

Funcionamiento del sistema NextSeq™ 500

Requisitos:

- Biblioteca preparada y cuantificada o bibliotecas agrupadas
- Kit NextSeq 500 (Alto rendimiento o rendimiento medio)
- [Opcional] Kit de control PhiX de Illumina
- Guía del usuario del sistema NextSeq 500

1 Planificación del experimento en BaseSpace®

 En el caso de instrumentos configurados con BaseSpace, tenga en cuenta lo siguiente:

-  Planifique el experimento desde la ficha BaseSpace Prep (Preparación BaseSpace). Consulte la Guía del usuario de BaseSpace.
- a Muestras biológicas:** Registre información sobre las muestras que se secuenciarán.
- b Bibliotecas:** Las bibliotecas son muestras biológicas preparadas con adaptadores. Seleccione el tipo de preparación de bibliotecas, asigne índices y un nombre a las bibliotecas.
- c Grupos:** Un grupo de bibliotecas se secuencia en un único experimento. Asigne un nombre único al grupo. Un grupo puede estar formado por una o varias bibliotecas.
- d Experimentos planificados:** Asocie un grupo al experimento, especifique los parámetros y asigne un nombre único al experimento.
- e** Haga clic en **Sequence** (Secuenciar). El experimento está listo para secuenciarse.

2 Preparación del cartucho de reactivos



Asegúrese de que el embalaje metálico de la celda de flujo y el cartucho de reactivos tengan el etiquetado del mismo tipo de kit, ya sea alto o medio.

- a** Descongele el cartucho de reactivos durante una hora al baño maría con una cantidad de agua a temperatura ambiente suficiente para sumergir solo la base.
- b** Inspeccione visualmente los depósitos más grandes para asegurarse de que los reactivos están totalmente descongelados y no contienen burbujas de aire.
- c** Con un paño, limpie el sello metálico que cubre el depósito n.º 28, perforo el sello con una punta de pipeta de 1 ml y añada una dilución fresca de 0,03 %–0,06 % NaOCl.

3 Preparación de la celda de flujo

- a** Con el embalaje metálico intacto, deje la celda de flujo empaquetada aparte a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- b** Con unos guantes nuevos, retire la celda de flujo del embalaje metálico y del estuche de plástico transparente.



Tras retirar la celda de flujo del embalaje metálico, utilice la celda de flujo dentro de un plazo de 12 horas.

- c** Inspeccione y limpie la celda de flujo.

4 Preparación y carga de bibliotecas



El paso de desnaturalización se aplica a la mayoría de tipos de bibliotecas. La adición de un control PhiX a la biblioteca agrupada es opcional. Consulte Denaturing and Diluting Libraries for NextSeq (Desnaturalización y dilución de bibliotecas para NextSeq).

- a** Desnaturalice las bibliotecas y, después, diluya a una concentración de carga de ~3 pM, en función del método de cuantificación.
- b** [Opcional] Desnaturalice y diluya la biblioteca de control PhiX a 20 pM. Guarde la biblioteca PhiX 20 pM no utilizada hasta un máximo de dos semanas a una temperatura de entre -25 y -15 °C.
- c** [Opcional] Añada el PhiX a la dilución de la biblioteca. Cargue las bibliotecas en el cartucho de reactivos cuando el cartucho se haya descongelado totalmente y esté listo para configurar el experimento.
- d** Con un paño, limpie el sello metálico que cubre el depósito n.º 10, perforo el sello con una punta de pipeta de 1 ml y dispense la biblioteca.

Configuración de análisis secundario



Utilice el comando Manage Instrument (Administrar instrumento) para acceder a los ajustes de configuración del sistema. Configure los ajustes de análisis secundario en BaseSpace, BaseSpace Onsite o modo autónomo. Consulte la Guía del usuario del sistema NextSeq 500.

5 Configuración del experimento



En la interfaz de NCS, seleccione **Sequence** (Secuenciar). La puerta de la celda de flujo se abre y el sistema se prepara para la configuración del experimento.



En el caso de instrumentos configurados con BaseSpace, inicie sesión en BaseSpace.



Cargue la celda de flujo. Seleccione **Load** (Cargar). Confirme el ID de la celda de flujo que se muestra en la pantalla.



Con las dos manos, retire la bandeja de reactivos utilizados. Vacíe la bandeja de reactivos utilizados y vuelva a cargarla.



Cargue el cartucho de tampón. Confirme el ID de tampón que se muestra en la pantalla.



Cargue el cartucho de reactivo. Seleccione **Load** (Cargar). Confirme el ID de reactivo que se muestra en la pantalla.

Run Setup

En el caso de instrumentos configurados con BaseSpace, seleccione un experimento disponible. En el caso de configuraciones autónomas, especifique los parámetros del experimento.



Revise los resultados de comprobación anteriores al experimento. Seleccione **Start** (Empezar) para empezar el experimento.

6 Monitorización del experimento

Monitoree el progreso del experimento desde la interfaz de NCS.

Ciclo 1-5	Generación de plantillas
Ciclo 5-25	Intensidad y densidad de grupos
A partir del ciclo 25	% PF, rendimiento estimado y puntuaciones Q



[Opcional] Monitoree el experimento desde la ficha BaseSpace Runs (Experimentos BaseSpace) o desde el SAV de otro ordenador.



Tras el ciclo 25, las llamadas de bases se transfieren a la ubicación de destino especificada.