

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

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

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20006831 N.º de documento 15069765 v07	Octubre de 2021	Se actualiza la duración máxima del experimento a "Duración del experimento de secuenciación". Se ha actualizado el número de ciclos en una sección "Lectura". Se han reorganizado los pasos en la sección "Preparación de la celda de flujo". Se han incluido cartuchos nuevos y antiguos en el manual. Se han incluido 3 filtros de aire de repuesto en la sección "Sustitución del filtro de aire". Las actualizaciones de la sección "Comprobación del sistema" incluyen las credenciales de LRM.
N.º de material 20006831 N.º de documento 15069765 v06	Junio de 2019	Se ha añadido información de grupo de trabajo para BaseSpace Sequence Hub durante la configuración del experimento. Se ha añadido información de la ruta UNC para la carpeta de resultados. Se han añadido soluciones de problemas para los errores de almacenamiento en red. Se ha aclarado que las direcciones de los filtros de aire son para instrumentos con un filtro accesible desde el panel trasero. Se ha actualizado la ubicación de los archivos de la carpeta raíz a las carpetas específicas del experimento de la carpeta de resultados.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
<p>N.º de material 20006831 N.º de documento 15069765 v05</p>	<p>Diciembre de 2018</p>	<p>Se han actualizado las descripciones de software, pantallas y flujo de trabajo del software de control de NextSeq (NCS) 4.0.</p> <p>Se ha actualizado la siguiente información adicional para NCS 4.0.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se ha añadido información en el software Local Run Manager. • Se ha actualizado la información BaseSpace, que ahora se denomina "BaseSpace Sequence Hub". La ficha Prep (Preparación) de BaseSpace y BaseSpace Onsite ya no están disponibles. • Se han añadido instrucciones sobre la selección de Local Run Manager o el modo de experimento manual. El modo manual sustituye el modo independiente, con algunas modificaciones. • Se ha añadido la opción de comprobar las actualizaciones del software del instrumento en BaseSpace Sequence Hub. • Se han añadido Local Run Manager, el servicio de copia universal y el controlador de acceso directo a la memoria a la descripción del paquete System Suite. Se han retirado BaseSpace Broker y SAV. • El servicio de copia de experimentos es ahora el servicio de copia universal. • Se ha añadido la opción de habilitar fórmulas personalizadas al cargar el cartucho de reactivos. • Se ha retirado la descripción de la celda de flujo cuando se supervisa el progreso del experimento. • Se ha retirado la opción de selección de opción de encendido para el modo de pantalla completa y de Windows. • Se ha añadido MethylationEPIC v1.0 como tipo de BeadChip compatible. • Se han añadido instrucciones de mantenimiento de instrumentos con un filtro de aire. • Se han añadido nuevos iconos para la atención, información y minimización de NCS. • Se han actualizado las instrucciones para la personalización de los ajustes del experimento y los ajustes del sistema. • Se ha actualizado la opción de enviar datos de rendimiento del instrumento. • Se han actualizado los iconos de transferencia de datos. • Se ha aclarado que, en el caso de la adquisición de imágenes, los archivos en cola para la transferencia no tienen límite de tiempo. • Se han corregido las referencias de BSM a "Mecanismo de aspiración del tampón" en la información de las comprobaciones de movimiento. • Se ha añadido información sobre la caducidad de las contraseñas de Windows durante seis meses. <p>Se ha añadido metanol o alcohol isopropílico (99 %) de grado reactivo o espectrofotométrico para el mantenimiento del instrumento.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de material 20006831 N.º de documento 15069765 v04	Mayo de 2018	Se ha añadido asistencia para los reactivos de NextSeq v2.5. Se ha actualizado la información de almacenamiento/envío para los NextSeq v2.5 Reagent Kits que envían celdas de flujo a temperaturas ambiente. Para las celdas de flujo de NextSeq v2.5 se siguen manteniendo las condiciones de almacenamiento previas. Se ha añadido información sobre los NextSeq v2.5 Reagent Kits que requieren las actualizaciones del software a la versión 2.2. Se ha añadido una nota sobre la concentración de carga del kit de rendimiento medio. Se ha añadido una nota sobre el almacenamiento de las celdas de flujo. Se ha añadido una nota en la que se recomienda el uso de celdas de flujo de rendimiento elevado para las comprobaciones del sistema.
N.º de material 20006831 N.º de documento 15069765 v03	Marzo de 2018	Se ha retirado el nombre de usuario y la contraseña predeterminados necesarios para iniciar sesión en el sistema operativo. Illumina recomienda usar credenciales específicas del centro. Se ha añadido información relativa al servicio de supervisión Illumina Proactive en la sección "Selección de configuración de BaseSpace". Se han actualizado las referencias del software RTA v2 a RTA2.
N.º de material 20006831 N.º de documento 15069765 v02	Marzo de 2016	Se ha añadido la sección titulada "Consideraciones sobre el indexado". Se han retirado los pasos para inspeccionar la celda de flujo. Se han especificado la concentración y el volumen de carga en el paso de Carga de bibliotecas en el cartucho de reactivos.
N.º de material 20001843 N.º de documento 15069765 v01	Octubre de 2015	Se ha especificado que un equivalente del proveedor recomendado de NaOCl es un equivalente de laboratorio. Se ha añadido una recomendación para el servicio de mantenimiento preventivo anual. Se ha reorganizado la información de los capítulos "Descripción general" y "Primeros pasos". Se han añadido instrucciones para la personalización de los ajustes del sistema. Se han retirado las instrucciones de Live Help del capítulo de solución de problemas. Esta función se ha retirado del software de control.
N.º de referencia 15069765 Rev. B	Mayo de 2015	Se ha corregido la descripción de los depósitos reservados en el cartucho de reactivos.
N.º de referencia 15069765 Rev. A	Mayo de 2015	Publicación inicial.

Índice

Capítulo 1 Descripción general	1
Introducción	1
Otros recursos	2
NextSeq 550Dx en modo de uso exclusivo en investigación	2
Componentes del instrumento	3
Descripción general de los consumibles de secuenciación	7
Capítulo 2 Primeros pasos	11
Puesta en servicio del instrumento	11
Personalización de los ajustes del sistema	12
Personalización de los ajustes del experimento	13
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario	14
Capítulo 3 Secuenciación	16
Introducción	16
Creación de un experimento con Local Run Manager Software	17
Creación de experimentos con NCS	17
Preparación del cartucho de reactivos	17
Preparación de la celda de flujo	18
Preparación de bibliotecas para la secuenciación	19
Configuración de un experimento de secuenciación	20
Supervisión del progreso del experimento	27
Lavado automático posterior al experimento	28
Capítulo 4 Lectura	30
Introducción	30
Descarga de la carpeta DMAP	31
Carga del BeadChip en el adaptador	32
Configuración de una lectura	32
Supervisión del progreso de lectura	35
Capítulo 5 Mantenimiento	36
Introducción	36
Realización de un lavado manual	36
Sustitución del filtro de aire	39
Actualizaciones de software	40
Apagado del instrumento	42
Apéndice A Resolución de problemas	43
Introducción	43
Archivos de solución de problemas	43
Solución de errores de la comprobación automática	45
El contenedor de reactivos usados está lleno	48

Flujo de trabajo de la rehibridación	48
Errores de lectura y BeadChip	50
Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas	52
Comprobación del sistema	52
Mensaje de error de RAID	55
Error de almacenamiento en red	55
Configuración de ajustes del sistema	55
Apéndice B Análisis en tiempo real	59
Descripción general de Análisis en tiempo real	59
Flujo de trabajo de Análisis en tiempo real	60
Apéndice C Archivos y carpetas de resultados	64
Archivos de resultados de secuenciación	64
Estructura de carpetas de resultados de secuenciación	67
Archivos de resultados de lectura	68
Estructura de carpetas de resultados de lectura	69
Apéndice D Consideraciones sobre el modo de investigación de NextSeq 550Dx	70
Introducción	70
Compatibilidad de los consumibles de NextSeq 550Dx	70
Puesta en servicio de NextSeq 550Dx Instrument	71
Indicadores de modo de NextSeq 550Dx Instrument	72
Opciones de reinicio y apagado de NextSeq 550Dx	72
Índice alfabético	74
Asistencia técnica	78

Capítulo 1 Descripción general

Introducción	1
Otros recursos	2
NextSeq 550Dx en modo de uso exclusivo en investigación	2
Componentes del instrumento	3
Descripción general de los consumibles de secuenciación	7

Introducción

El sistema NextSeq™ 550 de Illumina® es una solución única que proporciona una transición perfecta entre la secuenciación de rendimiento elevado y la lectura de arrays.

Características de la secuenciación

- ▶ **Secuenciación de rendimiento elevado:** NextSeq 550 permite realizar secuenciaciones de exomas, genomas completos y transcriptomas y admite bibliotecas TruSeq™, TruSight™ y Nextera™.
- ▶ **Tipos de celdas de flujo:** las celdas de flujo están disponibles en configuraciones que permiten un rendimiento elevado y medio. Cada tipo de celda de flujo se suministra en un kit con un cartucho de reactivos precargado compatible.
- ▶ **Análisis en tiempo real (RTA, Real-Time Analysis):** el software de análisis integrado lleva a cabo un análisis de datos integrado en el instrumento, que incluye el análisis de imágenes y las llamadas de bases. NextSeq usa una implementación de RTA llamada RTA v2, que incluye diferencias importantes en materia de arquitectura y funciones. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real en la página 59*.
- ▶ **Análisis basado en la nube con BaseSpace™ Sequence Hub:** el flujo de trabajo de secuenciación se encuentra integrado en BaseSpace Sequence Hub, el entorno informático basado en la nube de Illumina para la supervisión de experimentos, el análisis de datos y la colaboración. En el curso del experimento, los archivos de resultados se envían en tiempo real a BaseSpace Sequence Hub para su análisis.
- ▶ **Análisis de datos integrado en el instrumento:** el software Local Run Manager analiza los datos del experimento de acuerdo con el módulo de análisis especificado para el experimento.

Características de la lectura de arrays

- ▶ **Lectura de matrices integrada en software de control:** NextSeq 550 le permite realizar una transición entre la lectura de arrays y la secuenciación de rendimiento elevado en el mismo instrumento y software de control.
- ▶ **Capacidad de adquisición de imágenes ampliada:** el sistema de adquisición de imágenes de NextSeq 550 incorpora modificaciones de platina y de software que permiten adquirir imágenes de una superficie mayor para dar cabida a la lectura de BeadChip.
- ▶ **Tipos de BeadChip:** entre los tipos de BeadChip compatibles, se encuentran CytoSNP-12, CytoSNP-850K, Karyomap-12 y MethylationEPIC v1.0.
- ▶ **Adaptador de BeadChip:** gracias al adaptador reutilizable de BeadChips, cargar un BeadChip en el instrumento es muy sencillo.
- ▶ **Análisis de datos:** use el software BlueFuse® Multi para analizar los datos de arrays.

Otros recursos

La documentación siguiente está disponible para descargar en el sitio web de Illumina.

Recurso	Descripción
<i>Guía de preparación del centro para NextSeq System (n.º de documento 15045113)</i>	Proporciona especificaciones del espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales.
<i>Guía de cumplimiento y seguridad de NextSeq System (n.º de documento 15046564)</i>	Proporciona información sobre las consideraciones de seguridad operativa, las declaraciones de cumplimiento normativo y el etiquetado del instrumento.
<i>Guía del usuario del lector de RFID, n.º de modelo TR-001-44 (n.º de documento 15041950)</i>	Proporciona información sobre el lector de RFID del instrumento, las certificaciones de cumplimiento y las consideraciones de seguridad.
<i>Desnaturalización y dilución de bibliotecas para NextSeq System (n.º de documento 15048776)</i>	Proporciona instrucciones para la desnaturalización y dilución de bibliotecas preparadas para un experimento de secuenciación y la preparación de un control PhiX opcional. Este paso se aplica a la mayoría de los tipos de bibliotecas.
<i>Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de documento 15057456)</i>	Proporciona información sobre el uso de cebadores de secuenciación personalizados en lugar de cebadores de secuenciación de Illumina.
<i>Ayuda de BaseSpace</i>	Proporciona información sobre el uso de BaseSpace™ Sequence Hub y las opciones de análisis disponibles.
<i>Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 1000000009513)</i>	Proporciona una descripción general de los componentes y el software del instrumento, las instrucciones para realizar experimentos de secuenciación y los procedimientos para un mantenimiento y una resolución de problemas del instrumento en NextSeq 550Dx.
<i>Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 1000000002702)</i>	Proporciona una descripción general del software Local Run Manager e instrucciones para el uso de las funciones del software.

Visite la [página del servicio de asistencia de NextSeq 550](#) del sitio web de Illumina para acceder a la documentación, las descargas de software, la formación en línea y las preguntas frecuentes.

NextSeq 550Dx en modo de uso exclusivo en investigación

Las instrucciones en esta guía también se pueden aplicar al instrumento NextSeq 550Dx cuando está en el modo de investigación con la última versión del software del instrumento de RUO. Para ver un resumen sobre las excepciones y otras consideraciones, consulte *Consideraciones sobre el modo de investigación de NextSeq 550Dx* en la página 70.

Componentes del instrumento

El sistema NextSeq 550 cuenta con un monitor con pantalla táctil, una barra de estado y cuatro compartimentos.

Figura 1 Componentes del instrumento



- A **Monitor con pantalla táctil:** permite la configuración integrada en el instrumento y el ajuste mediante el uso de la interfaz del software de control.
- B **Barra de estado:** Indica el estado del instrumento, es decir, si está en funcionamiento (azul), si requiere asistencia (naranja), si está listo para la secuenciación (verde) o si se debe realizar un lavado en las próximas 24 horas (amarillo).
- C **Compartimento de tampones:** alberga el cartucho de tampones y el contenedor de reactivos usados.
- D **Compartimento de reactivos:** alberga el cartucho de reactivos.
- E **Botón de encendido/apagado:** enciende el instrumento y apaga o enciende el ordenador del instrumento.
- F **Compartimento de adquisición de imágenes:** alberga la celda de flujo para la secuenciación o el adaptador de BeadChips para la lectura.
- G **Compartimento del filtro de aire:** sostiene el filtro de aire para instrumentos con un filtro accesible desde el panel trasero.

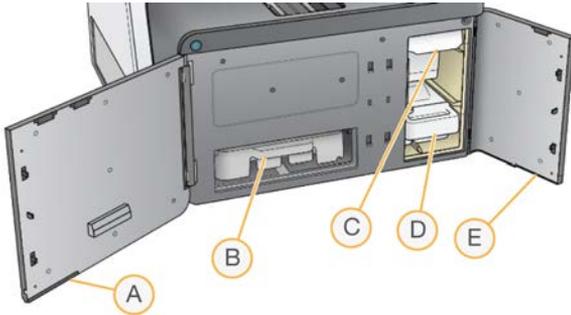
Compartimento de adquisición de imágenes

En el compartimento de adquisición de imágenes, se encuentra la platina, que consta de tres pasadores de alineación para posicionar la celda de flujo para la secuenciación o el adaptador de BeadChips para la lectura. Una vez cargada la celda de flujo o el adaptador de BeadChips, la puerta del compartimento de adquisición imágenes se cierra de forma automática y desplaza los componentes hasta su sitio.

Compartimentos de reactivos y tampones

La configuración de un experimento de secuenciación en NextSeq 550 requiere acceso al compartimento de reactivos y al compartimento de tampones para efectuar la carga de los consumibles del experimento y el vaciado del contenedor de reactivos usados.

Figura 2 Compartimentos de reactivos y tampones



- A **Puerta del compartimento de reactivos:** cierra el compartimento de reactivos con un cierre situado debajo de la esquina inferior derecha de la puerta. El compartimento de reactivos alberga el cartucho de reactivos. Los reactivos se bombean y pasan por los dispensadores y el sistema de fluídica y, a continuación, van a la celda de flujo.
- B **Cartucho de reactivos:** el cartucho de reactivos es un consumible precargado de un solo uso.
- C **Cartucho de tampones:** el cartucho de tampones es un consumible precargado de un solo uso.
- D **Contenedor de reactivos usados:** los reactivos usados se recogen para su desecho después de cada experimento.
- E **Puerta del compartimento de tampones:** cierra el compartimento de tampones con un cierre situado debajo de la esquina inferior izquierda de la puerta.

Compartimento del filtro de aire

El compartimento del filtro de aire sostiene el filtro de aire para instrumentos con un filtro accesible desde el panel trasero. Sustituya el filtro de aire cada 90 días. Para obtener información sobre la sustitución del filtro, consulte [Sustitución del filtro de aire en la página 39](#).

Software de NextSeq

El software del instrumento cuenta con aplicaciones integradas que efectúan experimentos de secuenciación o lecturas de arrays.

- ▶ **Software de control de NextSeq (NCS):** controla el funcionamiento del instrumento y le guía por los pasos de configuración de un experimento de secuenciación o una lectura de arrays.
 - ▶ El software está preinstalado en el NextSeq y se ejecuta integrado en el instrumento. El NCS realiza el experimento de acuerdo con los parámetros especificados en el módulo del software Local Run Manager o en el NCS.
 - ▶ Antes de comenzar el experimento de secuenciación, seleccione un experimento que haya creado con el módulo Local Run Manager o en el NCS. La interfaz del software NCS le guía en los pasos de carga de la celda de flujo y los reactivos.
 - ▶ Durante el experimento, el software pone en funcionamiento la platina de la celda de flujo, dispensa reactivos, controla la fluídica, establece las temperaturas, captura imágenes de los grupos de la celda de flujo y ofrece un resumen visual de las estadísticas de calidad. Puede supervisar el experimento en el NCS o en Local Run Manager.
 - ▶ Durante el experimento, que puede supervisar en el NCS o en Local Run Manager, el NCS realiza las siguientes funciones.
 - ▶ Opera la platina de la celda de flujo
 - ▶ Dispensa los reactivos
 - ▶ Controla la fluídica

- ▶ Establece las temperaturas
- ▶ Captura imágenes de los grupos en la celda de flujo
- ▶ Ofrece un resumen visual de las estadísticas de calidad
- ▶ **Software de Local Run Manager:** solución de software integrada para crear un experimento y analizar los resultados (análisis secundario). El software también realiza un seguimiento de la muestra y controla los permisos de los usuarios.
- ▶ **Software de Análisis en tiempo real (RTA):** en el caso de los experimentos de secuenciación, RTA realiza análisis de imágenes y llamadas de bases durante el experimento. NextSeq 550 usa RTA v2, que incluye diferencias importantes de arquitectura y de funciones con respecto a versiones anteriores. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real en la página 59*.
- ▶ **Servicio de copia universal:** copia los archivos de resultados de secuenciación de la carpeta de experimentos a la carpeta de resultados y a BaseSpace Sequence Hub (si corresponde), donde puede acceder a ellos.

El Análisis en tiempo real (RTA) y el servicio de copia universal solo ejecutan procesos en segundo plano.

Iconos de estado

Un icono de estado situado en la esquina superior derecha de la pantalla de interfaz del software de control indica cualquier cambio de condiciones durante la configuración del experimento o durante el experimento.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado correcto	El sistema está normal.
	Procesando	El sistema está procesando.
	Advertencia	Se ha producido una advertencia. Las advertencias no detienen un experimento ni requieren una acción antes de continuar.
	Error	Se ha producido un error. Los errores precisan una acción antes de continuar con el experimento.
	Atención	Hay una notificación que precisa su atención. Consulte el mensaje para obtener más información.
	Información	Un solo mensaje informativo. No se requieren más acciones.

Cuando se produce un cambio en las condiciones, el icono parpadea para alertarle. Seleccione el icono para visualizar una descripción del estado. Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para aceptar el mensaje y **Close** (Cerrar) para cerrar el cuadro de diálogo.

Icono de la barra de navegación

El icono de minimización de NCS se encuentra en la esquina superior derecha de la interfaz del software de control.

Icono de acceso	Nombre del icono	Descripción
	Minimización de NCS	Seleccione Minimize NCS (Minimización de NCS) para acceder a las aplicaciones y carpetas de Windows.

Botón de encendido

El botón de encendido que se encuentra en la parte delantera del NextSeq enciende la alimentación del instrumento y de su ordenador. El botón de encendido lleva a cabo las siguientes acciones en función del estado de alimentación del instrumento.

Estado de alimentación	Acción
El instrumento está apagado	Pulse brevemente el botón para encender la alimentación.
El instrumento está encendido	Pulse brevemente el botón para apagar la alimentación. Aparece un cuadro de diálogo en la pantalla para confirmar un apagado normal del instrumento.
El instrumento está encendido	Mantenga pulsado el botón de encendido durante 10 segundos para provocar un apagado forzado del instrumento y su ordenador. Use este método para apagar el instrumento solo si no responde.



NOTA

El apagado del instrumento durante un experimento de secuenciación finaliza el experimento de forma inmediata. La finalización de un experimento es definitiva. Los consumibles del experimento no se pueden reutilizar y los datos de secuenciación del experimento no se guardan.

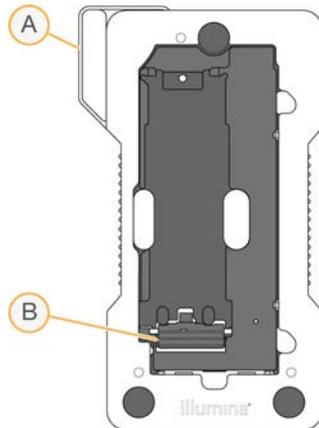
Requisitos de contraseña de Windows

El sistema operativo requiere un cambio de contraseña de Windows cada 180 días. Cuando se le pida, actualice su contraseña de Windows. Si usa Local Run Manager para el análisis, actualice también la contraseña para la cuenta de Windows en Local Run Manager. Consulte la sección Especificación de la configuración de la cuenta de servicio en la *Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 100000002702)*.

Descripción general del adaptador reutilizable de BeadChip

El adaptador reutilizable de BeadChips alberga el BeadChip durante la lectura. El BeadChip se asegura en el estante insertado del adaptador con la pinza de retención. A continuación, el adaptador de BeadChips se carga sobre la platina en el compartimento de adquisición de imágenes.

Figura 3 Adaptador reutilizable de BeadChip



- A Adaptador de BeadChips
- B Pinza de retención

Descripción general de los consumibles de secuenciación

Contenido y almacenamiento

Los consumibles de secuenciación necesarios para ejecutar NextSeq se proporcionan por separado en un kit de un solo uso. Cada kit incluye una celda de flujo, un cartucho de reactivos, un cartucho de tampones y un tampón de dilución de bibliotecas. Cuando reciba NextSeq 500/550 Kit:

- ▶ No abra el embalaje metálico de la celda de flujo hasta que se le indique.
- ▶ Almacene rápidamente los componentes a las temperaturas indicadas para garantizar un rendimiento adecuado.
- ▶ Almacene los cartuchos con las etiquetas de los embalajes orientadas hacia arriba.

Consumible	Cantidad	Temperatura de almacenamiento	Descripción
cartucho de reactivos	1	Entre -25 °C y -15 °C	Contiene reactivos de secuenciación y generación de grupos
cartucho de tampones	1	Entre 15 °C y 30 °C	Contiene solución de lavado y tampón
HT1	1	Entre -25 °C y -15 °C	Tampón de hibridación
celda de flujo	1	Entre 2 °C y 8 °C*	Celda de flujo de un solo uso

* Se envía a temperatura ambiente para los kits de NextSeq v2.5 Reagent.

Los reactivos son fotosensibles. Almacene el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones en un lugar oscuro alejado de la luz.

La celda de flujo, el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones usan la identificación por radiofrecuencia (RFID, Radio-Frequency Identification) para ofrecer precisión en la compatibilidad y el seguimiento de los consumibles.

Todos los demás kits incluyen cebadores de secuenciación de doble índice y NaOCl en el cartucho precargado. No se requieren pasos adicionales.



PRECAUCIÓN

Los kits NextSeq v2.5 Reagent requieren NCS v2.2 o posterior. Asegúrese de que han finalizado las actualizaciones de software antes de preparar las muestras y los consumibles.

Etiquetado de compatibilidad del kit

Los componentes del kit están etiquetados con indicadores codificados por colores que indican la compatibilidad entre las celdas de flujo y los cartuchos de reactivos. Use siempre una celda de flujo y un cartucho de reactivos compatibles. El cartucho de tampones es universal.

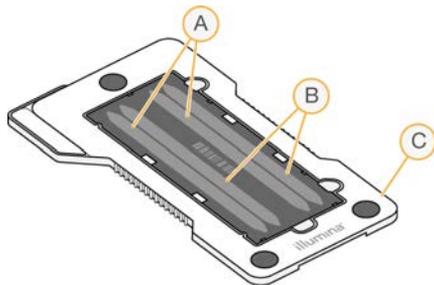
Todas las celdas de flujo y los cartuchos de reactivos vienen etiquetados con **High** (Elevado) o **Mid** (Medio). Compruebe siempre la etiqueta cuando prepare los consumibles para un experimento.

Tipo de kit	Marcado de la etiqueta
Componentes del kit de rendimiento elevado	
Componentes del kit de rendimiento medio	

Existen consideraciones adicionales de compatibilidad para los instrumentos NextSeq 550Dx en modo de investigación. Consulte *Compatibilidad de los consumibles de NextSeq 550Dx en la página 70*.

Descripción general de la celda de flujo

Figura 4 Cartucho de la celda de flujo



- A Par de carriles A: carriles uno y tres
- B Par de carriles B: carriles dos y cuatro
- C Marco del cartucho de la celda de flujo

La celda de flujo es un sustrato elaborado con cristal en el que se generan grupos y se lleva a cabo la reacción de secuenciación. La celda de flujo está revestida por el cartucho de la celda de flujo.

La celda de flujo contiene cuatro carriles y la adquisición de imágenes se realiza de dos en dos.

- ▶ Las imágenes de los carriles uno y tres (par de carriles A) se adquieren al mismo tiempo.
- ▶ Las imágenes de los carriles dos y cuatro (par de carriles B) se adquieren cuando se completa la adquisición de imágenes del par de carriles A.

Aunque la celda de flujo tiene cuatro carriles, en la celda de flujo se secuencian una sola biblioteca o un conjunto de bibliotecas agrupadas solamente. Las bibliotecas se cargan en el cartucho de reactivos en un único depósito y se transfieren automáticamente a la celda de flujo en los cuatro carriles.

Las imágenes de cada carril se adquieren en áreas de adquisición de imágenes pequeñas denominadas placas. Para obtener más información, consulte *Placas de la celda de flujo en la página 65*.

Descripción general del cartucho de reactivos

El cartucho de reactivos es un consumible de un solo uso con seguimiento de RFID y depósitos con cierre metálico precargados con reactivos de generación de grupos y de secuenciación.

Figura 5 Cartucho de reactivos



El cartucho de reactivos incluye un depósito designado para la carga de bibliotecas preparadas. Una vez iniciado el experimento, las bibliotecas se transfieren de forma automática del depósito a la celda de flujo.

Varios depósitos se reservan para el lavado automático posterior al experimento. La solución de lavado se bombea desde el cartucho de tampones hasta los depósitos reservados a través del sistema y, posteriormente, hasta el contenedor de reactivos usados.

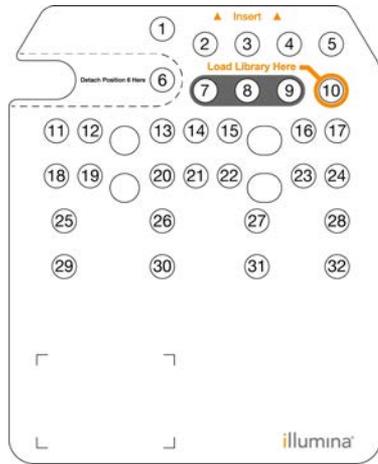


ADVERTENCIA

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

Depósitos reservados

Figura 6 Depósitos numerados



Posición	Descripción
7, 8 y 9	Reservados para cebadores personalizados opcionales
10	Carga de bibliotecas

Para obtener información sobre los cebadores personalizados, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de documento 15057456)*.

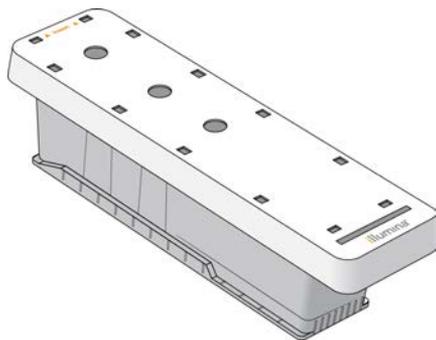
Depósito extraíble de la posición n.º 6

El cartucho de reactivos precargado incluye un reactivo de desnaturalización en la posición 6 que contiene formamida. Para garantizar un desecho seguro de cualquier reactivo no usado tras el experimento de secuenciación, se puede retirar el depósito en la posición seis. Para obtener más información, consulte [Retirada del depósito usado de la posición n.º 6](#) en la página 25.

Descripción general del cartucho de tampones

El cartucho de tampones es un consumible de un solo uso que contiene tres depósitos precargados con tampones y una solución de lavado. El contenido del cartucho de tampones es suficiente para efectuar la secuenciación de una celda de flujo.

Figura 7 Cartucho de tampones



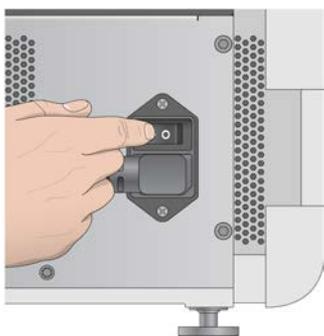
Capítulo 2 Primeros pasos

Puesta en servicio del instrumento	11
Personalización de los ajustes del sistema	12
Personalización de los ajustes del experimento	13
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario	14

Puesta en servicio del instrumento

Coloque el interruptor de encendido principal en la posición I (Encendido).

Figura 8 Interruptor de encendido situado en la parte trasera del instrumento



NOTA

Para iniciar el instrumento NextSeq 550Dx en modo de investigación, consulte *Puesta en servicio de NextSeq 550Dx Instrument* en la página 71.

- 1 Pulse el botón de encendido situado sobre el compartimento de reactivos. El botón de encendido enciende la alimentación del instrumento e inicia el ordenador y el software integrados en él.

Figura 9 Botón de encendido situado en la parte delantera del instrumento



- 2 Espere hasta que el sistema operativo se haya cargado completamente. El software de control de NextSeq (NCS) se carga e inicializa el sistema automáticamente. Una vez finalizada la inicialización, se abre la pantalla Home (Inicio).
- 3 Si su sistema se ha configurado para solicitar credenciales de inicio de sesión, espere a que el sistema se cargue y, a continuación, inicie sesión en el sistema operativo. De ser necesario, póngase en contacto con el administrador de las instalaciones para conocer el nombre de usuario y la contraseña.

Personalización de los ajustes del sistema

El software de control incluye ajustes configurables del sistema para las siguientes opciones. Para cambiar los ajustes de la configuración de red, consulte la sección *Configuración de ajustes del sistema* en la página 55.

- ▶ Personalizar identificación del instrumento (avatar y alias)
- ▶ Establecimiento del indicador de audio y opción de teclado
- ▶ Establecimiento de la opción de fórmulas personalizadas
- ▶ Establecimiento de la comprobación de actualizaciones de software del instrumento desde BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Establecimiento de la opción de envío de datos de rendimiento del instrumento

Personalización de avatar y alias del instrumento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Para asignar la imagen de avatar que desea para su instrumento, seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la imagen.
- 4 En el campo Nickname (Alias), introduzca el nombre del instrumento deseado.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla. La imagen y el nombre aparecen en la esquina superior izquierda de cada pantalla.

Establecimiento del indicador de audio y opción de teclado

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Use on-screen keyboard** (Usar teclado en pantalla) para activar el teclado en pantalla e introducir datos en el instrumento.
- 4 Seleccione la casilla de verificación **Play audio** (Reproducir audio) para activar los indicadores de audio en las siguientes situaciones.
 - ▶ Al inicializar el instrumento
 - ▶ Al iniciar un experimento
 - ▶ Cuando se produzcan determinados errores
 - ▶ Cuando sea necesaria la interacción del usuario
 - ▶ Cuando finalice un experimento
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

Establecimiento de la opción de fórmulas personalizadas

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Enable Custom Recipes** (Habilitar fórmulas personalizadas) para habilitar la selección de una fórmula personalizada cuando se cargue un cartucho de reactivos. Para obtener información adicional, consulte *Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas* en la página 52.
- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

Establecimiento de la comprobación de actualizaciones de software del instrumento desde BaseSpace

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Buscar nuevas actualizaciones de software de BaseSpace automáticamente) para activar las búsquedas automáticas de las actualizaciones de BaseSpace Sequence Hub.
La búsqueda automática de actualizaciones se realiza cada 24 horas. Cuando está disponible una actualización, aparece una notificación en los siguientes lugares.
 - ▶ En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) en el icono de Software Update (Actualización del software).
 - ▶ En el botón Manage Instrument (Administrar instrumento) en la pantalla Home (Inicio).
- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

Establecimiento de la opción de envío de datos de rendimiento del instrumento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la opción **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina) para activar el servicio de supervisión Illumina Proactive. El nombre del ajuste en la interfaz de software puede diferir del nombre que figura en esta guía, en función de la versión del NCS que se esté usando.
Con este ajuste activado, los datos del rendimiento del instrumento se envían a Illumina. Estos datos ayudan a Illumina a solucionar problemas de forma más sencilla y a detectar posibles fallos, lo que permite llevar a cabo tareas de mantenimiento proactivo y maximizar el tiempo de actividad del instrumento. Para obtener más información sobre las ventajas de este servicio, consulte *Nota técnica de Illumina Proactive (n.º de documento 1000000052503)*.
Tenga en cuenta lo siguiente en relación con este servicio:
 - ▶ No envía datos de secuenciación.
 - ▶ Requiere que el instrumento esté conectado a una red con acceso a Internet.
 - ▶ Está activado de manera predeterminada. Para desactivar este servicio, desactive el ajuste **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Enviar datos de rendimiento del instrumento a Illumina).
- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y avanzar a la siguiente pantalla.

Personalización de los ajustes del experimento

El software de control incluye ajustes personalizables para establecer las preferencias de configuración del experimento y para la purga de reactivos no usados.

Establecimiento de las opciones de configuración del experimento

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).

- 3 Seleccione la casilla de verificación **Use Advanced Load Consumables** (Usar consumibles de carga avanzada) para habilitar la opción de cargar todos los consumibles del experimento en una sola pantalla.
- 4 Seleccione la casilla de verificación **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Omitir confirmación de comprobación previa al experimento) para iniciar automáticamente la secuenciación o lectura después de que se lleve a cabo correctamente una comprobación automática.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y salir de la pantalla.

Establecimiento de la opción de purga automática

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Customization** (Personalización del sistema).
- 3 Seleccione la casilla de verificación **Purge Consumables at End of Run** (Purgar consumibles al final del experimento) para purgar los reactivos no usados del cartucho de reactivos y llevarlos al contenedor de reactivos usados de forma automática después de cada experimento.



NOTA

La purga automática de consumibles añade tiempo adicional al flujo de trabajo.

- 4 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar los ajustes y salir de la pantalla.

Consumibles y equipos proporcionados por el usuario

En NextSeq 550, se emplean los siguientes consumibles y equipos.

Consumibles para secuenciación

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOH 1 N (hidróxido sódico)	Proveedor de laboratorio general	Desnaturalización de bibliotecas, dilución a 0,2 N
Paño humedecido en alcohol isopropílico al 70 % o en etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714 (o equivalente) Proveedor de laboratorio general	Limpieza de la celda de flujo y fines generales
Toallita de laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026 (o equivalente)	Limpieza de la celda de flujo

Consumibles para mantenimiento y solución de problemas

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOCl al 5 % (hipoclorito de sodio)	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 239305 (o equivalente de laboratorio)	Lavado del instrumento con el lavado manual posterior al experimento; diluido al 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Lavado del instrumento con las opciones de lavado manual; diluido al 0,05 %
Agua de laboratorio	Proveedor de laboratorio general	Lavado del instrumento (lavado manual)

Consumible	Proveedor	Finalidad
Metanol o alcohol isopropílico de grado reactivo o espectrofotométrico (99 %), botella de 100 ml	Proveedor de laboratorio general	Limpieza periódica de los componentes de la óptica y soporte para el cartucho de limpieza del objetivo
Filtro de aire	Illumina, n.º de catálogo 20022240	Para instrumentos con un filtro de aire accesible desde el panel trasero. Limpieza del aire que el instrumento recibe para refrigerarse.

Guías para el agua de laboratorio

Use siempre agua de laboratorio o agua desionizada para llevar a cabo los procedimientos del instrumento. No use nunca agua corriente. Use solamente los siguientes tipos de agua o equivalentes:

- ▶ Agua desionizada
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Agua de 18 Megohmios (MΩ)
- ▶ Agua Milli-Q
- ▶ Agua Super-Q
- ▶ Agua de biología molecular

Equipo

Elemento	Proveedor	Finalidad
Congelador, entre -25 °C y -15 °C, sin hielo	Proveedor de laboratorio general	Almacenamiento del cartucho
Hielera	Proveedor de laboratorio general	Reserva de las bibliotecas
Refrigerador, entre 2 °C y 8 °C	Proveedor de laboratorio general	Almacenamiento de la celda de flujo

Capítulo 3 Secuenciación

Introducción	16
Creación de un experimento con Local Run Manager Software	17
Creación de experimentos con NCS	17
Preparación del cartucho de reactivos	17
Preparación de la celda de flujo	18
Preparación de bibliotecas para la secuenciación	19
Configuración de un experimento de secuenciación	20
Supervisión del progreso del experimento	27
Lavado automático posterior al experimento	28

Introducción

Para realizar un experimento de secuenciación en NextSeq 550, prepare un cartucho de reactivos y la celda de flujo. A continuación, siga las indicaciones del software para configurar e iniciar el experimento. La generación de grupos y la secuenciación se realizan en el instrumento. Tras el experimento, se inicia un lavado del instrumento de forma automática usando componentes cargados en él.

Generación de grupos

Durante la generación de grupos, las moléculas individuales de ADN se unen a la superficie de la celda de flujo y, a continuación, se amplifican para formar grupos.

Secuenciación

Las imágenes de los grupos se adquieren mediante el uso de química de secuenciación de dos canales y combinaciones de filtro específicas para cada uno de los terminadores de cadena etiquetados con fluorescencia. Tras finalizar la adquisición de imágenes de una placa en la celda de flujo, se procede a la adquisición de imágenes de la placa siguiente. El proceso se repite para cada ciclo de secuenciación. Después del análisis de imágenes, el software ejecuta las llamadas de bases, el filtrado y la puntuación de calidad.

Supervise el progreso del experimento y las estadísticas en las siguientes ubicaciones.

- ▶ La interfaz de NCS
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Local Run Manager
- ▶ Un ordenador conectado a la red mediante el uso del software de Sequencing Analysis Viewer (SAV). Consulte *Sequencing Analysis Viewer* en la página 28.

Análisis

A medida que el experimento avanza, el software de control transfiere de forma automática archivos de llamadas de bases (BCL) a BaseSpace Sequence Hub, Local Run Manager o a otra ubicación de salida especificada para el análisis secundario.

En función de la aplicación, hay varios métodos de análisis disponibles. Para obtener más información, consulte la *Guía de ayuda de BaseSpace* o de *software de Local Run Manager* (n.º de documento 100000002702).

Duración del experimento de secuenciación

La duración del experimento de secuenciación depende del número de ciclos realizados. La duración máxima del experimento es la de un experimento "paired-end" de 150 ciclos por cada lectura (2×150) y, en el caso de las lecturas de índices, de hasta diez ciclos por cada una de ellas, que son dos.

Para obtener más información sobre las duraciones previstas y otras especificaciones del sistema, visite la [página de especificaciones de NextSeq 550](#) en el sitio web de Illumina.

Número de ciclos de una lectura

En un experimento de secuenciación, el número de ciclos realizados en una lectura es un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, un experimento "paired-end" de 150 ciclos realiza dos lecturas de 151 ciclos (2×151) para un total de 302 ciclos. Al final del experimento, se habrán analizado 2×150 ciclos. El ciclo adicional es necesario para los cálculos de fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada.

Creación de un experimento con Local Run Manager Software

El proceso de configuración de los parámetros de experimentos y análisis en Local Run Manager varía dependiendo del módulo de flujo de trabajo de análisis que se use. Consulte la guía del módulo Local Run Manager para obtener instrucciones específicas sobre cómo crear un experimento.

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Edit Runs** (Editar experimentos).
- 2 Seleccione **Create Run** (Crear experimento) en el panel principal de Local Run Manager y seleccione un módulo de análisis.
- 3 Introduzca el nombre del experimento, las muestras del experimento y, si procede, importe los manifiestos.
- 4 Guarde el experimento y cierre la ventana del panel principal de Local Run Manager.

Para crear un experimento en NCS, sin el software Local Run Manager, use el modo de experimento manual. Consulte *Creación de experimentos con NCS* en la página 17 y *Modos de experimento* en la página 20.

Creación de experimentos con NCS

Si crea un experimento con NCS (modo de experimento manual), se introducen los parámetros de experimento y análisis inmediatamente antes de la carga de la celda de flujo.

- 1 Revise los parámetros de experimento y análisis requeridos en *Introduzca los parámetros de experimento y análisis en NCS (Modo de experimento manual)* en la página 22.
- 2 Determine ahora los parámetros de experimento y análisis para que no se produzca ningún retraso al iniciar su experimento de secuenciación.

Preparación del cartucho de reactivos

- 1 Retire el cartucho de reactivos almacenado a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Introdúzcalo en un baño con agua a temperatura ambiente hasta que se descongele (~60 minutos). No sumerja el cartucho.
- 3 Golpéelo ligeramente sobre la mesa para sacar el agua de la base y, a continuación, seque la base.
[Método alternativo] descongele los reactivos durante la noche a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los reactivos necesitan un mínimo de 18 horas para descongelarse. A esta temperatura, los reactivos

permanecen estables hasta una semana.

- 4 Invierta el cartucho cinco veces para mezclar los reactivos.
- 5 Inspeccione las posiciones 29, 30, 31 y 32 para asegurarse de que los reactivos estén descongelados.
- 6 Golpéelo ligeramente sobre la mesa para reducir las burbujas de aire.



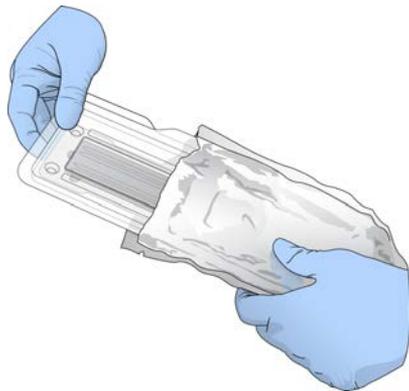
ADVERTENCIA

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

Preparación de la celda de flujo

- 1 Retire un nuevo embalaje de celda de flujo de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 2 Retire la celda de flujo del embalaje de aluminio.

Figura 10 Retirada del embalaje de aluminio



- 3 Deje el embalaje de la celda de flujo desenvuelto a temperatura ambiente durante 30 minutos.



NOTA

Si el embalaje de aluminio está intacto, la celda de flujo puede permanecer a temperatura ambiente hasta 12 horas. Evite el enfriamiento y el calentamiento repetidos de la celda de flujo.

- 4 Abra el estuche del embalaje de plástico transparente y retire la celda de flujo.

Figura 11 Retirada del estuche del embalaje



- 5 Limpie la superficie de cristal de la celda de flujo con un paño sin pelusa humedecido en alcohol. Seque el cristal con una toallita de laboratorio sin pelusa.

Preparación de bibliotecas para la secuenciación

La concentración de carga y el volumen de las bibliotecas varían en función de la versión de NCS que esté usando.

Versión de software de control	Volumen de bibliotecas	Concentración de bibliotecas
NCS v1.3 o posterior	1,3 ml	1,8 pM
NCS v1.2 o anterior	3 ml	3 pM

Desnaturalización y dilución de bibliotecas

Desnaturalice y diluya sus bibliotecas en el siguiente volumen y concentración de carga.

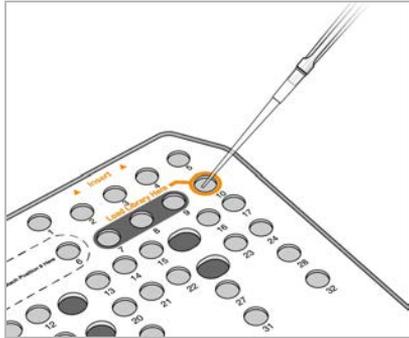
Tipo de kit	Volumen de carga	Concentración de carga
Rendimiento elevado	1,3 ml	1,8 pM
Rendimiento medio	1,3 ml	1,5 pM

En la práctica, la concentración de carga puede variar en función de los métodos de cuantificación y preparación de bibliotecas. Para obtener instrucciones, consulte la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas para NextSeq System (n.º de documento 15048776)*.

Carga de bibliotecas en el cartucho de reactivos

- 1 Limpie el sello metálico que cubre el depósito n.º 10 marcado como **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí) con una toallita sin pelusa.
- 2 Perfore el sello con una punta de pipeta de 1 ml limpia.
- 3 Cargue 1,3 ml de bibliotecas de 1,8 pM preparadas en el depósito n.º 10 marcado como **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí). Evite tocar el sello metálico cuando dispense las bibliotecas.

Figura 12 Carga de bibliotecas



Configuración de un experimento de secuenciación

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Experiment** (Experimento).
- 2 En la pantalla Select Assay (Seleccionar ensayo), seleccione **Sequence** (Secuenciar).
El comando Sequence (Secuenciar) abre la puerta del compartimento de adquisición de imágenes, suelta los consumibles del experimento anterior y abre el conjunto de pantallas de configuración del experimento. Suele producirse un breve retraso.

Modos de experimento

Cuando configure un experimento de secuenciación, seleccione uno de los siguientes modos de experimento para determinar dónde se introduce información del experimento y cómo se analizan los datos.

Modo de experimento	Run Information (Información de experimento)	Análisis de datos*
Local Run Manager	Entre en Local Run Manager.	El software guarda los datos en la carpeta de resultados especificada para analizarlos de forma automática en Local Run Manager.
Manual	Entre en el NCS.	El software guarda los datos en una carpeta de resultados especificada para su posterior análisis fuera del instrumento.

* Con fines analíticos, BaseSpace Sequence Hub puede asociarse con cualquiera de los dos modos de experimento. Cuando el modo de experimento es Local Run Manager y BaseSpace Sequence Hub está configurada, ambas aplicaciones analizan los datos.

Local Run Manager es el modo de experimento predeterminado y proporciona el flujo de trabajo más ágil. Cree y guarde los experimentos en Local Run Manager. A continuación, se envía la información al software de control, donde selecciona un experimento y continúa con la configuración del experimento. Una vez que la secuenciación haya finalizado, Local Run Manager realiza automáticamente el análisis de los datos. No se requieren hojas de muestras ni aplicaciones de análisis independientes.



NOTA

Local Run Manager no es una función del software de control. Se trata de un software integrado para registrar las muestras para secuenciar, especificar los parámetros del experimento y analizar los datos.

BaseSpace Sequence Hub (Opcional)

Cuando configure un experimento de secuenciación, puede seleccionar una de las siguientes opciones de BaseSpace Sequence Hub.

Opción	Descripción y requisitos
Run Monitoring and Storage (Almacenamiento y supervisión del experimento)	Envía archivos InterOp, archivos de registro y datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para su análisis y supervisión remotos. Hace falta una cuenta de BaseSpace Sequence Hub, una conexión a Internet y una hoja de muestras.
Run Monitoring Only (Solo supervisión del experimento)	Envía archivos InterOp y de registro a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota del experimento. Esta opción es la predeterminada. Requiere una cuenta de BaseSpace Sequence Hub y conexión a Internet.

Seleccione Run mode (Modo de experimento) y BaseSpace Sequence Hub

- En la pantalla Run Setup (Configuración del experimento), seleccione uno de los siguientes modos de experimento.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Manual
- [Opcional]** Seleccione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usar ajustes de BaseSpace Sequence Hub) y seleccione uno de los siguientes.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Almacenamiento y supervisión del experimento)
 - ▶ Run Monitoring Only (Solo supervisión del experimento)

Introduzca su nombre de usuario y contraseña de BaseSpace Sequence Hub.

Si se le solicita, seleccione un grupo de trabajo al que cargar datos del experimento. Se le solicitará solo si pertenece a varios grupos de trabajo.
- Seleccione **Next** (Siguiente).

Seleccione Run (Experimento) (Modo de experimento de Local Run Manager)

- Seleccione el nombre de un experimento en la lista de experimentos disponibles. Use las flechas arriba y abajo para desplazarse por la lista o introduzca un nombre de experimento en el campo Search (Buscar).
- Confirme los parámetros del experimento.
 - ▶ **Run Name** (Nombre del experimento): nombre del experimento asignado en Local Run Manager.
 - ▶ **Library ID** (ID de biblioteca): nombre de las bibliotecas agrupadas asignado en Local Run Manager.
 - ▶ **Recipe** (Fórmula): nombre de la fórmula, bien **NextSeq High** (Elevado) o bien **NextSeq Mid** (Medio) en función del cartucho de reactivos usado en el experimento.
 - ▶ **Read Type** (Tipo de lectura): lectura única o “paired-end”.
 - ▶ **Read Length** (Longitud de lectura): número de ciclos de cada lectura.
 - ▶ **[Opcional]** Cebadores personalizados, si corresponde.
- [Opcional]** Seleccione el icono **Edit** (Editar) para cambiar los parámetros de experimento. Cuando termine, seleccione **Save** (Guardar).
 - ▶ **Run parameters** (Parámetros del experimento): cambie el número de lecturas o el número de ciclos por lectura.

- ▶ **Custom primers** (Cebadores personalizados): cambie la configuración de los cebadores personalizados. Para obtener más información, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq* (n.º de documento 15057456).
- ▶ **Purge consumables for this run** (Purgar consumibles para este experimento): cambie el ajuste para purgar los consumibles de forma automática tras el experimento actual.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Introduzca los parámetros de experimento y análisis en NCS (Modo de experimento manual)

- 1 Introduzca el nombre de experimento que desee.
- 2 **[Opcional]** Introduzca el ID de biblioteca que desee.
- 3 En la lista desplegable Recipe (Fórmula), seleccione una fórmula. Solo se muestran las fórmulas compatibles.
- 4 Seleccione un tipo de lectura, **Single Read** (Única) o **Paired-End**.
- 5 Introduzca el número de ciclos de cada lectura en el experimento de secuenciación.
 - ▶ **Read 1** (Lectura 1): introduzca un valor de, como máximo, 151 ciclos.
 - ▶ **Read 2** (Lectura 2): introduzca un valor de, como máximo, 151 ciclos. Este valor suele coincidir con el número de ciclos de la lectura 1.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1): introduzca el número de ciclos necesario para el cebador del índice 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Índice 2): introduzca el número de ciclos necesario para el cebador del índice 2 (i5).

El software de control confirma las entradas con los criterios siguientes:

 - ▶ El número total de ciclos no supera el máximo número permitido de ciclos.
 - ▶ Los ciclos para la lectura 1 son superiores a los 5 ciclos usados para la generación de plantillas.
 - ▶ Los ciclos de la lectura del índice no superan los ciclos de la lectura 1 y la lectura 2.
- 6 **[Opcional]** Si usa cebadores personalizados, seleccione la casilla de verificación para los cebadores usados. Para obtener más información, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq* (n.º de documento 15057456).
 - ▶ **Read 1** (Lectura 1): cebador personalizado para la lectura 1.
 - ▶ **Read 2** (Lectura 2): cebador personalizado para la lectura 2.
 - ▶ **Index 1** (Índice 1): cebador personalizado para el índice 1.
 - ▶ **Index 2** (Índice 2): cebador personalizado para el índice 2.
- 7 Establezca la ubicación de la carpeta de resultados del experimento actual. Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a una ubicación de red.

Para obtener información acerca de los requisitos de la carpeta de resultados, consulte [Configuración de la ubicación de la carpeta de resultados en la página 57](#).
- 8 Seleccione **Browse** (Examinar) para ir hasta la ubicación de una hoja de muestras.

Los sistemas configurados en modo manual con almacenamiento y supervisión del experimento en BaseSpace Sequence Hub requieren la especificación de una hoja de muestras.
- 9 Seleccione **Purge consumables for this run** (Purgar consumibles para este experimento).

El ajuste purga los consumibles automáticamente después del experimento actual.
- 10 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 11 **[Opcional]** Seleccione el icono Edit (Editar) para cambiar los parámetros de experimento.
- 12 Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de la celda de flujo

- 1 Retire la celda de flujo usada de un experimento anterior.
- 2 Alinee la celda de flujo sobre los pasadores de alineación y colóquela en la platina.

Figura 13 Carga de la celda de flujo



- 3 Seleccione **Load** (Cargar).
La puerta se cierra de forma automática, el ID de la celda de flujo aparece en pantalla y se comprueban los sensores.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Vaciado del contenedor de reactivos usados

- 1 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de conformidad con las normativas aplicables.

Figura 14 Retirada del contenedor de reactivos usados



NOTA

Cuando retire el contenedor, coloque la otra mano debajo para sujetarlo.

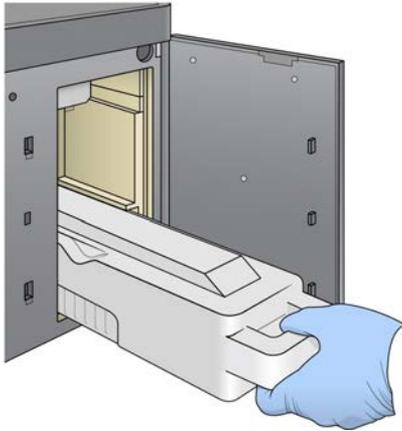


ADVERTENCIA

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

- 2 Deslice el contenedor de reactivos usados vacío dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga. Oirá un clic que indica que el contenedor está colocado.

Figura 15 Carga del contenedor de reactivos usados vacío



Carga del cartucho de tampones

- 1 Retire el cartucho de tampones usado del compartimento superior.
- 2 Deslice un nuevo cartucho de tampones dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga. Oirá un clic que indica que el cartucho está colocado; el ID del cartucho de tampones aparece en la pantalla y se comprueba el sensor.

Figura 16 Carga del cartucho de tampones



- 3 Cierre la puerta del compartimento de tampones y seleccione **Next** (Siguiente).

Carga del cartucho de reactivos

- 1 Retire el cartucho de reactivos usado del compartimento de reactivos. Deseche el contenido no usado de conformidad con las normativas aplicables.



ADVERTENCIA

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

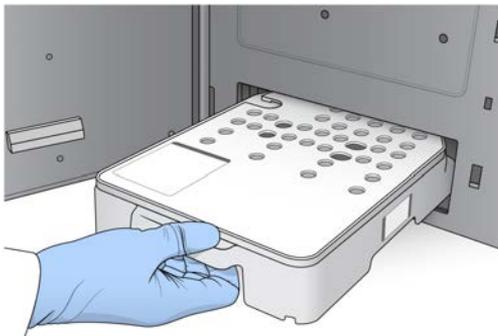


NOTA

Para garantizar un desecho seguro del reactivo no usado, el depósito de la posición 6 es retirable. Para obtener más información, consulte *Retirada del depósito usado de la posición n.º 6* en la página 25.

- 2 Deslice el cartucho de reactivos dentro del compartimento de reactivos hasta que el cartucho se detenga y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de reactivos.

Figura 17 Carga del cartucho de reactivos

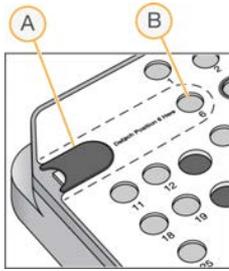


- 3 Seleccione **Load** (Cargar).
El software desplaza el cartucho hasta su sitio de forma automática (tarda unos 30 segundos), el ID del cartucho de reactivos aparece en la pantalla y se comprueban los sensores.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Retirada del depósito usado de la posición n.º 6

- 1 Tras retirar el cartucho de reactivos **usado** del instrumento, retire la cubierta protectora de goma que hay sobre la ranura que se encuentra junto a la posición n.º 6.

Figura 18 Posición n.º 6 extraíble



- A Cubierta protectora de goma
- B Posición n.º 6

- 2 Presione la pestaña de plástico transparente y empuje hacia la izquierda para extraer el depósito.
- 3 Deseche el depósito de conformidad con las normativas aplicables.

Revisión de la comprobación automática

El software ejecuta una comprobación automática del sistema. Durante la comprobación, aparecen en la pantalla los siguientes indicadores:

- ▶ **Marca de verificación gris** : todavía no se ha efectuado la comprobación.
- ▶ **Icono de progreso** : la comprobación está en curso.
- ▶ **Marca de verificación verde** : se ha superado la comprobación.
- ▶ **Cruz roja** : no se ha superado la comprobación. Todos los elementos que no la superen, precisan una acción antes de continuar. Consulte [Solución de errores de la comprobación automática en la página 45](#).

Para detener una comprobación automática en curso, seleccione el icono en la esquina inferior derecha. Para reiniciar la comprobación, seleccione el icono . La comprobación reanuda la primera comprobación incompleta o con error.

Para ver los resultados de cada comprobación dentro de una categoría, seleccione el icono para ampliar la categoría.

NOTA

Cuando lleva a cabo el primer experimento de secuenciación con NCS v4.0 o posterior, es normal que el registro de la celda de flujo dure más de 15 minutos durante la comprobación automatizada del sistema.

Inicio del experimento

Una vez finalizada la comprobación automática, seleccione **Start** (Iniciar). Empieza el experimento de secuenciación.

Para configurar el sistema de modo que el experimento se inicie de forma automática después de comprobar que todo es correcto, consulte [Establecimiento de las opciones de configuración del experimento en la página 13](#).

Supervisión del progreso del experimento

- 1 Supervise el progreso del experimento, las intensidades y las puntuaciones de calidad mientras los datos de medición aparecen en la pantalla.

Figura 19 Progreso y datos de medición del experimento de secuenciación



- A **Run progress** (Progreso del experimento): muestra el paso actual y el número de ciclos completados para cada lectura. La barra de progreso no es proporcional a la velocidad del experimento de cada paso. Use el tiempo restante de la esquina superior derecha para determinar la duración real.
- B **Q-Score** (Puntuación Q): muestra la distribución de las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q). Consulte [Puntuación de calidad en la página 63](#).
- C **Intensity** (Intensidad): muestra el valor de las intensidades de grupos del percentil 90 para cada placa. Los colores del diagrama indican cada base: rojo es A, verde es C, azul es G y negro es T. Los colores coinciden con los indicadores de las bases utilizados en el software de análisis de secuenciación (SAV).
- D **Cluster Density (K/mm²) (Densidad de grupos [K/mm²])**: muestra el número de grupos detectado para el experimento.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Grupos que superan el filtro [%]): muestra el porcentaje de grupos que superan el filtro. Consulte [Grupos que superan el filtro en la página 62](#).
- F **Estimated Yield (Gb)** (Rendimiento estimado [Gb]): muestra el número proyectado de bases para el experimento.



NOTA

Tras seleccionar Home (Inicio), no es posible volver a ver los criterios de medición del experimento. No obstante, puede acceder a los criterios de medición del experimento en BaseSpace Sequence Hub o desde un ordenador independiente mediante el uso de Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Ciclos de criterios de medición del experimento

Los criterios de medición del experimento aparecen en distintos puntos de un experimento.

- ▶ Durante los pasos de generación de grupos, no se mostrarán los criterios de medición.
- ▶ Los primeros cinco ciclos se reservan para generación de plantillas.
- ▶ Los criterios de medición del experimento aparecen tras el ciclo 25, incluida la densidad de grupos, los grupos que superan el filtro, el rendimiento y las puntuaciones de calidad.

Transferencia de datos

En función de la configuración de análisis seleccionada, durante el experimento aparece un icono en la pantalla para indicar el estado de la transferencia de datos.

Estado	Local Run Manager	Carpeta de resultados	Illumina BaseSpace Sequence Hub
Conectado			
Conectado y transfiriendo datos			
Desconectado			
Desactivado			

Si la transferencia de datos se interrumpe durante el experimento, los datos se almacenan temporalmente en el ordenador del instrumento. Al restablecer la conexión, la transferencia de datos se reanuda de manera automática. Si la conexión no se restablece antes de finalizar el experimento, se deben retirar manualmente los datos del ordenador del instrumento para que pueda empezar el siguiente experimento.

Servicio de copia universal

El paquete de NextSeq System Software incluye un servicio de copia universal. RTA v2 solicita al servicio que copie los archivos desde una ubicación de origen hasta una ubicación de destino y el servicio procesa las solicitudes de copia en el orden recibido. Si se produce una excepción, el archivo se vuelve a poner en la cola de copia según el número de archivos que haya en la cola de copia.

Sequencing Analysis Viewer

El software Sequencing Analysis Viewer muestra los criterios de medición generados durante el experimento. Estos datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas según los datos generados por RTA y escritos en los archivos InterOp. Los datos se actualizan conforme avanza el experimento. Seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento para ver los datos actualizados. Para obtener información adicional, consulte la *Guía del usuario de Sequencing Analysis Viewer (SAV)*, n.º de referencia 15020619.

Sequencing Analysis Viewer está incluido en el software instalado en el ordenador del instrumento. También puede instalar Sequencing Analysis Viewer en otro ordenador conectado a la misma red que el instrumento para supervisar de forma remota los criterios de medición del experimento.

Lavado automático posterior al experimento

Al finalizar el experimento de secuenciación, el software inicia un lavado automático posterior al experimento. El lavado posterior al experimento usa la solución de lavado proporcionada en el cartucho de tampones y el NaOCl proporcionado en el cartucho de reactivos.

El lavado automático posterior al experimento dura aproximadamente 90 minutos. Al finalizar el lavado, se activa el botón **Home** (Inicio). Los resultados de secuenciación permanecen visibles en la pantalla durante el lavado.

Después del lavado

Después del lavado, los dispensadores permanecen en la posición bajada para evitar que entre aire en el sistema. Deje los cartuchos en su lugar hasta el próximo experimento.

Capítulo 4 Lectura

Introducción	30
Descarga de la carpeta DMAP	31
Carga del BeadChip en el adaptador	32
Configuración de una lectura	32
Supervisión del progreso de lectura	35

Introducción

Para realizar una lectura en el sistema NextSeq 550, son necesarios los siguientes componentes del experimento:

- ▶ Un BeadChip tintado e hibridizado
- ▶ El adaptador reutilizable del BeadChips
- ▶ Archivos Decode map (DMAP) para el BeadChip que esté usando
- ▶ Un archivo de manifiesto para el BeadChip que esté usando
- ▶ Un archivo de grupos para el BeadChip que esté usando

Los archivos de resultados se generan durante la lectura y, después, se ponen en cola para transferirlos a la carpeta de resultados especificada.

Lleve a cabo el análisis con el software BlueFuse Multi, que precisa que los datos de lectura estén disponibles en el formato de archivo de llamada de genotipo (GTC). De forma predeterminada, el sistema NextSeq 550 genera un archivo de formato GTC con los datos normalizados y las llamadas de genotipo asociadas. Otra opción consiste en configurar el instrumento para que genere archivos de datos de intensidad (IDAT, Intensity Data) adicionales. Para obtener más información, consulte *BeadChip Scan Configuration (Configuración de lectura del BeadChip)* en la página 57.

Decode File Client

La carpeta DMAP contiene información que determina las ubicaciones de las bolas en el BeadChip y cuantifica la señal asociada a cada bola. Una carpeta DMAP es exclusiva para cada código de barras del BeadChip.

La utilidad Decode File Client le permite descargar carpetas DMAP directamente de los servidores de Illumina usando un protocolo HTTP estándar.

Para acceder al Decode File Client, diríjase a la [página del servicio de asistencia de Decode File Client](#) en el sitio web de [Illumina](#). Instale el Decode File Client en un ordenador que tenga acceso a la ubicación de red de la carpeta DMAP.

Para obtener más información, consulte *Descarga de la carpeta DMAP* en la página 31.

Archivos de manifiesto y archivos de grupos

Para cada BeadChip, el software necesita acceder a un archivo de grupos y a uno de manifiesto. Cada archivo de manifiesto y de grupos es único para un tipo de BeadChip. Compruebe que usa archivos de grupos que incluyen NS550 en el nombre del archivo. Estos archivos son compatibles con el sistema NextSeq.

- ▶ **Archivo de manifiesto:** los archivos de manifiesto describen el SNP (Single-Mononucleotide Polymorphism) o contenido de sonda de un BeadChip. Los archivos de manifiesto usan el formato de archivo BPM

- ▶ **Archivos de grupos:** los archivos de grupos describen las posiciones de los grupos para la array de genotipado de Illumina y se emplean cuando se analizan los datos para hacer la llamada de genotipo. Los archivos de grupos usan el formato de archivo EGT.

La ubicación de los archivos se especifica en la pantalla BeadChip Scan Configuration (Configuración de lectura del BeadChip). En la pantalla Home (Inicio) de NCS, seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento), **System Configuration** (Configuración del sistema) y, a continuación, seleccione **BeadChip Scan Configuration** (Configuración de lectura del BeadChip).

Cuando se instala el instrumento NextSeq 550, el representante de Illumina descarga estos archivos y especifica la ruta en el software de control. No es necesario cambiar estos archivos, salvo en el caso de que se produzca una pérdida o de que haya una nueva versión disponible. Para obtener más información, consulte *Sustitución de los archivos de manifiesto y archivos de grupos en la página 52*.

Descarga de la carpeta DMAP

Puede acceder a la carpeta DMAP usando el Decode File Client por la cuenta o por el BeadChip (vista predeterminada).

Acceso a la carpeta DMAP por la cuenta

- 1 En la ficha principal de Decode File Client, seleccione una opción de descarga:
 - ▶ AutoPilot (Piloto automático)
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Todos los BeadChips no descargados aún)
 - ▶ All BeadChips (Todos los BeadChips)
 - ▶ BeadChips by purchase order (BeadChips por orden de compra)
 - ▶ BeadChips by barcode (BeadChips por código de barras)
- 2 Introduzca la información requerida.
- 3 Localice la carpeta DMAP que desea descargar.
- 4 Compruebe que dispone de suficiente espacio libre en el destino de la descarga.
- 5 Inicie la descarga. Visualice el estado de la descarga en la ficha Download Status and Log (Estado y registro de la descarga).
- 6 Guarde la carpeta DMAP en la ubicación de la carpeta DMAP especificada.

Acceso a la carpeta DMAP por el BeadChip

- 1 Identifique los BeadChips usando dos de las siguientes opciones:
 - ▶ BeadChip barcode (Código de barras del BeadChip)
 - ▶ BeadChips box ID (ID de la caja del BeadChip)
 - ▶ Purchase order number (N.º de orden de compra)
 - ▶ Sales order number (N.º de pedido)
- 2 Localice la carpeta DMAP que desea descargar.
- 3 Compruebe que dispone de suficiente espacio libre en el destino de la descarga.
- 4 Inicie la descarga. Visualice el estado de la descarga en la ficha Download Status and Log (Estado y registro de la descarga).
- 5 Guarde la carpeta DMAP en la ubicación de la carpeta DMAP especificada.

Carga del BeadChip en el adaptador

- 1 Presione sobre la pinza de retención del adaptador. La pinza se inclina ligeramente hacia atrás para abrirse.
- 2 Sujutando el BeadChip por los bordes, posicónelo con el código de barras cerca de la pinza de retención y colóquelo en la plataforma empotrada del adaptador.

Figura 20 Carga del BeadChip en el adaptador



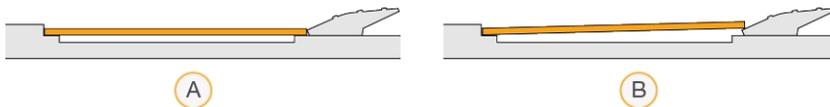
- 3 Mediante las aberturas situadas a cada lado del BeadChip, compruebe que este está colocado en la plataforma empotrada del adaptador.

Figura 21 Colocación y fijación del BeadChip



- 4 Libere con cuidado la pinza de retención para fijar el BeadChip.
- 5 Inspeccione el BeadChip desde un lateral para comprobar que está bien asentado en el adaptador. Si es necesario, vuelva a colocarlo.

Figura 22 Inspección de la posición del BeadChip



- A Posición correcta: el BeadChip se asienta bien en el adaptador al soltar la pinza.
B Posición incorrecta: el BeadChip no se asienta bien en el adaptador al soltar la pinza.

Configuración de una lectura

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Experiment** (Experimento) y, a continuación, **Scan** (Leer).

El comando Scan (Leer) abre la puerta del compartimento de adquisición de imágenes, suelta los consumibles del experimento anterior (si hay) y abre el conjunto de pantallas de configuración de la lectura. Suele producirse un breve retraso.

Descarga de consumibles de secuenciación

Si hay consumibles de secuenciación usados cuando configura una lectura, el software le solicita que descargue el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones para poder proceder con el paso siguiente.

- 1 Si se lo pide, retire los consumibles de secuenciación usados durante el experimento de secuenciación anterior.
 - a Retire el cartucho de reactivos del compartimento de reactivos. Deseche el contenido no usado de conformidad con las normativas aplicables.
 - b Retire el cartucho de tampones usado del compartimento de tampones.



ADVERTENCIA

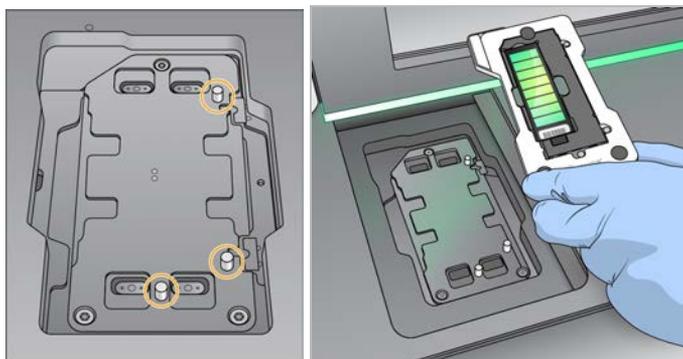
Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Use un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición.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

- 2 Cierre la puerta del compartimento de reactivos y la del compartimento de tampones.

Carga del adaptador de BeadChips

- 1 Use los pasadores de alineación para colocar el adaptador de BeadChips en la platina.

Figura 23 Carga del adaptador de BeadChips



- 2 Seleccione **Load** (Cargar).
La puerta se cierra de forma automática, el ID del BeadChip aparece en pantalla y se comprueban los sensores. Suele producirse un breve retraso. Si no se puede leer el código de barras del BeadChip, aparece un cuadro de diálogo que le permite introducir el código de barras manualmente. Consulte *El software no puede leer el código de barras del BeadChip* en la página 50.
- 3 Seleccione **Next** (Siguiente).

Configuración de la lectura

- 1 En la pantalla Scan Setup (Configuración de lectura), confirme la información siguiente:
 - ▶ **Barcode** (Código de barras): el software lee el código de barras del BeadChip al cargar el BeadChip. Si el código de barras se ha introducido de forma manual, el botón Edit (Editar) aparece para poder modificarlo.
 - ▶ **Type** (Tipo): el campo para el tipo de BeadChip se rellena automáticamente en función del código de barras del BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Ubicación de DMAP): la ubicación de la carpeta DMAP se especifica en la pantalla BeadChip Scan Configuration (Configuración de lectura del BeadChip). Si desea cambiar la ubicación solo para la lectura actual, seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la ubicación correcta.
 - ▶ **Output Location** (Ubicación de resultados): la ubicación de los resultados se especifica en la pantalla BeadChip Scan Configuration (Configuración de lectura del BeadChip). Si desea cambiar la ubicación solo para la lectura actual, seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la ubicación deseada.
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente).

Revisión de la comprobación automática

El software ejecuta una comprobación automática del sistema. Durante la comprobación, aparecen en la pantalla los siguientes indicadores:

- ▶ **Marca de verificación gris**  : todavía no se ha efectuado la comprobación.
- ▶ **Icono de progreso**  : la comprobación está en curso.
- ▶ **Marca de verificación verde**  : se ha superado la comprobación.
- ▶ **Cruz roja**  : no se ha superado la comprobación. Todos los elementos que no la superen, precisan una acción antes de continuar. Consulte [Solución de errores de la comprobación automática en la página 45](#).

Para detener una comprobación automática en curso, seleccione el icono  en la esquina inferior derecha.

Para reiniciar la comprobación, seleccione el icono . La comprobación reanuda la primera comprobación incompleta o con error.

Para ver los resultados de cada comprobación dentro de una categoría, seleccione el icono  para ampliar la categoría.



NOTA

Cuando lleva a cabo el primer experimento de secuenciación con NCS v4.0 o posterior, es normal que el registro de la celda de flujo dure más de 15 minutos durante la comprobación automatizada del sistema.

Inicio de la lectura

Una vez finalizada la comprobación automática, seleccione **Start** (Iniciar). Comenzará la lectura.

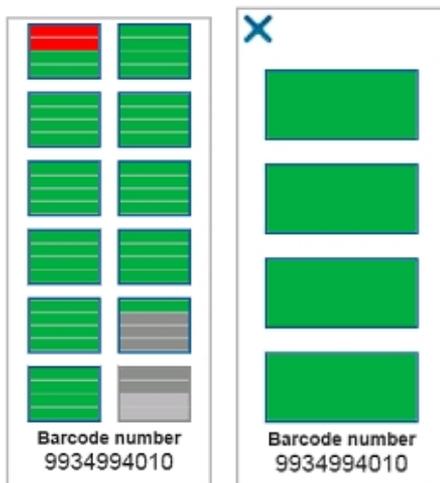
Para configurar el sistema de manera que la lectura se inicie de forma automática después de que se lleve a cabo correctamente la comprobación, consulte [Establecimiento de las opciones de configuración del experimento en la página 13](#).

Supervisión del progreso de lectura

- Supervise el progreso de la lectura mediante la imagen del BeadChip. Cada color de la imagen indica el estado de la lectura.
 - ▶ **Gris claro:** no escaneada
 - ▶ **Gris oscuro:** escaneada, pero no registrada
 - ▶ **Verde:** escaneada y registrada correctamente
 - ▶ **Rojo:** fallo en la lectura y el registro

Si falla el registro, puede volver a realizar la lectura de las muestras que contienen secciones fallidas. Consulte *Fallo de lectura de BeadChip en la página 51*.
- Seleccione la imagen del BeadChip para cambiar entre la vista completa y la vista detallada de una muestra seleccionada.
 - ▶ En la vista completa, se ven las muestras que están en el BeadChip y las secciones que hay en cada muestra.
 - ▶ En la vista detallada, se ve cada sección de la muestra seleccionada.

Figura 24 Imagen del BeadChip: vista completa y vista detallada



NOTA

La finalización de una lectura es definitiva. Si finaliza una lectura antes de que esta haya terminado, los datos de la lectura *no* se guardan.

Transferencia de datos

Cuando finaliza la lectura, los datos se ponen en cola para transferirlos a la carpeta de resultados de lectura. Los datos se guardan de forma temporal en el ordenador del instrumento. Cuando se inicia una lectura posterior, la carpeta temporal se elimina del ordenador del instrumento de forma automática.

El tiempo necesario para la transferencia de datos depende de su conexión de red. Antes de empezar una nueva lectura, asegúrese de que los datos se han guardado en la carpeta de resultados. Para comprobarlo, asegúrese de que en la carpeta del código de barras hay archivos GTC. Para obtener más información, consulte *Estructura de carpetas de resultados de lectura en la página 69*.

Si se interrumpe la conexión, la transferencia de datos se reanuda automáticamente cuando se restablece la conexión.

Capítulo 5 Mantenimiento

Introducción	36
Realización de un lavado manual	36
Sustitución del filtro de aire	39
Actualizaciones de software	40
Apagado del instrumento	42

Introducción

Los procedimientos de mantenimiento incluyen los lavados manuales del instrumento, la sustitución del filtro de aire y las actualizaciones del software del sistema si están disponibles.

- ▶ **Lavados del instrumento:** un lavado automático posterior al experimento después de cada experimento de secuenciación mantiene el rendimiento del instrumento. No obstante, es preciso realizar un lavado manual periódicamente en determinadas condiciones. Consulte *Realización de un lavado manual en la página 36*.
- ▶ **Actualizaciones de software:** cuando esté disponible una versión actualizada del software del sistema, puede instalarla automáticamente mediante uno de los dos métodos siguientes.
 - ▶ A través de una conexión a BaseSpace Sequence Hub
 - ▶ Manualmente después de descargar el instalador del sitio web de Illumina. Consulte *Actualizaciones de software en la página 40*.
- ▶ **Sustitución del filtro de aire:** si el instrumento incluye un filtro de aire accesible desde el panel trasero, su sustitución asegurará un flujo de aire correcto a través del instrumento.

Mantenimiento preventivo

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

Realización de un lavado manual

Los lavados manuales se inician en la pantalla Home (Inicio). Entre las opciones de lavado, están el lavado rápido y el lavado manual posterior al experimento.

Tipos de lavado	Descripción
Lavado rápido Duración: 20 minutos	Lava el sistema con una solución de lavado proporcionada por el usuario de agua de laboratorio y Tween 20 (cartucho de lavado de tampones). <ul style="list-style-type: none">• Es necesario cada 14 días que el instrumento permanezca inactivo con el cartucho de reactivos y cartucho de tampones colocados.• Es necesario cada siete días que el instrumento se encuentre seco (cartucho de reactivos y cartucho de tampones retirados).• Necesario después de un apagado.
Lavado manual posterior al experimento Duración: 90 minutos	Lava el sistema con una solución de lavado proporcionada por el usuario de agua de laboratorio y Tween 20 (cartucho de lavado de tampones) e hipoclorito de sodio al 0,12 % (cartucho de lavado de reactivos). Necesario en caso de no haber llevado a cabo un lavado automático posterior al experimento.

Para llevar a cabo un lavado manual, se debe usar el cartucho de lavado de reactivos y el cartucho de lavado de tampones que vienen con el instrumento, así como una celda de flujo usada. Una celda de flujo usada se puede utilizar hasta 20 veces para los lavados del instrumento.

Figura 25 Cartucho de lavado de reactivos y cartucho de lavado de tampones de estilo original.

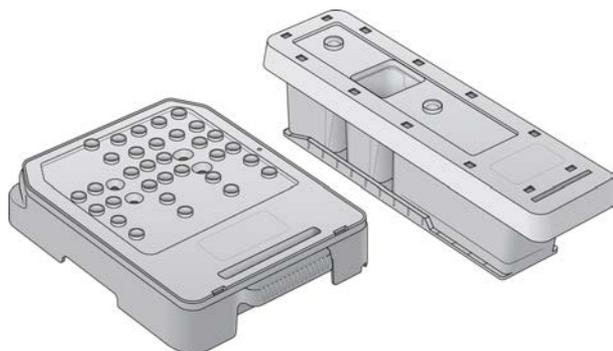
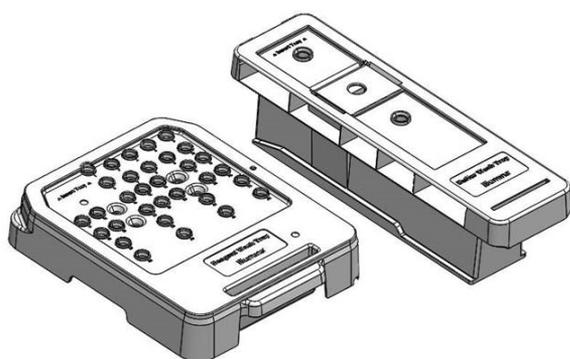


Figura 26 Cartucho de lavado de reactivos y cartucho de lavado de tampones de estilo nuevo.



Preparación para un lavado manual posterior al experimento

Consumibles proporcionados por el usuario	Volumen y descripción
<ul style="list-style-type: none"> • NaOCl 	1 ml, diluido al 0,12 % Se carga en el cartucho de lavado de reactivos (en la posición n.º 28)
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 al 100 % • Agua de laboratorio 	Se usa para realizar una solución de lavado Tween 20 de 125 ml al 0,05 % Se carga en el cartucho de lavado de tampones (en el depósito central)

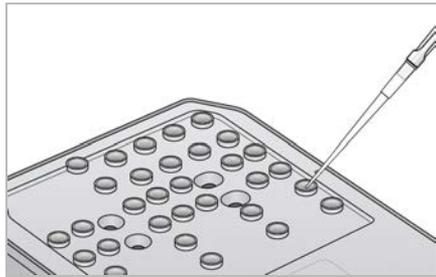


NOTA

Use siempre una dilución de NaOCl nueva preparada en las últimas **24 horas**. Si prepara un volumen superior a 1 ml, almacene la dilución sobrante a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C para utilizar en las próximas 24 horas. De lo contrario, deseche la dilución de NaOCl sobrante.

- 1 Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifugación para conseguir 1 ml de NaOCl al 0,12 %:
 - ▶ NaOCl al 5 % (24 µl)
 - ▶ Agua de laboratorio (976 µl)
- 2 Invierta el tubo para mezclar.
- 3 Añada 1 ml de NaOCl al 0,12 % al cartucho de lavado de reactivos. El depósito correcto es el equivalente a la posición n.º **28** en el cartucho precargado.

Figura 27 Carga de NaOCl



- 4 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,05 %:
 - Cartucho de lavado de tampones de estilo original
 - ▶ Tween 20 al 100 % (62 µl)
 - ▶ Agua de laboratorio (125 ml)
 - ▶ Añada 125 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
 - Cartucho de lavado de tampones de estilo nuevo
 - ▶ Tween 20 al 100 % (75 µl)
 - ▶ Agua de laboratorio (150 ml)
 - ▶ Añada 150 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
- 5 Seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado) y, a continuación, **Manual Post-Run Wash** (Lavado manual posterior al experimento).

Preparación para un lavado rápido

Consumibles proporcionados por el usuario	Volumen y descripción
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 al 100 % • Agua de laboratorio 	Se usa para realizar una solución de lavado Tween 20 de 40 ml al 0,05 % Se carga en el cartucho de lavado de tampones (en el depósito central)

- 1 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,05 %:
 - ▶ Tween 20 al 100 % (20 µl)
 - ▶ Agua de laboratorio (40 ml)
- 2 Añada 40 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
- 3 Seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado) y, a continuación, **Quick Wash** (Lavado rápido).

Carga de una celda de flujo usada y de los cartuchos de lavado

- 1 Si no hay ninguna celda de flujo usada, cargue una. Seleccione **Load** (Cargar) y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

- 2 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de conformidad con las normativas aplicables.



ADVERTENCIA

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

- 3 Deslice el contenedor de reactivos usados vacío dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga.
- 4 Retire el cartucho de tampones usados del experimento anterior si todavía no lo ha hecho.
- 5 Cargue el cartucho de lavado de tampones que contiene la solución de lavado.
- 6 Retire el cartucho de reactivos usado del experimento anterior si todavía no lo ha hecho.
- 7 Cargue el cartucho de lavado de reactivos.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiendo). La comprobación previa al lavado comienza de forma automática.

Inicio del lavado

- 1 Seleccione **Start** (Iniciar).
- 2 Una vez finalizado el lavado, seleccione **Home** (Inicio).

Después del lavado

Después del lavado, los dispensadores permanecen en la posición bajada para evitar que entre aire en el sistema. Deje los cartuchos en su lugar hasta el próximo experimento.

Sustitución del filtro de aire

Los nuevos sistemas vienen con tres filtros de aire de repuesto. Estos deben ser almacenados y usados cuando se recibe un aviso del instrumento para cambiar el filtro.

En los instrumentos que incluyen un filtro de aire accesible desde el panel trasero, dicho filtro garantiza el flujo de aire a través del instrumento. El software muestra una notificación para cambiar el filtro de aire cada 90 días. Cuando se le solicite, seleccione **Remind in 1 day** (Recordarme en 1 día), o bien siga el procedimiento que se describe a continuación y seleccione **Filter Changed** (Filtro cambiado). Tras la selección de la opción **Filter Changed** (Filtro cambiado), la cuenta regresiva de 90 días se restablece.

- 1 Retire el filtro de aire nuevo del envase y anote la fecha de instalación en el marco del filtro.
- 2 En la parte trasera del instrumento, presione sobre la parte superior de la bandeja del filtro para liberar la bandeja.
- 3 Sujete la parte superior de la bandeja del filtro y tire hacia arriba para levantar la bandeja por completo y extraerla del instrumento.
- 4 Retire y deseche el filtro de aire antiguo.
- 5 Inserte el nuevo filtro de aire en la bandeja.

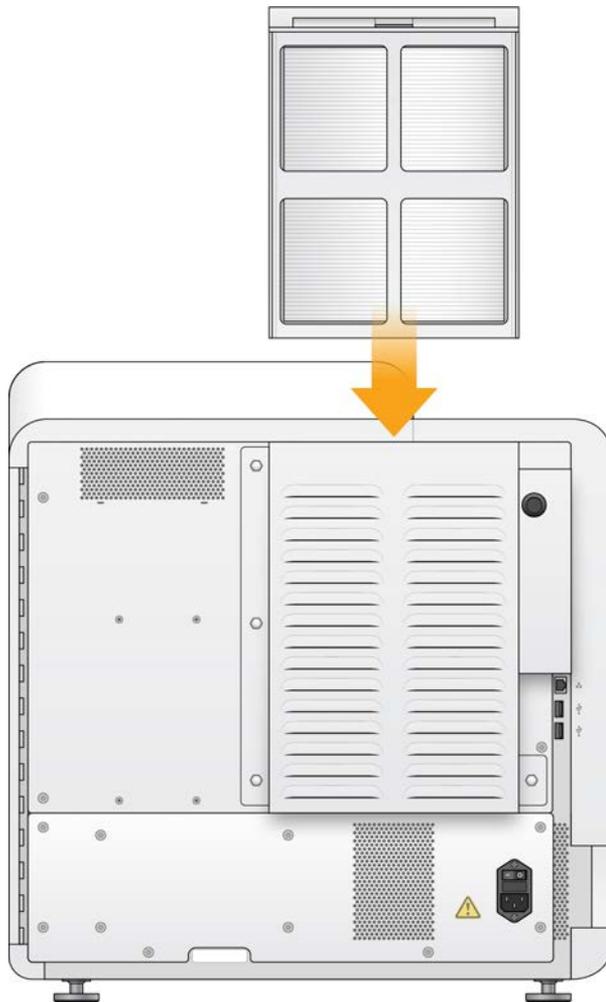


NOTA

El filtro de aire no funcionará correctamente si se coloca del revés. Asegúrese de que introduce el filtro de aire en la bandeja de forma que pueda ver la flecha hacia arriba de color verde y que no pueda ver la etiqueta de advertencia. La flecha debe apuntar hacia el asa de la bandeja del filtro.

- 6 Deslice la bandeja del filtro para introducirla en el instrumento. Presione sobre la parte superior de la bandeja del filtro hasta que se oiga un chasquido que indique que se ha colocado en su posición.

Figura 28 Inserción del filtro de aire



Actualizaciones de software

Las actualizaciones de software se suministran en un paquete llamado System Suite, que incluye el software siguiente:

- ▶ Software de control de NextSeq (NCS)
- ▶ Fórmulas de NextSeq
- ▶ Software Local Run Manager
- ▶ RTA2

- ▶ Software de servicio de NextSeq (NSS, NextSeq Service Software)
- ▶ Servicio de copia universal
- ▶ Controlador de acceso directo a la memoria (DMA, Direct Memory Access)

Puede instalar las actualizaciones de software de forma automática con una conexión a Internet o de forma manual desde una ubicación de red o USB.

- ▶ **Actualizaciones automáticas:** si el instrumento está conectado a una red con acceso a Internet, aparecerá un icono de alerta  en el botón Manage Instrument (Administrar instrumento) de la pantalla Home (Inicio) cuando haya una actualización de software disponible.
- ▶ **Actualizaciones manuales:** descargue el instalador de System Suite de la [página de asistencia técnica de NextSeq 550](#) en el sitio web de Illumina. Si piensa realizar una actualización manual, asegúrese de finalizarla antes de preparar las muestras y consumibles para un experimento de secuenciación.

Actualización automática de software

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Software Update** (Actualización de software).
- 3 Seleccione **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Instalar la actualización descargada de BaseSpace).
- 4 Seleccione **Update** (Actualizar) para iniciar la actualización. Se abre un cuadro de diálogo para confirmar el comando.
- 5 Siga los mensajes del asistente de instalación:
 - a Acepte el acuerdo de licencia.
 - b Revise las notas de la versión.
 - c Revise la lista de software incluido en la actualización.

Al finalizar la actualización, el software de control se reinicia automáticamente.



NOTA

Si se incluye una actualización de firmware, es necesario efectuar un reinicio automático del sistema después de que el firmware se haya actualizado.

Actualización manual de software

- 1 Descargue el instalador de System Suite del sitio web de Illumina y guárdelo en una ubicación de red. De manera alternativa, copie el archivo de instalación del software en una unidad USB portátil.
- 2 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 3 Seleccione **Software Update** (Actualización de software).
- 4 Seleccione **Manually install the update from the following location** (Instalar manualmente la actualización desde la siguiente ubicación).
- 5 Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación del archivo de instalación del software y, a continuación, seleccione **Update** (Actualizar).

- 6 Siga los mensajes del asistente de instalación:
 - a Acepte el acuerdo de licencia.
 - b Revise las notas de la versión.
 - c Revise la lista de software incluido en la actualización.

Al finalizar la actualización, el software de control se reinicia automáticamente.



NOTA

Si se incluye una actualización de firmware, es necesario efectuar un reinicio automático del sistema después de que el firmware se haya actualizado.

Apagado del instrumento

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).



NOTA

Para apagar el instrumento NextSeq 550Dx instrument en modo de investigación, consulte *Opciones de reinicio y apagado de NextSeq 550Dx en la página 72*.

- 2 Seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
- 3 Seleccione **Shutdown** (Apagado).

El comando Shutdown (Apagar) cierra el software de forma segura y apaga la alimentación del instrumento. Espere al menos 60 segundos antes de volver a encender el instrumento.



PRECAUCIÓN

No cambie la posición del instrumento. Si lo mueve de forma incorrecta, la alineación óptica podría verse afectada y comprometer la integridad de los datos. Si debe cambiar la posición del instrumento, póngase en contacto con su representante de Illumina.

Apéndice A Resolución de problemas

Introducción	43
Archivos de solución de problemas	43
Solución de errores de la comprobación automática	45
El contenedor de reactivos usados está lleno	48
Flujo de trabajo de la rehibridación	48
Errores de lectura y BeadChip	50
Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas	52
Comprobación del sistema	52
Mensaje de error de RAID	55
Error de almacenamiento en red	55
Configuración de ajustes del sistema	55

Introducción

Para cuestiones técnicas, visite las páginas de asistencia de NextSeq 550 en el sitio web de Illumina. Las páginas de asistencia proporcionan acceso a la documentación, las descargas y las preguntas frecuentes.

Inicie sesión en su cuenta de MyIllumina para acceder a los boletines de asistencia.

Si tiene problemas con el rendimiento o la calidad de los experimentos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Consulte *Asistencia técnica en la página 78*.

Le recomendamos compartir un enlace con el resumen del experimento en BaseSpace Sequence Hub con el servicio de asistencia técnica de Illumina para facilitar la solución de problemas. También puede ayudar a la solución de problemas cuando el servicio de supervisión Illumina Proactive está activo. Para obtener más información sobre el servicio, consulte *Establecimiento de la opción de envío de datos de rendimiento del instrumento en la página 13*.

Archivos de solución de problemas

Es posible que el representante del servicio de asistencia técnica de Illumina le solicite que proporcione copias de archivos específicos del experimento o de la lectura para solucionar problemas. Normalmente, se utilizan los archivos siguientes para solucionar problemas.

Archivos de solución de problemas para los experimentos de secuenciación

Archivo clave	Subcarpeta	Descripción
Archivo de información del experimento (RunInfo.xml)	<Nombre de la carpeta de experimento>	Contiene la siguiente información: <ul style="list-style-type: none">• Nombre del experimento• Número de ciclos del experimento• Número de ciclos de cada lectura• Si la lectura es una lectura indexada• Número de sectores y placas de la celda de flujo
Archivo de parámetros del experimento (RunParameters.xml)	<Nombre de la carpeta de experimento>	Contiene información sobre los parámetros del experimento y los componentes del experimento. La información incluye el RFID, el número de serie, el número de producto y la fecha de caducidad.

Archivo clave	Subcarpeta	Descripción
Archivo de configuración de RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Contiene los parámetros de configuración de RTA para el experimento. El archivo RTAConfiguration.xml se crea al inicio del experimento.
Archivos InterOp (*.bin)	InterOp	Archivos binarios de informes usados por Sequencing Analysis Viewer. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro	Logs (Registros)	Los archivos de registro describen cada paso llevado a cabo por el instrumento en cada ciclo y enumeran las versiones de software y firmware utilizadas con el experimento. El archivo llamado [NombreDelInstrumento]_CurrentHardware.csv muestra los números de serie de los componentes del instrumento.
Archivos de registro de errores (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de errores de RTA. Los archivos de registro de errores se actualizan siempre que se produce un error.
Archivos de registro global (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de todos los eventos de RTA. Los archivos de registro global se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro de carril (*LaneLog*.txt)	RTA Logs (Registros de RTA)	Registro de eventos de procesamiento de RTA. Los archivos de registro de carril se actualizan durante el experimento.

Errores de RTA

Para solucionar los errores de RTA, compruebe primero el registro de errores de RTA que se almacena en la carpeta RTALogs (Registros de RTA). Este archivo no está presente para los experimentos realizados con éxito. Los archivos se encuentran en carpetas específicas del experimento de la carpeta de resultados. Incluya el registro de errores al notificar los problemas al servicio de asistencia técnica de Illumina.

Archivos de solución de problemas para las lecturas de arrays

Archivo clave	Subcarpeta	Descripción
Archivo de parámetros de la lectura (ScanParameters.xml)	<Nombre de la carpeta de experimento>	Contiene información sobre los parámetros de la lectura. La información incluye la fecha de lectura, el código de barras del BeadChip, la ubicación del archivo de grupos y la ubicación del archivo de manifiesto.
Archivos de registro	Logs (Registros)	Los archivos de registro describen todos los pasos llevados a cabo en el instrumento durante la lectura.

Archivo clave	Subcarpeta	Descripción
Archivos de criterios de medición	[Código de barras]	Los criterios de medición se proporcionan como criterios de medición de la muestra y como criterios de medición de la sección. [código de barras]_sample_metrics.csv : para cada muestra y canal (rojo y verde), recoge Percent Off Image (Porcentaje fuera de imagen), Percent Outliers (Porcentaje de valores atípicos), P05, P50, P95, Avg FWHM Avg (Prom. FWHM prom.), FWHM Stddev (Desviación estándar de FWHM) y Min Registration Score (Puntuación mínima de registro). [código de barras]_section_metrics.csv : para cada sección y placa, recoge Laser Z-position (Posición Z del láser), Through Focus Z-position (Posición de Z a través del enfoque), Red FWHM (FWHM rojo), Green FWHM (FWHM verde), Red Avg Pixel Intensity (Intensidad media de píxeles rojos), Green Avg Pixel Intensity (Intensidad media de píxeles verdes), Red Registration Score (Puntuación de registro rojo) y Green Registration Score (Puntuación de registro verde).
Archivo de relectura	[Código de barras]	[código de barras]_rescan.flowcell : recoge las ubicaciones de placas ajustadas para una relectura, que incluyen un solapamiento de placa a placa progresivo.

Solución de errores de la comprobación automática

Si se producen errores durante la comprobación automática, lleve a cabo las medidas recomendadas que se indican a continuación para solucionar el error. Las comprobaciones automáticas son distintas para la secuenciación y para las lecturas de arrays.

Sin embargo, las RFID de la celda de flujo, el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones se bloquearán durante la inicialización del software de control, lo que puede ser necesario para resolver un error. El usuario debe retirar la celda de flujo, el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones del instrumento antes de que el sistema se reinicie. Además, las RFID de los consumibles se bloquean después de que se haya perforado el sello metálico.

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Doors Closed (Puertas cerradas)	Asegúrese de que las puertas del compartimento estén cerradas.
Consumables Loaded (Consumibles cargados)	Los sensores de los consumibles no registran debidamente. Asegúrese de que todos los consumibles estén bien cargados. En las pantallas de configuración del experimento, seleccione Back (Atrás) para volver al paso de carga y repita la configuración del experimento.
Required Software (Software necesario)	Faltan los componentes críticos del software. Lleve a cabo una actualización manual del software para restablecer todos los componentes del software.
Instrument Disk Space (Espacio de disco del instrumento)	El disco duro del instrumento no tiene suficiente espacio para ejecutar un experimento. Es posible que no se hayan transferido los datos de un experimento anterior. Borre los datos del experimento del disco duro del instrumento.
Network Connection (Conexión de red)	La conexión de red se ha interrumpido. Compruebe el estado de la red y la conexión de red física.
Network Disk Space (Espacio de disco de la red)	La cuenta de BaseSpace o el servidor de red están llenos.

Temperatura	Acción recomendada
Temperatura	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Temperature Sensors (Sensores de temperatura)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Fans (Ventiladores)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Sistema de adquisición de imágenes	Acción recomendada
Imaging Limits (Límites de adquisición de imágenes)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Z Steps-and-Settle (Pasos y asentamiento de la platina Z)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Bit Error Rate (Tasa de errores de bits)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	<p>Es posible que la celda de flujo no esté bien colocada.</p> <ul style="list-style-type: none"> • En las pantallas de configuración del experimento, seleccione Back (Atrás) para volver al paso de la celda de flujo. La puerta del compartimento de adquisición de imágenes se abre. • Descargue y vuelva a cargar la celda de flujo para asegurarse de que esté bien colocada.
Administración de reactivos	Acción recomendada
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Pump (Bomba)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Buffer Mechanism (Mecanismo de los tampones)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Spent Reagents Empty (Reactivos usados vaciados)	Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a cargar el contenedor ya vacío.

Comprobaciones para los experimentos de secuenciación

Si falla una comprobación previa al experimento, la identificación de radiofrecuencia (RFID) del cartucho de reactivos no está bloqueada y puede usarse en un experimento posterior. Sin embargo, la RFID se bloquea después de que se hayan perforado los cierres metálicos.

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Doors Closed (Puertas cerradas)	Asegúrese de que las puertas del compartimento estén cerradas.
Consumables Loaded (Consumibles cargados)	<p>Los sensores de los consumibles no registran debidamente. Asegúrese de que todos los consumibles estén bien cargados.</p> <p>En las pantallas de configuración del experimento, seleccione Back (Atrás) para volver al paso de carga y repita la configuración del experimento.</p>
Required Software (Software necesario)	<p>Faltan los componentes críticos del software.</p> <p>Lleve a cabo una actualización manual del software para restablecer todos los componentes del software.</p>
Instrument Disk Space (Espacio de disco del instrumento)	<p>El disco duro del instrumento no tiene suficiente espacio para ejecutar un experimento. Es posible que no se hayan transferido los datos de un experimento anterior.</p> <p>Borre los datos del experimento del disco duro del instrumento.</p>

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Network Connection (Conexión de red)	La conexión de red se ha interrumpido. Compruebe el estado de la red y la conexión de red física.
Network Disk Space (Espacio de disco de la red)	La cuenta de BaseSpace o el servidor de red están llenos.

Temperatura	Acción recomendada
Temperatura	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Temperature Sensors (Sensores de temperatura)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Fans (Ventiladores)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sistema de adquisición de imágenes	Acción recomendada
Imaging Limits (Límites de adquisición de imágenes)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Z Steps-and-Settle (Pasos y asentamiento de la platina Z)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Bit Error Rate (Tasa de errores de bits)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	<p>Es posible que la celda de flujo no esté bien colocada.</p> <ul style="list-style-type: none"> En las pantallas de configuración del experimento, seleccione Back (Atrás) para volver al paso de la celda de flujo. La puerta del compartimento de adquisición de imágenes se abre. Descargue y vuelva a cargar la celda de flujo para asegurarse de que esté bien colocada.

Administración de reactivos	Acción recomendada
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Pump (Bomba)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Buffer Mechanism (Mecanismo de los tampones)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Spent Reagents Empty (Reactivos usados vaciados)	Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a cargar el contenedor ya vacío.

Comprobaciones para las lecturas de arrays

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Doors Closed (Puertas cerradas)	Asegúrese de que las puertas del compartimento estén cerradas.
Consumables Loaded (Consumibles cargados)	<p>Los sensores de los consumibles no registran debidamente. Asegúrese de que todos los consumibles estén bien cargados.</p> <p>En las pantallas de configuración del experimento, seleccione Back (Atrás) para volver al paso de carga y repita la configuración del experimento.</p>
Required Software (Software necesario)	<p>Faltan los componentes críticos del software.</p> <p>Lleve a cabo una actualización manual del software para restablecer todos los componentes del software.</p>

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Verify Input Files (Verificar archivos de entrada)	Compruebe que la ruta del archivo de grupos y del archivo de manifiesto es correcta y que están los archivos.
Instrument Disk Space (Espacio de disco del instrumento)	El disco duro del instrumento no tiene suficiente espacio para ejecutar un experimento. Es posible que no se hayan transferido los datos de un experimento anterior. Borre los datos del experimento del disco duro del instrumento.
Network Connection (Conexión de red)	La conexión de red se ha interrumpido. Compruebe el estado de la red y la conexión de red física.
Network Disk Space (Espacio de disco de la red)	La cuenta de BaseSpace o el servidor de red están llenos.

Sistema de adquisición de imágenes	Acción recomendada
Imaging Limits (Límites de adquisición de imágenes)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Z Steps-and-Settle (Pasos y asentamiento de la platina Z)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Bit Error Rate (Tasa de errores de bits)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Auto-Center (Autocentrado)	Descargue el adaptador de BeadChips. Compruebe que el BeadChip está bien colocado en el adaptador y, a continuación, vuelva a cargar el adaptador.

El contenedor de reactivos usados está lleno

Inicie siempre un experimento con un contenedor de reactivos usados vacío.

Si inicia un experimento sin un contenedor vacío, cuando el contenedor se llena, los sensores del sistema activan el software para que detenga el experimento. Los sensores del sistema no pueden pausar un experimento durante la generación de grupos, la resíntesis "paired-end" ni el lavado automático posterior al experimento.

Cuando se pausa el experimento, se abre un cuadro de diálogo con opciones para levantar los dispensadores y vaciar el contenedor lleno.

Vaciado del contenedor de reactivos usados

- 1 Seleccione **Raise Sippers** (Levantar dispensadores).
- 2 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de manera adecuada.
- 3 Vuelva a colocar el contenedor vacío en el compartimento de tampones.
- 4 Seleccione **Continue** (Continuar). El experimento se reanuda automáticamente.

Flujo de trabajo de la rehibridación

Es posible que se deba realizar un experimento de rehibridación si los criterios de medición generados durante los primeros ciclos muestran intensidades por debajo de 2500. Algunas bibliotecas con poca diversidad pueden mostrar intensidades por debajo de 1000, lo que es previsible y no se puede resolver con la rehibridación.



NOTA

El comando End Run (Finalizar experimento) es definitivo. No es posible reanudar el experimento, no se pueden reutilizar los consumibles del experimento y tampoco se guardan los datos de secuenciación del experimento.

Cuando el usuario finaliza un experimento, el software lleva a cabo los pasos siguientes antes de que el experimento termine:

- ▶ Coloca la celda de flujo en un estado seguro.
- ▶ Desbloquea la RFID de la celda de flujo para un experimento posterior.
- ▶ Asigna una fecha de caducidad de rehibridación a la celda de flujo.
- ▶ Escribe los registros del experimento para los ciclos realizados. Suele producirse un retraso.
- ▶ Omite el lavado automático posterior al experimento.

Cuando inicie un experimento de rehibridación, el software realizará los pasos siguientes para llevar a cabo el experimento:

- ▶ Crea una carpeta de experimento con un nombre basado en un nombre único del experimento.
- ▶ Comprueba que la fecha de rehibridación de la celda de flujo no haya caducado.
- ▶ Ceba los reactivos. Suele producirse un retraso.
- ▶ Se salta el paso de generación de grupos.
- ▶ Retira el cebador de lectura 1 anterior.
- ▶ Hibrida un cebador de lectura 1 nuevo.
- ▶ Continúa con la lectura 1 y el resto del experimento según los parámetros del experimento especificados.

Puntos para finalizar un experimento de rehibridación

La posterior rehibridación solo es posible si finaliza el experimento en los puntos siguientes:

- ▶ **Después del ciclo 5:** las intensidades aparecen tras el registro de la cadena molde, para lo que son necesarios los primeros cinco ciclos de secuenciación. Aunque es seguro finalizar un experimento después del ciclo 1, se recomienda finalizarlo después del ciclo 5. No finalice un experimento durante la generación de grupos.
- ▶ **Lectura 1 o lectura de índice 1:** finalice el experimento *antes* de iniciar la resíntesis "paired-end". La celda de flujo no se puede guardar para la posterior rehibridación una vez iniciada la resíntesis "paired-end".

Consumibles necesarios

Para efectuar un experimento de rehibridación, hay que contar con un cartucho de tampones y un cartucho de reactivos de NextSeq nuevos, independientemente de cuándo se haya detenido el experimento.

Finalización del experimento actual

- 1 Seleccione **End Run** (Finalizar experimento). Cuando se le pregunte si quiere confirmar el comando, seleccione **Yes** (Sí).
- 2 Cuando se le pregunte si quiere guardar la celda de flujo, seleccione **Yes** (Sí). Al guardar la celda de flujo, no se garantiza que el experimento actual pueda rescatarse posteriormente. Tenga en cuenta la fecha de caducidad para la rehibridación.
- 3 Retire la celda de flujo guardada y resérvela a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta que esté listo para configurar el experimento de rehibridación.



NOTA

Puede almacenar la celda de flujo hasta siete días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en el estuche protector de plástico *sin* el paquete desecante. Para obtener los mejores resultados, rehibride la celda de flujo guardada antes de que transcurran tres días.

Realización de un lavado manual

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado).
- 2 En la pantalla Wash Selection (Selección de lavado), seleccione **Manual Post-Run Wash** (Lavado manual posterior al experimento). Consulte *Realización de un lavado manual en la página 36*.



NOTA

Si no ha retirado el cartucho de reactivos y el cartucho de tampones del experimento detenido, puede usarlos para el lavado manual. De lo contrario, lleve a cabo un lavado manual con el cartucho de lavado de reactivos y el cartucho de lavado de tampones.

Configuración de un experimento en el instrumento

- 1 Prepare un cartucho de reactivos nuevo.
- 2 Si se ha almacenado la celda de flujo guardada, deje que alcance la temperatura ambiente (15-30 minutos).
- 3 Limpie y cargue la celda de flujo guardada.
- 4 Retire el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de manera adecuada; a continuación, vuelva a cargar el contenedor vacío.
- 5 En la pantalla Run Setup (Configuración del experimento), seleccione uno de los siguientes modos de experimento.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Manual
- 6 **[Opcional]** Seleccione **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Usar ajustes de BaseSpace Sequence Hub) y seleccione uno de los siguientes.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Almacenamiento y supervisión del experimento)
 - ▶ Run Monitoring Only (Solo supervisión del experimento)
 Introduzca su nombre de usuario y contraseña de BaseSpace Sequence Hub.
- 7 Cargue el nuevo cartucho de tampones y el nuevo cartucho de reactivos.
- 8 Seleccione **Next** (Siguiendo) para continuar con la comprobación previa al experimento e inicie el experimento.

Errores de lectura y BeadChip

El software no puede leer el código de barras del BeadChip

Cuando aparezca el cuadro de diálogo de error del código de barras, seleccione una de las siguientes opciones:

- ▶ Seleccione **Rescan** (Volver a realizar lectura). El software intenta leer el código de barras de nuevo.

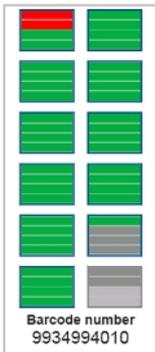
- ▶ Seleccione el campo de texto e introduzca el código de barras numérico tal y como se muestra en la imagen. En función del BeadChip, los números del código de barras tienen hasta 12 dígitos. Seleccione **Save** (Guardar). La imagen del código de barras se guarda en la carpeta de resultados.
- ▶ Seleccione **Cancel** (Cancelar). La puerta del compartimento de adquisición de imágenes se abre para descargar el adaptador de BeadChips.

Fallo de lectura de BeadChip

Las imágenes se registran después de su lectura. El registro identifica las bolas relacionando su ubicación en la imagen leída con la información que figura en el archivo del mapa de bolas o la carpeta DMAP.

Las secciones que no se pueden registrar están marcadas en rojo en la imagen del BeadChip.

Figura 29 BeadChip en el que se muestran las secciones fallidas



Una vez que finaliza la lectura y que los datos de esta se guardan en la carpeta de resultados, se activa el botón Rescan (Volver a realizar la lectura).

Cuando se selecciona Rescan (Volver a realizar la lectura), el software lleva a cabo los siguientes pasos:

- ▶ Vuelve a realizar la lectura de las muestras que contienen secciones fallidas usando un solapamiento de placa a placa progresivo.
- ▶ Genera los archivos de resultados en la carpeta de resultados original.
- ▶ Sobrescribe los archivos de resultados anteriores correspondientes a las secciones fallidas.
- ▶ Aumenta de uno en uno el contador de lecturas para cada relectura, pero lo hace en segundo plano. El software no cambia el nombre de la carpeta de resultados.

Relectura o inicio de una nueva lectura

- 1 Seleccione **Rescan** (Volver a realizar lectura) para realizar la lectura de muestras que contienen secciones fallidas.
- 2 Si la lectura sigue dando fallo, térmela.
- 3 Retire el BeadChip y el adaptador y compruebe que el BeadChip no está sucio ni tiene polvo. Use aire comprimido u otro método comprimido de desempolvadura para quitar la suciedad.
- 4 Vuelva a cargar el BeadChip e inicie una lectura nueva. Cuando se inicia una nueva lectura, el software lleva a cabo los siguientes pasos:
 - ▶ Realiza la lectura de todo el BeadChip.
 - ▶ Genera los archivos de resultados en una carpeta de resultados nueva.
 - ▶ Aumenta de uno en uno el contador de lecturas en función del recuento de lecturas en la última relectura.

Sustitución de los archivos de manifiesto y archivos de grupos

- 1 Diríjase a [la página del servicio de asistencia de Illumina](#) correspondiente al BeadChip que esté usando y haga clic en la ficha **Downloads** (Descargas).
- 2 Descargue los archivos que se deben sustituir o actualizar y cópielos en la ubicación de red deseada.



NOTA

Asegúrese de seleccionar archivos de grupos y de manifiesto que sean compatibles con el sistema NextSeq 550. Los archivos compatibles llevan **NS550** en el nombre del archivo.

- 3 Solo si ha cambiado la ubicación, actualícela en la pantalla BeadChip Scan Configuration (Configuración de lectura del BeadChip) de la forma siguiente:
 - a En la pantalla Home (Inicio) de NCS (NextSeq Control Software), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
 - b Seleccione **System Configuration** (Configuración del sistema).
 - c Seleccione **BeadChip Scan Configuration** (Configuración de lectura del BeadChip).
- 4 Seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la ubicación de los archivos sustituidos o actualizados.

Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas

No modifique las fórmulas originales. Realice siempre una copia de la fórmula original con un nuevo nombre. Si se modifica una fórmula original, el actualizador de software ya no podrá reconocerla para las actualizaciones posteriores y no se instalarán versiones más recientes.

Guarde las fórmulas personalizadas en la carpeta de fórmulas correspondiente. Las carpetas de fórmulas se organizan como se indica a continuación.

 **Custom** (Personalizado)

 **High** (Elevado): fórmulas personalizadas que se utilizan con un kit de rendimiento elevado.

 **Mid** (Medio): fórmulas personalizadas que se utilizan con un kit de rendimiento medio.

 **High** (Elevado): fórmulas originales que se utilizan con un kit de rendimiento elevado.

 **Mid** (Medio): fórmulas originales que se utilizan con un kit de rendimiento medio.

 **Wash** (Lavado): contiene la fórmula de lavado manual.

Comprobación del sistema

No se precisa ejecutar ninguna comprobación del sistema para el funcionamiento normal o el mantenimiento del instrumento. No obstante, un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina puede solicitarle que ejecute una comprobación del sistema para solucionar posibles problemas.



NOTA

Si se debe realizar un lavado del instrumento, realícelo antes de iniciar una comprobación del sistema.

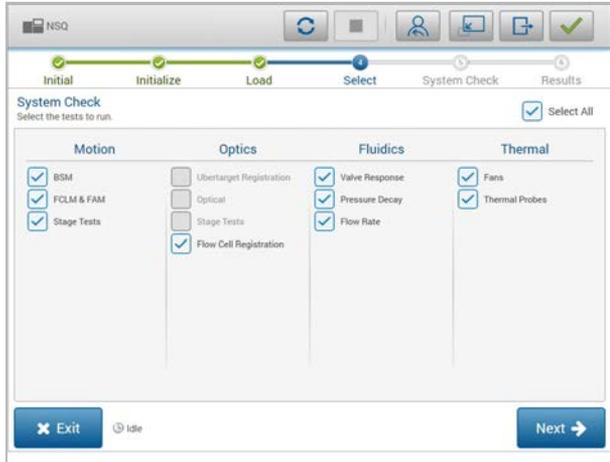
Al iniciar una comprobación del sistema, se cierra automáticamente el software de control y se inicia el software de servicio de NextSeq (NSS). El software de servicio se inicia y se abre una página de inicio de sesión. Use cualquier credencial de nombre de usuario y contraseña de Local Run Manager (Nivel de administrador o usuario) para acceder a NSS. Una vez autenticado, el NSS se abre en la pantalla Load (Cargar), que está configurada para usarla opción de carga avanzada



NOTA

Las credenciales de usuario administrador de Local Run Manager necesitan usarse para iniciar sesión en el software del servicio antes de que aparezca la pantalla Load (Cargar).

Figura 30 Comprobaciones del sistema disponibles



Las casillas de verificación desactivadas de la pantalla Select (Seleccionar) indican pruebas que requieren la asistencia de un representante del servicio de Illumina.

Realizar una comprobación del sistema

- 1 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Check** (Comprobación del sistema). Cuando se le solicite cerrar el software de control, seleccione **Yes** (Sí).
- 2 Cargue los consumibles como se describe a continuación:
 - a Si todavía no hay ninguna celda de flujo usada en el instrumento, cargue una.



NOTA

Illumina recomienda utilizar una celda de flujo de rendimiento elevado para las comprobaciones del sistema.

- b Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a colocarlo en el instrumento.
 - c Cargue el cartucho de lavado de tampones que contiene 120 ml de agua de laboratorio en el depósito central.
 - d Cargue el cartucho de lavado de reactivos. Asegúrese de que el cartucho de lavado de reactivos está limpio y vacío.
- 3 Seleccione **Load** (Cargar). El software mueve la celda de flujo y el cartucho de lavado de reactivos a su posición. Seleccione **Next** (Siguiendo).
- 4 Seleccione **Next** (Siguiendo). Se inicia la comprobación del sistema.
- 5 **[Opcional]** Cuando haya finalizado la comprobación del sistema, seleccione **View** (Visualizar) junto al nombre de comprobación para visualizar los valores asociados a cada comprobación.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiendo). Se abre el informe de comprobación del sistema.
- 7 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar el informe en un archivo comprimido. Vaya a una ubicación de red para guardar el archivo.

- 8 Cuando termine, seleccione **Exit** (Salir).
- 9 Cuando se le solicite cerrar el software de servicio y reiniciar el software de control, seleccione **Yes** (Sí). El software de control se reinicia automáticamente.

Comprobaciones de movimiento

Comprobación del sistema	Descripción
BSM	Comprueba la ganancia y la distancia del mecanismo de aspiración del tampón (BSM, Buffer Straw Mechanism) para confirmar que el módulo funciona correctamente.
FCLM y FAM	Comprueba la ganancia y la distancia del mecanismo de carga de la celda de flujo (FCLM, Flow Cell Load Mechanism) y del módulo de automatización de fluidos (FAM, Fluid Automation Module) para confirmar que los módulos funcionan correctamente.
Stage Tests (Pruebas de platina)	Comprueba los límites de desplazamiento y el rendimiento de la platina XY y las 6 platinas Z, una por cámara.

Comprobación del sistema óptico

Comprobación del sistema	Descripción
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	Mide la inclinación de la celda de flujo en un plano óptico, comprueba la función de la cámara, comprueba el módulo de adquisición de imágenes y verifica el registro de la celda de flujo en la posición correcta de adquisición de imágenes.

Comprobaciones de la fluídica

Comprobación del sistema	Descripción
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Comprueba la precisión de los movimientos de la válvula y la bomba, así como la amplitud de movimiento de la jeringa de la bomba.
Pressure Decay (Caída de la presión)	Comprueba la tasa de fuga de un sistema de fluídica con cierre, que confirma que la celda de flujo está bien montada en la posición de secuenciación.
Flow Rate (Velocidad de flujo)	Comprueba el funcionamiento de los sensores de burbujas, que se utilizan para detectar la presencia de aire en los conductos de reactivo. Mide la velocidad de flujo para detectar oclusiones o fugas.

Comprobaciones térmicas

Comprobación del sistema	Descripción
Fans (Ventiladores)	Comprueba la velocidad de los ventiladores del sistema en pulsos por minuto (PPM) para confirmar que los ventiladores funcionan. Los ventiladores que no funcionan devuelven un valor negativo.
Thermal Probes (Sondas térmicas)	Comprueba la temperatura media de cada sensor térmico. Los sensores térmicos que no funcionan devuelven un valor negativo.

Mensaje de error de RAID

El ordenador de NextSeq está equipado con dos discos duros. Si un disco duro empieza a fallar, el sistema genera un mensaje de error de RAID y le sugiere que se ponga en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Normalmente, es necesario sustituir un disco duro.

Puede proceder con los pasos de configuración del experimento y el funcionamiento normal. El propósito del mensaje es planificar los trabajos de mantenimiento de forma anticipada para evitar interrupciones en el funcionamiento normal del instrumento. Para continuar, seleccione **Acknowledge** (Aceptar) y, a continuación, **Close** (Cerrar).

Error de almacenamiento en red

Los errores de almacenamiento en red son el resultado de una de las siguientes razones:

- ▶ **Espacio de almacenamiento insuficiente para la carpeta de resultados:** aumente la cantidad de espacio disponible en el dispositivo de almacenamiento o mueva la carpeta de resultados a una ubicación con suficiente almacenamiento.
- ▶ **No se puede conectar con el almacenamiento en red:** compruebe la ruta a la carpeta de resultados. Consulte *Configuración de la ubicación de la carpeta de resultados en la página 57*.
- ▶ **El sistema no puede escribir en el almacenamiento en red:** consulte al administrador de TI para comprobar los permisos. En la cuenta de Windows en el sistema operativo del instrumento hacen falta permisos de lectura y escritura de la carpeta de resultados.

En la cuenta de Windows en Local Run Manager también hacen falta permisos de lectura y escritura de la carpeta de resultados. Consulte Especificación de la configuración de la cuenta de servicio en la *Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 1000000002702)*.

Configuración de ajustes del sistema

El sistema se configura durante la instalación. No obstante, si es necesario realizar un cambio o si el sistema se debe volver a configurar, use las opciones de configuración del sistema.

- ▶ **Network Configuration** (Configuración de red): proporciona opciones de ajuste de dirección IP, dirección de servidor de nombres de dominio (DNS, Domain Name Server), nombre del ordenador y nombre de dominio.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub:** si está en uso BaseSpace Sequence Hub, proporciona opciones de ubicación a la que se transferirán los datos para su almacenamiento y análisis.
- ▶ **Output Folder Location** (Ubicación de la carpeta de resultados): proporciona opciones de ruta a la carpeta de resultados.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (Configuración de lectura del BeadChip): proporciona opciones para especificar lo siguiente.
 - ▶ Ubicación predeterminada para la carpeta DMAP
 - ▶ Ubicación de la carpeta de resultados
 - ▶ Formato de archivo de las imágenes guardadas
 - ▶ Tipo de archivo de salida

Ajuste de la configuración de red

- 1 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Configuration** (Configuración del sistema).
- 2 Seleccione **Network Configuration** (Configuración de red).
- 3 Seleccione **Obtain an IP address automatically** (Obtener una dirección IP de forma automática) para obtener la dirección IP mediante el uso del servidor DHCP.



NOTA

El protocolo de configuración de host dinámico (DHCP, Dynamic Host Configuration Protocol) es un protocolo de red estándar que se usa en redes IP para distribuir de forma dinámica los parámetros de configuración de la red.

Por otra parte, también puede seleccionar **Use the following IP address** (Usar la dirección IP siguiente) para conectar el instrumento a otro servidor de forma manual, como se indica a continuación. Póngase en contacto con el administrador de su red para obtener las direcciones específicas del centro.

- ▶ Introduzca una dirección IP. La dirección IP es una serie de cuatro números separados por un punto. Por ejemplo, 168.62.20.37.
 - ▶ Introduzca la máscara de subred, que es una subdivisión de la red IP.
 - ▶ Introduzca la puerta de enlace predeterminada, que es el enrutador de la red que se conecta a Internet.
- 4 Seleccione **Obtain a DNS server address automatically** (Obtener una dirección de servidor DNS de forma automática) para conectar el instrumento al servidor de nombres de dominio asociado con la dirección IP.
De forma alternativa, seleccione **Use the following DNS server addresses** (Utilizar las siguientes direcciones de servidor DNS) para conectar el instrumento al servidor de nombres de dominio manualmente del modo siguiente.
 - ▶ Introduzca la dirección DNS deseada. La dirección DNS es el nombre del servidor utilizado para traducir nombres de dominio en direcciones IP.
 - ▶ Introduzca la dirección DNS alternativa. La dirección alternativa se utiliza si la DNS no puede traducir un nombre de dominio concreto en una dirección IP.
 - 5 Seleccione **Save** (Guardar) para pasar a la pantalla Computer (Ordenador).



NOTA

El nombre del ordenador del instrumento se asigna al ordenador del instrumento en el momento de su fabricación. Cualquier cambio realizado en el nombre del ordenador puede afectar a la conectividad y requerir un administrador de red.

- 6 Conecte el ordenador del instrumento a un dominio o grupo de trabajo, como se explica a continuación.
 - ▶ **Para instrumentos conectados a Internet:** seleccione **Member of domain** (Miembro del dominio) y, a continuación, introduzca el nombre de dominio asociado a la conexión a Internet de su centro. Los cambios de dominio requieren un nombre y contraseña de usuario de administrador.
 - ▶ **Para instrumentos no conectados a Internet:** seleccione **Member of work group** (Miembro del grupo de trabajo) y, a continuación, introduzca el nombre del grupo de trabajo. El nombre del grupo de trabajo es exclusivo de su centro.
- 7 Seleccione **Save** (Guardar).

Configuración de ajustes de BaseSpace Sequence Hub

- 1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **System Configuration** (Configuración del sistema).
- 3 Seleccione **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Configuración de BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Seleccione una de las siguientes opciones para especificar la ubicación a la que se transfieren los datos para su análisis.
 - ▶ En la lista Hosting Location (Ubicación de alojamiento), seleccione la ubicación del servidor en el que se cargan los datos.
 - ▶ Si cuenta con una suscripción Enterprise, seleccione la casilla de verificación **Private Domain** (Dominio privado) e introduzca el nombre del dominio (URL) usado para el inicio de sesión individual en BaseSpace Sequence Hub.
Por ejemplo: <https://sulaboratorio.basespace.illumina.com>.
- 5 Seleccione **Save** (Guardar).

Configuración de la ubicación de la carpeta de resultados

En NextSeq hace falta una carpeta de resultados para todos los experimentos. Use la ruta Universal Naming Convention (UNC) para la carpeta de resultados. La ruta UNC incluye dos barras invertidas, el nombre del servidor y el nombre de directorio, pero *no* la letra de una unidad de red asignada.

- ▶ En las rutas a la carpeta de resultados de un nivel hace falta una barra invertida final.
 - ▶ Ejemplo de ruta UNC: \\nombredeservidor\directorio\
- ▶ En las rutas a la carpeta de resultados de dos o más niveles no hace falta una barra invertida final.
 - ▶ Ejemplo de ruta UNC: \\nombredeservidor\directorio1\directorio2
- ▶ Las rutas a una unidad de red asignada causan errores. **No las use.**
 - ▶ Ejemplo de una ruta de unidad de red asignada: T:\archivos sbs

En el modo de experimento de Local Run Manager, configure la ubicación de la carpeta de resultados en el software Local Run Manager. Para obtener más información, consulte la *Guía del software Local Run Manager* (n.º de documento 1000000002702).

BeadChip Scan Configuration (Configuración de lectura del BeadChip)

- 1 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Configuration** (Configuración del sistema).
- 2 Seleccione **BeadChip Scan Configuration** (Configuración de lectura del BeadChip).
- 3 Para especificar una ubicación predeterminada para la carpeta DMAP, seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la ubicación de la carpeta que desee dentro de la red del centro.



NOTA

Antes de cada lectura, descargue y copie el contenido DMAP en esta ubicación. El contenido DMAP es necesario para cada BeadChip y se corresponde unívocamente con el código de barras del BeadChip.

- 4 Para especificar una ubicación de resultados predeterminada, seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la ubicación que desee dentro de la red del centro.
- 5 Seleccione un formato de archivo de imagen para las imágenes guardadas. El tipo de imagen predeterminado es **JPG**.

- 6 Seleccione un formato de archivo de resultados para los datos de la lectura. El tipo de archivo de resultados predeterminado es **GTC solamente**.
- 7 Seleccione **Save** (Guardar).
- 8 En la pantalla Scan Map (Mapa de lecturas), especifique la ruta completa del archivo de grupos y del archivo de manifiesto para cada tipo de BeadChip. Seleccione **Browse** (Examinar) para cada tipo de archivo y vaya a la carpeta que contiene estos archivos.

Apéndice B Análisis en tiempo real

Descripción general de Análisis en tiempo real	59
Flujo de trabajo de Análisis en tiempo real	60

Descripción general de Análisis en tiempo real

NextSeq 550 usa una implementación del software de Análisis en tiempo real (RTA) denominada RTA2. RTA2 se ejecuta en el ordenador del instrumento y extrae las intensidades de las imágenes, realiza una llamada de bases y asigna una puntuación de calidad a dicha llamada. RTA2 y el software de control se comunican a través de una interfaz web HTTP y de archivos de memoria compartidos. Si RTA2 se interrumpe, el procesamiento no se reanuda y los datos del experimento no se guardan.



NOTA

No se calcula el rendimiento de demultiplexado. En consecuencia, la ficha Index (Índice) Sequencing Analysis Viewer (SAV) aparece vacía.

Entradas de RTA2

RTA2 precisa las siguientes entradas principales:

- ▶ Las imágenes de las placas contenidas en la memoria del sistema local.
- ▶ **RunInfo.xml**, que se genera automáticamente al inicio del experimento. El archivo proporciona la siguiente información.
 - ▶ Nombre del experimento
 - ▶ Número de ciclos
 - ▶ Si se indexa una lectura
 - ▶ Número de placas de la celda de flujo
- ▶ **RTA.exe.config**, que es un archivo de configuración de software en formato XML.

RTA2 recibe comandos del software de control que indican la ubicación de **RunInfo.xml** y si se ha especificado una carpeta de resultados opcional.

Archivos de resultados de RTA v2

Las imágenes de cada canal se transfieren en memoria como placas. Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como el campo de visión por la cámara. A partir de estas imágenes, el software produce un resultado en forma de conjunto de archivos de filtro y archivos de llamadas de bases con puntuación de calidad. Todos los demás archivos admiten archivos de resultados.

Tipo de archivo	Descripción
Archivos de llamada de bases (*.bcl)	Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamadas de bases agregado para cada carril y para cada ciclo. El archivo de llamadas de bases agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada para cada grupo en ese carril.
Archivos de filtro (*.filter)	Cada placa produce información de filtro que se agrega a un archivo de filtro para cada carril. El archivo de filtro especifica si un grupo ha superado los filtros.
Archivos de ubicación de grupos (*.locs)	Los archivos de ubicación de grupos contienen las coordenadas X e Y para cada grupo en una placa. Durante la generación de plantillas, se genera un archivo de ubicación de grupos para cada carril.
Archivos de índice de llamada de bases (*.bci)	Se produce un archivo de índice de llamada de bases para cada carril con el fin de preservar la información de placa original. El archivo de índice contiene un par de valores para cada placa, que son el número de placa y el número de grupos para esa placa.

Los archivos de resultados se usan para los análisis sucesivos en BaseSpace. De manera alternativa, use el software de conversión bcl2fastq para la conversión a FASTQ y soluciones de análisis de otros proveedores. Los archivos de NextSeq requieren bcl2fastq v2.0 o posterior. Para obtener la última versión de bcl2fastq, visite la [página de descargas de NextSeq](#) en el sitio web de Illumina.

RTA v2 proporciona criterios de medición en tiempo real de experimentos de calidad guardados como archivos InterOp. Los archivos InterOp son archivos de resultados binarios que contienen criterios de medición relacionados con placas, ciclos y lecturas y son necesarios para la visualización de criterios de medición en tiempo real con Sequencing Analysis Viewer (SAV). Para obtener la última versión de SAV, visite la [página de descargas del SAV](#) en el sitio web de Illumina.

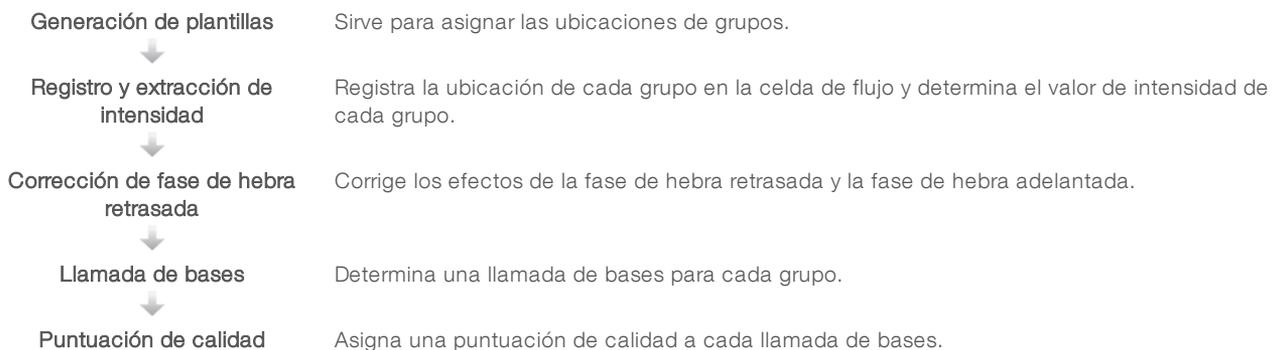
Gestión de errores

RTA2 crea archivos de registro y los guarda en la carpeta RTALogs (Registros de RTA). Los errores se registran en un archivo de errores con formato *.tsv.

Los archivos de errores y de registro siguientes se transfieren a la ubicación de destino de los resultados finales tras completar el procesamiento:

- ▶ *GlobalLog*.tsv contiene un resumen de los eventos importantes del experimento.
- ▶ *LaneNLog*.tsv enumera los eventos de procesamiento de cada carril.
- ▶ *Error*.tsv enumera los errores que se han producido durante un experimento.
- ▶ *WarningLog*.tsv enumera las advertencias que se han producido durante un experimento.

Flujo de trabajo de Análisis en tiempo real



Generación de plantillas

El primer paso del flujo de trabajo de RTA es la generación de plantillas, que define la posición de cada grupo en una placa mediante el uso de las coordenadas X e Y.

La generación de plantillas requiere los datos de imagen de los cinco primeros ciclos del experimento. Tras el último ciclo de la plantilla para la adquisición de imágenes de una placa, se genera la plantilla.



NOTA

Para detectar un grupo durante la generación de plantillas, debe haber como mínimo una base distinta de G en los primeros **cinco** ciclos. Para las secuencias de índice, RTA v2 precisa como mínimo una base distinta de G en los primeros **dos** ciclos.

La plantilla se usa como referencia para el siguiente paso de registro y extracción de intensidad. Las posiciones de los grupos para el conjunto de la celda de flujo se escriben en archivos de ubicación de grupos (*.locs), uno por carril.

Registro y extracción de intensidad

El registro y la extracción de intensidad comienza después de la generación de plantillas.

- ▶ El registro alinea imágenes producidas durante cada ciclo de adquisición de imágenes posterior en relación con la plantilla.
- ▶ La extracción de intensidad determina un valor de intensidad para cada grupo de la plantilla para una imagen determinada.

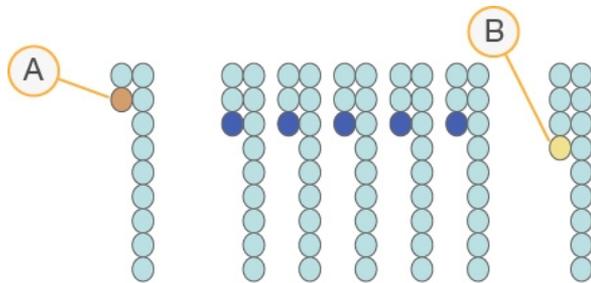
Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Use el software Sequencing Analysis Viewer (SAV) para examinar las imágenes en miniatura e identificar las imágenes que no se han podido registrar.

Corrección de fase de hebra retrasada

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

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

Figura 31 Fase de hebra retrasada y fase de hebra adelantada



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

RTA2 corrige los efectos de la fase de hebra retrasada y adelantada, lo que aumenta al máximo la calidad de los datos en cada uno de los ciclos del experimento.

Llamada de bases

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. NextSeq 550Dx usa la secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos de cuatro bases de ADN: una del canal rojo y otra del canal verde.

Las intensidades extraídas de una imagen en comparación con otra imagen producen cuatro poblaciones distintas, cada una de las cuales corresponde a un nucleótido. El proceso de llamada de bases determina a qué población pertenece cada grupo.

Figura 32 Visualización de intensidades de grupos

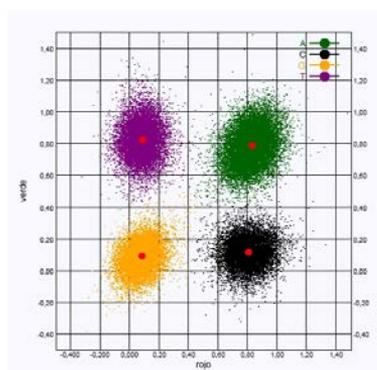


Tabla 1 Llamada de bases en la secuenciación de dos canales

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
A	1 (encendido)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad en el canal rojo y verde.
C	1 (encendido)	0 (apagado)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal rojo.
G	0 (apagado)	0 (apagado)	Grupos que no presentan intensidad en una ubicación de grupos conocida.
T	0 (apagado)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal verde.

Grupos que superan el filtro

Durante el experimento, RTA2 filtra incidencias para retirar las lecturas que no satisfagan el umbral de calidad de los datos. Los grupos que se solapan o de baja calidad se retiran.

En el caso del análisis de dos canales, RTA2 usa un sistema basado en la población para determinar la castidad de una llamada de bases. Los grupos superan el filtro (PF) cuando, como máximo, una llamada de bases en los primeros 25 ciclos muestra un valor de casticidad de $<0,63$. En los grupos que no superan el filtro, no se realiza la llamada de bases.

Consideraciones sobre el indexado

El proceso de llamada de bases de las lecturas del índice difiere de la llamada de bases durante otras lecturas.

Las lecturas del índice deben comenzar, al menos, con una base diferente de G en cualquiera de los dos primeros ciclos. Si una lectura del índice comienza con dos llamadas de bases G, no se genera ninguna intensidad de señal. La señal debe estar presente en cualquiera de los dos primeros ciclos para garantizar el rendimiento del demultiplexado.

Para aumentar la solidez del demultiplexado, seleccione las secuencias de índices que proporcionen señal en al menos un canal, preferiblemente los dos canales, por cada ciclo. Al seguir estas guías, se evitan las combinaciones de índices que solo dan lugar a bases G en cualquier ciclo.

- ▶ Canal rojo: A o C
- ▶ Canal verde: A o T

Este proceso de llamada de bases garantiza la precisión al analizar muestras de bajo plexado.

Puntuación de calidad

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

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

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



NOTA

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

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

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

Apéndice C Archivos y carpetas de resultados

Archivos de resultados de secuenciación	64
Estructura de carpetas de resultados de secuenciación	67
Archivos de resultados de lectura	68
Estructura de carpetas de resultados de lectura	69

Archivos de resultados de secuenciación

Tipo de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos de llamadas de bases	Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamadas de bases, agregado en un archivo para cada carril y para cada ciclo. El archivo agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada para cada grupo en ese carril. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : los archivos se almacenan en una carpeta por carril. [Ciclo].bcl.bgzf , donde [Ciclo] representa el número de ciclo de cuatro dígitos. Los archivos de llamadas de bases se comprimen mediante el uso de la compresión de bloques gzip.
Archivo de índice de llamadas de bases	Para cada carril, un archivo de índice binario recopila la información de placas original en un par de valores para cada placa, que son el número de placa y el número de grupos para la placa. Los archivos de índice de llamadas de bases se generan al crear por primera vez un archivo de llamadas de bases para ese carril. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : los archivos se almacenan en una carpeta por carril. s_[Carril].bci
Archivos de ubicación de grupos	Para cada placa, las coordenadas X e Y para cada grupo se agregan a un archivo de ubicación de grupos para cada carril. Los archivos de ubicación de grupos son el resultado de la generación de plantillas. Data\Intensities\L00[X] : los archivos se almacenan en una carpeta por carril. s_[carril].locs
Archivos de filtro	El archivo de filtro especifica si los grupos han superado los filtros. La información de filtro se agrega a un archivo de filtro para cada carril y lectura. Estos archivos se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : los archivos se almacenan en una carpeta por carril. s_[carril].filter
Archivos InterOp	Archivos de informes binarios usados por Sequencing Analysis Viewer (SAV). Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento. Carpeta InterOp
Archivo de configuración de RTA	Creado al inicio del experimento, el archivo de configuración de RTA contiene los parámetros de configuración del experimento. <Nombre de carpeta de experimento>, RTAConfiguration.xml
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si es una lectura indexada y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. <Nombre de carpeta de experimento>, RunInfo.xml
Archivos en miniatura	Una imagen en miniatura para cada canal de color (rojo y verde) para las placas 1, 6 y 12 de todas las cámaras, superficies superiores e inferiores, en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] : los archivos se almacenan en una carpeta por carril y una subcarpeta por ciclo. s_[carril]_[placa]_[canal].jpg : en el nombre de archivo, la placa se representa con un número de cinco dígitos que indica la superficie, el sector, la cámara y la placa. Para obtener más información, consulte <i>Numeración de placas en la página 66</i> y <i>Asignación de nombre a imágenes en miniatura en la página 67</i> .

Placas de la celda de flujo

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como el campo de visión por la cámara. El número total de placas depende del número de imágenes de carriles, sectores y superficies adquiridas en la celda de flujo y del funcionamiento conjunto de las cámaras para la obtención de las imágenes.

- ▶ Las celdas de flujo de rendimiento elevado tienen un total de 864 placas.
- ▶ Las celdas de flujo de rendimiento medio tienen un total de 288 placas.

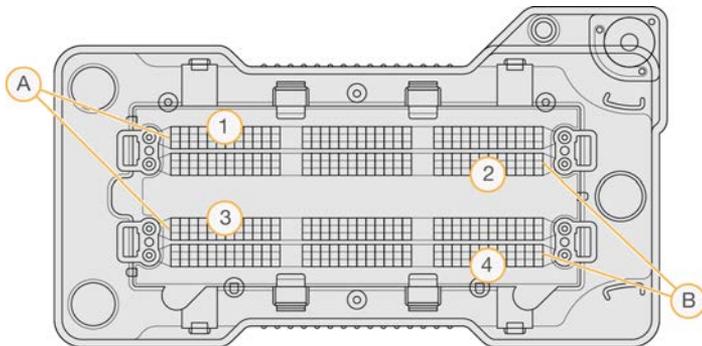
Tabla 2 Placas de la celda de flujo

Componente de la celda de flujo	Rendimiento elevado	Rendimiento medio	Descripción
Carriles	4	4	Un carril es un canal físico con puertos de entrada y salida específicos.
Superficies	2	2	La imagen de la celda de flujo se adquiere en dos superficies, la superior y la inferior. En primer lugar, se adquiere la imagen de la superficie superior de una placa y, a continuación, la imagen de la superficie inferior de la misma placa antes de pasar a la placa siguiente.
Sectores por carril	3	1	Un sector es una columna de placas en un carril.
Segmentos de cámara	3	3	El instrumento usa seis cámaras para la adquisición de imágenes de la celda de flujo en tres segmentos por carril.
Placas por sector por segmento de cámara	12	12	Una placa es el área de la celda de flujo que la cámara ve como una imagen.
Total de imágenes adquiridas de placas	864	288	El número total de placas equivale a carriles × superficies × sectores × segmentos de cámara × placas por sector por segmento.

Numeración de carriles

Las imágenes de los carriles 1 y 3, conocidos como par de carriles A, se adquieren al mismo tiempo. Las imágenes de los carriles 2 y 4, conocidos como par de carriles B, se adquieren cuando se completa la adquisición de imágenes del par de carriles A.

Figura 33 Numeración de carriles

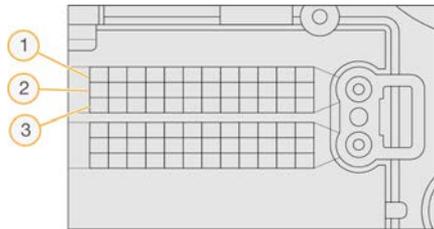


- A Par de carriles A: carriles 1 y 3
- B Par de carriles B: carriles 2 y 4

Numeración de sectores

Las imágenes de cada carril se adquieren en tres sectores. Los sectores están numerados del 1 al 3 para las celdas de flujo de rendimiento elevado.

Figura 34 Numeración de sectores

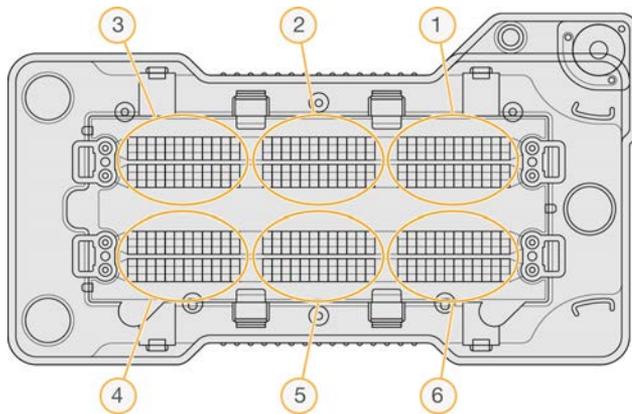


Numeración de cámaras

NextSeq 550 usa seis cámaras para efectuar la adquisición de imágenes de la celda de flujo.

Las cámaras están numeradas del 1 al 6. Las cámaras del 1 al 3 adquieren imágenes del carril uno. Las cámaras del 4 al 6 adquieren imágenes del carril tres. Después de adquirir imágenes de los carriles 1 y 3, el módulo de adquisición de imágenes se desplaza al eje X para adquirir imágenes de los carriles 2 y 4.

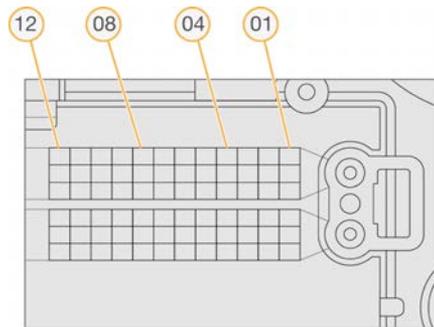
Figura 35 Numeración de cámaras y segmentos (se muestra una celda de flujo de rendimiento elevado)



Numeración de placas

Hay 12 placas en cada sector de cada segmento de cámara. Las placas están numeradas del 01 al 12, independientemente del número de sector o del segmento de cámara, y se representan con dos dígitos.

Figura 36 Numeración de placas



El número de placa completo incluye 5 dígitos para la representación de la ubicación, tal y como se indica a continuación:

- ▶ **Superficie:** 1 representa la superficie superior y 2 representa la superficie inferior
- ▶ **Sector:** 1, 2 o 3
- ▶ **Cámara:** 1, 2, 3, 4, 5 o 6
- ▶ **Placa:** 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 o 12

Ejemplo: el número de placa 12 508 indica la superficie superior, el sector 2, la cámara 5 y la placa 8.

El número de placa completo de cinco dígitos se usa en el nombre de los archivos de imágenes en miniatura y los archivos empíricos de fases de hebras retrasadas. Para obtener más información, consulte [Archivos de resultados de secuenciación en la página 64](#).

Asignación de nombre a imágenes en miniatura

Se genera una imagen en miniatura para cada canal de color (rojo y verde) para las placas 1, 6 y 12 de todas las cámaras, superficies superiores e inferiores, en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Las imágenes en miniatura se generan en el formato de archivo JPG.

Se asigna a cada imagen un nombre con el número de placa tal y como indica la convención de nomenclatura siguiente, que siempre empieza por **s_**:

- ▶ **Carril:** 1, 2, 3 o 4
- ▶ **Placa:** número de placa de 5 dígitos que indica la superficie, el sector, la cámara y la placa
- ▶ **Canal:** rojo o verde

Ejemplo: `s_3_12512_green.jpg`, que indica el carril 3, la superficie superior, el sector 2, la cámara 5, la placa 12 y el canal verde.

Estructura de carpetas de resultados de secuenciación

El software de control genera el nombre de la carpeta de resultados de forma automática.

📁 Data (Datos)

📁 Intensities (Intensidades)

📁 BaseCalls (Llamada de bases)

📁 **L001:** archivos de llamada de bases para el carril 1, agregados en un archivo por ciclo.

📁 **L002:** archivos de llamada de bases para el carril 2, agregados en un archivo por ciclo.

📁 **L003:** archivos de llamada de bases para el carril 3, agregados en un archivo por ciclo.

 **L004:** archivos de llamada de bases para el carril 4, agregados en un archivo por ciclo.

 **L001:** un archivo *.locs agregado para el carril 1.

 **L002:** un archivo *.locs agregado para el carril 2.

 **L003:** un archivo *.locs agregado para el carril 3.

 **L004:** un archivo *.locs agregado para el carril 4.

 **Images** (Imágenes)

 **Focus** (Enfoque)

 **L001:** imágenes de enfoque para el carril 1.

 **L002:** imágenes de enfoque para el carril 2.

 **L003:** imágenes de enfoque para el carril 3.

 **L004:** imágenes de enfoque para el carril 4.

 **InterOp:** archivos binarios usados por Sequencing Analysis Viewer (SAV).

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

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

 **RTALogs** (Registros de RTA): archivos de registro que describen los pasos del análisis.

 **Thumbnail_Images** (Miniatura_Imágenes): imágenes en miniatura para las placas 1, 6 y 12 en cada sector de cada ciclo.

 RTAComplete.xml

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

Archivos de resultados de lectura

Tipo de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos GTC	<p>Archivo de llamada de genotipo. Se genera un archivo GTC para cada muestra que se escanea en el BeadChip. En el nombre del archivo, se incluye el código de barras y la muestra escaneada.</p> <p>[código de barras]_[muestra].gtc</p>
Archivos de imagen	<p>Los archivos de imagen se nombran de acuerdo con el área escaneada del BeadChip. En el nombre, se incluye el código de barras, la muestra y la sección en el BeadChip, el sector y el canal de adquisición de imágenes (rojo o verde).</p> <p>[código de barras]_[muestra]_[sección]_[sector]_[cámara]_[placa]_[canal].jpg</p> <ul style="list-style-type: none"> • Código de barras: el nombre de archivo comienza con el código de barras del BeadChip. • Muestra: un área del BeadChip, numerada como fila (ROX) de arriba abajo y columna (COX) de izquierda a derecha. • Sección: fila numerada dentro de una muestra. • Sector: las imágenes de los BeadChips se adquieren en forma de grupo de placas superpuestas. Por tanto, para adquirir la imagen de la sección solo se usa un sector. • Cámara: la cámara empleada para capturar la imagen. • Placa: un área de adquisición de imágenes definida como campo de visión por la cámara. • Canal: un canal es verde o rojo.

Estructura de carpetas de resultados de lectura

📁 [Fecha]_[Nombre de instrumento]_[N.º de lectura]_[Código de barras]

📁 [Código de barras]

📁 **Config** (Configuración)

📄 Effective.cfg: registra los ajustes de configuración usados durante la lectura.

📁 **Focus** (Enfoque): contiene archivos de imagen usados para enfocar la lectura.

📁 **Logs** (Registros): contiene archivos de registro en los que se recogen todos los pasos llevados a cabo durante la lectura.

📁 **PreScanDiagnosticFiles** (Archivos de diagnóstico previo a la lectura)

📁 [Fecha_Hora] **Barcode Scan** (Lectura de código de barras)

📄 ProcessedBarcode.jpg: imagen del código de barras del BeadChip.

📄 Diagnóstico de lectura (archivos de registro)

📄 PreScanChecks.csv: registra los resultados de la comprobación automática.

📄 Archivos GTC: archivos de llamada de genotipo (un archivo por muestra).

📄 Archivos IDAT (opcional): archivos de datos de intensidad (dos archivos por muestra; uno por cada canal).

📄 Archivos de imagen: imágenes de la lectura correspondientes a cada muestra, sección, sector, cámara, placa y canal.

📄 [Código de barras]_sample_metrics.csv

📄 [Código de barras]_section_metrics.csv

📄 ScanParameters.xml

Apéndice D Consideraciones sobre el modo de investigación de NextSeq 550Dx

Introducción	70
Compatibilidad de los consumibles de NextSeq 550Dx	70
Puesta en servicio de NextSeq 550Dx Instrument	71
Indicadores de modo de NextSeq 550Dx Instrument	72
Opciones de reinicio y apagado de NextSeq 550Dx	72

Introducción

Las instrucciones en esta guía, con algunas excepciones, se pueden aplicar al instrumento NextSeq 550Dx cuando está en modo de investigación con NCS v4.0 o posterior. Cuando esté en modo de investigación con NCS v3.0, consulte la *Guía de referencia del modo de investigación del instrumento NextSeq 550Dx* (n.º de documento 1000000041922).

Su fuente de instrucciones generales del software Local Run Manager depende del modo que se esté usando en el instrumento NextSeq 550Dx. Cuando esté en modo de investigación, consulte la *Guía del software Local Run Manager* (n.º de documento 1000000002702). Cuando esté en modo de diagnóstico, consulte las instrucciones del software Local Run Manager en la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument* (n.º de documento 1000000009513). El software Local Run Manager no está disponible para NCS v3.0.

Las diferencias entre NextSeq 550Dx en modo de investigación y NextSeq 550 incluyen las siguientes.

- ▶ Compatibilidad de los consumibles.
- ▶ Puesta en servicio del instrumento.
- ▶ Reinicio y apagado del instrumento.

Compatibilidad de los consumibles de NextSeq 550Dx

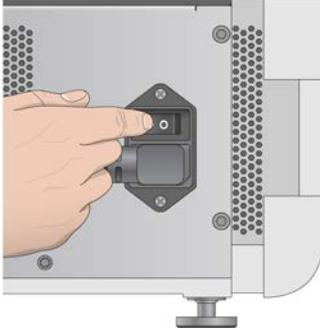
La realización de un experimento de secuenciación en NextSeq 550Dx requiere NextSeq 550/550 Kit de un solo uso o NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit.

Si usa un NextSeq 550Dx High Output Reagent kit para un experimento en modo de investigación, todos los componentes deben ser del mismo lote de kit. NextSeq 550/550 Kit no se puede usar para un experimento en modo de diagnóstico.

Puesta en servicio de NextSeq 550Dx Instrument

Coloque el interruptor de encendido principal en la posición I (Encendido).

Figura 37 Interruptor de encendido situado en la parte trasera del instrumento



- 1 Pulse el botón de encendido situado sobre el compartimento de reactivos. El botón de encendido enciende la alimentación del instrumento e inicia el ordenador y el software integrados en él. De manera predeterminada, el instrumento se reinicia y pasa al modo de diagnóstico.

Figura 38 Botón de encendido situado en la parte delantera del instrumento



- 2 Espere hasta que el sistema operativo se haya cargado completamente. El software operativo NextSeq 550Dx (NOS) abre e inicializa el sistema de manera automática. Una vez finalizada la inicialización, se abre la pantalla Home (Inicio).
- 3 Introduzca el nombre de usuario y la contraseña de Local Run Manager. Para obtener información sobre las contraseñas de Local Run Manager, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.
- 4 Seleccione **Login** (Iniciar sesión). La pantalla Home (Inicio) se abre junto con los iconos Sequence (Secuenciar), Local Run Manager, Manage Instrument (Administrar instrumento) y Perform Wash (Realizar lavado).
- 5 Use el comando Reboot to RUO (Reiniciar en modo de uso exclusivo en investigación) en NOS para apagar de forma segura el instrumento y reiniciar en modo de investigación.
 - ▶ Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
 - ▶ Seleccione **Reboot/Shutdown** (Reiniciar/Apagar).
 - ▶ Seleccione **Reboot to RUO** (Reiniciar en modo de uso exclusivo en investigación).

- 6 Espere hasta que el sistema operativo se haya cargado completamente. El NCS abre e inicializa el sistema automáticamente. Una vez finalizada la inicialización, se abre la pantalla Home (Inicio).
- 7 Si su sistema se ha configurado para solicitar credenciales de inicio de sesión, abra sesión en Windows con el nombre de usuario y la contraseña de su centro.



NOTA

Si no está seguro del modo en que se encuentra el instrumento, consulte *Indicadores de modo de NextSeq 550Dx Instrument*.

Indicadores de modo de NextSeq 550Dx Instrument

En la siguiente tabla, se enumeran los indicadores del modo del instrumento en la pantalla de NCS o de NOS. Para obtener información sobre cómo cambiar del modo de investigación al modo de diagnóstico, consulte *Opciones de reinicio y apagado de NextSeq 550Dx* en la página 72.

Modo	Pantalla Home (Inicio)	Barra de color	Orientación de icono de estado
Modo de diagnóstico	Bienvenido a NextSeqDx	Azul	Horizontal
Modo de investigación	Bienvenido a NextSeq	Naranja	Vertical

Opciones de reinicio y apagado de NextSeq 550Dx

Acceda a las siguientes funciones en NextSeq 550Dx cuando esté en modo de investigación seleccionando el botón Shutdown Options (Opciones de apagado):

- ▶ Reboot to Dx (Reiniciar en modo de diagnóstico): el instrumento se abre en el modo de diagnóstico.
- ▶ Reboot to RUO (Reiniciar en modo de uso exclusivo en investigación): el instrumento se abre en el modo de investigación.
- ▶ Shutdown (Apagado): el instrumento se abre en el modo de diagnóstico.
- ▶ Exit to Windows (Salir a Windows): en función de sus permisos, puede cerrar NCS y ver el sistema Windows.



NOTA

Si usa NextSeq 550Dx en modo de investigación, al volver al modo de diagnóstico se le solicita realizar un lavado posterior al experimento.

Reinicio en modo de diagnóstico

Use el comando Reboot to Dx (Reiniciar en modo de diagnóstico) para apagar el instrumento de forma segura y reiniciar para entrar en el modo de diagnóstico.

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
- 3 Seleccione **Reboot to Dx** (Reiniciar en modo de diagnóstico).

Reinicio en modo de investigación

Use el comando Reboot to RUO (Reiniciar en modo de uso exclusivo en investigación) para apagar el instrumento de forma segura y reiniciar para entrar en el modo de investigación.

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
- 3 Seleccione **Reboot to RUO** (Reiniciar en modo de uso exclusivo en investigación).

Apagado del instrumento

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
- 3 Seleccione **Shutdown** (Apagado).

El comando Shutdown (Apagar) cierra el software de forma segura y apaga la alimentación del instrumento. Espere al menos 60 segundos antes de volver a encender el instrumento.



NOTA

De manera predeterminada, el instrumento se reinicia y pasa al modo de diagnóstico cuando se enciende.



PRECAUCIÓN

No cambie la posición del instrumento. Si lo mueve de forma incorrecta, la alineación óptica podría verse afectada y comprometer la integridad de los datos. Si debe cambiar la posición del instrumento, póngase en contacto con su representante de Illumina.

Exit to Windows (Salir a Windows)

El comando Exit to Windows (Salir a Windows) proporciona acceso al sistema operativo del instrumento y a cualquier carpeta en el ordenador del instrumento. El comando cierra de forma segura el software y sale a Windows.

- 1 Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 Seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
- 3 Seleccione **Exit to Windows** (Salir a Windows).

Índice alfabético

A

- actualización del software 40
- adaptador
 - cargar BeadChip 33
 - descripción general 6
 - orientación del BeadChip 32
- administrar instrumento
 - apagado 42
- adquisición de imágenes, secuenciación de dos canales 61
- ajustes de configuración 55
- alertas de estado 5
- algoritmo Phred 63
- análisis
 - archivos de resultados 64
 - opciones 20-21
- análisis, principal
 - pureza de la señal 62
- apagado del instrumento 42
- archivos
 - InterOp 43, 64
 - locs 64
- archivos de entrada, lectura
 - archivos de grupos 30, 52
 - archivos de manifiesto 30, 52
 - carpeta DMAP 30
 - carpeta DMAP, descarga 31
- archivos de filtros 64
- archivos de llamadas de bases 64
- archivos de registro
 - GlobalLog 60
 - LaneNLog 60
- archivos de resultados 64
- archivos de resultados de lectura
 - GTC, IDAT 68
- archivos de resultados, lectura
 - GTC, IDAT 68
- archivos de resultados, secuenciación 64
- archivos GTC 68
- ayuda
 - documentación 2
 - técnica 78

B

- barra de estado 3
- BaseSpace Sequence Hub 1, 21
 - configuración 57

- iconos de transferencia 28
- inicio de sesión 21, 50
- BeadChip
 - adaptador 6, 32
 - análisis 1
 - cargar 33
 - fallo de registro 51
 - no se puede leer el código de barras 50
 - orientación del código de barras 32
 - tipos 1
- botón de encendido 6, 11

C

- carpeta de resultados 20
- carpeta DMAP
 - Decode File Client 30
 - descargar 31
- cartucho de reactivos
 - depósito n.º 28 37
 - descripción general 9
 - preparación 17
- cartucho de tampones 10, 24
- celda de flujo
 - adquisición de imágenes 66
 - asignación de nombre a archivos de imagen 67
 - descripción general 8
 - embalaje 18
 - limpieza 18
 - numeración de carriles 65
 - numeración de placas 66
 - número de sector 66
 - pares de carriles 8
 - pasadores de alineación 23
 - placas 65
 - rehibridación 48
 - tipos 1
- ciclos en una lectura 17
- compartimento de adquisición de imágenes 3
- compartimento de reactivos 3
- compartimento de tampones 3
- compartimento del filtro de aire 3-4
- compatibilidad
 - seguimiento de RFID 9
- componentes
 - barra de estado 3
 - compartimento de adquisición de imágenes 3
 - compartimento de reactivos 3

- compartimento de tampones 3
- compartimento del filtro de aire 3
- comprobación del sistema 52
- comprobación previa al experimento 26, 34
- configuración del experimento, opción avanzada 13
- consideraciones sobre el indexado 62
- consumibles
 - agua de laboratorio 15
 - cartucho de reactivos 9
 - cartucho de tampones 10
 - celda de flujo 8
 - consumibles de lavado 36-37
 - experimentos de secuenciación 14
 - mantenimiento del instrumento 14
- consumibles suministrados por el usuario 14
- contraseña y nombre de usuario del sistema 11
- crear un experimento 17
- criterios de medición
 - ciclos de densidad de grupos 27
 - ciclos de intensidad 27
 - llamada de bases 61
- criterios de medición de experimento 27

D

- Decode File Client 30
 - acceso por el BeadChip 31
 - acceso por la cuenta 31
- documentación 2, 78
- duración del experimento 17

E

- error de almacenamiento en red 55
- errores
 - comprobación previa al experimento 45
 - iconos de estado 5
 - probabilidad 63
- errores y advertencias
 - archivos de resultados 60
- experimentos
 - crear 17

F

- fase de hebra adelantada 61
- fase de hebra retrasada 61
- filtro de aire 39
- filtro de castidad 62

- flujo de trabajo
 - BeadChip 33
 - cartucho de reactivos 17, 25
 - cartucho de tampones 24
 - celda de flujo 23
 - comprobación previa al experimento 26, 34
 - consideraciones sobre el indexado 62
 - criterios de medición del experimento 27
 - duración del experimento 17
 - hipoclorito de sodio 37
 - inicio de sesión de BaseSpace Sequence
 - Hub 21, 50
 - Local Run Manager 21
 - modo de Local Run Manager 21
 - modo manual 22
 - NCS 21
 - opción de carga avanzada 13
 - preparación de la celda de flujo 18
 - puerta del compartimento de la celda de flujo 20
 - reactivos usados 23
 - secuenciación 60
 - flujo de trabajo de secuenciación 60
 - formación en línea 2
 - formamida, posición 6 25

G

- generación de plantillas 60
- grupos que superan el filtro 62
- guías para el agua de laboratorio 15

H

- hipoclorito de sodio, lavado 37

I

- iconos
 - errores y advertencias 5
 - estado 5
 - minimización de NCS 6
- imágenes en miniatura 64
- instrumento
 - ajustes de configuración 55
 - botón de encendido 6
 - puesta en servicio 11
- intensidades 61
- interruptor de encendido 11

L

- lavado
 - automático 28
 - componentes de lavado 36
 - consumibles suministrados por el usuario 36
 - instrumento 36
 - manual 36
 - posterior al experimento 28
- llamada de bases 61
 - consideraciones sobre el indexado 62
- Local Run Manager 20-21
 - crear un experimento 17
 - módulos 20
- longitud de lectura 17

M

- mantenimiento del instrumento
 - consumibles 14
 - preventivo 36
- mensaje de error de RAID 55
- modo de experimento
 - Local Run Manager 21
 - manual 21-22
- modo manual
 - crear un experimento 17
- módulos 20

N

- NextSeq 550Dx
 - apagado 72
 - apagado del instrumento 73
 - inicio de instrumento 71
 - indicadores de modo 72
 - inicialización de software 71
 - interruptor de encendido 71
 - nombre de usuario y contraseña de sistema 71
 - reinicio 72-73
 - reinicio de instrumento 72
 - reinicio de instrumento en diagnóstico 72
 - reinicio de instrumento en RUO 73
 - salir a Windows 73
 - software Local Run Manager 70
- nombre de usuario y contraseña del sistema 11
- numeración de cámaras 66
- numeración de carriles 65
- numeración de placas 66

numeración de sectores 66

O

opción de carga avanzada 13

P

- parámetros de experimento
 - editar parámetros 21
 - modo de Local Run Manager 21
 - modo manual 22
- pares de carriles 65
- prevención, mantenimiento 36
- problemas técnicos, asistencia 78
- puerta del compartimento de la celda de flujo 20
- puntuaciones Q 63
- purgar consumibles 14

R

- reactivos usados
 - contenedor lleno 48
 - desecho 23, 38
 - desecho correcto 25
- rehibridación del cebador 48
- rehibridación, Lectura 1 48
- RTA v2
 - cierre 59
 - descripción general 59
- RTA2
 - gestión de errores 60
- RunInfo.xml 43, 64

S

- secuenciación
 - consumibles suministrados por el usuario 14
- Sequencing Analysis Viewer 16
- servicio de asistencia al cliente 78
- servicio de copia universal 28
- Servicio de supervisión Illumina Proactive 13
- software
 - actualización automática 41
 - actualización manual 41
 - ajustes de configuración 55
 - análisis de imágenes, llamadas de bases 4
 - crear un experimento 17
 - duración del experimento 17
 - inicialización 11

- integrado en el instrumento 4
- software BlueFuse Multi 1
- software de análisis en tiempo real 1, 4
 - resultados 64
- software de control 4
- solución de problemas
 - archivos específicos de la lectura 44
 - archivos específicos del experimento 43
 - comprobación del sistema 52
 - comprobación previa al experimento 45
 - contenedor de reactivos usados 48
 - criterios de medición de baja calidad 48
 - fallo de registro de lectura 51
 - no se puede leer el código de barras del BeadChip 50
 - opciones de contacto 43
 - sustitución de los archivos de manifiesto y de grupos 52
- superar el filtro (PF, Passing Filter) 62

T

- tablas de calidad 63
- transferencia de datos
 - datos de lectura 35
 - iconos de actividad 28
 - servicio de copia universal 28
 - servicio de copia universal 28

U

- ubicación de carpeta 22
- ubicación de grupos
 - archivos 64
 - generación de plantillas 60

W

- Windows
 - acceso 6
 - contraseña 6

Asistencia técnica

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

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

Números del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Regional
Norteamérica	+1 800 809 4566	
Alemania	+49 800 101 4940	+49 893 803 5677
Australia	+1 800 775 688	
Austria	+43 800 006 249	+43 1928 6540
Bélgica	+32 8007 7160	+32 3400 2973
China	400 066 5835	
Corea del Sur	+82 802 345 300	
Dinamarca	+45 8082 0183	+45 8987 1156
España	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Finlandia	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Francia	+33 805 102 193	+33 170 770 446
Hong Kong (China)	800 960 230	
Irlanda	+353 180 093 6608	+353 016 950 506
Italia	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Japón	0 800 111 5011	
Noruega	+47 8001 6836	+47 2193 9693
Nueva Zelanda	080 045 1650	
Países Bajos	+31 800 022 2493	+31 207 132 960
Reino Unido	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Singapur	+1 800 579 2745	
Suecia	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Suiza	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Taiwán (China)	008 0665 1752	
Otros países	+44 179 953 4000	

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 (EE. UU.)

+ 1 800 809 ILMN (4566)

+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

illumina[®]