentes.

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte maneira:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
- 2 Quando a primeira limpeza for concluída, remova a bandeja e o frasco de limpeza e descarte a solução de limpeza restante.
- 3 Encha os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
 - a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.

- 4 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza da seguinte forma:
 - a Insira a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes fazendo-a deslizar até ela parar. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
 - b Carregue o frasco de limpeza e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, fazendo o aspirador descer até os frascos de limpeza e de resíduos.
 - c Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 5 Selecione **Next** (próximo). A segunda limpeza é iniciada.

Realização da limpeza final

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte maneira:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
- 2 Quando a segunda limpeza for concluída, remova a bandeja e o frasco de limpeza e descarte a solução de limpeza restante.
- 3 Encha os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
 - a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
- 4 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza da seguinte forma:
 - a Insira a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes fazendo-a deslizar até ela parar. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
 - b Carregue o frasco de limpeza e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, fazendo o aspirador descer até os frascos de limpeza e de resíduos.
 - c Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 5 Selecione **Next** (próximo). A limpeza final é iniciada.

Após a limpeza

Quando a limpeza estiver concluída, deixe no instrumento a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante.



OBSERVAÇÃO

Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e que entre ar no sistema.

Realizar uma limpeza de espera

Caso não se preveja o uso do instrumento nos próximos sete dias, prepare o instrumento para ficar ocioso realizando uma limpeza de espera. Uma limpeza de espera realiza duas limpezas consecutivas que removem de cada posição os eventuais reagentes restantes ou o eventual acúmulo de sais. Cada limpeza demora aproximadamente 60 minutos. Reserve cerca de 2 horas para completar a limpeza de espera.

Quando a limpeza de espera estiver concluída, o instrumento entrará no modo de espera e aparecerá uma mensagem na tela Welcome (Boas-vindas), indicando o status do instrumento. Quando o instrumento estiver no modo de espera, uma limpeza de manutenção deverá ser executada antes do início de uma execução de sequenciamento.



OBSERVAÇÃO

A Illumina recomenda repetir a limpeza de espera *a cada 30 dias* que o instrumento permanecer ocioso. Se estiver executando o fluxo de trabalho do VeriSeq, consulte *Frequência de manutenção para o fluxo de trabalho do VeriSeq* na página 63.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, nº do catálogo P7949)
- ▶ Água de qualidade de laboratório

Procedimento

- 1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
- 2 Na tela Welcome (Boas-vindas), selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza).
- 3 Na tela Perform Wash (Realizar limpeza), selecione **Standby Wash** (Limpeza de espera). O software eleva automaticamente os aspiradores de líquidos no refrigerador de reagentes.

Realização da primeira limpeza

- 1 Prepare uma solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte maneira:

- a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
- 2 Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
- a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
- 3 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento:
- a Abra a porta do compartimento de reagentes e a porta do refrigerador de reagentes e remova do refrigerador o cartucho de reagentes usado ou a bandeja de limpeza usada.
 - b Insira a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes fazendo-a deslizar até ela parar. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
 - c Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco de resíduos e do frasco de PR2 até que ela trave, e substitua o frasco de PR2 pelo frasco de limpeza.
-  **OBSERVAÇÃO**
Descarte o frasco de PR2 após cada execução. Não reutilize nenhum PR2 que sobrar.
- d Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.
 - e Abaixar lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
 - f Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 4 Selecione **Next** (próximo). A primeira limpeza é iniciada.

Realização da segunda limpeza



OBSERVAÇÃO

Utilize sempre uma solução de limpeza fresca para cada etapa de limpeza. A reutilização da solução de limpeza anteriores pode devolver resíduos para as linhas de fluxo de reagentes.

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água de qualidade de laboratório da seguinte maneira:

- a Adicione 5 ml de Tween 20 100% a 45 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 10% a 475 ml de água de qualidade de laboratório. Esses volumes resultam em uma solução de limpeza de Tween 20 a 0,5%.
 - c Inverta cinco vezes para misturar.
- 2 Quando a primeira limpeza for concluída, remova a bandeja e o frasco de limpeza e descarte a solução de limpeza restante.
 - 3 Encha os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca da seguinte forma:
 - a Adicione 6 ml da solução de limpeza em cada reservatório da bandeja de limpeza.
 - b Adicione 350 ml da solução de limpeza no frasco de limpeza de 500 ml.
 - 4 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza da seguinte forma:
 - a Insira a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes fazendo-a deslizar até ela parar. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
 - b Carregue o frasco de limpeza e abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, fazendo o aspirador descer até os frascos de limpeza e de resíduos.
 - c Feche a porta do compartimento de reagentes.
 - 5 Selecione **Next** (próximo). A segunda limpeza é iniciada.

Após a limpeza

Quando a limpeza estiver concluída, deixe no instrumento a lâmina de fluxo, a bandeja e o frasco de limpeza usados contendo a solução de limpeza restante.



OBSERVAÇÃO

Os aspiradores de líquidos permanecem na posição para baixo, o que é normal. Deixe a solução de limpeza não utilizada na bandeja e no frasco de limpeza, para evitar que os aspiradores de líquidos sequem e que entre ar no sistema.

Atualizações de software

Se seu sistema estiver conectado a uma rede com acesso à Internet, você poderá atualizar automaticamente o software do instrumento na tela Welcome (Boas-vindas).

O botão **Update Available (Atualização disponível)** aparecerá na tela Welcome (Boas-vindas) quando atualizações do software estiverem disponíveis. Caso contrário, esse botão não estará visível.

Para iniciar uma atualização de software, selecione **Update Available (Atualização disponível)**. Uma caixa de diálogo se abrirá para confirmar o comando, momento em que é necessário reinicializar o instrumento. A instalação da atualização será iniciada automaticamente com a reinicialização.

Se o instrumento não estiver conectado a uma rede com acesso à Internet, será possível atualizar o software manualmente.

Tela Manual Update (Atualização manual)

Use o recurso Manual Update (Atualização manual) para atualizar o software de controle do instrumento e o software de análise a partir da interface do MiSeq indo para o local do arquivo do software instalável.

Selecione **Browse (Procurar)** para ir para o local em que está localizado o arquivo instalável para a nova versão do software. Quando o caminho para o arquivo do software instalável aparecer na tela, selecione **Update (Atualizar)**.

Como alternativa, é possível atualizar o software automaticamente, se o instrumento estiver conectado a uma rede. Para obter mais informações, consulte *Atualizações de software* na página 80.

Desligar o instrumento

É melhor deixar o instrumento sempre ligado. No entanto, se o instrumento tiver que ser desligado, use o procedimento a seguir para finalizar o Windows e preparar as linhas do fluxo de reagentes.

- 1 Realize uma limpeza de manutenção. Para obter mais informações, consulte *Realizar uma limpeza de manutenção* na página 73.
- 2 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.
- 3 Feche a porta do compartimento de reagentes.
- 4 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **Shut Down (Desligar)**. Esse comando finaliza o software.
- 5 Coloque o interruptor na posição OFF (Desligado).



OBSERVAÇÃO

Toda vez que desligar o instrumento, espere no *mínimo* 60 segundos antes de colocar o interruptor na posição ON (Ligado).

Solução de problemas

Introdução	84
Agrupar logs para solução de problemas	85
Configurações do software	87
Pausar ou interromper uma execução	91
Resolver os erros de configuração da execução	94
Resolver a falha de leitura de RFID	96
Solucionar erro da taxa de fluxo	98
Realizar um teste de volume	99
Medir os volumes de limpeza esperados	103



Introdução

Esta seção descreve as etapas comuns para solução de problemas a serem seguidas antes de entrar em contato com o suporte técnico da Illumina. Para a maioria dos erros, uma mensagem aparece na tela com instruções para a correção do erro.

Em caso de dúvidas técnicas, visite as páginas de suporte do MiSeq no site da Illumina para ter acesso às perguntas mais frequentes ou faça login com sua conta MyIllumina para acessar os boletins de suporte.

Em caso de problemas com a qualidade ou o desempenho da execução, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Para obter mais informações, consulte *Assistência técnica* na página 109.

Geralmente, o representante do suporte técnico solicita cópias de arquivos específicos da execução para poder solucionar o problema. Você pode usar a guia Bundle Logs (Agrupar logs), na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), para combinar e compactar os arquivos necessários para a solução de problemas. Consulte *Agrupar logs para solução de problemas* na página 85.

Agrupar logs para solução de problemas

O recurso Bundle Logs (Agrupar logs) ajuda os clientes a agrupar e compactar arquivos a serem enviados para o suporte técnico da Illumina para solução de problemas.

Guia Bundle Logs (Agrupar logs)

Use a guia Bundle Logs (Agrupar logs) na tela Manage Files (Gerenciar arquivos) para selecionar um grupo de arquivos, chamado de *bundle* (pacote). O pacote é compactado automaticamente.

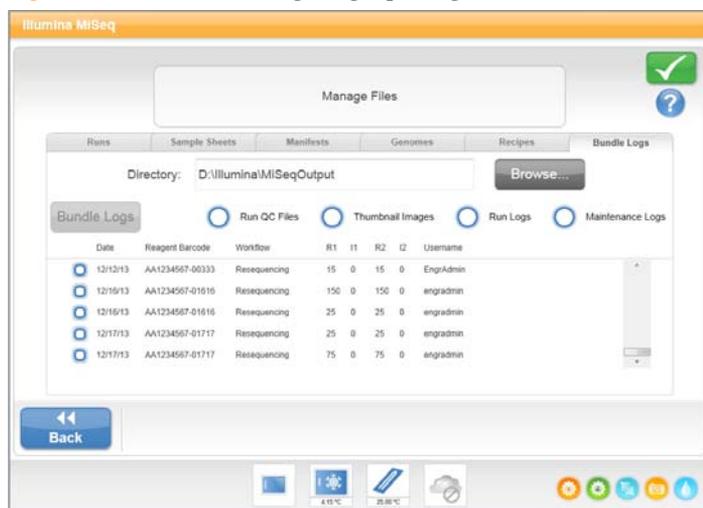


OBSERVAÇÃO

O recurso Bundle Logs (Agrupar logs) agrupa os arquivos de uma execução em um tipo de pacote por vez. Repita o procedimento Bundle Logs (Agrupar logs) para cada execução e tipo de pacote que o suporte técnico da Illumina solicitar.

- 1 Na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione a guia **Bundle Logs (Agrupar logs)**.
- 2 Selecione **Browse (Procurar)** para ir até o local da pasta MiSeqOutput.
- 3 Clique na caixa azul ao lado da execução e no círculo azul ao lado do tipo de pacote solicitado pelo suporte técnico da Illumina.
- 4 Selecione **Bundle Logs (Agrupar logs)**.
- 5 A tela Bundle Files (Agrupar arquivos) é aberta com informações sobre o pacote e com uma lista de arquivos contidos no pacote.
Para obter mais informações sobre pastas e arquivos do recurso Bundle Logs (Agrupar logs), consulte o *Cartão de referência rápida de pastas de análise e saída MiSeq (nº do catálogo 15034791)*.
- 6 Selecione **Next (Próximo)**.
- 7 Vá para o local em que você deseja salvar os arquivos compactados do pacote.
- 8 Clique em **Save (Salvar)**.
- 9 Uma mensagem Bundling Files (Agrupando arquivos) é aberta.
- 10 Ao final do agrupamento, a guia Bundle Logs (Agrupar logs) é reaberta.
- 11 Envie esse pacote compactado para o suporte técnico da Illumina.

Figura 25 Guia Bundle Logs (Agrupar logs)



Configurações do software

O MCS apresenta várias telas que acessam comandos para configurar o sistema e gerenciar o instrumento.

Tela System Settings (Configurações do sistema)

As configurações do sistema normalmente são definidas quando o instrumento é instalado e iniciado pela primeira vez. Se alguma configuração precisar ser alterada por causa de uma alteração na rede ou no local, use o recurso System Settings (Configurações do sistema).

Figura 26 Configurações do sistema



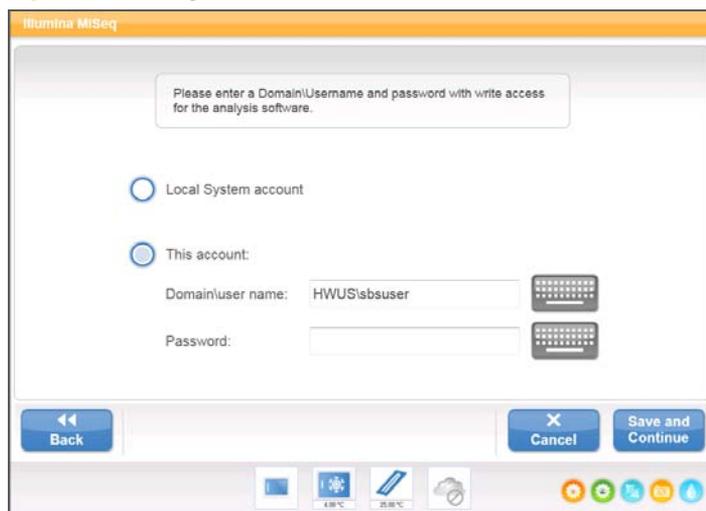
Entre em contato com o administrador da instalação para obter informações sobre as configurações de rede.

Alteração nas credenciais do sistema

Altere a senha e o nome de usuário do sistema na tela System Settings (Configurações do sistema). Selecione **System Settings (Configurações do sistema)** na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) e selecione **Save and Continue (Salvar e continuar)** para avançar para a terceira tela da série de telas.

Selecione **This account (Esta conta)**. Digite o nome do domínio (Domínio\MiSeq1, por exemplo) e a senha. Selecione **Save and Continue (Salvar e continuar)**. As credenciais para o MiSeq Reporter e o BaseSpace também são atualizadas.

Figura 27 Configurações do sistema



Tela System Check (Verificação do sistema)

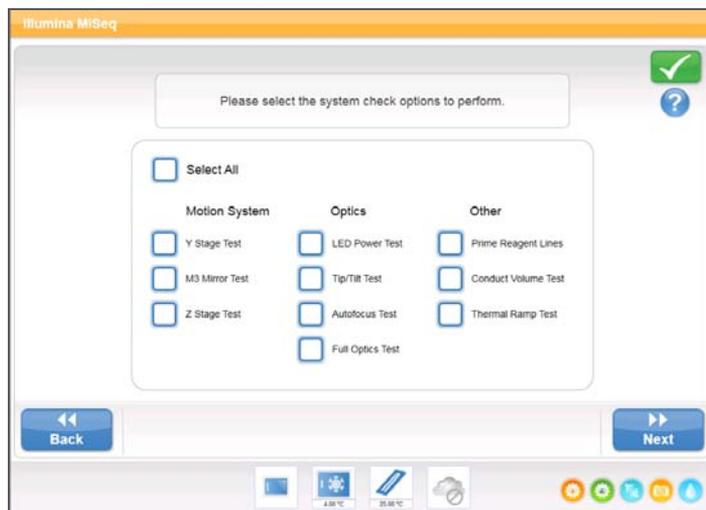
A tela System Check (Verificação do sistema) é normalmente usada para se conectar com um representante do suporte técnico da Illumina durante uma sessão Live Help (Ajuda ao vivo). O uso desse recurso não é necessário durante a operação normal ou para a manutenção do instrumento.

Algumas verificações do sistema podem ser realizadas antes de se entrar em contato com o suporte técnico da Illumina, como o teste de volume. Um teste de volume verifica a integridade do sistema de fluxo de reagentes estimando o volume do fluxo enquanto as bolhas passam pelos sensores. Para obter mais informações, consulte *Realizar um teste de volume* na página 99.

Após a conclusão de uma verificação do sistema, os resultados do teste aparecem na tela:

- ▶ Selecione **Show Details (Mostrar detalhes)** para ver um resumo dos resultados na interface do programa.
- ▶ Selecione **Export Results (Exportar resultados)** para exportar os resultados em formato *.csv para uma unidade USB.

Figura 28 Opções de System Check (Verificação do sistema)



Live Help (Ajuda ao vivo)

O MiSeq deve estar conectado a uma rede com acesso à Internet para se ativar o Live Help. O recurso Live Help é uma ferramenta de assistência on-line que permite que um representante do suporte técnico da Illumina visualize a tela do MiSeq com sua permissão e compartilhe o controle do instrumento. Você tem controle sobre quaisquer alterações, e pode terminar a sessão de compartilhamento de tela a qualquer momento.

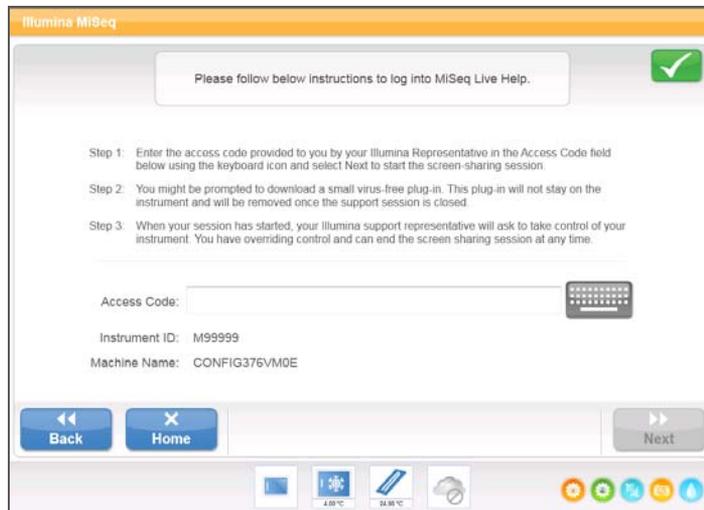
Acesse o Live Help pelo ícone de ajuda na tela Welcome (Boas-vindas).

Figura 29 Menu de ajuda



Para habilitar uma conexão, obtenha um código de acesso exclusivo do suporte técnico da Illumina, digite esse código na tela Live Help (Ajuda ao vivo) e selecione **Next (Próximo)**.

Figura 30 Tela Live Help (Ajuda ao vivo)



Pausar ou interromper uma execução

O MiSeq foi projetado para efetuar uma execução do início ao fim, sem a intervenção do usuário. No entanto, é possível pausar ou interromper uma execução na tela Sequencing (Sequenciamento).

Pausar uma execução

É possível pausar temporariamente uma execução antes dela ser concluída. Por exemplo, é possível pausar uma execução em caso de suspeita do frasco de resíduos estar cheio. Você pode retomar uma execução em pausa.



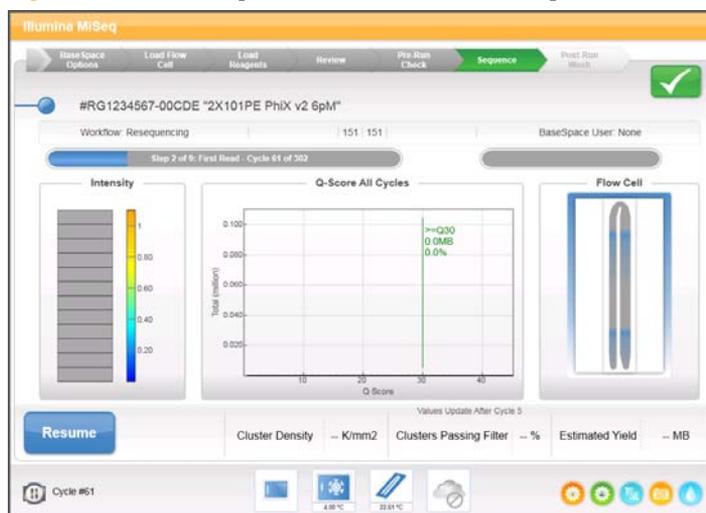
CUIDADO

Não pause uma execução durante a clusterização nem nos primeiros oito ciclos do sequenciamento. Não é possível retomar uma execução que foi pausada durante essa etapa. Consulte *Métricas de execução* na página 57 para obter informações sobre os ciclos dos kits de cartuchos de reagentes do MiSeq.

Quando você selecionar **Pause** (Pausa), o comando atual será concluído, e em seguida a execução será pausada e a lâmina de fluxo será colocada em um estado seguro.

Para pausar uma execução na tela Sequencing (Sequenciamento), selecione **Pause (Pausa)**. O botão mudará para **Resume** (Continuar). Quando estiver pronto para continuar a execução, selecione **Resume (Continuar)**.

Figura 31 Tela da sequência de uma execução em pausa

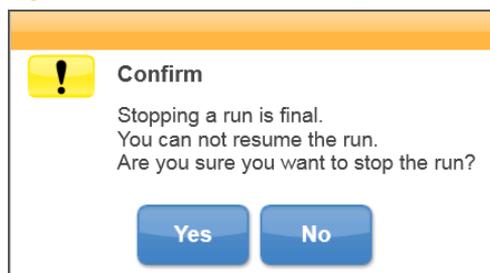


Interromper uma execução

Você pode parar uma execução durante o sequenciamento antes que a execução tenha sido concluída usando o botão **Stop (Parar)** na tela Sequencing (Sequenciamento). A execução poderá ser interrompida se tiver sido configurada incorretamente, se a qualidade dos dados for ruim ou se houver um erro de hardware.

Quando uma execução for interrompida, o comando atual não será concluído, e a plataforma da lâmina de fluxo se movimentará para a frente. A análise primária continuará no último ciclo concluído.

Figura 32 Parada de uma execução



A interrupção de uma execução é definitiva. Uma execução interrompida não pode ser retomada. A única opção é seguir para uma limpeza no instrumento.

Resolver os erros de configuração da execução

Se a verificação da pré-execução encontrar alguma falha, um ícone **X** vermelho aparecerá ao lado do item. A mensagem que aparece na tela descreve o erro e como corrigi-lo.

Erro	Ação
X Taxa de fluxo medida	<p>A tela de verificação da taxa de fluxo se abre. Use a lista suspensa ou o teclado da tela para inserir as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solução: PR2 • Volume: 250 • Taxa de aspiração: 2500 • Taxa de dispensação: 2500 <p>Selecione Pump (Bombear). Se o erro persistir, defina o volume para bombear 500 µl PR2 e repita o processo. Quando os fluidos tiverem sido bombeados, selecione Restart Check (Reiniciar verificação).</p> <p>Quando a verificação pré-execução for bem-sucedida, o botão Start Run (Iniciar execução) ficará ativo.</p> <p>Se a verificação de fluxo falhar novamente, recoloque a lâmina de fluxo para certificar-se de que não haja interrupção no fluxo por causa de desalinhamento. Inspeccione se há fiapos ou irregularidades na junta da lâmina de fluxo.</p>
X Espaço em disco livre	<p>Se o espaço em disco estiver baixo, uma mensagem aparecerá indicando quanto espaço em disco é necessário. Use o recurso Manage Files (Gerenciar arquivos) para liberar o espaço necessário no computador do instrumento.</p>
X Conexão de rede ativa	<p>Verifique se o cabo de rede está conectado ao instrumento.</p> <p>Se a conexão de rede não for restaurada, selecione Reboot (Reiniciar) na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) para reiniciar o programa.</p> <p>Se a conexão ainda não for restaurada, selecione Shut Down (Desligar) na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) e depois desligue o instrumento usando o interruptor. Aguarde pelo menos 60 segundos e depois ligue o instrumento e inicie o programa.</p>
X Análise primária pronta	<p>A análise primária da execução anterior não está completa. O tempo padrão para que a análise primária seja completada é de 1 hora, e uma contagem regressiva aparece na tela. As opções são esperar 1 hora ou selecionar Terminate Analysis (Finalizar análise). Isso fará parar a análise secundária dos eventuais ciclos incompletos.</p>

Erro	Ação
<p>✘ Planilha de amostras presente</p>	<p>Se você não nomeou sua planilha de amostras com a ID do cartucho de reagentes para a execução, o instrumento não conseguirá localizar automaticamente a planilha de amostras adequada. Navegue até a planilha de amostras para sua execução.</p> <p>Se você nomeou sua planilha de amostras com a ID do cartucho de reagentes para a execução, verifique se a planilha de amostras está localizada na pasta de planilha de amostras padrão. Verifique o local da pasta padrão em Run Options (Opções de execução) na tela Welcome (Boas-vindas).</p> <p>Verifique se a extensão de arquivo da planilha de amostras é *.csv.</p> <p>Se estiver faltando a planilha de amostras, crie uma e copie-a para os locais de planilhas de amostras especificados em Run Options (Opções de execução).</p> <p>Quando você localizar uma planilha de amostras, selecione Restart Check (Reiniciar verificação).</p>

Resolver a falha de leitura de RFID

No caso do sistema não poder ler a RFID de um material de consumo, é possível obter um código de desvio temporário no site da Illumina. O código de desvio temporário expira em sete dias.

- 1 Selecione sempre **Retry (Repetir)** antes de prosseguir. Se a RFID falhar outra vez, selecione **Get Code (Obter código)**.
- 2 Em um computador com acesso à Internet, acesse o site my.illumina.com e faça login em sua conta MyIllumina.
- 3 Na página do MyIllumina, clique em **Account (Conta)**. Na coluna Resources (Recursos), clique em **MiSeq Self-Service (Autosserviço MiSeq)**.
- 4 Na página MiSeq Self-Service (Autosserviço MiSeq), digite o **número de série do MiSeq**.
- 5 Na lista suspensa Type of Override Code (Tipo de código de substituição), selecione **RFID Override (Substituição de RFID)**.

Figura 33 Página MiSeq Self-Service (Autosserviço MiSeq)

MyIllumina / Account / MiSeq Self Service

Self Service for MiSeq

MiSeq Serial Number

Note: The MiSeq serial number can be found under the title "Instrument Name" in the About menu.

Description of the Issue

Type of Override Code

Please select...

GET CODE

- 6 Para gerar o código, selecione **Get Code (Obter código)**.
- 7 Retorne para a interface do MCS e selecione **Enter Code (Inserir código)**.

- 8 Digite o código de desvio temporário usando o teclado da tela e depois selecione **Next (Próximo)**.
- 9 Digite o número de código de barras da lâmina de fluxo, frasco de PR2 ou cartucho de reagentes.

Material de consumo	Local do número de código de barras
Lâmina de fluxo	Acima do código de barras no rótulo do recipiente da lâmina de fluxo. Os números do código de barras da lâmina de fluxo começam com A (padrão), G (micro) ou D (nano). Exemplo: A0E61
Frasco de PR2	Abaixo do código de barras no rótulo do frasco de PR2. Exemplo: MS0011881-PR2
Cartucho de reagentes	Abaixo do código de barras no rótulo do cartucho de reagentes. Exemplo: MS0010744-300

- 10 Se você for inserir um código de desvio para o cartucho de reagentes, insira o número da versão do kit. Selecione **Enter Reagent Kit Barcode (Digitar código de barras do kit de reagentes)** para digitar manualmente o número do código de barras do cartucho de reagentes e o número da versão do kit.



CUIDADO

Digitar a versão incorreta do kit de reagentes pode afetar negativamente os dados de sequenciamento.

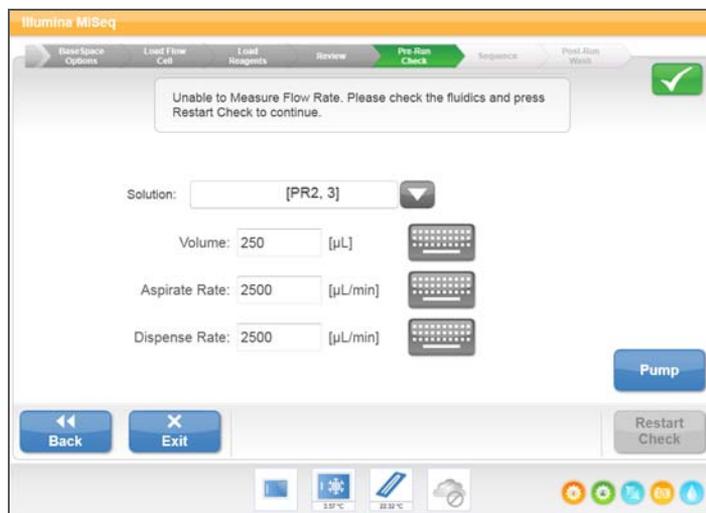
- 11 Selecione **Enter (Inserir)**.

Solucionar erro da taxa de fluxo

A taxa de fluxo é a velocidade com que os fluidos passam através do sistema de fluxo de reagentes ($\mu\text{l}/\text{min}$). Ela é medida antes de cada execução, durante a verificação pré-execução. Se o sistema não conseguir medir a taxa de fluxo, será preciso bombear um volume de reagente (PR2) pelo sistema antes de se verificar a taxa de fluxo novamente.

- 1 Use a lista suspensa ou o teclado da tela para inserir as seguintes informações:
 - Solução: **PR2**
 - Volume: **250 μl**
 - Taxa de aspiração: **2500 $\mu\text{l}/\text{min}$**
 - Taxa de dispensação: **2500 $\mu\text{l}/\text{min}$**
- 2 Selecione **Pump (Bombear)**.

Figura 34 Medição da taxa de fluxo



- 3 Quando a etapa da bomba estiver concluída, selecione **Restart Check (Reiniciar verificação)**.
- 4 Se o erro persistir, defina o volume para bombear como 500 μl de PR2 e repita o processo mais uma vez. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina se a segunda tentativa não resolver o erro.

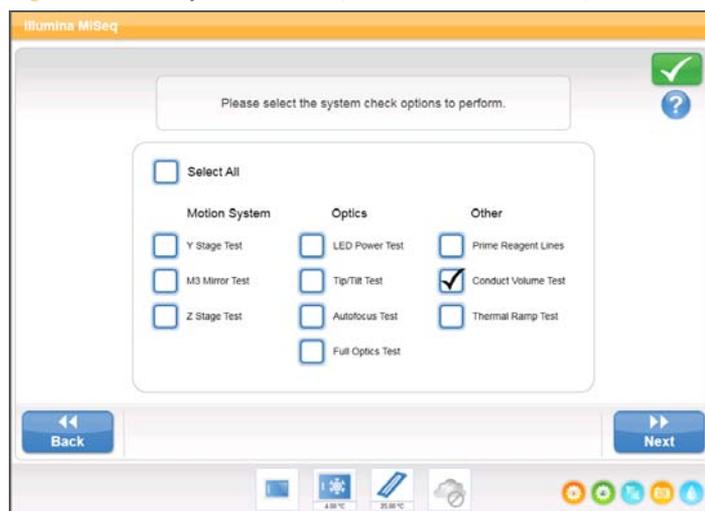
Realizar um teste de volume

Uma obstrução nas linhas de fluxo de reagentes pode ser a causa da fraca distribuição de reagente ou afetar os resultados do sequenciamento. Se houver suspeita de uma obstrução nas linhas de fluxo de reagentes, realize um teste de volume.

Um teste de volume verifica a integridade do sistema de fluxo de reagentes estimando o volume entre duas bolhas que passam pelos sensores. Para executar um teste de volume, a bandeja e o frasco de limpeza devem ser carregados com água de qualidade de laboratório e uma lâmina de fluxo usada deve ser colocada no lugar. Siga as instruções na tela para executar o teste.

- 1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
- 2 Na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento), selecione **System Check (Verificação do sistema)**.
- 3 Selecione **Conduct Volume Test (Realizar teste de volume)** e depois **Next (Próximo)**.

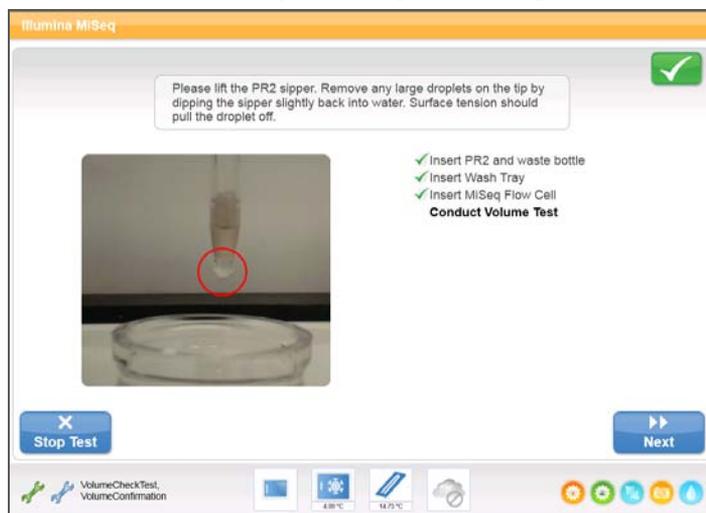
Figura 35 Tela System Check (Verificação do sistema)



- 4 Encha cada reservatório da bandeja de limpeza com 6 ml de água de qualidade de laboratório.
- 5 Encha o frasco de limpeza de 500 ml com 350 ml de água de qualidade de laboratório.

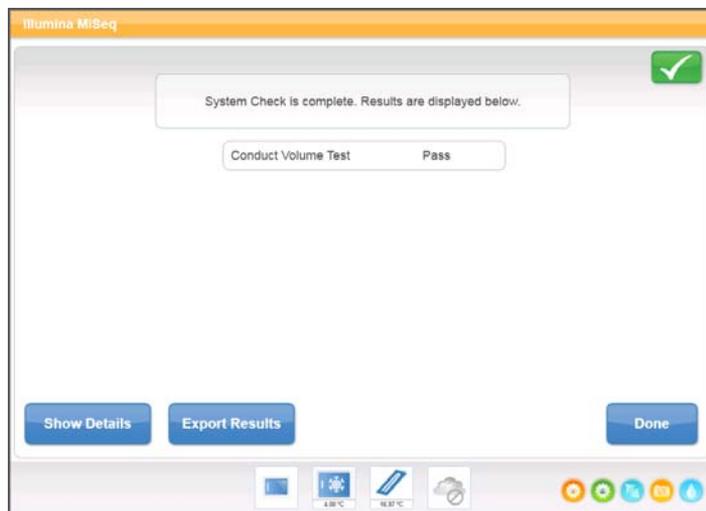
- 6 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento.
 - a Abra a porta do compartimento de reagentes e a porta do refrigerador de reagentes e deslize a bandeja de limpeza pelo refrigerador até o fundo. Feche a porta do refrigerador de reagentes.
 - b Levante a alça do aspirador de líquidos até que ela trave e carregue o frasco de limpeza.
 - c Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento de reagentes.
 - d Abaixе lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
- 7 Depois dos avisos na tela, remova todas as gotas do aspirador de líquidos do frasco de limpeza da seguinte forma:
 - a Quando solicitado, levante lentamente a alça do aspirador de líquidos e verifique se há uma gota de água no aspirador.
 - b Quando solicitado, abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos o suficiente na água para permitir que a tensão da superfície remova a gota.
 - c Quando solicitado, levante lentamente a alça do aspirador de líquidos e verifique se há uma gota de água no aspirador.
 - d Quando solicitado, abaixe lenta e completamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.

Figura 36 Remoção das gotas do aspirador de líquidos



8. Selecione **Next (Próximo)**. O teste de volume é iniciado. Quando o teste de volume estiver concluído, os resultados serão exibidos na tela.

Figura 37 Resultados do teste de volume



Se não passar no teste, realize uma limpeza de manutenção. Consulte *Realizar uma limpeza de manutenção* na página 73.

- 9 Quando a limpeza de manutenção for concluída, repita o teste de volume.

Medir os volumes de limpeza esperados

A medição dos volumes de limpeza esperados confirma se o sistema de fluxo de reagentes de limpeza está operando com eficiência.

- 1 Antes de iniciar uma limpeza, esvazie o frasco de resíduos.
- 2 Quando a limpeza estiver concluída, meça o volume de limpeza no frasco de resíduos.

Tipo de limpeza	Volume de limpeza esperado
Limpeza pós-execução	17,25 ml
Limpeza pós-execução, que inclui uma limpeza da linha padrão	25,5 ml
Limpeza de espera	46 ml
Limpeza de manutenção	17,25 ml

A

- agrupar logs 21, 84-85
- ajuda, Live Help 90
- ajuda, técnica 109
- alça do aspirador de líquidos 8
- alertas por e-mail 22
- análise
 - durante o sequenciamento 31
 - opções 29
- análise em tempo real 2
 - geração de modelos 57
 - pastas de execução 32
- análise secundária 31
- arquivo de manifesto
 - cópia para o instrumento 19
 - definição 14
- assistência técnica 109
- atualização do software 80

B

- BaseSpace
 - conexão 17
 - credenciais 88
- BluFuse 29

C

- carregamento de reagentes
 - cartucho 50
 - PR2 49
- cartucho de reagentes 9
- ciclos em uma leitura 28
- clusterização 39
- como ligar o instrumento 13
- compartimento da lâmina de fluxo 5-6
- compartimento de reagentes 5, 8
- CompletedJobInfo.xml 31
- componentes
 - cartucho de reagentes 9

- compartimento da lâmina de fluxo 5-6
- compartimento de reagentes 5, 8
- lâmina de fluxo 7
- módulo óptico 5
- conexão de rede 95
- configuração do instrumento 26
- configurações de rede 87
- configurações do sistema 87
- cópia de arquivos e pastas 19

D

- desativação do instrumento 77
- desligamento do instrumento 26, 81
- diretrizes para água de qualidade de laboratório 12
- documentação 109
- duração da execução 27

E

- endereço IP 87
- espaço em disco
 - pouco espaço em disco 95
 - verificação 35
- espera 65
- exclusão de arquivos e pastas 19

F

- fixação da lâmina de fluxo 6
- fluxo de reagentes
 - limpeza 73, 77
 - solução de problemas 98-99
- fluxo de trabalho 39
 - duração da execução 27
- fluxo de trabalho de análise
 - definição 14
- fluxo de trabalho do VeriSeq
 - análise secundária 29

- frequência de manutenção 63
- lâmina de fluxo 44
- replicar análise localmente 22
- frasco de resíduos 8

G

- genoma de referência
 - formato do arquivo 14
- geração de modelos 27, 57

Í

- ícone de alerta de status 18
- ícones
 - alerta de status 18
 - erros e advertências 18
 - indicadores de atividade 17
 - sensores 17

I

- indicadores de atividade 17
- indicadores de sensores 17
- inicialização 95
- interruptor 13

L

- lâmina de fluxo
 - canaleta única 27
 - cor da tampa 44
 - designador de letra 96
 - limpeza 44
 - numeração dos blocos 60
 - visão geral 7
- limpeza
 - benefícios da 62
 - espera 77
 - preparação para o estado ocioso 77
- limpeza da linha padrão 67
- limpeza de espera 65, 77
- limpeza de manutenção 65, 73
- limpeza pós-execução 67
- limpezas
 - configurações da limpeza pós-execução 22
 - manutenção 65, 73
 - pós-execução 67
 - preparação para finalizar 81
 - volumes esperados 103

- Live Help 90
- locais das pastas
 - configurações padrão 22
 - para a execução atual 53

M

- materiais de consumo
 - água de qualidade de laboratório 12
 - fornecidos pela Illumina 10
 - fornecidos pelo usuário 11
- materiais de consumo fornecidos pelo usuário 11
- MiSeq Reporter 2
 - credenciais 88
 - visão geral 31
- MiSeq Self-Service 96
- módulo óptico 5
- monitoramento da execução 55
- movimentação de arquivos e pastas 19

N

- nome da conta do sistema 88
- nome de domínio 87-88
- nome de usuário 13
- numeração dos blocos 60

O

- opções da execução 22

P

- parada de uma execução 92
- pasta de execução
 - definição 14
- pasta InterOp 33
- pastas da execução
 - arquivos de análise primária 58
 - nomenclatura 32
- pastas de execução
 - conteúdo 33
 - gerenciamento 19
 - temp, saída, análise 32
- pausa na execução 91
- PGS 44
- planilha de amostras
 - alteração 51
 - cópia para o instrumento 19
 - definição 14

- na pasta de execução 58
- não encontrada 95
- PR2, carregamento 49

R

- reagentes
 - carregamento 49
 - em kits 10
- Real Time Analysis
 - resultados 58
- receitas, gerenciamento 19
- referências do genoma 19
- refrigerador de reagentes,
 - temperatura 17
- reinício do software 26
- RFID
 - cartucho de reagentes 50
 - PR2 49
 - rastreamento 2
 - solução de problemas 96
- RTAcomplete.txt 58
- RunInfo.xml 33, 58
- runParameters.xml 33

S

- senha 13
- senha, alteração 88
- sensor da porta da lâmina de fluxo 17
- sequenciamento 39
- Sequencing Analysis Viewer 27, 55
- software
 - atualização 80
 - configuração do instrumento 26
 - duração da execução 27
 - inicialização 13
 - no instrumento 15
 - verificação do espaço em disco 35
- solução de problemas
 - agrupar logs 21, 84-85
 - arquivos específicos da execução
 - para 84
 - erros de configuração da
 - execução 95
 - fluxo de reagentes 99
 - RFID 96
 - taxa de fluxo 98
- status.xml 58
- suporte ao cliente 109

T

- tamanho da leitura 27-28
- taxa de fluxo, solução de problemas 98
- tela de sequenciamento 55
- tela welcome (boas-vindas) 15
- telas de configuração de execução 18,
 - 43
- teste de volume 99

V

- volumes de limpeza 103

W

- Windows, minimizar para 26

Assistência técnica

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

Tabela 5 Informações de contato gerais da Illumina

Endereço	5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 E.U.A.
Site	www.illumina.com
E-mail	techsupport@illumina.com

Tabela 6 Illumina Números de telefone do suporte ao cliente

Região	Número de contato	Região	Número de contato
América do Norte	1.800.809.4566	Holanda	0800.0223859
Alemanha	0800.180.8994	Irlanda	1.800.812949
Áustria	0800.296575	Itália	800.874909
Bélgica	0800.81102	Noruega	800.16836
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
Espanha	900.812168	Suécia	020790181
Finlândia	0800.918363	Suíça	0800.563118
França	0800.911850	Outros países	+44.1799.534000

Fichas de dados de segurança

As fichas de dados de segurança (SDSs) estão disponíveis no site da Illumina, em support.illumina.com/sds.html.

Documentação do produto

No site da Illumina, há documentação do produto em PDF disponível para download. Vá para support.illumina.com, selecione um produto, e em seguida clique em **Documentation & Literature**.

