

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

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

Histórico de revisões

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000154717 v00	Fevereiro de 2021	Atualizadas informações do ciclo do índice.
Material n.º 20000262 Documento n.º 15027617 v04	Julho de 2018	Acréscimo de novas opções de configuração de execuções para os modos de sequenciamento Local Run Manager, Sample Sheets (Planilhas de amostras) e Manual. Substituição de referências ao MiSeq Reporter por Local Run Manager. Acréscimo do tópico Resolver faixas de temperatura do refrigerador ao Apêndice Resolução de problemas.
Material n.º 20000262 Documento n.º 15027617 v03	Maio de 2018	Removido o nome de usuário padrão e senha necessários para fazer login no sistema operacional. A Illumina recomenda usar credenciais específicas do site. Acrescentadas informações sobre o serviço de monitoramento Illumina Proactive na seção Personalizar configurações do sistema. Acrescentada nota em Compartimento do reagente em relação à faixa obrigatória de temperatura do refrigerador. Acrescentado o MiSeq Reporter novamente e removidas as referências ao Local Run Manager. Alterado o nome do guia, de Guia do sistema de Sequenciamento MiSeq para Guia do sistema MiSeq. Pequenas edições de texto.
Material n.º 20000262 Documento n.º 15027617 v02	Janeiro de 2018	Acréscimo de novas opções de configuração de execuções para os modos de sequenciamento Local Run Manager, Sample Sheets (Planilhas de amostras) e Manual. Substituição de referências ao MiSeq Reporter por Local Run Manager. Acréscimo do tópico Resolver faixas de temperatura do refrigerador ao Apêndice Resolução de problemas. Acréscimo de nova instrução de coleta de dados de desempenho do instrumento no tópico Personalizar configurações do sistema. O nome do guia foi alterado de Guia do sistema MiSeq para Guia do Sistema de Sequenciamento MiSeq.

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
<p>Material n.º 20000262 Documento n.º 15027617 v01</p>	<p>Setembro de 2015</p>	<p>O nome do guia foi alterado de Guia do usuário do sistema MiSeq para Guia do sistema MiSeq. Novo no MCS v2.6, foram adicionadas informações do BaseSpace Onsite. Reorganização das informações do guia com base em tarefas, em vez de telas. Todas as referências à tela Welcome (Boas-vindas) foram alteradas para a tela Home (Página inicial). Acréscimo de informações que estão nos Guias de preparação dos reagentes dos kits de reagentes do MiSeq, incluindo tipos de lâminas de fluxo, conteúdo do cartucho de reagente e instruções para descongelar o cartucho de reagente. Visite o site da Illumina para obter mais informações sobre kits de reagentes do MiSeq support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.html. Correção do volume de enxágue esperado de uma limpeza de manutenção de 17,25 ml para 51,75 ml. Atualização da ordem das etapas de fluxo de trabalho para preparar primeiro o cartucho de reagente e depois, se necessário, desnaturar e diluir bibliotecas. Transferência das informações de resolução de problemas para o Apêndice A. Transferência das informações de pasta de saída e bloco da lâmina de fluxo para o Apêndice B. Transferência das informações sobre o gerenciamento de arquivos para o capítulo Manutenção. Transferência das instruções de limpeza após a execução do capítulo Manutenção para o capítulo Sequenciamento. Alteração do nome do capítulo Realização de uma execução para Sequenciamento. Alteração das referências a análise primária para análise pelo software RTA. Atualização das instruções de diluição para o procedimento de limpeza após a execução com uma limpeza da linha de modelo de NaOCl a 6% para NaOCl a 5%. Acréscimo de um número da peça do NaOCl a 5% à lista de materiais de consumo fornecidos pelo usuário.</p>

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15027617 Rev. O	Setembro de 2014	<p>Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Novo no MCS v2.5, atualização da opção de limpeza após a execução para incluir uma limpeza da linha de modelo. • Atualização das instruções para uma limpeza após a execução com hipoclorito de sódio para a limpeza da linha de modelo. • Acréscimo do volume de enxágue esperado para uma limpeza após a execução. <p>Acréscimo das informações de fluxo de trabalho do VeriSeq PGS sobre recursos adicionais, opções de execução, opções de análise secundária, lavagens do instrumento e cor da tampa da lâmina de fluxo.</p>
N.º da peça 15027617 Rev. N	Junho de 2014	<p>Acréscimo de informações aplicáveis ao fluxo de trabalho do VeriSeq PGS.</p> <p>Atualização das informações de medidas de execução para clusterização e densidade.</p> <p>Remoção das informações de software antivírus. Consulte o <i>Guia de preparação do local do sistema MiSeq</i>.</p>
N.º da peça 15027617 Rev. M	Janeiro de 2014	<p>Atualização conforme a alteração introduzida no MCS v2.4:</p> <p>Acréscimo do recurso Bundle logs (Agrupar registros) para o envio de arquivos de resolução de problemas.</p>
N.º da peça 15027617 Rev. L	Outubro de 2013	<p>Acréscimo da reinicialização do software do sistema como uma etapa pré-execução.</p> <p>Acréscimo dos tubos de microcentrifuga à lista de materiais de consumo fornecidos pelo usuário.</p> <p>Eliminação do <i>Software MiSeq</i> como um capítulo separado, e distribuição do conteúdo ao longo do guia.</p> <p>Remoção das informações sobre as pastas para receitas personalizadas.</p> <p>Remoção das informações sobre faixas recomendadas de densidade de cluster para os kits de reagentes do MiSeq.</p> <p>Remoção dos detalhes sobre os kits de reagentes do MiSeq e acréscimo de uma visão geral dos recursos do kit de reagentes. Para obter mais informações, consulte a documentação de preparação de reagentes do kit que você está usando.</p> <p>Acréscimo de conteúdo no aviso sobre marcas registradas.</p>
N.º da peça 15027617 Rev. K	Agosto de 2013	Correção de erros de formatação.

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15027617 Rev. J	Agosto de 2013	<p>Acréscimo de descrições de execução para o MCS v2.3 e o kit de reagentes do MiSeq v3.</p> <p>Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kit de reagentes e compatibilidade entre versões para incluir o kit de reagentes do MiSeq v3. • Descrição da pasta Custom Recipes (Receitas personalizadas) para incluir uma subpasta v3. • Alteração da faixa de densidade de cluster para v2; acréscimo de faixa para v3. • Caminho de saída para os arquivos de imagem. <p>Correção dos códigos de barra da lâmina de fluxo para nanolâminas de fluxo (D) e microlâminas de fluxo (G). Remoção de informações sobre o kit de reagentes do MiSeq, incluindo conteúdo e tipos de lâmina de fluxo. Para obter mais informações, consulte o <i>Guia de preparação de reagentes do MiSeq</i> (documento n.º 15044983).</p>
N.º da peça 15027617 Rev. H	Março de 2013	<p>Acréscimo de 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>Remoção das 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 obter mais informações sobre esses tópicos, consulte o <i>Guia do usuário do MiSeq Reporter</i>, n.º da peça 15028784, ou o <i>Guia de referência rápida da planilha de amostras do MiSeq</i>, n.º da peça 15028392.</p> <p>Remoção das instruções para a preparação de primers personalizados. Para obter mais informações, consulte <i>Uso de primers personalizados no MiSeq</i>, n.º da peça 15041638.</p>
N.º da peça 15027617 Rev. G	Janeiro de 2013	<p>Remoção das instruções para desnaturação e diluição de bibliotecas de DNA e preparação de um controle do Illumina PhiX. Consulte <i>Preparação das bibliotecas de DNA para o sequenciamento no MiSeq</i>, n.º da peça 15039740.</p> <p>Atualização das instruções para limpeza do instrumento para adicionar 25 ml de solução de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em laboratório, em vez de 500 ml de água aprovada para uso em laboratório.</p>

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15027617 Rev. F	Novembro de 2012	<p>Acréscimo das seguintes novas informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acréscimo de descrições do kit para novos kits de reagentes do MiSeq: nanokit de reagentes do MiSeq e microkit de reagentes do MiSeq. • Acréscimo da visão geral dos tipos de lâmina de fluxo. • Acréscimo da descrição do fluxo de trabalho de análise de enriquecimento. <p>Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Novo no MCS v2.1, atualização da tela Perform Wash (Realizar limpeza) para adicionar uma opção e um comando de limpeza após a execução para levantar os aspiradores de líquidos. • Atualização da tabela de compatibilidade entre versões para incluir dependências de nano e microkits. • Atualização das informações de compatibilidade entre versões para incluir novos kits de reagentes.
N.º da peça 15027617 Rev. E	Outubro de 2012	<p>Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Correção das instruções de preparação do controle PhiX e densidade esperada de cluster do controle de PhiX preparado para 1.000 a 1.200 K/mm². • Observação de que o procedimento de desnaturação e diluição de bibliotecas, <i>Preparação das bibliotecas</i>, não se aplica a bibliotecas Nextera XT nem a bibliotecas de Amplicon TruSeq. • Alteração do nome da atualização de Pacote de expansão do MiSeq para Atualização de hardware do MiSeq. • Acréscimo do <i>Guia do usuário do MiSeq Reporter</i> à lista de recursos adicionais.

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15027617 Rev. D	Julho de 2012	<p>Atualização das descrições do software para MCS v2.0. Acréscimo das seguintes novas informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acréscimo de uma seção intitulada <i>Novidades no MCS</i> para descrever novos recursos do software, alterações na interface e alterações no fluxo de trabalho. • Acréscimo de descrição e número de catálogo do kit de reagentes do MiSeq v2, 500 ciclos. • Acréscimo da seção Compatibilidade entre versões e requisitos. • Acréscimo da descrição do pacote de expansão do MiSeq, que é necessário para a geração de imagens de lâmina de fluxo com superfície dupla de 14 blocos. • Acréscimo da descrição da numeração dos blocos da lâmina de fluxo com superfície dupla. • Acréscimo do fluxo de trabalho de análise de Amplicon de PCR para bibliotecas Nextera XT. • Acréscimo do uso de Tween 20 a 10% em procedimentos de limpeza e volumes de enxágue esperados. • Acréscimo da versão do cartucho de reagente para o procedimento de falha de leitura de RFID. <p>Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alteração dos acrônimos de reagentes IMF, CMF e AMX para os nomes de reagentes v2 IMS, CMS e AMS, respectivamente. • Alteração da concentração de PhiX de 8 pM para 12,5 pM. • Alteração da concentração máxima recomendada de NaOH para 1 mM na solução final. • Observação de 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. • Remoção da seção Parâmetros da planilha de amostras e da etapa de configuração da planilha de amostras 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>, n.º da peça 15028392, e o <i>Guia do usuário do Illumina Experiment Manager</i>, n.º da peça 15031335).

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
N.º da peça 15027617 Rev. C	Abril de 2012	<p>Atualização das descrições do software para MCS v1.2. Acréscimo dos seguintes novos procedimentos e seções: Visão geral do BaseSpace, Uso de primers personalizados, Geração de arquivos FASTQ, Resolução 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 de espera.</p> <p>Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atualização do nome do fluxo de trabalho de Amplicon para Amplicon personalizado; atualização do nome do fluxo de trabalho DenovoAssembly para Assembly; acréscimo do fluxo de trabalho GenerateFASTQ. • Acréscimo de descrições de pastas e arquivos de execução; atualização da nomenclatura da pasta de execução; acréscimo do tamanho da pasta de dados da execução. • Indicação da pasta de genoma como necessária para o sequenciamento de Amplicon em Parâmetros da planilha de amostras. • Acréscimo de instruções para diluição de NaOH para desnaturar bibliotecas. • Atualização da seção Resolução de falhas de leitura do RFID para incluir instruções de autosserviço do MiSeq. • Indicação dos arquivos e pastas usados para resolver problemas de desempenho da execução.
N.º da peça 15027617 Rev. B	Dezembro de 2011	<p>Atualização das descrições do software para MCS v1.1. Acréscimo de informações sobre proteção antivírus. Atualização das seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instruções para resolver falhas de RFID. • Preparação de bibliotecas — alteração para 0,2 N de NaOH. • Convenção de nomenclatura para pasta de execução. • Espaço em disco e capacidade de armazenamento necessários. • Etapas de configuração da execução — acréscimo de mais informações à seção Configuração da planilha de amostras. • Etapas de configuração da execução — acréscimo de observação para a eliminação do PR2 restante. • Duração da análise — acréscimo de quando a análise for superior a duas horas. • Requisitos de entrada de análise — indicação dos arquivos de manifesto como necessários para as bibliotecas de Amplicon personalizado TruSeq. • Correção do tamanho do tubo HT1 em Conteúdo do kit de reagentes do MiSeq. • Alteração das referências de iCom para Myllumina.
N.º da peça 15027617 Rev. A	Setembro de 2011	Versão inicial

Sumário

Histórico de revisões	iii
Capítulo 1 Visão geral	1
Introdução	1
Recursos adicionais	1
Componentes	2
Conceitos do MiSeq	4
Software do sistema	5
Opções de análise secundária	7
Sequencing Analysis Viewer	8
Espaço em disco necessário	9
Visão geral do kit de reagentes do MiSeq	9
Capítulo 2 Introdução	13
Início do MiSeq	13
Personalizar configurações do sistema	13
Configurar as notificações de atualizações do BaseSpace	14
Definir preferências de e-mail	14
Definir locais de pastas padrão	15
Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	15
Capítulo 3 Sequenciamento	17
Introdução	17
Duração da execução	17
Fluxo de trabalho do MiSeq	18
Descongelar o cartucho de reagente	19
Inspecionar o cartucho de reagente	20
Desnaturar e diluir bibliotecas	20
Carregar bibliotecas de amostra	20
Configurar uma execução usando o MCS	21
Limpeza da lâmina de fluxo	23
Carregar a lâmina de fluxo	25
Carregar os reagentes	26
Iniciar a execução	28
Monitorar a execução	29
Realizar uma limpeza após a execução	31
Capítulo 4 Manutenção	37
Frequência da manutenção	37
Frequência de manutenção do fluxo de trabalho do VeriSeq PGS	37
Realizar uma limpeza de manutenção	38
Realizar uma limpeza de espera	40
Gerenciar arquivos	42

Atualizações de software	43
Desligar o instrumento	44
Apêndice A Resolução de problemas	45
Introdução	45
Agrupar registros para resolução de problemas	45
Executar uma verificação do sistema	46
Pausar ou interromper uma execução	47
Levantar manualmente os aspiradores de líquidos do cartucho de reagente	48
Resolver os erros de configuração da execução	48
Resolver a falha de leitura de RFID	48
Realizar um teste de volume	49
Medir os volumes de enxágue esperados	50
Resolver erros de temperatura do refrigerador de reagentes	50
Resolver erros de análise do Local Run Manager	50
Definir as configurações do sistema	51
Apêndice B Pastas e arquivos de saída	53
Pastas de execução	53
Conteúdo da pasta MiSeqOutput	53
Pastas e arquivos do RTA	55
Índice	57
Assistência técnica	61

Capítulo 1 Visão geral

Introdução	1
Recursos adicionais	1
Componentes	2
Conceitos do MiSeq	4
Software do sistema	5
Opções de análise secundária	7
Sequencing Analysis Viewer	8
Espaço em disco necessário	9
Visão geral do kit de reagentes do MiSeq	9

Introdução

O sistema Illumina® MiSeq™ combina a comprovada tecnologia de sequenciamento por síntese (SBS) com um fluxo de trabalho revolucionário, que permite que você vá do DNA aos dados analisados em apenas oito horas. O MiSeq integra a clusterização, o sequenciamento e a análise de dados em um só instrumento.

Recursos

- ▶ **Automação completa** — Depois de configurar a execução, o que abrange carregar o cartucho de reagente pré-carregado, o frasco do tampão e a lâmina de fluxo, não é necessário mais nenhum tempo de trabalho efetivo.
- ▶ **Cartucho de reagente pré-carregado** — Um cartucho descartável de reagente pré-carregado projetado especialmente fornece reagentes para a clusterização e o sequenciamento, inclusive reagentes de sequenciamento do tipo paired-end e reagentes de indexação. O controle integrado de identificação por radiofrequência (RFID, Radio Frequency Identification) permite o rastreamento preciso dos materiais de consumo.
- ▶ **Controles da interface** — A interface do MiSeq Control Software (MCS) fornece controles para configurar o instrumento, configurar e monitorar as execuções e efetuar os procedimentos de manutenção.
- ▶ **Carregamento prático da lâmina de fluxo** — Um mecanismo de fixação posiciona automaticamente a lâmina de fluxo enquanto ela é carregada no instrumento. O controle integrado de identificação por radiofrequência (RFID, Radio Frequency Identification) permite o rastreamento preciso dos materiais de consumo.
- ▶ **Arquitetura inovadora de fluxo de reagentes** — O sistema de fluxo de reagentes do MiSeq possibilita uma eficiência insuperável no tempo do ciclo químico durante o sequenciamento.
- ▶ **Real-Time analysis (RTA)** — O software de análise integrado faz a análise de dados do instrumento em tempo real durante a execução do sequenciamento, com a análise de imagens e a identificação de bases e economiza um tempo valioso na análise posterior.
- ▶ **Local Run Manager** — O software integrado de análise secundária processa dados da análise pelo RTA para fazer o alinhamento e fornece informações sobre cada uma das amostras analisadas.

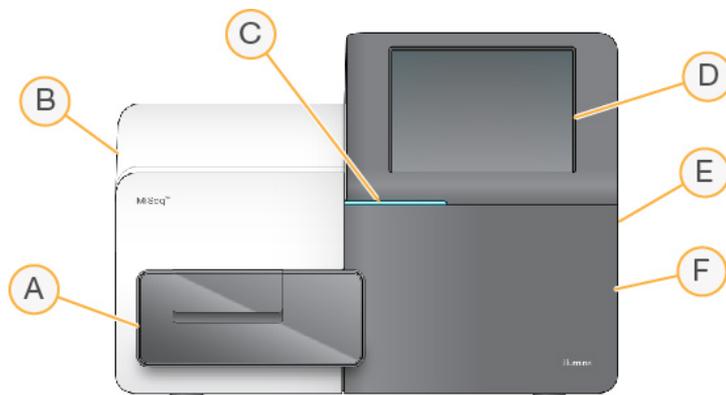
Recursos adicionais

As páginas de suporte do Sistema MiSeq no site da Illumina oferecem outros recursos. Esses recursos abrangem software, treinamento, produtos compatíveis e a documentação abaixo. Verifique sempre as páginas de suporte quanto às versões mais recentes.

Recurso	Descrição
<i>Guia de preparação do local do sistema MiSeq (documento n.º 15027615)</i>	Fornecer especificações para área do laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais.
<i>Guia de segurança e conformidade do sistema MiSeq (documento n.º 15027616)</i>	Fornecer informações sobre rotulagem de instrumentos, certificações de conformidade e considerações de segurança.
<i>Guia do usuário do Illumina Experiment Manager (documento n.º 15031335)</i>	Fornecer instruções para a criação de placas de amostra e planilhas de amostras para diferentes fluxos de trabalho e tipos de biblioteca.
<i>Guia do usuário do BlueFuse Workflow Manager (documento n.º 1000000028842)</i>	Fornecer instruções para a criação de placas de amostra e planilhas de amostras para uso com o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS.
<i>Guia de referência rápida da planilha de amostras do MiSeq (documento n.º 15028392)</i>	Apresentar informações sobre a adição de configurações da planilha de amostras à sua planilha de amostras.
<i>Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do sistema MiSeq (documento n.º 15039740)</i>	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.
<i>Guia de primers personalizados MiSeq (documento n.º 15041638)</i>	Fornecer instruções de preparação e carregamento de primers personalizados e de edição da planilha de amostras para primers personalizados.
<i>Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)</i>	Fornecer uma visão geral do software Local Run Manager, instruções de uso dos recursos do software e instruções de instalação dos módulos de análise no computador do instrumento.
<i>Guia do BlueFuse Multi Software (documento n.º 15053620)</i>	Fornecer uma visão geral abrangente dos procedimentos de análise, dos fluxos de trabalho de análise e dos arquivos gerados pelo BlueFuse Multi, bem como requisitos de computação e informações de resolução de problemas. Utilize este guia com o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS.
<i>Guia do usuário do BaseSpace (documento n.º 15044182)</i>	Fornecer instruções de uso do BaseSpace e descrições dos gráficos gerados para cada fluxo de trabalho de análise.
<i>Guia do sistema BaseSpace Onsite (documento n.º 15049148)</i>	Fornecer instruções para utilizar o sistema BaseSpace Onsite.

Componentes

O MiSeq contém um monitor com tela de toque, uma barra de status, um botão liga/desliga com portas USB adjacentes e três compartimentos.



- A **Compartimento da lâmina de fluxo** — Contém o estágio que abriga a lâmina de fluxo durante a execução. Os motores do estágio da lâmina de fluxo movem o estágio para fora do módulo óptico para o carregamento da lâmina de fluxo e o retorna quando a execução é iniciada.
- B **Compartimento óptico fechado** — Contém componentes ópticos que permitem a aquisição da imagem da lâmina de fluxo.
- C **Barra de status** — Indica o status da lâmina de fluxo como pronta para sequenciamento (verde), em processamento (azul) ou requer atenção (laranja).
- D **Monitor com tela de toque** — Exibe a interface do software de controle para configuração do sistema e da execução.
- E **Portas USB externas** — Facilitam a transferência de arquivos e dados para o computador do instrumento a partir do monitor de tela de toque.
- F **Compartimento do reagente** — Contém reagentes na temperatura apropriada, soluções de limpeza e um frasco para os reagentes usados. A porta do compartimento do reagente é protegida por uma trava magnética.

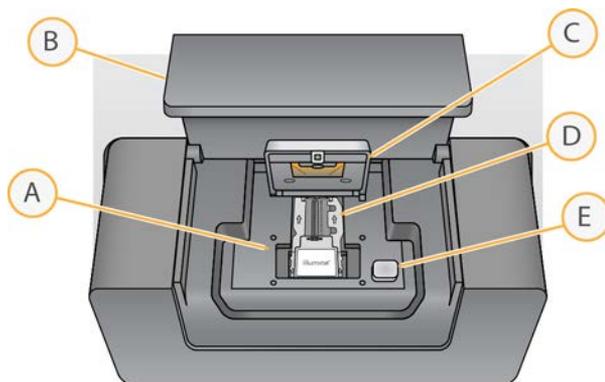
A interface do MiSeq orienta as etapas de configuração das execuções utilizando o monitor de tela de toque. Para carregar os componentes da execução, é preciso acessar o compartimento do reagente e o compartimento da lâmina de fluxo.

Compartimento da lâmina de fluxo

O compartimento da lâmina de fluxo abriga o estágio da lâmina de fluxo, a estação térmica e as conexões de fluxos de reagentes para a lâmina de fluxo. O estágio da lâmina de fluxo apoia a lâmina de fluxo e a fixação da lâmina de fluxo a fixa e posiciona. Quando a fixação da lâmina de fluxo é fechada, dois pinos próximos à dobradiça da fixação posicionam a lâmina de fluxo automaticamente.

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

Figura 1 Compartimento da lâmina de fluxo



- A Estágio da lâmina de fluxo
- B Porta do compartimento da lâmina de fluxo
- C Fixação da lâmina de fluxo
- D Lâmina de fluxo
- E Botão para liberação da fixação da lâmina de fluxo

Compartimento do reagente

O compartimento do reagente contém o refrigerador de reagentes e as posições para o frasco de solução tampão de limpeza (PR2) e o frasco de resíduos. Para manter uma temperatura consistente, abra e feche o refrigerador de reagentes somente quando receber instruções.



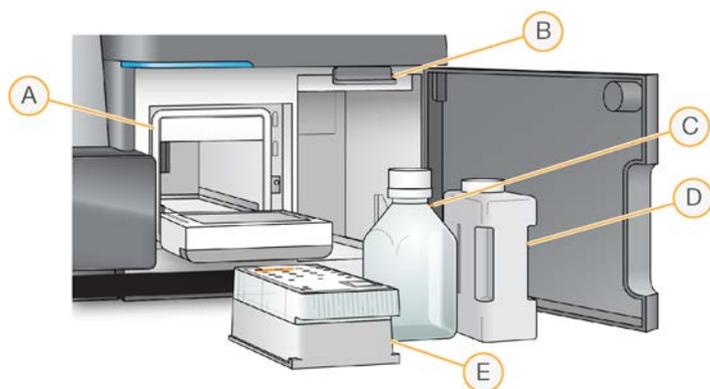
OBSERVAÇÃO

A faixa de temperatura necessária do refrigerador de reagentes é de 2 °C a 11 °C.

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

No lado direito do refrigerador de reagentes, há aberturas específicas para o frasco de PR2 e o frasco de resíduos. A alça do aspirador de líquidos mantém as garrafas no lugar e abaixa o aspirador de líquidos apropriado em cada frasco. Os reagentes são bombeados pelo aspirador de líquidos e pelas linhas de fluxo de reagentes e seguem para a lâmina de fluxo. Os resíduos do reagente são colocados no frasco de resíduos durante todo o processo.

Figura 2 Componentes do compartimento do reagente



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

Conceitos do MiSeq

Os conceitos e termos a seguir são comuns nas etapas de configuração de execuções no MiSeq.

Conceito	Descrição
Fluxo de trabalho de análise	Um procedimento de análise secundária é executado pelo Local Run Manager. O fluxo de trabalho de análise de cada execução é especificado na planilha de amostras ou pelo módulo selecionado.

Conceito	Descrição
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. Os arquivos de manifesto também podem ser carregados no Local Run Manager para serem usados durante a análise secundária.
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 é especificado na planilha de amostras.
Pasta de execução	A estrutura de pastas preenchida pelo software RTA (pasta MiSeqOutput) ou a pasta preenchida pelo Local Run Manager (MiSeqAnalysis). Para obter informações, consulte <i>Pastas de execução na página 53</i> .
Planilha de amostras	Um arquivo de valores separados por vírgula (*.csv) que contém as informações usadas para configurar e analisar uma execução de sequenciamento, inclusive uma lista de amostras e suas sequências de índices. A planilha de amostras pode ser fornecida durante as etapas de configuração de execuções 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 fluxos de trabalho de análise e formatos de arquivo de manifesto, consulte o *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)*.

Para obter mais informações sobre planilhas de amostras, consulte o *Guia de referência rápida da planilha de amostras MiSeq (documento n.º 15028392)*.

Software do sistema

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

- ▶ **MiSeq Control Software (MCS)** — Controla a operação do instrumento. A interface do MiSeq Control Software (MCS) orienta as etapas de carregamento da lâmina de fluxo e dos reagentes antes de iniciar a execução. Uma visão geral das estatísticas de qualidade é exibida conforme a execução avança.
- ▶ Durante a execução, o MCS opera o estágio da lâmina de fluxo, distribui os reagentes, controla as temperaturas da lâmina de fluxo e captura as imagens de clusters na lâmina de fluxo. O MCS efetua a execução de acordo com os parâmetros especificados no software Local Run Manager.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA)** – Faz a análise da imagem e a identificação de base e atribui uma pontuação de qualidade a cada base de cada ciclo. As imagens são armazenadas temporariamente na pasta de execução para processamento pelo RTA e depois automaticamente excluídas quando a análise do RTA é concluída.
- ▶ **Local Run Manager** — Uma solução integrada do instrumento usada para criar uma execução, monitorar o status, analisar os dados de sequenciamento e visualizar os resultados. O Local Run Manager também controla as informações da amostra e as permissões dos usuários. O software é executado como um serviço do Windows no computador do instrumento e é visualizado por meio de um navegador da Web. Para obter mais informações, consulte *Software Local Run Manager na página 8*.

O software opcional usado à exceção do instrumento inclui o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para obter mais informações, consulte *Sequencing Analysis Viewer na página 8*.

Ícones de status

Um ícone de status, na interface do software de controle, indica que há uma alteração nas condições durante a configuração da execução ou durante a execução. Um número no ícone indica o número de condições para um status.

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

É possível filtrar os tipos de mensagens exibidos 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.

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. No entanto, algumas 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.

Indicadores de atividade

Um ícone do indicador de atividade exibe a atividade que o instrumento está executando no momento.

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

Os indicadores de sensor, exibidos na base de cada tela da interface, representam o status dos componentes 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 do reagentes em °C
- ▶ Temperatura da lâmina de fluxo em °C
- ▶ Status da conexão do BaseSpace® (mostrado como não conectado)

Opções de análise secundária

Os dados de sequenciamento do MiSeq podem ser analisados no computador do instrumento por meio do Local Run Manager, em um servidor em rede, utilizando o BaseSpace™ OnSite, ou na nuvem, usando o BaseSpace. Esses aplicativos geram informações sobre alinhamento, variantes e conjuntos de sequências contíguas de cada genoma solicitado e de cada amostra de uma execução com várias amostras. Ao executar o fluxo de trabalho do VeriSeq™ PGS, use o software BlueFuse™ Multi para análise.

Visão geral do BaseSpace e BaseSpace Onsite

O BaseSpace é um ambiente de computação em nuvem da Illumina. O BaseSpace Onsite fornece um ambiente de computação em um servidor dedicado, completo com ferramentas de configuração de execução e opções de análise.

Faça login no BaseSpace ou no BaseSpace Onsite quando você configurar a execução do sequenciamento. Ao usar o BaseSpace ou BaseSpace Onsite, você tem a opção adicional de armazenar dados de execução localmente. Para obter mais informações, consulte *Personalizar configurações do sistema na página 13*.

Quando você começar a execução de sequenciamento, o ícone será alterado para indicar que o MiSeq está conectado ao BaseSpace ou ao BaseSpace Onsite e que os arquivos de dados estão sendo transferidos para o local especificado.

Figura 5 Ícone indicando conexão com o BaseSpace



Figura 6 Ícone indicando conexão com o BaseSpace Onsite



Usando o BaseSpace, os arquivos de dados são criptografados durante o processo, descriptografados durante a análise e criptografados novamente ao serem armazenados. Usando o BaseSpace Onsite, os arquivos de dados são criptografados durante o processo, descriptografados durante a análise e, como opção, podem ser criptografados novamente ao serem armazenados.

O BaseSpace e o BaseSpace Onsite se desconectam automaticamente do MiSeq no final da execução ou assim que todos os arquivos de análise do RTA terminaram a transferência. Se a conexão com a Internet for interrompida, o upload dos arquivos de análise continuará quando ela for restaurada, a partir do ponto em que ocorreu a interrupção.

Assim que o último arquivo de identificação de bases for carregado no BaseSpace ou no BaseSpace Onsite, a análise secundária dos dados será iniciada. Os mesmos fluxos de trabalho de análise são compatíveis com o BaseSpace e o BaseSpace Onsite e também com a análise do instrumento por meio do Local Run Manager.

Você pode acessar o BaseSpace em basespace.illumina.com. Faça login usando sua conta Myllumina. Para obter mais informações sobre o BaseSpace, consulte o *Guia do usuário do BaseSpace (documento n.º 15044182)* e as páginas de suporte do BaseSpace no site da Illumina.

Para obter mais informações sobre o BaseSpace Onsite, consulte o *Guia do sistema BaseSpace Onsite (documento n.º 15049148)* e as páginas de suporte do BaseSpace OnSite no site da Illumina.

Software Local Run Manager

O software Local Run Manager é uma solução integrada do instrumento para criar uma execução, monitorar o status, analisar os dados e visualizar os resultados. O software integra-se ao MCS e processa as identificações de bases geradas durante a análise inicial. O Local Run Manager efetua automaticamente a análise secundária mediante a conclusão de uma execução de sequenciamento.

O Local Run Manager é usado para registrar informações da amostra durante a preparação de bibliotecas e garante o controle positivo das amostras durante todo o processo, produzindo informações sobre cada amostra.

Além disso, o Local Run Manager pode controlar a autenticação do usuário se estiver ativada, concedendo vários níveis de permissões de acesso aos usuários. As permissões são salvas em um arquivo de banco de dados que o MiSeq consulta. O Local Run Manager também pode monitorar a execução de sequenciamento. Para obter mais informações, consulte o *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)*.

Sequenciamento durante a análise

Os recursos de computação do sistema MiSeq são exclusivos para sequenciamento ou análise.

Com o Local Run Manager, se for iniciada uma nova execução de sequenciamento no MiSeq antes da conclusão de uma análise secundária de uma execução anterior, será exibida uma caixa de diálogo de confirmação. Depois de confirmar se você deseja que a nova execução de sequenciamento seja iniciada, a análise secundária da execução anterior é interrompida até que a nova execução conclua o sequenciamento.

Quando a nova execução concluir o sequenciamento, a análise secundária da execução anterior começará novamente de modo automático, desde o início.

Sequencing Analysis Viewer

É possível monitorar a execução de modo mais detalhado sem interferir nela usando o Sequencing Analysis Viewer (SAV) da Illumina. Seu MiSeq deve estar conectado à rede para visualizar os resultados da análise primária com o SAV.

O SAV permite analisar as medidas durante uma execução conforme elas são geradas, e também mais tarde, após a 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 medidas geradas pelo RTA e as organiza em lotes, gráficos e tabelas.



OBSERVAÇÃO

O SAV é universal para os sistemas de sequenciamento da Illumina e a maioria deles usa uma lâmina de fluxo de 8 cavidades. Algumas exibições incluem listas suspensas que mostram as cavidades 1 a 8. Como a lâmina de fluxo do MiSeq tem somente uma cavidade, selecione **All** (Todas) ou **Lane 1** (Cavidade 1). Para obter mais informações, consulte o *Guia do usuário do Sequencing Analysis Viewer* (documento n.º 15020619).

Espaço em disco necessário

O computador integrado ao instrumento tem aproximadamente 550 GB de capacidade de armazenamento. Antes de iniciar uma execução, o software verifica o espaço em disco disponível. Se não houver espaço suficiente em disco para a execução, será exibida uma mensagem indicando a quantidade de espaço em disco necessária.

Se você precisar liberar espaço em disco disponível, mova ou exclua as pastas de execução mais antigas, conforme apropriado. Para obter mais informações, consulte [Gerenciar arquivos na página 42](#). Depois de liberar o espaço adequado em disco, selecione **Restart Check** (Reiniciar verificação).

Visão geral do kit de reagentes do MiSeq

O kit de reagentes do MiSeq é um kit de uso único, necessário para realizar uma execução de sequenciamento. Ele está disponível em diversos tipos e tamanhos. Cada tipo de kit de reagentes do MiSeq contém 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 PR2 e o cartucho de reagente fornecidos no kit usam identificação por radiofrequência (RFID) para rastreamento e compatibilidade precisos dos materiais de consumo.

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

Para obter uma descrição dos kits de reagentes disponíveis, visite a [página do produto kits de reagentes do MiSeq](#) no site da Illumina.

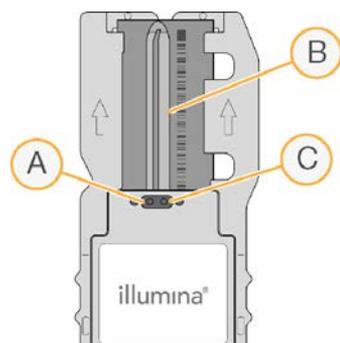
Lâmina de fluxo

A lâmina de fluxo MiSeq é um substrato de uso único com base em vidro no qual são gerados agrupamentos 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 cavidade 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 bibliotecas são carregadas no cartucho de reagente antes de configurar a execução e automaticamente transferidas para a lâmina de fluxo depois do início da execução.

Figura 7 Lâmina de fluxo do MiSeq



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

Cor da tampa da lâmina de fluxo

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

Lâmina de fluxo	Cor da tampa da lâmina de fluxo
Lâmina de fluxo padrão Lâmina de fluxo do PGS	Clara
Microlâmina de fluxo	Verde
Nanolâmina de fluxo	Amarela

Visão geral do cartucho de reagente

O cartucho de reagente do MiSeq é um material de consumo de uso único, composto por reservatórios com selo de alumínio preenchidos com reagentes de clusterização e sequenciamento suficientes para sequenciar uma lâmina de fluxo.

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



ADVERTÊNCIA

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

Reservatórios reservados

Figura 8 Cartucho de reagente com reservatórios numerados

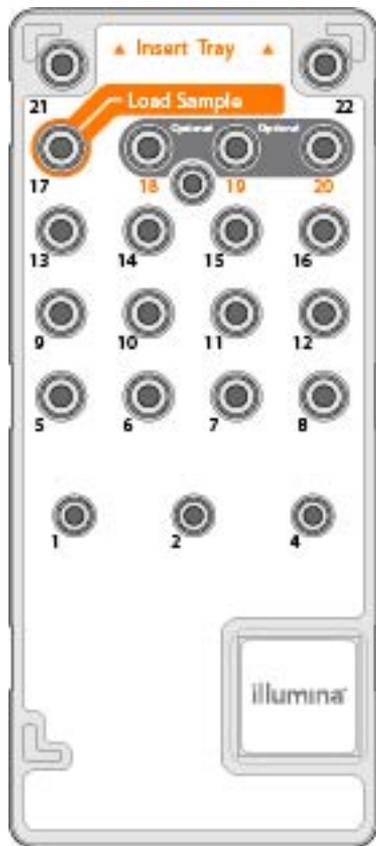


Tabela 1 Reservatórios do cartucho de reagente

Posição	Nome do reagente	Descrição
8	LDR	Reagente de desnaturação (contém formamida)
17	Reservado	Load Samples (Carregar amostras) (Reservado para bibliotecas de amostras)
18	Reservado	Reservado para primer de leitura 1 personalizado [Opcional]
19	Reservado	Reservado para primer de leitura de índice personalizado [Opcional]
20	Reservado	Reservado para primer de leitura 2 personalizado [Opcional]



OBSERVAÇÃO

Para obter mais informações sobre o uso de primers personalizados no cartucho de reagente do MiSeq, consulte o *Guia de primers personalizados do MiSeq* (documento n.º 15041638).

Capítulo 2 Introdução

Início do MiSeq	13
Personalizar configurações do sistema	13
Configurar as notificações de atualizações do BaseSpace	14
Definir preferências de e-mail	14
Definir locais de pastas padrão	15
Materiais de consumo fornecidos pelo usuário	15

Início do MiSeq

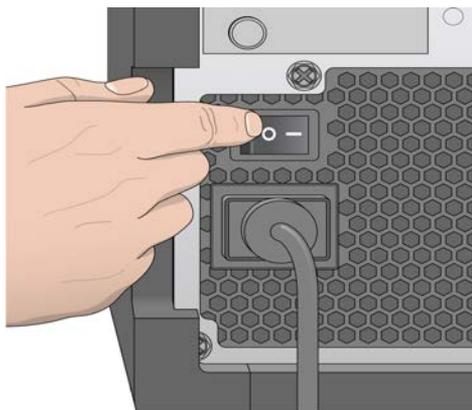
- 1 Altere o interruptor na parte traseira do instrumento para a posição | (on) ligado.



OBSERVAÇÃO

Para obter um melhor desempenho, deixe o instrumento ligado continuamente. No entanto, se for necessário desligar o instrumento, consulte *Desligar o instrumento na página 44*. Aguarde **no mínimo** 60 segundos antes de colocar o interruptor novamente na posição ON (ligado).

Figura 9 Localização do interruptor



- 2 Aguarde o sistema carregar e depois faça login no sistema operacional. Se necessário, consulte seu administrador das instalações quanto ao nome de usuário e senha. Quando o sistema operacional é carregado, o MiSeq Control Software (MCS) é aberto e inicializa o sistema automaticamente.
- 3 Para o Local Run Manager, se o gerenciamento de usuários estiver habilitado, faça login usando seu nome de usuário e senha do Local Run Manager e selecione **Next** (Avançar).

Personalizar configurações do sistema

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Run Options** (Opções de execução).
- 2 Selecione a guia **Run Settings** (Configurações de execução).
- 3 Selecione **Post Run Wash** (Limpeza após a execução) ou **Maintenance Wash** (Limpeza de manutenção). Uma limpeza do instrumento é necessária após cada execução. O software exige que a limpeza seja feita antes de configurar uma execução subsequente. A opção Post-Run Wash (Limpeza após a execução) especifica o tipo de limpeza que é realizado por padrão. A limpeza após a execução leva aproximadamente 30 minutos. A limpeza de manutenção leva aproximadamente uma hora.

- 4 **[Opcional]** Selecione **Start run after pre-run check. Do not prompt for confirmation.** (Iniciar execução após verificação pré-execução. Não solicitar confirmação.) para iniciar a execução automaticamente.
- 5 Na guia **BaseSpace Settings** (Configurações do BaseSpace), digite o endereço do Cloud Server ou do local do Onsite Server.
É necessário configurar o servidor do Onsite se você usa o BaseSpace Onsite.
- 6 Selecione **Send Instrument Performance Data to Illumina to aid technical support** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina para ajudar o suporte técnico) para habilitar o serviço de monitoramento do Illumina Proactive. O nome da configuração na interface do software pode ser diferente do nome deste guia, dependendo da versão do MCS em uso.
Com essa configuração ativada, os dados de desempenho do instrumento são enviados à Illumina. Esses dados ajudam a Illumina a resolver problemas com mais facilidade e detectar possíveis falhas, possibilitando a manutenção proativa e maximizando o tempo de atividade do instrumento. Para obter mais informações sobre os benefícios desse serviço, consulte a *Nota técnica do Illumina Proactive (documento n.º 1000000052503)*.
Esse serviço:
 - ▶ Não envia dados de sequenciamento.
 - ▶ Exige que o instrumento esteja conectado a uma rede com acesso à Internet.
 - ▶ É ativado por padrão. Para cancelar esse serviço, desabilite a configuração **Send instrument Performance Data to Illumina to aid technical support** (Enviar dados de desempenho do instrumento à Illumina para ajudar o suporte técnico).

Configurar as notificações de atualizações do BaseSpace

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 3 Selecione **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Verificar automaticamente novas atualizações de software no BaseSpace).

Definir preferências de e-mail

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

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Run Options** (Opções de execução).
- 2 Selecione a guia **Email Notifications** (Notificações por e-mail).
- 3 Digite as seguintes informações:
 - ▶ **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 address** (Endereço 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.
 - ▶ **Recipient addresses** (Endereços dos destinatários) — Use o teclado na tela para digitar os endereços de e-mail de cada destinatário que receberá 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 de execução que gerarão uma notificação.

Definir locais de pastas padrão

As pastas podem estar em uma rede local ou no computador do instrumento.

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Run Options** (Opções de execução).
- 2 Selecione a guia **Folder Settings** (Configurações de pasta).
- 3 Informe locais padrão para as seguintes pastas.
 - ▶ **Pasta Output** (Saída) – Define o local padrão para os arquivos de saída de análise. Altere a pasta de saída padrão para um local de rede para compartilhamento e armazenamento de longa duração. Para obter informações, consulte *Pastas de execução na página 53*.
 - ▶ **Pasta Recipe** (Receita) – Define o local padrão para 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.
 - ▶ **Pasta Sample Sheet** (Planilha de amostras) — Define o local padrão das planilhas de amostras. As planilhas de amostras são criadas antes da preparação da biblioteca e contêm os parâmetros para a execução.
 - ▶ **Pasta Manifest** (Manifesto) — Os arquivos de manifesto são necessários para alguns tipos de biblioteca. Consulte a documentação de preparação de amostra para seu kit de preparação de amostras, bem como o *Guia de referência rápida da planilha de amostras (documento n.º 15028392)*.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

Verifique se os seguintes materiais de consumo fornecidos pelo usuário estão disponíveis antes do início de uma execução.

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
1.0 N NaOH, grau de biologia molecular	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Desnaturação de bibliotecas de amostra e DNA de controle de PhiX
Compressa com álcool isopropílico 70% ou etílico 70%	VWR, n.º do catálogo 95041-714* Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza do suporte da lâmina de fluxo
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral
Lenço para laboratório com poucos fiapos	VWR, n.º do catálogo 21905-026*	Limpeza do estágio da lâmina de fluxo e do selo de alumínio que cobre o reservatório de carregamento das amostras
Papel para limpeza de lente, 4 x 6 pol.	VWR, n.º do catálogo 52846-001*	Limpeza da lâmina de fluxo

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
Tubos de microcentrífuga	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Desnaturação e diluição de bibliotecas de amostras e DNA de controle de PhiX
Tubos MiSeq	Illumina, peça n.º MS-102-9999	Limpeza da linha de modelo, para uso com o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS (opcional para outros fluxos de trabalho)
NaOCl, 5%	Sigma-Aldrich, n.º do catálogo 239305*	Limpeza da linha de modelo, para uso com o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS (opcional para outros fluxos de trabalho)
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º do catálogo P7949	Limpeza do instrumento
Pinças plásticas com ponta quadrada (opcional)	McMaster-Carr, n.º do catálogo 7003A22*	Remoção da lâmina de fluxo do receptáculo de transporte da lâmina de fluxo
Água aprovada para uso em laboratório	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Limpeza do instrumento

* ou equivalente à aprovada para uso em laboratório

Orientações para água aprovada para uso em laboratório

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

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

Capítulo 3 Sequenciamento

Introdução	17
Duração da execução	17
Fluxo de trabalho do MiSeq	18
Descongelar o cartucho de reagente	19
Inspecionar o cartucho de reagente	20
Desnaturar e diluir bibliotecas	20
Carregar bibliotecas de amostra	20
Configurar uma execução usando o MCS	21
Limpeza da lâmina de fluxo	23
Carregar a lâmina de fluxo	25
Carregar os reagentes	26
Iniciar a execução	28
Monitorar a execução	29
Realizar uma limpeza após a execução	31

Introdução

Para fazer uma execução de sequenciamento no MiSeq, siga as etapas de configuração descritas neste capítulo.

Há três opções de configuração de execução:

- ▶ Local Run Manager – Selecionar uma execução que tenha sido preparada com o Local Run Manager.
- ▶ Planilha de amostras – Criar uma execução usando uma planilha de amostras. As planilhas de amostras são validadas no Local Run Manager.
- ▶ Manual – Criar uma execução inserindo manualmente até 10 ciclos para cada leitura. Não será realizada nenhuma análise secundária quando esta opção estiver selecionada.

Depois do início da execução, não é necessária qualquer intervenção do usuário.

Use uma das seguintes opções para monitorar a execução de sequenciamento:

- ▶ No instrumento, usando a tela Sequencing (Sequenciamento).
- ▶ Remotamente, usando o Sequencing Analysis Viewer (SAV). Esse aplicativo opcional está disponível para download no site da Illumina.
- ▶ Remotamente, usando o Local Run Manager.

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

Duração da execução

A duração da execução baseia-se no número de ciclos efetuados. Com o MCS v2.3 ou posterior, é possível fazer uma execução de tipo paired-end de até 2 x 301 ciclos de sequenciamento além das leituras de índice. Além disso, a duração da execução baseia-se na versão dos reagentes do MiSeq usados e dos upgrades de melhoria de desempenho instalados no instrumento.

Para obter informações sobre as durações previstas e outras especificações, visite a [página de especificações do sistema MiSeq](#) no site da Illumina.

Número de ciclos em uma leitura

Em uma execução de sequenciamento, o número de ciclos realizados em uma leitura é um ciclo a mais 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 x 301) para um total de 602 ciclos. No final da execução, 2 x 300 ciclos são analisados.

Fluxo de trabalho do MiSeq



Prepare o cartucho de reagente pré-carregado para uso.



Desnature e dilua as bibliotecas (não se aplica a todos os tipos de bibliotecas). Consulte *Preparação das bibliotecas para o sequenciamento no MiSeq* (documento n.º 15039740).



Coloque a mistura da biblioteca no cartucho de reagente no reservatório designado.



Na interface do software, selecione **Sequence** (Sequenciamento) para iniciar as etapas de configuração da execução.



Na tela Sequence Mode Selection (Seleção do modo de sequenciamento), selecione uma opção de configuração de execução: **Local Run Manager**, **Sample Sheet** (Planilha de amostras) ou **Manual**.



[Opcional] Na tela de seleção do Local Run Manager, selecione uma execução.

[Opcional] Conecte-se ao BaseSpace ou ao BaseSpace Onsite.

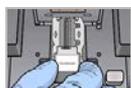


[Opcional] Na tela de seleção de Sample Sheet (Planilha de amostras), navegue para selecionar uma planilha de amostras para a execução.

[Opcional] Conecte-se ao BaseSpace ou ao BaseSpace Onsite.



[Opcional] Na tela do modo Manual, digite os parâmetros da execução. Nenhuma análise secundária está disponível neste modo.



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



Carregue o frasco de PR2 e verifique se o frasco de resíduos está vazio. Carregue o cartucho de reagente.



Revise os parâmetros da execução e os resultados da verificação pré-execução.

Selecione **Start Run** (Iniciar execução).



Monitore sua execução pela interface do MCS ou por outro computador usando o Local Run Manager ou o Sequencing Analysis Viewer (SAV).



Realize uma limpeza após a execução.

Clusterização

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

Sequenciamento

Após a clusterização, são geradas imagens dos clusters com o uso de combinações de filtro e LED específicas para cada um dos quatro didesoxinucleotídeos marcados de forma fluorescente. Quando a geração de imagens de um bloco é concluída, a lâmina de fluxo é movida para o lugar com o objetivo de expor o bloco seguinte. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento. Após a análise das imagens, o software realiza uma identificação de bases, uma filtragem e uma pontuação de qualidade.

Análise

Quando a execução estiver concluída com o Local Run Manager ou o modo de Sample Sheet (Planilha de amostras), o software de análise Local Run Manager é iniciado automaticamente para realizar a análise secundária, que abrange o alinhamento e a identificação de variantes. É possível monitorar a análise secundária usando uma conexão com a Internet de outro computador. Para obter mais informações, consulte *Definir a opção Local Run Manager na página 21*.

Descongelar o cartucho de reagente

Descongele o cartucho de reagente usando banho-maria à temperatura ambiente.



OBSERVAÇÃO

Como alternativa, descongele os reagentes durante a noite armazenando-os em uma temperatura entre 2 °C e 8 °C. Os reagentes ficam estáveis até uma semana quando armazenados nessa temperatura.

- 1 Remova o cartucho de reagente do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
- 2 Coloque o cartucho de reagente em banho-maria contendo uma quantidade suficiente de água desionizada à temperatura ambiente para mergulhar a base do cartucho de reagente. A água não pode ultrapassar a linha de água máxima impressa no cartucho de reagente.

Figura 10 Linha de água máxima



- 3 Deixe o cartucho de reagente descongelar em banho-maria em temperatura ambiente até que esteja completamente descongelado.
 - ▶ Cartuchos MiSeq v3 — Aproximadamente 60 a 90 minutos.
 - ▶ Cartuchos MiSeq v2 — Aproximadamente 60 minutos.
- 4 Retire o cartucho do banho-maria e bata-o levemente na bancada para retirar a água da base do cartucho. Seque a base do cartucho.

Inspecionar o cartucho de reagente

- 1 Inverta o cartucho de reagente dez vezes para misturar os reagentes descongelados e, em seguida, inspecione visualmente se todas as posições estão descongeladas.
- 2 Inspeção os reagentes nas posições 1, 2 e 4 para certificar-se de que eles estão totalmente misturados e sem precipitados.
- 3 Bata o cartucho levemente na bancada para reduzir as bolhas de ar nos reagentes.



OBSERVAÇÃO

Os tubos do aspirador de líquidos do MiSeq vão para o fundo de cada reservatório para aspirar os reagentes; portanto, é importante que os reservatórios não contenham bolhas de ar.

- 4 Coloque o cartucho de reagente no gelo por até seis horas ou reserve entre 2 °C e 8 °C até que você esteja pronto para configurar a execução. Para obter melhores resultados, prossiga diretamente para o carregamento da amostra e a configuração da execução.



ADVERTÊNCIA

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

Desnaturar e diluir bibliotecas

Se for necessário para seu tipo de biblioteca, desnature e dilua as bibliotecas e adicione o controle opcional do PhiX. Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do sistema MiSeq (documento n.º 15039740)*. Se você estiver executando o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS, consulte o *Guia de preparação de bibliotecas do VeriSeq PGS (documento n.º 15052877)*.

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 estiver usando primers personalizados, prepare os primers e configure a planilha de amostras conforme a descrição no *Guia de primers personalizados do MiSeq (documento n.º 15041638)*.

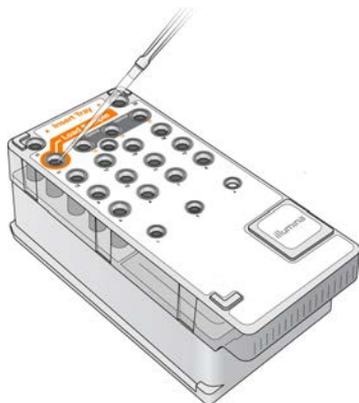
Carregar bibliotecas de amostra

Quando o cartucho de reagente estiver completamente descongelado e pronto para uso, carregue as

bibliotecas preparadas dentro do cartucho.

- 1 Limpe o selo de alumínio que cobre o reservatório denominado **Load Samples** (Carregar amostras) com um lenço para laboratório com poucos fiapos.
- 2 Perfure o selo de alumínio com uma pipeta limpa de 1 ml.
- 3 Pipete 600 µl de bibliotecas preparadas no reservatório **Load Samples** (Carregar amostras). Evite tocar o selo de alumínio.

Figura 11 Carregar bibliotecas



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

Configurar uma execução usando o MCS

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **Reboot** (Reiniciar) para reiniciar o software do sistema.
- 3 **[Opcional]** Na tela Run Options (Opções de execução), verifique os locais de pastas do MiSeqOutput, receitas, planilhas de amostras e manifestos. Para obter mais informações, consulte *Definir locais de pastas padrão na página 15*.

- 4 Na tela Home (Página inicial), selecione **Sequence** (Sequenciamento) para iniciar as etapas de configuração da execução.

Quando você seleciona **Sequence** (Sequenciamento) na tela Home (Página inicial), é aberta uma série de telas de configuração de execução na seguinte ordem: Sequence Mode Selection (Seleção do modo de sequenciamento) (Local Run Manager, Sample Sheet [Planilha de amostras], Manual), BaseSpace Option (Opção BaseSpace), Load Flow Cell (Carregar lâmina de fluxo), Load Reagents (Carregar reagentes), Review (Revisão) e Pre-Run Check (Verificação pré-execução).

Definir a opção Local Run Manager

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Sequence** (Sequenciamento).
- 2 Na tela Sequence Mode Selection (Seleção do modo de sequenciamento), selecione **Local Run Manager**.
- 3 **[Opcional]** Na tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace), selecione **Use BaseSpace™**. Para obter mais informações, consulte *Definir a opção BaseSpace ou BaseSpace Onsite na página 22*.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).

- 5 Selecione um nome de execução na lista de execuções disponíveis.
- 6 [Opcional] Selecione **Preview Samples** (Visualizar amostras) para ver as amostras associadas à análise.
- 7 Selecione **Next** (Avançar) para prosseguir para *Carregar a lâmina de fluxo na página 25*.



OBSERVAÇÃO

Limpe as lâminas de fluxo antes de carregá-las. Para obter mais informações, consulte *Limpeza da lâmina de fluxo na página 23*.

Definir a opção de Planilha de amostras

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Sequence** (Sequenciamento).
- 2 Na tela Sequence Mode Selection (Seleção do modo de sequenciamento), selecione **Sample Sheet** (Planilha de amostras).
- 3 [Opcional] Na tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace), selecione **Use BaseSpace™**. Para obter mais informações, consulte *Definir a opção BaseSpace ou BaseSpace Onsite na página 22*.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).
- 5 Navegue para selecionar seu arquivo de planilha de amostras. O arquivo é enviado ao Local Run Manager para validação ou para criar a execução.
- 6 [Opcional] Selecione **Disable Local Run Manager Secondary Analysis** (Desativar a análise secundária do Local Run Manager) para ignorar a análise secundária do Local Run Manager.
- 7 Resolva eventuais erros em sua planilha de amostras.
- 8 Selecione **Next** (Avançar) para prosseguir para *Carregar a lâmina de fluxo na página 25*.



OBSERVAÇÃO

Limpe as lâminas de fluxo antes de carregá-las. Para obter mais informações, consulte *Limpeza da lâmina de fluxo na página 23*.

Definir a opção BaseSpace ou BaseSpace Onsite

Opcionalmente, faça a análise secundária usando o BaseSpace ou o BaseSpace Onsite.

Se forem selecionados os modos de sequenciamento Local Run Manager ou Sample Sheet (Planilha de amostras), é possível efetuar opcionalmente uma análise secundária usando o BaseSpace ou o BaseSpace Onsite.

- 1 Na tela BaseSpace Options (Opções do BaseSpace), selecione **Use BaseSpace™**. Ao selecionar essa opção, também são armazenados os dados brutos dessa execução no MiSeq.
- 2 Selecione uma das seguintes opções:
 - ▶ **Send all run data to BaseSpace Sequence Hub for remote monitoring and data analysis** (Enviar todos os dados da execução ao BaseSpace Sequence Hub para monitoramento remoto e análise dos dados).
 - ▶ **Only send run information files to BaseSpace Sequence Hub so runs can be monitored remotely** (Enviar apenas os arquivos de informações da execução ao BaseSpace Sequence Hub para que as execuções possam ser monitoradas remotamente).
- 3 Digite as credenciais de sua conta Myllumina.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).

Definir a opção Manual

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Sequence** (Sequenciamento).
- 2 Na tela Sequence Mode Selection (Seleção do modo de sequenciamento), selecione **Manual**.
- 3 [Opcional] Selecione **Use run monitoring only** (Usar apenas monitoramento da execução) e digite suas credenciais Myllumina.



OBSERVAÇÃO

A opção de análise e armazenamento no BaseSpace Sequence Hub não está disponível no modo manual.

- 4 Selecione **Next** (Avançar).
- 5 Defina o Read Type (Tipo de leitura), a Read Length (Duração da leitura) e os Custom Primers (Primers personalizados) de todos os seus ciclos. Insira até 10 ciclos para cada leitura de índice.
- 6 Selecione **Next** (Avançar) para prosseguir para *Carregar a lâmina de fluxo na página 25*.



OBSERVAÇÃO

Limpe as lâminas de fluxo antes de carregá-las. Para obter mais informações, consulte *Limpeza da lâmina de fluxo na página 23*.

Limpeza da lâmina de fluxo

- 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 receptáculo da lâmina de fluxo.

Figura 12 Remoção da lâmina de fluxo



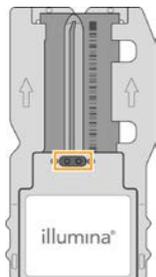
- 3 Enxágue ligeiramente a lâmina de fluxo com água aprovada para uso em laboratório eliminando completamente o excesso de sais do vidro e do cartucho plástico.
O excesso de sais pode afetar o assentamento da lâmina de fluxo no instrumento. Se os sais secarem na área de imagem, esta também poderá ser afetada.

Figura 13 Enxágue da lâmina de fluxo



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

Figura 14 Junta e portas da lâmina de fluxo



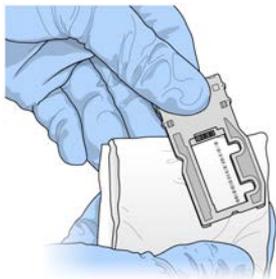
- 5 Limpe o vidro da lâmina de fluxo com uma compressa com álcool. Verifique se há manchas ou impressões digitais no vidro e se há fiapos ou fibras de tecido.



OBSERVAÇÃO

Não use a compressa com álcool na junta da porta da lâmina de fluxo.

Figura 15 Secagem da lâmina de fluxo

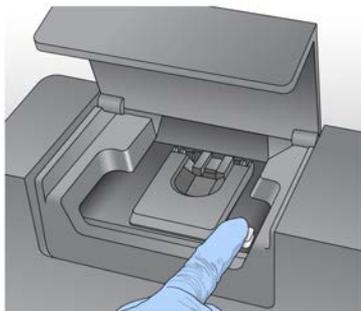


- 6 Seque o álcool em excesso com um pano sem fiapos para limpeza de lentes.
- 7 Certifique-se de que as portas da lâmina de fluxo não tenham obstruções e a junta esteja bem assentada em torno das portas da lâmina de fluxo.
Se a junta parecer estar desalojada, pressione-a suavemente de volta no lugar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

Carregar a lâmina de fluxo

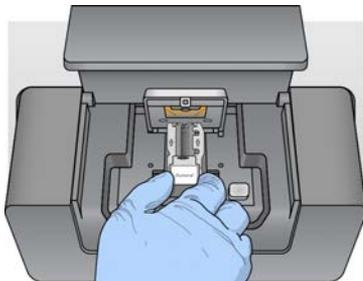
- 1 Levante a porta do compartimento da lâmina de fluxo e depois pressione o botão de liberação à direita da fixação da lâmina de fluxo. A fixação da lâmina de fluxo é aberta.

Figura 16 Abertura da fixação da lâmina de fluxo



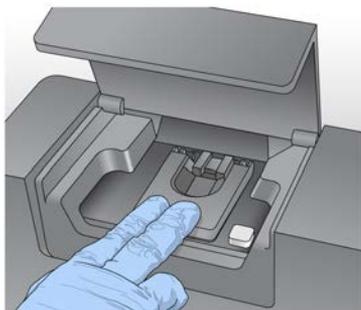
- 2 Certifique-se de que o estágio da lâmina de fluxo não tenha fiapos. Caso haja fiapos ou outros resíduos, limpe o estágio da lâmina de fluxo usando uma compressa com álcool ou um tecido sem fiapos umedecido com etanol ou isopropanol. Limpe cuidadosamente a superfície do estágio da lâmina de fluxo até que ela esteja limpa e seca.
- 3 Segurando a lâmina de fluxo pelas bordas, coloque-a sobre o estágio da lâmina de fluxo.

Figura 17 Colocação da lâmina de fluxo no estágio



- 4 Pressione delicadamente a fixação da lâmina de fluxo para fechá-la sobre a lâmina de fluxo. À medida que a fixação da lâmina de fluxo se fecha, os pinos de alinhamento posicionam a lâmina de fluxo. Um clique audível indica que a fixação da lâmina de fluxo está firme.

Figura 18 Fechamento da fixação da lâmina de fluxo



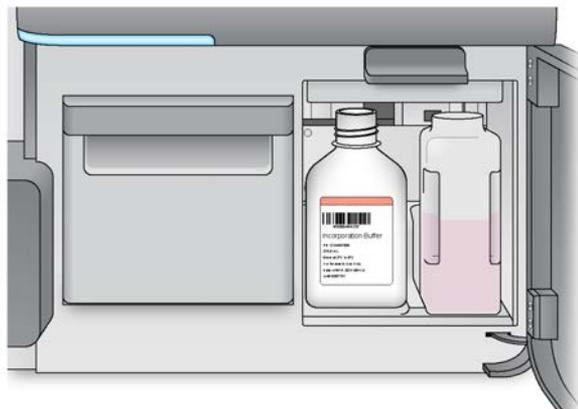
- 5 Se o software não identificar o RFID da lâmina de fluxo, consulte [Resolver a falha de leitura de RFID na página 48](#)
- 6 Feche a porta do compartimento da lâmina de fluxo.
- 7 Selecione **Next** (Avançar).

Carregar os reagentes

Carregar PR2 e verificar o frasco de resíduos

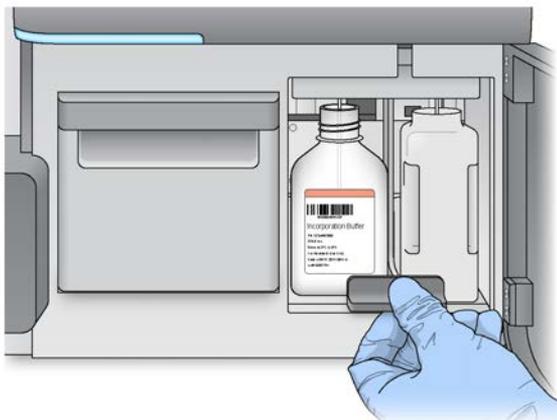
- 1 Remova o frasco do PR2 do armazenamento de 2 °C a 8 °C. Inverta para misturar e depois remova a tampa.
- 2 Abra a porta do compartimento do reagente.
- 3 Levante a alça do aspirador de líquidos até que ela trave.
- 4 Retire o frasco de limpeza e coloque o frasco do PR2.

Figura 19 Carregar o frasco do PR2



- 5 Esvazie o conteúdo do frasco de resíduos na lixeira adequada.
- 6 Abaixar lentamente a alça do aspirador de líquidos. Os aspiradores de líquido devem descer até os frascos de resíduos e do PR2.

Figura 20 Abaixar a alça do aspirador de líquidos



- 7 Se o software não identificar o RFID do frasco do PR2, consulte *Resolver a falha de leitura de RFID na página 48*.
- 8 Selecione **Next** (Avançar).

Carregar o cartucho de reagente

- 1 Abra a porta do refrigerador de reagentes.



OBSERVAÇÃO

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

- 2 Segure o cartucho de reagente na extremidade que contém o rótulo da Illumina e deslize-o para dentro do refrigerador de reagentes até que o cartucho fique firme.
É preciso usar o cartucho de reagente associado ao tipo da lâmina de fluxo carregado. Se o cartucho de reagente não for compatível, uma mensagem será exibida na tela. Selecione **Back** (Voltar) para carregar o cartucho de reagente apropriado ou **Home** (Página inicial) para voltar à tela Home.

Figura 21 Carregar o cartucho de reagente



- 3 Feche a porta do refrigerador de reagentes.
- 4 Se o software não identificar o RFID do cartucho de reagente, consulte *Resolver a falha de leitura de RFID na página 48*.

- 5 Se o cartucho de reagente não for compatível com a lâmina de fluxo, uma mensagem será exibida. Selecione **Back** (Voltar) para carregar um cartucho compatível ou **Exit** (Sair) para retornar à tela Home (Página inicial).
- 6 Feche a porta do compartimento do reagente.
- 7 Selecione **Next** (Avançar).

Iniciar a 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.



OBSERVAÇÃO

A execução será iniciada automaticamente se a opção **Start run after pre-run check** (Iniciar execução após a verificação pré-execução) estiver selecionada em Run Settings (Configurações da execução). Para obter mais informações, consulte [Personalizar configurações do sistema na página 13](#).

Revisar os parâmetros de execução

- 1 Revise Experiment Name (Nome do experimento), Module Name (Nome do módulo), Read Type (Tipo de leitura), Read Length (Duração da leitura) e Custom Primers (Primers personalizados). Esses parâmetros são especificados na planilha de amostras.
- 2 [Opcional] Quando estiver no Local Run Manager ou no modo Manual, selecione **Edit** (Editar) para fazer alterações em Read Type (Tipo de leitura), Read Length (Duração da leitura) ou Custom Primers (Primers personalizados) e depois selecione **Save** (Salvar).



OBSERVAÇÃO

As alterações nos índices devem ser feitas na planilha de amostras. Quando estiver no modo Sample Sheet (Planilha de amostras), as alterações devem ser feitas na planilha de amostras original e depois esta deve ser recarregada.

- 3 Selecione **Change Folder** (Alterar pasta) para revisar os locais de pastas.
- 4 Modifique conforme necessário e depois selecione **Save and Continue** (Salvar e continuar).
- 5 Selecione **Next** (Avançar).

Alteração de pastas

Para alterar os locais das pastas, selecione **Change Folders** (Alterar pastas) e navegue até o local de sua preferência. O uso dessa opção na tela Review (Revisão) altera os locais de pastas de todas as execuções subsequentes.

Analisar a verificação antes da 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, é exibida na tela uma mensagem com instruções sobre como corrigir o erro. Para obter mais informações, consulte [Resolver os erros de configuração da execução na página 48](#).

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 nem as portas do compartimento do reagente, nem toque no monitor do instrumento, exceto para pausar a execução. Para obter mais informações, consulte *Pausar uma execução* na página 47.



ADVERTÊNCIA

Assegure-se de fechar todos os arquivos no MiSeq antes de iniciar uma execução e não os abra durante a execução.

Monitorar a execução

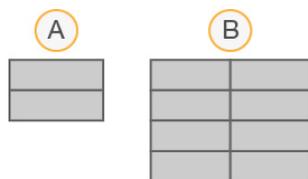
Durante uma execução, monitore os detalhes desta usando a tela Sequencing (Sequenciamento) no instrumento. A tela Sequencing (Sequenciamento) é somente para exibição.

Outras opções para monitorar uma execução são:

- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV) instalado em um computador independente do computador do instrumento. É necessária uma conexão de rede. Para obter mais informações, consulte *Sequencing Analysis Viewer* na página 8. De modo alternativo, se estiver conectado ao BaseSpace, a execução poderá ser monitorada com o SAV no BaseSpace.
 - ▶ Local Run Manager para monitorar a execução remotamente se o instrumento estiver conectado à mesma rede. O Local Run Manager mostra o progresso da execução e as informações do sequenciamento (Total de clusters, % Clusters PF, Leitura 1 e Leitura 2 %>= Q30 e Último ciclo pontuado). Para obter mais informações, consulte *Software Local Run Manager* na página 8.
- 1 Na tela Sequencing (Sequenciamento) do instrumento, monitore o progresso da execução, intensidades e pontuações de qualidade.
- ▶ **Run Progress** (Andamento da execução) — Mostra o andamento da execução em uma barra de status e relaciona o número de ciclos concluídos.
 - ▶ **Intensity** (Intensidade) — Mostra o valor das intensidades de clusters do 90^o 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, será exibido um gráfico com uma coluna.
- ▶ Se a imagem da lâmina de fluxo for criada nas superfícies superior e inferior, será exibido um gráfico com duas colunas.



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

- ▶ **Q-Score All Cycles** (Q-Score de todos os ciclos) — Mostra a percentagem 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 identificação de bases errada. As Q-scores são calculadas após o ciclo 25.

Q-Score	Probabilidade de identificação de bases errada
Q40	1 em 10.000
Q30	1 em 1.000
Q20	1 em 100
Q10	1 em 10

- ▶ **Cluster Density (K/mm²)** (Densidade de cluster) — Mostra o número de cluster por milímetro quadrado para a execução.
- ▶ **Clusters Passing Filter (%)** (Filtro de passagem de clusters) — Mostra a percentagem de clusters que passam pelo filtro com base no filtro de pureza da Illumina, que mede a qualidade. Esses dados aparecem apenas após o ciclo 25.



OBSERVAÇÃO

A pureza de uma identificação de bases é o resultado da intensidade do maior sinal dividido pela soma dos dois maiores sinais. Se houver mais de uma identificação de bases com valor de 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 identificadas para a execução, medido em megabases. Esses dados aparecem apenas após o ciclo 25.
- 2 Quando a execução for concluída, será exibido o botão Next (Avançar). Revise os resultados na tela Sequencing (Sequenciamento) antes de prosseguir.



OBSERVAÇÃO

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

- 3 Selecione **Next** (Avançar) para sair da tela Sequencing (Sequenciamento) e prosseguir para uma limpeza após a execução.

Geração do modelo

Geração do modelo é o processo pelo qual são definidas as posições dos clusters em toda a superfície da lâmina de fluxo de acordo com a posição das coordenadas X e Y. O Real-Time Analysis (RTA) usa os primeiros ciclos de uma execução para a geração de modelos.

Após a geração do modelo das posições dos clusters, 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 do nucleotídeo são extraídas e as identificações de base são produzidas a partir das intensidades normalizadas dos clusters.

Medidas da execução

As medidas de execução são exibidas na tela Sequencing (Sequenciamento), em momentos diferentes de uma execução. Durante as etapas de clusterização, não é exibida nenhuma medida.

Após o início do sequenciamento, as seguintes medidas são exibidas nos ciclos indicados:

Medida	Kit	Ciclo
Intensity (Intensidade)	Kits de reagentes do MiSeq, v3	Ciclos 1 a 7
	Kits de reagentes do MiSeq, v2	Ciclos 1 a 4
	Kits de reagentes do MiSeq, v1	Ciclos 1 a 4
Intensity and Cluster Density (Intensidade e densidade de cluster)	Kits de reagentes do MiSeq, v3	Ciclos 8 a 25
	Kits de reagentes do MiSeq, v2	Ciclos 5 a 25
	Kits de reagentes do MiSeq, v1	Ciclos 5 a 25
Intensity (Intensidade), Cluster Density (Densidade de cluster), % PF, Yield (Rendimento) e Q-scores	Kits de reagentes do MiSeq, v3 Kits de reagentes do MiSeq, v2 Kits de reagentes do MiSeq, v1	Ciclo 26 até a conclusão da execução

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 do RTA

O resultado da análise do RTA de uma execução de sequenciamento é um conjunto de arquivos de identificação de bases avaliados por qualidade (*.bcl), gerados a partir dos arquivos de imagem bruta. Para obter uma lista de arquivos e pastas do RTA, consulte *Pastas e arquivos do RTA na página 55*.

Realizar uma limpeza após a execução

A limpeza após a execução é a limpeza padrão do instrumento realizada entre execuções do sequenciamento. Sempre realize uma limpeza no instrumento depois de completar uma execução. Siga as instruções do programa para carregar os componentes e realizar a limpeza. Cada limpeza após a execução leva aproximadamente 20 minutos.

Comece a limpeza imediatamente após a conclusão de uma execução. É necessário realizar uma lavagem no instrumento para que você possa configurar uma execução posterior. Para realizar uma limpeza após a execução em um momento que não seja imediatamente após esta, use o comando na tela Perform Wash (Realizar limpeza) para iniciar a limpeza.



OBSERVAÇÃO

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

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

- ▶ Removendo os reagentes remanescentes das linhas de fluxo de reagentes e dos aspiradores de líquidos.
- ▶ Impedindo o acúmulo de sal e a cristalização nas linhas de fluxo de reagentes e nos aspiradores de líquidos.
- ▶ Impedindo a contaminação cruzada com a execução anterior.

Se você estiver usando o MCS v2.5 ou posterior, terá a opção de realizar uma limpeza após a execução que inclui uma limpeza da linha de modelo com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl). A limpeza leva aproximadamente 30 minutos. Consulte *Procedimento com limpeza da linha de modelo na página 33*.



OBSERVAÇÃO

Se estiver usando o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS, faça limpezas após a execução que incluam uma limpeza da linha de modelo. Consulte *Procedimento com limpeza da linha de modelo na página 33*.

Materiais de consumo

- ▶ Tween 20
- ▶ Água aprovada para uso em laboratório
- ▶ NaOCl (use com uma limpeza após a execução que inclui uma limpeza da linha de modelo)
- ▶ Tubo MiSeq (n.º da peça MS-102-9999) (para limpezas após a execução que incluam uma limpeza da linha de modelo)

Procedimento

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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:
 - 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 software levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.
Não selecione **Perform optional template line wash** (Executar limpeza opcional da linha do modelo) na tela Post-Run wash (Limpeza após a execução). A limpeza da linha de modelo requer um procedimento diferente. Consulte *Procedimento com limpeza da linha de modelo* na página 33.
- 4 Abra a porta do compartimento do reagente, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagente usado do refrigerador.
- 5 Deslize a bandeja de limpeza no refrigerador de reagentes até o fundo e feche a porta do refrigerador de reagentes.
- 6 Levante a alça do aspirador de líquidos na frente do frasco do PR2 e do frasco de resíduos até que ela trave.
- 7 Remova o frasco do PR2 e substitua-o pelo frasco de limpeza.



OBSERVAÇÃO

Descarte o frasco do PR2 após cada execução. Não reutilize qualquer PR2 que sobrar.

- 8 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento do reagente.



ADVERTÊNCIA

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

- 9 Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
- 10 Feche a porta do compartimento do reagente.
- 11 Selecione **Next** (Avançar).

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 de modelo

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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 de NaOCl com água aprovada para uso em laboratório:
 - a Adicione 36 µl de NaOCl a 5% a 864 µl de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em uma diluição 1:25 de NaOCl.
 - b Adicione 50 µl da diluição 1:25 de NaOCl a 950 µl de água aprovada para uso em laboratório em um tubo MiSeq (n.º da peça MS-102-9999).

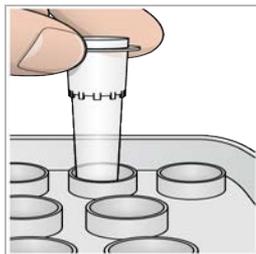


OBSERVAÇÃO

É importante usar a concentração correta de NaOCl. Verifique a porcentagem de NaOCl no rótulo do produto. Se a concentração for alta demais, ela pode provocar uma falha da clusterização nas execuções subsequentes. Se NaOCl a 5% não estiver disponível, faça uma solução de 1 ml de NaOCl a 0,01% em água aprovada para uso em laboratório. **Não** use NaOCl com uma limpeza de manutenção nem com uma limpeza de espera

- 3 Prepare os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca:
 - 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 a solução de limpeza com NaOCl a 0,01% na posição 17 da bandeja de limpeza até que o pescoço do tubo seja lavado com a bandeja. O tubo desloca o Tween 20 e a solução de limpeza com água aprovada para uso em laboratório da posição 17.

Figura 22 Tubo MiSeq na posição 17 da bandeja de limpeza



OBSERVAÇÃO

Insira o tubo MiSeq com NaOCl somente na posição 17 da bandeja. A inserção do tubo em outra posição pode causar falha na clusterização nas próximas execuções, além de poder danificar o sistema de fluxo de reagentes do instrumento MiSeq.

- 5 Quando a execução for concluída, selecione **Start Wash** (Iniciar limpeza). O software levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.
- 6 Selecione **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza opcional da linha de modelo) na tela Post-Run Wash (Limpeza após a execução).
Ao usar o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS, a opção **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza opcional da linha de modelo) já estará selecionada para você. O MCS controla o tipo de limpeza após a execução efetuada após cada execução. Se **Perform optional template line wash** (Realizar limpeza opcional da linha de modelo) não estiver selecionada para a limpeza após a execução, uma mensagem na tela Run Review (Revisão da execução) lembrará você na próxima vez que for iniciada uma execução de sequenciamento.
- 7 Abra a porta do compartimento do reagente, a porta do refrigerador de reagentes e remova o cartucho de reagente 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 do PR2 e do frasco de resíduos até que ela trave.
- 10 Remova o frasco do PR2 e substitua-o pelo frasco de limpeza.



OBSERVAÇÃO

Descarte o frasco do PR2 após cada execução. Não reutilize qualquer 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 do reagente.



ADVERTÊNCIA

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

- 12 Abaixe 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 do reagente.

14 Selecione **Next** (Avançar).

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. 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.

Capítulo 4 Manutenção

Esta seção descreve os procedimentos necessários para a manutenção da integridade do sistema, inclusive a realização de uma limpeza de manutenção e atualização do software. Manter o software de controle atualizado garante que seu sistema tenha as correções de bugs e recursos mais recentes instalados para um desempenho ideal.

Frequência da manutenção

Realize os seguintes procedimentos de manutenção nos intervalos recomendados.



OBSERVAÇÃO

Se executar o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS, certifique-se de seguir as orientações de frequência de manutenção do VeriSeq PGS. Consulte *Frequência de manutenção do fluxo de trabalho do VeriSeq PGS* na página 37.

Tabela 2 Manutenção durante o funcionamento normal

Atividade	Frequência
Post-Run Wash (Limpeza após a execução)	Após cada execução
Maintenance Wash (Limpeza de manutenção)	Mensal
Standby Wash (Limpeza de espera)	Para se preparar para o modo ocioso (se não for utilizado por ≥ 7 dias) e a cada 30 dias, o instrumento permanece inativo
Instrument Shutdown (Desligamento do instrumento)	Conforme necessário

Tabela 3 Manutenção durante o modo ocioso (sem utilização por ≥ 7 dias)

Atividade	Frequência
Standby Wash (Limpeza de espera)	Mensal
Instrument Shutdown (Desligamento do instrumento)	Conforme necessário

Frequência de manutenção do fluxo de trabalho do VeriSeq PGS

Ao executar o fluxo de trabalho do VeriSeq PGS, execute os seguintes procedimentos de manutenção nos intervalos recomendados.

Tabela 4 Manutenção durante o funcionamento normal

Atividade	Frequência
Post-Run Wash (Limpeza após a execução)	Após cada execução
Maintenance Wash (Limpeza de manutenção)	Mensal
Post-Run Wash (Limpeza após a execução), na tela Perform Wash (Realizar limpeza)	Depois do modo ocioso (não utilizado por > 3 dias)

Atividade	Frequência
Standby Wash (Limpeza de espera)	Para se preparar para o modo ocioso (se não for utilizado por ≥ 7 dias) e a cada 30 dias, o instrumento permanece inativo
Instrument Shutdown (Desligamento do instrumento)	Conforme necessário

Tabela 5 Manutenção durante o modo ocioso (sem utilização por ≥ 7 dias)

Atividade	Frequência
Standby Wash (Limpeza de espera)	Mensal
Instrument Shutdown (Desligamento do instrumento)	Conforme necessário

Realizar uma limpeza de manutenção

Realize uma limpeza de manutenção a cada 30 dias para garantir o melhor desempenho.

Cada limpeza de manutenção leva aproximadamente 90 minutos para ser concluída. A limpeza abrange uma série de três etapas de limpeza, que lavam todo o sistema.

É possível configurar seu instrumento para realizar uma limpeza de manutenção entre as execuções. Para obter mais informações, consulte *Personalizar configurações do sistema na página 13*.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, n.º do catálogo P7949)
- ▶ Água aprovada para uso em laboratório

Procedimento

- 1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
- 2 Na tela Home (Página inicial), selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza).
- 3 Na tela Perform Wash (Realizar limpeza), selecione **Perform Maintenance Wash** (Realizar limpeza de manutenção).
O software levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.

Realização da primeira limpeza

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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:
 - 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 do reagente e a porta do refrigerador de reagentes e remova do refrigerador o cartucho de reagente 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 do PR2 até que ela trave e substitua o frasco do PR2 por um frasco de limpeza.



OBSERVAÇÃO

Descarte o frasco do PR2 após cada execução. Não reutilize qualquer PR2 que sobrar.

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

Realização da segunda limpeza

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

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório da seguinte maneira:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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 do reagente.
- 5 Selecione **Next** (Avançar). A segunda limpeza é iniciada.

Realização da limpeza final

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório:

- a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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 novamente os componentes de limpeza com a solução de limpeza fresca:
 - 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:
 - 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 do reagente.
 - 5 Selecione **Next** (Avançar). 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

Se não houver planos de usar o instrumento nos próximos sete dias, prepare o instrumento e as linhas de fluxo de reagentes para ficarem ociosos, fazendo uma limpeza de espera. Faça uma limpeza de espera a cada 30 dias em que o instrumento ficar ocioso.

Cada limpeza de espera leva aproximadamente duas horas para ser concluída. Uma limpeza executa duas limpezas consecutivas que lavam todas as posições dos reagentes remanescentes ou do acúmulo de sal. Cada limpeza leva aproximadamente 60 minutos.

Quando a limpeza de espera estiver concluída, o instrumento entrará no modo de espera e será exibida uma mensagem na tela Home (Página inicial) indicando o status do instrumento. Quando o instrumento estiver no modo de espera, deverá ser executada uma limpeza de manutenção antes do início de uma execução de sequenciamento.

Materiais de consumo fornecidos pelo usuário

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, n.º do catálogo P7949)
- ▶ Água aprovada para uso em laboratório

Procedimento

- 1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
- 2 Na tela Home (Página inicial), selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza).
- 3 Na tela Wash Options (Opções de limpeza), selecione **Perform Standby Wash** (Realizar limpeza de espera).
O software levanta automaticamente os aspiradores de líquidos do refrigerador de reagentes.

Realização da primeira limpeza

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.
 - b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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:
 - 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 do reagente e a porta do refrigerador de reagentes e remova do refrigerador o cartucho de reagente 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 do PR2 até que ela trave e substitua o frasco do PR2 por um frasco de limpeza.



OBSERVAÇÃO

Descarte o frasco do PR2 após cada execução. Não reutilize qualquer PR2 que sobrar.

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

Realização da segunda limpeza

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

- 1 Prepare a solução de limpeza fresca com Tween 20 e água aprovada para uso em laboratório da seguinte maneira:
 - a Adicione 5 ml de Tween 20 a 100% a 45 ml de água aprovada para uso em laboratório. Esses volumes resultam em Tween 20 a 10%.

- b Adicione 25 ml de Tween 20 a 10% a 475 ml de água aprovada para uso em 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 do reagente.
 - 5 Selecione **Next** (Avançar). 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.

Gerenciar arquivos

Selecione Manage Files (Gerenciar arquivos) na tela Home (Página inicial) para mover, fazer upload e excluir arquivos ou renomear planilhas de amostras no computador do instrumento.

Excluir arquivos

- 1 Na guia da tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione **Browse** (Procurar) para navegar até os arquivos que podem ser acessados pelo instrumento.
- 2 Selecione dentre as seguintes opções:
 - ▶ Selecione a caixa de seleção ao lado dos arquivos individuais ou das pastas na lista.
 - ▶ Selecione a caixa de seleção à esquerda do botão Delete (Excluir) para excluir todos os arquivos e todas as pastas da lista. Essa opção está disponível para execuções, planilhas de amostras, manifestos, genomas e receitas.
- 3 Selecione **Delete** (Excluir).



OBSERVAÇÃO

O comando Delete (Excluir) está disponível em todas as guias, com exceção da guia Bundle Logs (Agrupar registros).

Mover pastas de execução

O comando Move (Mover) *copia* a pasta de execução para o novo local e depois *exclui* a pasta do local anterior.

- 1 Na guia Runs (Execuções), na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione **Browse** (Procurar) para navegar até os arquivos que podem ser acessados pelo instrumento.
- 2 Selecione a caixa de seleção ao lado dos arquivos individuais ou das pastas na lista.
- 3 Selecione **Move** (Mover).
- 4 Selecione **Browse Network** (Procurar rede) e um novo local para os arquivos ou pastas.
- 5 Selecione **OK**.

Fazer upload de arquivos

O comando Upload (Fazer upload) está disponível para planilhas de amostras, manifestos, genomas e receitas. Se o MiSeq não estiver conectado a uma rede, use esse recurso para fazer upload dos arquivos para o computador do instrumento de uma unidade USB.

- 1 Na guia da tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione **Browse** (Procurar) para navegar até os arquivos que podem ser acessados pelo instrumento.
- 2 Selecione **Upload** (Fazer upload).
- 3 Selecione **Browse Network** (Procurar rede) e navegue até a unidade USB na qual se encontra o arquivo.
- 4 Selecione **OK**.
É feito o upload do arquivo para a pasta indicada no campo Directory (Diretório).

Renomear planilhas de amostras

- 1 Na guia Sample Sheets (Planilhas de amostras), na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione as seguintes opções:
 - ▶ Selecione a caixa de seleção ao lado das planilhas de amostras individuais.
 - ▶ Marque a caixa de seleção à esquerda do botão Delete (Excluir) para selecionar todas as planilhas de amostras na lista.
- 2 Selecione **Rename** (Renomear).
- 3 Selecione o ícone do teclado e use o teclado na tela para renomear as planilhas de amostras.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).
- 5 Selecione **Back** (Voltar).

Atualizações de software

Caso seu sistema esteja conectado a uma rede com acesso à Internet, será possível atualizar automaticamente o software do instrumento na tela Home (Página inicial). Você também pode configurar o software para verificar automaticamente se há atualizações do BaseSpace. Para obter mais informações, consulte [Configurar as notificações de atualizações do BaseSpace na página 14](#).

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

Atualizar software automaticamente

Quando houver atualizações disponíveis no software, o botão **Update Available** (Atualização disponível) será exibido na tela Home (Página inicial). Caso contrário, esse botão não estará visível. Assegure-se de que seu MiSeq esteja conectado a uma rede com acesso à Internet para ativar essa opção.

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Update Available** (Atualização disponível).
- 2 Confirme o comando para atualizar na caixa de diálogo.
É necessário reiniciar o instrumento. A instalação da atualização será iniciada automaticamente depois da reinicialização.

Atualizar software manualmente

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

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **Software Update** (Atualização de software).
- 3 Selecione **Browse** (Procurar) para ir até onde está localizado o arquivo instalável da nova versão do software.
- 4 Quando o caminho para o arquivo do software instalável for exibido na tela, selecione **Save and Update** (Salvar e atualizar).
- 5 Confirme o comando para atualizar na caixa de diálogo.
É necessário reiniciar o instrumento. A instalação da atualização será iniciada automaticamente depois da reinicialização.

Desligar o instrumento

É melhor deixar o instrumento ligado em todos os momentos. No entanto, caso seja necessário desligar o instrumento, use o procedimento a seguir para desligar o Windows e preparar as linhas de fluxo de reagentes.

- 1 Realize uma limpeza de manutenção. Para obter mais informações, consulte *Realizar uma limpeza de manutenção na página 38*.
- 2 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento do reagente.
- 3 Feche a porta do compartimento do reagente.
- 4 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 5 Selecione **Shut Down** (Desligar).
Esse comando finaliza o software.
- 6 Coloque o interruptor na posição OFF (Desligado).



OBSERVAÇÃO

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

Apêndice A Resolução de problemas

Introdução	45
Agrupar registros para resolução de problemas	45
Executar uma verificação do sistema	46
Pausar ou interromper uma execução	47
Levantar manualmente os aspiradores de líquidos do cartucho de reagente	48
Resolver os erros de configuração da execução	48
Resolver a falha de leitura de RFID	48
Realizar um teste de volume	49
Medir os volumes de enxágue esperados	50
Resolver erros de temperatura do refrigerador de reagentes	50
Resolver erros de análise do Local Run Manager	50
Definir as configurações do sistema	51

Introdução

Esta seção descreve etapas comuns de resolução de problemas que devem ser observadas antes de entrar em contato com o suporte técnico da Illumina. Para a maioria dos erros, uma mensagem é exibida na tela com instruções para a correção do erro.

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

Para problemas com qualidade ou desempenho da execução, entre em contato com o suporte técnico da Illumina. Para obter mais informações, consulte *Assistência técnica na página 61*.

Os representantes do suporte técnico da Illumina normalmente solicitam cópias de arquivos específicos para a execução para fins de resolução de problemas. Você pode usar a guia Bundle Logs (Agrupar registros), na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), para combinar e compactar os arquivos necessários para a resolução de problemas. Consulte *Agrupar registros para resolução de problemas na página 45*.

Agrupar registros para resolução de problemas

Bundle Logs (Agrupar registros) é um recurso que agrupa os arquivos para os enviá-los ao suporte técnico da Illumina para resolução de problemas. Use a guia Bundle Logs (Agrupar registros) na tela Manage Files (Gerenciar arquivos) para selecionar um grupo de arquivos, denominado *bundle* (pacote). O pacote é compactado automaticamente.

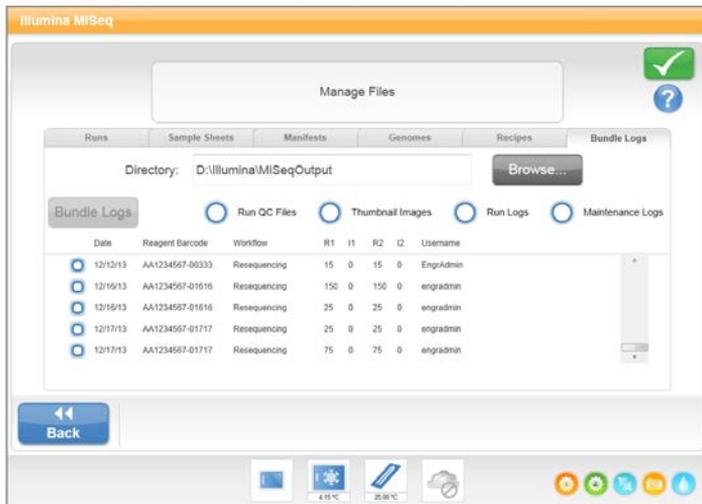
O recurso Bundle Logs (Agrupar registros) agrupa os arquivos de uma execução em um tipo de pacote por vez. Repita o procedimento de Bundle Logs (Agrupar registros) para cada execução e tipo de pacote solicitados pelo suporte técnico da Illumina.

- 1 Na tela Manage Files (Gerenciar arquivos), selecione a guia **Bundle Logs** (Agrupar registros).
- 2 Selecione **Browse** (Procurar) para navegar até a 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 registros).
A tela Bundle Files (Agrupar arquivos) é aberta com informações sobre o pacote e com a lista dos arquivos contidos no pacote.

Para obter mais informações sobre pastas e arquivos do recurso Bundle Logs (Agrupar registros), consulte o *Cartão de referência rápida de pastas de análise e saída do MiSeq (documento n.º 15034791)*.

- 5 Selecione **Next** (Avançar).
- 6 Vá para o local em que você deseja salvar os arquivos compactados do pacote.
- 7 Selecione **Save** (Salvar).
Ao final do agrupamento, a guia Bundle Logs (Agrupar registros) é reaberta.
- 8 Envie o pacote zipado ao suporte técnico da Illumina.

Figura 23 Guia Bundle Logs (Agrupar registros)



Executar uma verificação do sistema

A tela System Check (Verificação do sistema) normalmente é usada para entrar em contato 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 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 de fluxo enquanto as bolhas passam pelos sensores. Para obter mais informações, consulte *Realizar um teste de volume na página 49*.

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Check** (Verificação do sistema).
- 3 Execute uma das seguintes ações:
 - ▶ Selecione os testes individuais que você deseja efetuar.
 - ▶ Escolha **Select All** (Selecionar tudo) para fazer todos os testes.
- 4 Selecione **Next** (Avançar).
Quando concluídos, os resultados dos testes são exibidos na tela.
- 5 **[Opcional]** Selecione **Show Details** (Mostrar detalhes) para ver um resumo dos resultados na interface do software.

- 6 [Opcional] Selecione **Export Results** (Exportar resultados) para exportar os resultados em formato de arquivo *.csv para uma unidade USB.
- 7 Selecione **Done** (Concluído).

Pausar ou interromper uma execução

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

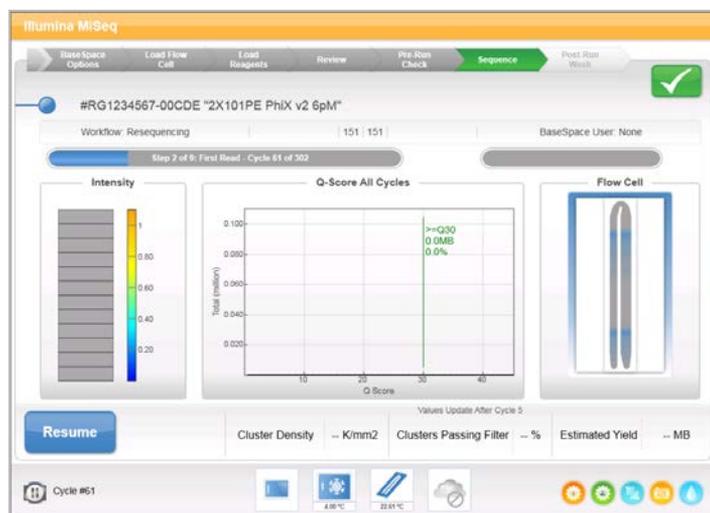
Pausar uma execução

É possível pausar temporariamente uma execução antes que ela seja concluída. Por exemplo, uma execução pode ser pausada se você suspeitar que um frasco de resíduos está cheio. As execuções pausadas podem ser retomadas.

Quando você seleciona **Pause** (Pausar), o comando atual é concluído antes de pausar a execução e colocar a lâmina de fluxo em um estado seguro.

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

Figura 24 Tela de sequenciamento de uma execução em pausa

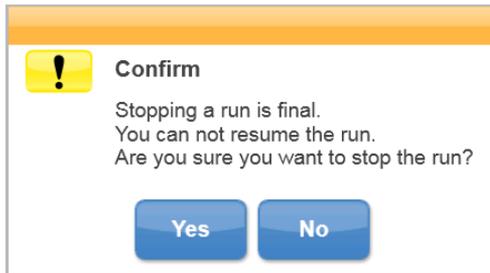


Interromper uma execução

Você pode interromper uma execução durante o sequenciamento antes que a execução seja concluída usando o botão **Stop** (Interromper) 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 o estágio da lâmina de fluxo se movimentará para a frente. O software Real-Time Analysis continua a análise do último ciclo completo.

Figura 25 Interrupção 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.

Levantar manualmente os aspiradores de líquidos do cartucho de reagente

Os aspiradores de líquidos do cartucho de reagente poderão não se levantar automaticamente se uma execução for interrompida inesperadamente ou se ocorrer um erro durante a execução. Para remover o cartucho de reagente, eleve os aspiradores de líquidos do cartucho de reagente manualmente.

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Perform Wash** (Realizar limpeza).
- 2 Selecione **Raise Sippers** (Elevar aspiradores).
- 3 Remova o cartucho de reagente.

Resolver os erros de configuração da execução

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

Erro	Ação
X Free Disk Space (Espaço livre em disco)	Se houver pouco espaço em disco, uma mensagem será exibida indicando quanto espaço em disco é necessário. Use o recurso Manage Files (Gerenciar arquivos) para liberar o espaço necessário no computador do instrumento.
X Network Connection Active (Conexão de rede ativa)	Verifique se o cabo de rede está conectado ao instrumento. Se a conexão de rede não for restaurada, selecione Reboot (Reiniciar) na tela Manage Instrument (Gerenciar instrumento) para reiniciar o software. 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 software.
X Primary Analysis Ready (Análise primária pronta)	A análise primária da execução anterior não está completa. O tempo padrão para que a análise primária seja completada é de uma hora e uma contagem regressiva é exibida na tela. As opções são esperar uma hora ou selecionar Terminate Analysis (Finalizar análise). Isso interrompe a análise secundária dos eventuais ciclos incompletos.

Resolver a falha de leitura de RFID

Se o sistema não puder ler o 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 Sempre repita a leitura do RFID antes de prosseguir. Se o RFID falhar pela segunda vez, selecione **Enter Code** (Digitar código).

- 2 Em um computador com acesso à Internet, acesse my.illumina.com e selecione **Sign In** (Registrar-se) na barra de ferramentas no topo da página.
- 3 Faça login em sua conta Myllumina.
Seu nome substitui o botão Sign In (Registrar-se) na barra de ferramentas.
- 4 Passe o mouse sobre seu nome e selecione **Account** (Conta). Na coluna **My Tools** (Minhas ferramentas), clique em **MiSeq Self-Service** (Autosserviço do MiSeq).
- 5 Na página MiSeq Self-Service (Autosserviço do MiSeq), digite o **número de série do MiSeq**.
- 6 Na lista suspensa Type of Override Code (Tipo de código de substituição), selecione **RFID Override** (Substituição de RFID).
- 7 Para gerar o código, selecione **Get Code** (Obter código).
- 8 Volte à interface do MCS e selecione **Enter Code** (Digitar código).
- 9 Digite o código de desvio temporário usando o teclado da tela e depois selecione **Next** (Avançar).
- 10 Digite o número do código de barras da lâmina de fluxo, frasco de PR2 ou cartucho de reagente.

Material de consumo	Local do número do código de barras
Lâmina de fluxo	Acima do código de barras no rótulo do receptáculo 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 na etiqueta do frasco de PR2. Exemplo: MS0011881-PR2
Cartucho de reagente	Abaixo do código de barras no rótulo do cartucho de reagente. Exemplo: MS0010744-300

- 11 Se você estiver inserindo um código de desvio para o cartucho de reagente, 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 reagente e o número da versão do kit.



CUIDADO

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

- 12 Selecione **Enter**.

Realizar um teste de volume

Uma obstrução nas linhas de fluxo de reagentes pode causar uma fraca distribuição de reagente e 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 ao estimar o volume entre as bolhas que passam pelos sensores. Para executar um teste de volume, a bandeja e o frasco de limpeza devem ser carregados com água aprovada para uso em laboratório e deve ser colocada no lugar uma lâmina de fluxo usada. Siga as instruções na tela para executar o teste.

- 1 Verifique se uma lâmina de fluxo usada está carregada no instrumento.
- 2 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 3 Selecione **System Check** (Verificação do sistema).

- 4 Selecione **Conduct Volume Test** (Realizar teste de volume) e depois **Next** (Avançar).
- 5 Encha cada reservatório da bandeja de limpeza com 6 ml de água aprovada para uso em laboratório.
- 6 Encha o frasco de limpeza de 500 ml com 350 ml de água aprovada para uso em laboratório.
- 7 Carregue a bandeja e o frasco de limpeza no instrumento.
 - a Abra a porta do compartimento do reagente 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 Remova o frasco de resíduos e descarte o conteúdo de forma apropriada. Coloque o frasco de resíduos de volta no compartimento do reagente.
 - c Abaixe lentamente a alça do aspirador de líquidos, deixando que o aspirador desça até os frascos de limpeza e de resíduos.
- 8 Selecione **Next** (Avançar).
Quando o teste de volume estiver concluído, os resultados serão exibidos na tela.
Se não passar no teste, realize uma limpeza de manutenção. Consulte *Realizar uma limpeza de manutenção na página 38*.
- 9 Quando for concluída a limpeza de manutenção, repita o teste de volume.

Medir os volumes de enxágue esperados

A medição de 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 enxágue no frasco de resíduos.

Tipo de limpeza	Volume de enxágue esperado
Post Run Wash (Limpeza após a execução)	17,25 ml
Post Run Wash (Limpeza após a execução), que inclui uma limpeza da linha de modelo	25,5 ml
Standby Wash (Limpeza de espera)	46 ml
Maintenance Wash (Limpeza de manutenção)	51,75 ml

Resolver erros de temperatura do refrigerador de reagentes

A faixa obrigatória de temperatura do refrigerador de reagentes é de 2 °C a 11 °C. Um indicador de sensor mostra a temperatura do refrigerador de reagentes. Consulte *Indicadores de sensor na página 6*.

Se você receber uma mensagem de erro de que o refrigerador não está na faixa especificada de temperatura, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Para obter mais informações sobre o refrigerador de reagentes, consulte *Compartimento do reagente na página 4*.

Resolver erros de análise do Local Run Manager

Para obter informações de resolução de problemas relacionadas a erros de análise, consulte o *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)*. Contém instruções para recolocar a análise na fila.

Definir as configurações do sistema

O MCS inclui várias telas que acessam comandos para configurar o sistema. Normalmente, as configurações de software são definidas durante a instalação do MiSeq.

Definir as configurações de IP e DNS

Configure o endereço IP e o endereço do servidor DNS, se for necessário, devido a uma alteração na rede ou na instalação.

- 1 Na tela Home (Página inicial), selecione **Manage Instrument** (Gerenciar instrumento).
- 2 Selecione **System Settings** (Configurações do sistema).
 - ▶ Selecione **Obtain an IP address automatically** (Obter um endereço IP automaticamente) ou **Use the following IP address** (Usar o seguinte endereço IP).
Se você selecionar **Use the following IP address** (Usar o seguinte endereço IP), insira um endereço IP, a máscara de sub-rede e o gateway padrão.
 - ▶ Selecione **Obtain DNS address automatically** (Obter um endereço de DNS automaticamente) ou **Use the following DNS server addresses** (Usar os seguintes endereços de servidor DNS).
Se você selecionar **Use the following DNS server addresses** (Usar os seguintes endereços de servidor DNS), digite um endereço de servidor DNS preferencial e alternativo.
- 3 Selecione **Save and Continue** (Salvar e continuar).

Apêndice B Pastas e arquivos de saída

Pastas de execução	53
Conteúdo da pasta MiSeqOutput	53
Pastas e arquivos do RTA	55

Pastas de execução

Cada execução efetuada no MiSeq gera 3 pastas de execução, cada uma com uma finalidade específica:

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp** — Quando se inicia a execução, é criada uma pasta temporária de execução 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. Consulte *Pastas e arquivos do RTA na página 55*.
- ▶ 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 *Definir locais de pastas padrão na página 15*.
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis** — Quando a análise do RTA é concluída, o Local Run Analysis acessa a pasta MiSeqAnalysis no disco local do instrumento para começar a análise secundária. Todos os arquivos gravados na pasta MiSeqAnalysis são copiados novamente na pasta MiSeqOutput. Para obter mais informações, consulte *Conteúdo da pasta MiSeqOutput na página 53*.

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.

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

AAMMDD_<Número do Instrumento>_<Número da execução>_<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

Quando o RTA concluir a análise, a pasta MiSeqOutput será preenchida com arquivos necessários para a análise secundária. Quando a análise secundária estiver concluída, as pastas MiSeqOutput e MiSeqAnalysis serão idênticas, com exceção da pasta MiSeqOutput, que conterá 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 principal e renomeada para SampleSheet.csv. As cópias são gravadas em Data\Intensities e Data\Intensities\BaseCalls.

- ▶ **runParameters.xml** — Contém um resumo dos parâmetros de execução e informações sobre componentes da execução, como o 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 de análise incluem as seguintes pastas geradas durante a execução de sequenciamento:

- ▶ **<Nome da pasta da execução>\Config** — Contém arquivos de configuração para a execução.
- ▶ **<Nome da pasta da execução>\Data** — Contém as subpastas Intensities (Intensidades), BaseCalls e Alignment (Alinhamento). Os dados gerados a partir do Local Run Manager estão localizados na subpasta Alignment (Alinhamento).
- ▶ **<Nome da pasta da execução>\Data\RTA Logs** — Contém arquivos de registro que descrevem cada etapa realizada pelo RTA para cada leitura.
- ▶ **<Nome da pasta da execução>\Data\Intensities\BaseCalls** — Contém subpastas com arquivos de identificação de bases (*.bcl), arquivos de phasing e matriz. O Local Run Manager grava arquivos FASTQ nessa pasta durante a análise secundária. Para obter mais informações, consulte o *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)*.
- ▶ **<Nome da pasta da execução>\Recipe** — Contém a receita utilizada para a execução.
- ▶ **<Nome da pasta da execução>\Logs** — Contém arquivos de registro que descrevem cada etapa realizada pelo instrumento para cada ciclo.
- ▶ **<Nome da pasta da execução>\InterOp** — Contém arquivos binários usados pelo Sequencing Analysis Viewer (SAV) para resumir várias medidas de análise primária, como a densidade de cluster, 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 nem para a resolução de problemas.

O Local Run Manager acrescenta outras pastas, como a pasta Alignment (Alinhamento), durante a análise secundária. Para obter mais informações, consulte o *Guia do software Local Run Manager (documento n.º 1000000002702)*.

Pastas e arquivos do RTA

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 uma análise secundária, efetuada pelo software Local Run Manager.

Arquivo principal	Subpasta	Descrição
RTAComplete.txt	Pasta principal	Um arquivo marcador gerado quando a análise de identificação de bases é concluída. A presença desse arquivo desencadeia o início da análise secundária.
SampleSheet.csv	Pasta principal	Este arquivo é lido e copiado para a pasta de execução antes desta, e usado mais tarde para a análise secundária.
RunInfo.xml	Pasta principal	Identifica os limites das leituras (incluindo as 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 da base e identificação de bases do RTA para um ciclo e um bloco.
Arquivos *.stats	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	Os arquivos *.stats contêm estatísticas de identificação de bases do RTA para um determinado ciclo/bloco.
Arquivos *.filter	Data\ Intensities\BaseCalls	Os arquivos *.filter contêm resultados de filtro por bloco.
*.txt	Data\RTALogs	Arquivos de registro da análise primária.
Arquivos *.cif	Data\ Intensities\L001\CX.X	Cada arquivo binário *.cif contém resultados da análise de imagem do RTA para um ciclo e um bloco. Para obter mais informações, consulte Numeração de blocos da lâmina de fluxo na página 56 .
Arquivos *.locs	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001	Informa as coordenadas de cluster. Cada arquivo *.locs representa um bloco.
Arquivos *.jpg	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	Imagens em miniatura geradas para cada ciclo e base que podem ser usadas para resolver problemas de uma execução. Esses arquivos são usados para a análise de imagens e não são copiados para a pasta Analysis. Consulte Numeração de blocos da lâmina de fluxo na página 56 para obter os nomes dos arquivos de imagem.

Blocos da lâmina de fluxo

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

Lâmina de fluxo	Kit de reagentes do MiSeq	Blocos	Superfície de imagem	Total de blocos com imagem gerada
Lâmina de fluxo padrão	Kits de reagentes do MiSeq, v3	19 blocos	Superior e inferior	38 blocos no total
Lâmina de fluxo do PGS	Kit de reagentes do MiSeq v3-PGS	19 blocos	Superior e inferior	38 blocos no total
Lâmina de fluxo padrão	Kits de reagentes do MiSeq, v2	14 blocos	Superior e inferior	28 blocos no total

Lâmina de fluxo	Kit de reagentes do MiSeq	Blocos	Superfície de imagem	Total de blocos com imagem gerada
Microlâmina de fluxo	Microkits de reagentes do MiSeq, v2	4 blocos	Superior e inferior	8 blocos no total
Nanolâmina de fluxo	Nanokits de reagentes do MiSeq, v2	2 blocos	Somente superior	2 blocos no total

Quando são feitas imagens dos blocos durante a execução do sequenciamento, um arquivo de saída é gerado para cada bloco. Para obter mais informações, consulte *Numeração de blocos da lâmina de fluxo* na página 56.

Numeração de blocos da lâmina de fluxo

Quando são feitas imagens dos blocos durante a execução de sequenciamento, é gerado um arquivo de saída para cada bloco e nomeado com o número do bloco em um formato de quatro dígitos. Com exceção da nanolâmina de fluxo, são geradas imagens das lâminas de fluxo nas superfícies superior e inferior. Os arquivos de saída de cada bloco estão localizados na pasta de execução em `Data\Intensities\BaseCalls\L001`.

Lâmina de fluxo	Kit de reagentes do MiSeq	Blocos	Superfície de imagem	Nomes de arquivos de imagem
Lâmina de fluxo padrão	Kits de reagentes do MiSeq, v3	1-19	Superior	1101 até 1119
Lâmina de fluxo do PGS		1-19	Inferior	2101 até 2119
Lâmina de fluxo padrão	Kits de reagentes do MiSeq, v2	1-14	Superior	1101 até 1114
		1-14	Inferior	2101 até 2114
Microlâmina de fluxo	Microkits de reagentes do MiSeq, v2	1-4	Superior	1101 até 1104
		1-4	Inferior	2101 até 2104
Nanolâmina de fluxo	Nanokits de reagentes do MiSeq, v2	1-2	Somente superior	1101 até 1102

Índice

A

- advertências 6
- agrupar registros 42-43, 45
- alça do aspirador de líquidos 4
- alertas de e-mail 14
- análise
 - opções 7
- análise secundária 8
- arquivo de manifesto
 - cópia para o instrumento 42
 - definição 4
- arquivos InterOp 5
- assistência técnica 61
- atualização de software 14
- atualização do software 43-44

B

- BaseSpace
 - atualizações 14
 - conexão 6-7
- BaseSpace Onsite
 - conexão 7
 - local do servidor 13

C

- carregamento de reagentes
 - cartucho 27
 - PR2 26
- cartucho de reagente 10
 - conteúdo 11
 - descongelamento 19
 - inspecionar 20
- ciclos em uma leitura 17
- clusterização 18
- compartimento da lâmina de fluxo 2
 - componentes
 - compartimento da lâmina de fluxo 3
- compartimento do reagente 2, 4
- CompletedJobInfo.xml 8
- componentes
 - cartucho de reagente 10
 - compartimento da lâmina de fluxo 2
 - compartimento do reagente 2, 4
 - lâmina de fluxo 9, 55
 - módulo óptico 2
- configurações de rede 51

- configurações do sistema 51
- cópia de arquivos e pastas 42

D

- desativação do instrumento 40
- desligamento do instrumento 44
- documentação 1, 61
- duração da execução 17

E

- endereço IP 51
- erros 6
- espaço em disco
 - verificação 9
- exclusão de arquivos e pastas 42

F

- fixação da lâmina de fluxo 3
- fluxo de reagentes
 - limpeza 38, 40
 - solução de problemas 49
- fluxo de trabalho 18
 - duração da execução 17
- fluxo de trabalho de análise
 - definição 4
- fluxo de trabalho do VeriSeq PGS
 - análise secundária 7
 - frequência de manutenção 37
 - lâmina de fluxo 10
- fluxo de trabalho VeriSeq PGS
 - replicar análise localmente 13
- frasco de resíduos 4

G

- genoma de referência
 - formato do arquivo 4
- geração de modelos 8, 30

I

- ícones
 - indicadores de atividade 6
 - sensores 6
- ícones piscantes 6

- ícones, piscantes 6
- indicadores de atividade 6
- indicadores de sensor 6
- interrupção de uma execução 47

L

- lâmina de fluxo
 - blocos 55
 - cavidade única 8
 - cor da tampa 10
 - designador de letra 48
 - limpeza 23
 - numeração dos blocos 56
 - visão geral 9
- limpeza
 - preparação para estado ocioso 40
- limpeza após a execução 31
- limpeza da linha de modelo 31
- limpeza de espera 41
- limpeza de manutenção 38
- limpezas
 - após a execução 31
 - configurações de limpeza após a execução 13
 - espera 41
 - manutenção 38
 - preparação para desligamento 44
 - vantagem de 31
 - volumes esperados 50
- locais das pastas
 - para a execução atual 28
- locais de pastas
 - configurações padrão 15
- Local Run Manager 1
 - visão geral 8

M

- materiais de consumo 15
 - água aprovada para uso em laboratório 16
- MiSeq Self-Service 48
- módulo óptico 2
- monitoramento da execução 29
- movimentação de arquivos e pastas 42

N

- nome de domínio 51
- numeração dos blocos 56

O

- opções de execução 13-15
- orientações sobre água aprovada para uso em laboratório 16

P

- pacote do software 5
- páginas de suporte 1
- pasta InterOp 54
- pastas da execução
 - arquivos de análise primária 55
 - conteúdo 53
 - definição 4
 - gerenciamento 42
 - nomenclatura 53
 - temp, saída, análise 53
- pausa na execução 47
- planilha de amostras
 - cópia para o instrumento 42
 - definição 4
 - na pasta da execução 55
- PR2, carregamento 26

R

- reagentes
 - em kit 9
- Real-Time Analysis 1, 5
 - geração de modelos 30
 - pasta da execução 53
 - resultados 55
- receitas, gerenciamento 42
- referências do genoma 42
- refrigerador de reagentes, temperatura 6
- resolução de problemas
 - agrupar registros 42-43, 45
 - arquivos específicos para a execução para 45
 - RFID 48
- RFID
 - cartucho de reagente 27
 - PR2 26
 - rastreamento 1
 - resolução de problemas 48
- RTAcomplete.txt 55
- RunInfo.xml 53, 55
- runParameters.xml 53

S

- sensor da porta da lâmina de fluxo 6
- sequenciamento 18
- Sequencing Analysis Viewer 8, 29
- serviço de cópia universal 5
- Serviço de monitoramento Illumina Proactive 14
- software
 - atualização 43-44
 - duração da execução 17
 - verificação de espaço em disco 9
- software BlueFuse Multi 7, 13
- software de controle 5
- solução de problemas
 - fluxo de reagentes 49
- status.xml 55
- suporte ao cliente 61

T

- tamanho da leitura 17
- técnica, ajuda 61
- tela de sequenciamento 29
- telas de configuração da execução 21
- teste de volume 49
- treinamento 1

V

- volumes de limpeza 50

Assistência técnica

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

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

Telefones do suporte ao cliente da Illumina

Região	Ligação gratuita	Regional
América do Norte	+1.800.809.4566	
Alemanha	+49 8001014940	+49 8938035677
Austrália	+1.800.775.688	
Áustria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Cingapura	+1.800.579.2745	
Coreia do Sul	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
Espanha	+34 911899417	+34 800300143
Finlândia	+358 800918363	+358 974790110
França	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Itália	+39 800985513	+39 236003759
Japão	0800.111.5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nova Zelândia	0800.451.650	
Países Baixos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Suécia	+46 850619671	+46 200883979
Suíça	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	00806651752	
Outros países	+44.1799.534000	

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122, EUA

+1 (800) 809-ILMN (4566)

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

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]