

El presente documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina"), y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en relación con el uso de los productos aquí descritos y a ningún otro efecto. El presente documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán a ningún otro efecto 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, propiedad intelectual ni derechos de autor ni similares derechos de terceros.

En un documento aparte, se le otorga la licencia del Software en virtud de los términos y condiciones del Acuerdo de licencia del software de secuenciación de Illumina. Si no acepta dichos términos y condiciones, Illumina no le otorgará la licencia del Software y no deberá utilizarlo ni instalarlo.

Para garantizar el uso correcto y seguro de los productos aquí descritos, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir sus instrucciones de manera rigurosa y expresa. Debe leer y entender completamente todo el contenido del presente documento antes de usar los productos.

SI NO SE LEEN COMPLETAMENTE NI SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES AQUÍ CONTENIDAS, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES EN PERSONAS (USUARIOS U OTROS) Y DAÑOS EN OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHOS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN RELACIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHOS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO DE INVESTIGACIÓN SOLAMENTE

© 2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAIIX, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, ForenSeq, MiSeq, MiSeqDx, MiSeq FGx, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, el color naranja calabaza y el diseño de las bases de streaming son marcas comerciales de Illumina, Inc. o de sus filiales en EE. UU. u otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

Este software contiene la biblioteca SeqAn, que está autorizada para Illumina y se distribuye de acuerdo con la siguiente licencia:

Copyright © 2010, Knut Reinert, FU Berlin, Todos los derechos reservados. Están permitidos el uso y la redistribución del código fuente y en formato binario, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones:

- 1 Las redistribuciones del código fuente deben incluir la mención de propiedad intelectual anterior, esta lista de condiciones y la consiguiente renuncia.
- 2 Las redistribuciones en formato binario deben reproducir la mención de propiedad intelectual anterior, esta lista de condiciones y la consiguiente renuncia en la documentación u otros materiales incluidos en la distribución.
- 3 No pueden usarse los nombres de FU Berlin y Knut Reinert ni los nombres de sus colaboradores para avalar o promover los productos derivados de este software sin el permiso previo por escrito correspondiente.

LOS TITULARES DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL Y SUS COLABORADORES PROPORCIONAN ESTE SOFTWARE "TAL CUAL", Y RENUNCIAN A TODAS LAS GARANTÍAS EXPLÍCITAS O IMPLÍCITAS, ENTRE LAS QUE SE INCLUYEN, A MODO ENUNCIATIVO PERO NO TAXATIVO, LAS GARANTÍAS IMPLÍCITAS DE COMERCIABILIDAD Y ADECUACIÓN A UN FIN ESPECÍFICO. EL TITULAR DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL Y SUS COLABORADORES NO SE RESPONSABILIZARÁN EN NINGÚN CASO DE LOS DAÑOS DIRECTOS, INDIRECTOS, ACCIDENTALES, CUANTIFICABLES, PUNITIVOS O CONSECUENTES (ENTRE LOS QUE SE INCLUYEN LA PRESTACIÓN DE BIENES O SERVICIOS DE SUSTITUCIÓN, LA PÉRDIDA DE USOS, DATOS O BENEFICIOS, Y LA INTERRUPCIÓN DEL NEGOCIO), INDEPENDIENTEMENTE DE CÓMO SE PRODUZCAN Y DEL PRINCIPIO DE RESPONSABILIDAD QUE SE APLIQUE, YA SEA

CONTRACTUAL, POR HECHOS AJENOS O POR ACTO ILÍCITO CIVIL (NEGLIGENTE O NO), QUE SE DERIVEN DE CUALQUIER MODO DEL USO DE ESTE SOFTWARE, AUNQUE SE AVISE DE LA POSIBILIDAD DE DICHOS DAÑOS.

Leer antes de usar el producto

Este producto, y su uso y disposición, están sujetos a los siguientes términos y condiciones. Si el comprador no acepta estos términos y condiciones, no contará con la autorización de Illumina para utilizar el producto y no deberá utilizarlo.

- Definiciones. "PI de aplicaciones específicas"** hace referencia a los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina y que atañen a este producto (y a su uso) solo en relación con aplicaciones específicas o campos específicos. La PI de aplicaciones específicas excluye toda propiedad intelectual bajo el control o la posesión de Illumina que cubra los aspectos o las características de este producto (o su uso) que sean comunes a este producto en todas las posibles aplicaciones y todos los posibles campos de uso (la "**PI común**"). La PI de aplicaciones específicas y la PI común son subconjuntos individuales y no coincidentes de todos los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina. A modo enunciativo pero no taxativo, los derechos de propiedad intelectual de Illumina sobre métodos diagnóstico específicos, métodos forenses específicos o biomarcadores de ácido nucleico, secuencias o combinaciones de biomarcadores o secuencias específicas son ejemplos de una PI de aplicaciones específicas. "**Consumibles**" hace referencia a los elementos fungibles y los reactivos de marca Illumina que ha concebido Illumina para su uso junto con el hardware, así como para su consumo mediante el uso de este último. "**Documentación**" hace referencia al manual del usuario de Illumina correspondiente a este producto, incluido, entre otros, los prospectos y cualquier otro tipo de documentación que se adjunte a este producto, al que el producto haga referencia o que se encuentre en el embalaje de este vigentes en la fecha de envío de Illumina. La documentación incluye este documento. "**Hardware**" hace referencia a los instrumentos, accesorios o periféricos de marca Illumina. "**Illumina**" hace referencia a Illumina, Inc. o a un afiliado de Illumina, según corresponda. "**Producto**" hace referencia al producto al que se adjunta este documento (por ejemplo, hardware, consumibles o software). "**Comprador**" es la persona o entidad que adquiere de manera legal y correcta este producto de Illumina o de un distribuidor autorizado de Illumina. "**Software**" hace referencia al software de marca Illumina (por ejemplo, el software que se ejecuta en el hardware o el software de análisis de datos). Todo el software se concede mediante licencia y no se vende, al tiempo que puede estar sujeto a términos adicionales que figuren en el acuerdo de licencia del usuario final del software. "**Especificaciones**" hace referencia a las especificaciones escritas de Illumina con respecto a este producto vigentes en la fecha de envío del producto por parte de Illumina.
- Derechos exclusivos para uso en investigación.** De conformidad con estos términos y condiciones y, a menos que se acuerde lo contrario por escrito con un directivo de Illumina, al comprador solo se le concede un derecho no exclusivo, no transferible, personal y sin posibilidad de sublicencia sobre la PI común de Illumina, existente en la fecha de envío de este producto por parte de Illumina, con el único fin de utilizar este producto en las instalaciones del comprador para los fines de investigación interna del comprador (que incluye los servicios de investigación prestados a terceros) y solo conforme a la documentación de este producto, **pero queda excluido de manera específica cualquier uso que** (a) requiriera derechos o una licencia por parte de Illumina sobre una PI de aplicaciones específicas, (b) constituya un nuevo uso de un consumible utilizado previamente, (c) constituya el desmontaje, la ingeniería inversa, la compilación inversa o el montaje inverso de este producto, (d) constituya la separación, la extracción o el aislamiento de los componentes de este producto o de otros análisis no autorizados de este producto, (e) conceda acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o determine dichos métodos, (f) constituya el uso de consumibles o reactivos que no sean de Illumina con el hardware de Illumina (no se aplica si las especificaciones o la documentación disponen lo contrario), o bien (g) constituya la transferencia a un tercero, o la sublicencia, del software o cualquier software de terceros. Todo el software, ya se proporcione por separado, se instale o se incorpore en un producto, se otorga en forma de licencia al comprador y no se vende. Salvo que se estipule de manera expresa en esta sección, ningún derecho ni ninguna licencia de los derechos de propiedad intelectual de Illumina se otorgan de manera expresa, implícita o por impedimento legal (estoppel).



El comprador solo será responsable de determinar si posee todos los derechos de propiedad intelectual necesarios para los usos previstos de este producto por su parte, incluidos entre otros, cualquier derecho de terceros o derechos en relación con la PI de aplicaciones específicas. Illumina no garantiza que los usos previstos específicos del comprador no infrinjan los derechos de propiedad intelectual de un tercero o de una PI de aplicaciones específicas.

- 3 **Conformidad normativa.** Este producto no se ha aprobado, autorizado ni se le ha otorgado licencia alguna por parte de la Agencia de Medicamentos y Alimentos (FDA, Food and Drug Administration) de EE. UU. o de cualquier otra entidad normativa, ya sea extranjera o nacional, para ningún uso previsto específico, bien para su uso en investigación, uso comercial, uso diagnóstico o de cualquier otro tipo. Este producto contiene la etiqueta "Para uso exclusivo en investigación". El comprador debe asegurarse de que cuenta con todas las aprobaciones normativas pertinentes para los usos previstos de este producto por su parte.
- 4 **Usos no autorizados.** El comprador acepta: (a) utilizar cada consumible solo una vez, y (b) utilizar solo consumibles o reactivos de Illumina con el hardware de Illumina. Las limitaciones (a) y (b) no se aplican si la documentación o las especificaciones de este producto disponen lo contrario. El comprador acepta no involucrarse en ninguna de las siguientes actividades, ni tampoco autoriza a ningún tercero a involucrarse en ninguna de ellas: (i) desmontar, llevar a cabo ingeniería inversa, compilación inversa o montaje inverso del producto, (ii) separar, extraer o aislar componentes de este producto, o bien someter al producto o a sus componentes a cualquier análisis que no se haya autorizado expresamente en la documentación de este producto, (iii) otorgar acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o intentar determinarlos, o bien (iv) transferir a un tercero, o conceder una sublicencia, en relación con cualquier software o cualquier software de terceros. Además, el comprador acepta que el contenido y los métodos de funcionamiento de este producto son propiedad de Illumina y que este producto contiene o incluye secretos comerciales de Illumina. Las condiciones y restricciones que figuran en estos términos y condiciones se negocian como condiciones de venta y, por tanto, controlan la venta de este producto, así como su uso por parte del comprador.
- 5 **Limitación de responsabilidades.** EN LA MEDIDA EN QUE LO PERMITA LA LEY, EN NINGÚN CASO SE CONSIDERARÁ RESPONSABLE A ILLUMINA NI A SUS PROVEEDORES EN RELACIÓN CON EL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DE LOS COSTES DE GESTIÓN DE SUSTITUCIÓN DE PRODUCTOS O SERVICIOS, DE LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS, DATOS U OPERACIONES COMERCIALES, NI DE NINGÚN DAÑO INDIRECTO, ESPECIAL, ACCIDENTAL, EJEMPLAR, CONSECUENTE O PUNITIVO DE NINGÚN TIPO DERIVADO DE O RELACIONADO CON, ENTRE OTROS, LA VENTA DE ESTE PRODUCTO, SU USO, EL CUMPLIMIENTO DE LAS PRESENTES CONDICIONES POR PARTE DE ILLUMINA NI DE CUALQUIERA DE ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, YA SE DERIVEN O PROCEDAN DE CUALQUIER PRINCIPIO DE RESPONSABILIDAD (BIEN POR CONTRATO, DELITO [INCLUIDA LA NEGLIGENCIA], RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD).
- 6 **LA RESPONSABILIDAD TOTAL Y ACUMULATIVA DE ILLUMINA CON RESPECTO AL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DERIVADA DE, O EN RELACIÓN CON, ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, INCLUIDOS, ENTRE OTROS, ESTE PRODUCTO (INCLUIDO SU USO) Y EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA CONFORME AL PRESENTE DOCUMENTO, YA SEA POR CONTRATO, DELITO (INCLUIDA LA NEGLIGENCIA), RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD, NO SUPERARÁ EN NINGÚN CASO LA CANTIDAD PAGADA A ILLUMINA POR ESTE PRODUCTO.**
- 7 **Limitaciones de las garantías concedidas por Illumina.** EN LA MEDIDA EN QUE LO PERMITA LA LEY Y DE ACUERDO CON LA GARANTÍA EXPRESA DEL PRODUCTO QUE FIGURA EN ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, ILLUMINA NO OTORGA NINGUNA GARANTÍA (Y RENUNCIA DE MANERA EXPRESA A CUALQUIER GARANTÍA), YA SEA EXPRESA, IMPLÍCITA O LEGAL, EN RELACIÓN CON ESTE PRODUCTO, INCLUIDAS ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIABILIDAD, ADECUACIÓN A UN FIN ESPECÍFICO, DE NO INFRACCIÓN O DERIVADA DE UN RENDIMIENTO, ACUERDO, USO O TRANSACCIÓN COMERCIAL. SIN LIMITAR LA GENERALIDAD DE LO DISPUESTO ANTERIORMENTE,

ILLUMINA NO AFIRMA, REPRESENTA NI GARANTIZA DE NINGUNA MANERA LA UTILIDAD DE ESTE PRODUCTO PARA LOS USOS PREVISTOS DEL COMPRADOR.

- 8 **Garantía del producto.** Todas las garantías son personales del comprador y no se pueden transferir ni asignar a un tercero, incluido un afiliado del comprador. Todas las garantías son específicas de las instalaciones y no se transfieren si el producto se traslada a otra instalación del comprador, a menos que Illumina efectúe dicho traslado.
- a **Garantía de los consumibles.** Illumina garantiza que los consumibles, que no sean personalizados, cumplirán sus especificaciones hasta el período mayor de los siguientes: (i) 3 meses a partir de la fecha de envío por parte de Illumina o (ii) la fecha de caducidad o el final de su vida útil impresa previamente en dicho consumible por parte de Illumina; en ningún caso será superior a un período de 12 meses a partir de la fecha de envío. En relación con los consumibles personalizados (es decir, consumibles fabricados de acuerdo con las especificaciones o los diseños elaborados por el comprador o que el comprador, o alguna entidad en su nombre, proporciona a Illumina), Illumina solo garantiza que los consumibles personalizados se fabricarán y probarán de acuerdo con los procesos de control de calidad y fabricación estándar de Illumina. Illumina no garantiza que los consumibles personalizados funcionen de la manera prevista por el comprador o para los usos previstos del comprador.
 - b **Garantía del hardware.** Illumina garantiza que el hardware, que no sean componentes actualizados, cumplirá sus especificaciones durante un período de 12 meses tras la fecha de envío por parte de Illumina, a menos que el hardware incluya la instalación ofrecida por Illumina, en cuyo caso el período de garantía comienza en la fecha de instalación o 30 días después de la fecha de envío, lo que ocurra primero ("Garantía básica del hardware"). El término "componentes actualizados" hace referencia a los componentes, las modificaciones o las mejoras de Illumina en el hardware que el comprador haya adquirido previamente. Illumina garantiza que los componentes actualizados cumplirán sus especificaciones durante un período de 90 días a partir de la fecha de instalación de dichos componentes actualizados. Los componentes actualizados no amplían el período de garantía del hardware a menos que la actualización la haya llevado a cabo Illumina en las instalaciones de Illumina, en cuyo caso el hardware actualizado enviado al comprador incorporará una Garantía básica del hardware.
 - c **Exclusiones de la cobertura de la garantía.** Las anteriores garantías no se aplican en la medida en que el incumplimiento se deba a (i) un abuso, uso indebido, abandono, negligencia, accidente, almacenamiento inadecuado o uso contrario a las disposiciones de la documentación o las especificaciones, (ii) una manipulación, instalación, mantenimiento o reparación indebidos (no realizados por el personal de Illumina), (iii) alteraciones no autorizadas, (iv) sucesos de fuerza mayor, o bien (v) su uso con un producto de terceros no suministrado por Illumina (a menos que la documentación o las especificaciones del producto dispongan de manera expresa que dicho producto de tercero es para su uso con el producto).
 - d **Procedimiento para la cobertura de la garantía.** Con el objeto de ser apto para cualquier servicio de reparación o sustitución conforme a esta garantía, el comprador debe (i) ponerse en contacto con la mayor brevedad posible con el departamento de asistencia de Illumina para informarle del incumplimiento, (ii) cooperar con Illumina en la confirmación o el diagnóstico del incumplimiento y (iii) devolver este producto, con pago previo de los costes de transporte a Illumina de acuerdo con las instrucciones de Illumina o, si se acuerda entre Illumina y el comprador, conceder acceso a este producto al personal de reparación autorizado de Illumina con el objeto de confirmar el incumplimiento y realizar las reparaciones pertinentes.
 - e **Único recurso legal conforme a la garantía.** Según su criterio, Illumina reparará o sustituirá el producto no conforme a las especificaciones que se confirme que está cubierto por esta garantía. Se ofrece una garantía de 30 días para los consumibles reparados o sustituidos. El hardware se puede reparar o sustituir por un hardware o componentes funcionalmente equivalentes, reacondicionados o nuevos (solo si un componente del hardware no cumple las especificaciones). Si el hardware se sustituye en su totalidad, el período de garantía correspondiente a la sustitución es de 90 días a partir de la fecha de envío o el período restante de la garantía del hardware original, lo que sea más breve. Si solo se repara o sustituye un componente, el período de garantía de dicho componente será de 90 días a partir de la fecha de envío o el período restante de la garantía del hardware original, lo que finalice antes.

Las anteriores disposiciones establecen la única solución del comprador y las únicas obligaciones de Illumina conforme a la garantía que se otorga por la presente.

- f **Productos de terceros y garantía.** Illumina no tiene ninguna obligación de garantía en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador de acuerdo con los presentes términos y condiciones. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. La garantía de los productos de terceros, si la hubiera, la proporciona el fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha garantía al comprador.

9 Indemnización.

- a **Indemnización por infracción por parte de Illumina.** Conforme a estos términos y condiciones, incluidas entre otras, las exclusiones de las obligaciones de indemnización de Illumina (sección 9[b] más adelante) y las condiciones de obligación a indemnización (sección 9[d] a continuación), Illumina (i) defenderá, indemnizará y eximirá al comprador frente a cualquier reclamación o demanda de terceros en la que se alegue que este producto, al utilizarse con fines de investigación, de acuerdo con estos términos y condiciones y de acuerdo con la documentación y las especificaciones de este producto, infringe los derechos de propiedad intelectual válidos y ejecutables de un tercero, y (ii) pagará todas las liquidaciones derivadas, y todos los costes y juicios finales (incluidos los honorarios razonables de los abogados) que se le imputen al comprador en relación con dicha reclamación de infracción. Si este producto, o alguna de sus partes, pasa a ser, o según la opinión de Illumina puede ser, el objeto de una reclamación por infracción, Illumina tendrá derecho, según su propio criterio, a (A) conceder al comprador el derecho a continuar utilizando este producto, (B) modificar o sustituir este producto con una sustitución no infractora sustancialmente equivalente, o bien (C) solicitar la devolución de este producto y anular los derechos, la licencia y cualquier otro permiso otorgado al comprador en relación con este producto, así como a reembolsar al comprador el valor depreciado (tal como se muestra en los registros oficiales del comprador) del producto devuelto en el momento de dicha devolución; siempre que, no se otorgue ningún tipo de reembolso para consumibles utilizados o caducados. Esta sección establece la responsabilidad total de Illumina por cualquier infracción de derechos de propiedad intelectual de terceros.
- b **Exclusiones de obligaciones de indemnización por parte de Illumina.** Illumina no tiene la obligación de defender, indemnizar ni eximir al comprador frente a ninguna reclamación por infracción de Illumina en la medida en que dicha infracción se deba a lo siguiente: (i) el uso de este producto de una manera o para un propósito que se encuentre fuera del ámbito de la finalidad de uso para investigación, (ii) el uso de este producto de una manera que no sea conforme a sus especificaciones, su documentación, los derechos concedidos de manera expresa al comprador conforme a estos términos y condiciones, o cualquier infracción por parte del comprador de estos términos y condiciones, (iii) el uso de este producto junto con cualquier otro producto, material o servicio no prestados por Illumina, (iv) el uso de este producto para realizar un ensayo u otro proceso no proporcionado por Illumina, o bien (v) el cumplimiento de las especificaciones o instrucciones por parte de Illumina para este producto que ha proporcionado el comprador, o en su nombre (las condiciones de [i] a [v] se denominan "Reclamación excluida").
- c **Indemnización por parte del comprador.** El comprador defenderá, indemnizará y eximirá a Illumina, sus afiliados, sus colaboradores no afiliados y los socios de desarrollo que contribuyeron al desarrollo de este producto, y a sus directivos, directores, representantes y empleados correspondientes frente a cualquier reclamación, responsabilidad, daño, multa, penas, demanda y pérdida de cualquier tipo, incluidas entre otras, las reclamaciones por daños personales o muerte y la infracción de los derechos de propiedad intelectual de terceros, que se deriven, estén relacionadas o procedan de (i) una infracción por parte del comprador de cualquiera de estos términos y condiciones, (ii) el uso del comprador de este producto fuera del ámbito de su uso para investigación, (iii) cualquier uso de este producto que no sea conforme a las especificaciones o la documentación de este documento, o bien (iv) cualquier Reclamación excluida.

- d **Condiciones para obligaciones de indemnización.** Las obligaciones de indemnización de las partes estarán condicionadas por las siguientes acciones de la parte que solicita la indemnización: (i) notificación inmediata a la otra parte por escrito de dicha reclamación o demanda, (ii) concesión de autorización y control exclusivo a la otra parte sobre la defensa y arreglo de cualquier reclamación o demanda, (iii) no admisión de la infracción de ningún derecho de propiedad intelectual sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte, (iv) la no negociación de ningún acuerdo o compromiso en relación con dicha reclamación o demanda sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte y (v) la prestación de asistencia razonable a la otra parte en la defensa de la reclamación o demanda; siempre que la parte reembolse a la parte indemnizada los gastos razonables complementarios que se deriven de la prestación de dicha asistencia.
- e **Productos de terceros e indemnización.** Illumina no tiene ninguna obligación de indemnización en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. Los derechos de indemnización del comprador, si los hubiera, en relación con los productos de terceros serán conforme a la indemnización del propietario de la patente o del fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha indemnización, si la hubiera, al comprador.

Historial de revisiones

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617_ESP	O	Septiembre de 2014	<p>Se actualizó la siguiente información:</p> <ul style="list-style-type: none">• Novedad en MCS v2.5: actualización de la opción de lavado posterior al experimento para incluir la limpieza del conducto de cadena molde• Actualización de las directrices del lavado posterior al experimento con hipoclorito de sodio en la limpieza del conducto de cadena molde• Adición del volumen de lavado esperado en limpiezas posteriores al experimento <p>Se añadió información de flujo de trabajo de VeriSeq relativa a recursos adicionales, opciones de experimento, opciones de análisis secundario, lavados de instrumentos y color de la tapa de las celdas de flujo.</p>
15027617	N	Junio de 2014	<p>Solo disponible en inglés.</p> <p>Se añadió información relativa al flujo de trabajo de VeriSeq.</p> <p>Se actualizó la información de las métricas de los experimentos en cuanto a densidad y generación de grupos.</p> <p>Se eliminó información sobre el software antivirus. Consulte la <i>Guía de preparación en el centro del sistema MiSeq</i>.</p>
15027617_ESP	M	Enero de 2014	<p>Actualización conforme a un cambio introducido en MCS v2.4:</p> <p>Se añadió la función de empaquetado de registros para enviar archivos de solución de problemas.</p>

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617	L	Octubre de 2013	<p>Solo disponible en inglés.</p> <p>Se añadió el reinicio del software del sistema como fase previa al experimento.</p> <p>Se añadieron tubos de microcentrífuga a la lista de consumibles proporcionados por el usuario.</p> <p>Se eliminó <i>Software MiSeq</i> y ya no consta como capítulo independiente, sino que su contenido quedó repartido por toda la guía.</p> <p>Se eliminó información sobre carpetas de fórmulas personalizadas.</p> <p>Se eliminó información sobre los rangos de densidad de grupos recomendados para los kits de reactivos de MiSeq.</p> <p>Se eliminaron detalles sobre los kits de reactivos de MiSeq y se añadió un resumen de las características de dichos kits. Para obtener información detallada, consulte la documentación de preparación de reactivos correspondiente al kit que utilice.</p> <p>Se añadió contenido a la mención de marcas comerciales.</p>
15027617_ESP	K	Agosto de 2013	Errores de formato corregidos.
15027617	J	Agosto de 2013	<p>Solo disponible en inglés.</p> <p>Descripciones de análisis añadidas para MCS v2.3 y MiSeq Reagent Kit v3.</p> <p>Se actualizó la información siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Compatibilidad del kit de reactivos y de la versión para incluir MiSeq Reagent Kit v3 • Descripción de la carpeta de fórmulas personalizadas para incluir una subcarpeta v3 • Rango de densidades de grupo cambiado para v2; rango añadido para v3 • Ruta de salida para los archivos de imágenes <p>Códigos de barras de celdas de flujo corregidos para celdas de flujo nano (D) y celdas de flujo micro (G)</p> <p>Información eliminada sobre el kit de reactivos de MiSeq, incluidos el contenido y los tipos de celdas de flujo. Para obtener más información, consulte la <i>Guía de preparación de reactivos de MiSeq</i> (n.º de referencia 15044983).</p>

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617_ESP	H	Marzo de 2013	<p>Se añadió una sección titulada <i>Conceptos de MiSeq</i> que introduce el flujo de trabajo del análisis, el archivo de manifiesto y la hoja de muestras.</p> <p>Se eliminó información sobre la generación del archivo FASTQ, los formatos del archivo de manifiesto, los detalles del flujo de trabajo del análisis y los detalles de la hoja de muestras. Para obtener información sobre estos temas, consulte la <i>Guía del usuario de MiSeq Reporter</i>, n.º de referencia 15028784 o la <i>Guía de referencia rápida de la hoja de muestras de MiSeq</i>, n.º de referencia 15028392.</p> <p>Se han eliminado instrucciones para preparar cebadores personalizados. Para obtener información adicional, consulte <i>Uso de cebadores personalizados en MiSeq</i>, n.º de referencia 15041638.</p>
15027617	G	Enero de 2013	<p>Solo disponible en inglés.</p> <p>Se han eliminado instrucciones para desnaturalizar y diluir bibliotecas de ADN, y preparar un control PhiX de Illumina. Consulte <i>Preparación de bibliotecas de ADN para la secuenciación en MiSeq</i>, n.º de referencia 15039740.</p> <p>Instrucciones actualizadas de lavado del instrumento para añadir 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio, en lugar de 500 ml de agua de laboratorio.</p>

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617_ESP	F	Noviembre de 2012	<p>Se añadió la información nueva siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se añadieron las descripciones de los nuevos kits de reactivos de MiSeq: Kit nano de reactivo MiSeq y Kit micro de reactivo MiSeq. • Se añadió la descripción general de los tipos de celdas de flujo. • Se añadió la descripción del flujo de trabajo del análisis de enriquecimiento. <p>Se actualizó la información siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Novedades de MCS v2.1, se actualizó la pantalla Perform Wash (Realizar lavado) para añadir una opción de lavado posterior al experimento y un comando para levantar los dispensadores. • Se actualizó la tabla de compatibilidad de versiones para incluir las dependencias de los kits nano y micro. • Se actualizó la información sobre compatibilidad de versiones para incluir nuevos kit de reactivos.
15027617	E	Octubre de 2012	<p>Solo disponible en inglés.</p> <p>Se actualizó la información siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se corrigieron las instrucciones de preparación de controles PhiX y la densidad de grupos prevista para los controles PhiX preparados, con el nuevo valor 1000–1200 K/mm². • Se constató que el procedimiento de desnaturalización y dilución de las bibliotecas <i>Preparación de las bibliotecas</i>, no se aplica a las bibliotecas de Nextera XT ni a las bibliotecas de TruSeq Amplicon. • Se cambió el nombre de actualización del paquete de ampliación de MiSeq a MiSeq hardware upgrade (Actualización de hardware de MiSeq). • Se añadió la <i>Guía del usuario de MiSeq Reporter</i> a la lista de recursos adicionales.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617_ESP	D	Julio de 2012	<p>Se actualizaron las descripciones de software a MCS v2.0. Se añadió la información nueva siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se añadió una sección titulada <i>Novedades de MCS</i> para describir las nuevas funciones de software, los cambios en la interfaz y los cambios en el flujo de trabajo. • Se añadió el número de catálogo y la descripción del MiSeq Reagent Kit v2, 500 ciclos. • Se añadió la sección sobre compatibilidad y requisitos de la versión. • Se añadió la descripción del paquete de ampliación de MiSeq, necesario para digitalización de la celda de flujo de superficie doble de 14 placas. • Se añadió una descripción de la numeración de las placas de la celda de flujo de superficie doble. • Se añadió el flujo de trabajo del análisis PCR Amplicon (Amplicón de PCR) para bibliotecas Nextera XT. • Se añadió el uso de Tween 20 al 10 % en procedimientos de lavado y volúmenes de lavado esperados. • Se añadió la versión del cartucho de reactivo al procedimiento de fallo de lectura de RFID. <p>Se actualizó la información siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se cambiaron los acrónimos de reactivos de IMF, CMF y AMX a los nombres de reactivos de la v2 IMS, CMS y AMS, respectivamente. • Se cambió la concentración de PhiX de 8 pM a 12,5 pM. • Se cambió la concentración máxima recomendada de NaOH a 1 mM en la solución final. • Se añadió que es necesario un lavado de mantenimiento para sacar el instrumento del modo en espera y comenzar los pasos de configuración para un experimento posterior. • Se eliminó la sección Parámetros de la hoja de muestras y el paso de configuración de la hoja de muestras del flujo de trabajo. Illumina recomienda crear la hoja de muestras antes de preparar las muestras. Consulte la <i>Guía de referencia rápida de la hoja de muestras de MiSeq</i>, n.º de referencia 15028392, y la <i>Guía del usuario de Illumina Experiment Manager</i>, n.º de referencia 15031335.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617	C	Abril de 2012	<p>Solo disponible en inglés.</p> <p>Se actualizaron las descripciones de software a MCS v1.2.</p> <p>Se añadieron los nuevos procedimientos y las secciones siguientes: Descripción general de BaseSpace, Uso de cebadores personalizados, Generación de archivos FASTQ, Solución de problemas de errores de velocidad de flujo, Realización de una prueba de volumen, Realización de un lavado de mantenimiento e Inactividad del instrumento, que incluye un lavado en modo en espera.</p> <p>Se actualizó la información siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se actualizó el nombre del flujo de trabajo Amplicon (Amplicón) a Custom Amplicon (Amplicón personalizado); se actualizó el nombre del flujo de trabajo DenovoAssembly (ConjuntoDenovo) a Assembly (Conjunto); se añadió el flujo de trabajo GenerateFASTQ (GenerarFASTQ). • Se añadieron descripciones de archivos y carpetas de experimentos; se actualizó la nomenclatura de las carpetas de experimentos; se añadió el tamaño de archivo de resultados. • Se incluyó la carpeta de genoma como elemento obligatorio para la secuenciación de amplicón en los parámetros de la hoja de muestras. • Se añadieron instrucciones para diluir NaOH con el fin de desnaturalizar bibliotecas. • Se actualizó la resolución del fallo de lectura de RFID para que incluya las instrucciones de automantenimiento de MiSeq. • Se incluyeron los archivos y las carpetas utilizados para la solución de problemas de rendimiento de los experimentos.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15027617_ESP	B	Diciembre de 2011	<p>Se actualizaron las descripciones de software a MCS v1.1. Se añadió información sobre la protección antivirus. Se actualizó la información siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instrucciones para resolver el fallo de RFID. • Preparación de bibliotecas: Cambio a 0,2 N NaOH. • Convención de nomenclatura de las carpetas de experimentos. • Espacio de disco y capacidad de almacenamiento necesarios. • Pasos de configuración de experimentos: Se añadió más información a "Configuración de la hoja de muestras". • Pasos de configuración de experimentos: Se añadió una nota sobre la eliminación del PR2 restante. • Duración del análisis: Añadido cuando el análisis supera las 2 horas. • Requisitos de entrada de análisis: Se incluyeron los archivos de manifiesto como obligatorios para las bibliotecas TruSeq Custom Amplicon (Amplicón personalizado de TruSeq). • Tamaño del tubo de HT1 corregido en el contenido del MiSeq Reagent Kit. • Se modificaron las referencias de iCom a MyIllumina.
15027617	A	Septiembre de 2011	Solo disponible en inglés. Versión original

Tabla de contenidos

Historial de revisiones	ix
Tabla de contenidos	xvii
Capítulo 1 Primeros pasos	1
Introducción	2
Componentes	5
Resumen del kit de reactivos de MiSeq	10
Consumibles proporcionados por el usuario	11
Inicio del sistema MiSeq	13
Conceptos de MiSeq	14
Software MiSeq	15
Opciones de análisis secundario	29
Carpetas del experimento	32
Espacio en disco requerido	35
Capítulo 2 Realización de un experimento	37
Introducción	38
Flujo de trabajo de MiSeq	39
Carga de bibliotecas de muestras	41
Configuración de un experimento con MCS	43
Limpieza de la celda de flujo	44
Carga de la celda de flujo	47
Carga de reactivos	49
Inicio del experimento	53
Supervisión del experimento	55
Capítulo 3 Procedimientos de mantenimiento	61
Introducción	62
Lavados del instrumento	65
Realización de un lavado posterior al experimento	67
Realización de un lavado de mantenimiento	73
Realización de un lavado en modo en espera	77
Actualizaciones de software	80
Apagado del instrumento	81

Capítulo 4 Solución de problemas	83
Introducción	84
Empaquetado de registros para solucionar problemas	85
Configuración del software	87
Pausa o detención de un experimento	91
Resolución de errores de configuración de experimentos	94
Resolución del error de lectura de RFID	96
Solución de problemas de velocidad de flujo	98
Realización de una prueba de volumen	99
Medición de los volúmenes de lavado esperados	103
Índice	105
Asistencia técnica	109

Primeros pasos

Introducción	2
Componentes	5
Resumen del kit de reactivos de MiSeq	10
Consumibles proporcionados por el usuario	11
Inicio del sistema MiSeq	13
Conceptos de MiSeq	14
Software MiSeq	15
Opciones de análisis secundario	29
Carpetas del experimento	32
Espacio en disco requerido	35



Introducción

El sistema MiSeq® de Illumina combina tecnología probada de secuenciación por síntesis (SBS) con un flujo de trabajo revolucionario que permite pasar del ADN a los datos analizados en tan solo ocho horas. MiSeq integra la generación de grupos, la secuenciación y el análisis de datos en un solo instrumento.

Funciones

- ▶ **Walkaway automation** (Automatización del proceso): Después de configurar el experimento, que incluye la carga del cartucho de reactivo precargado, la botella del tampón y la celda de flujo, no se requiere participación activa adicional.
- ▶ **Pre-filled reagent cartridge** (Cartucho de reactivo precargado): Un cartucho de reactivo precargado de un solo uso con un diseño especial proporciona reactivos para la secuenciación y generación de grupos, incluidos los reactivos de secuenciación "paired-end" y los de indexación. El seguimiento integrado de identificación de radiofrecuencia (RFID) permite el seguimiento preciso de consumibles.
- ▶ **Interface controls** (Controles de interfaz): La interfaz de Software MiSeq Control (MCS) proporciona controles para configurar el instrumento, configurar y controlar los experimentos, y realizar procedimientos de mantenimiento.
- ▶ **Convenient flow cell loading** (Fácil carga de celdas de flujo): Un mecanismo de abrazadera posiciona automáticamente la celda de flujo mientras se carga en el instrumento. El seguimiento integrado de identificación de radiofrecuencia (RFID) permite el seguimiento preciso de consumibles.
- ▶ **Innovative fluidics architecture** (Arquitectura innovadora del sistema de fluídica): El sistema de fluídica de MiSeq aporta una eficacia incomparable en la duración del ciclo de química durante la secuenciación.
- ▶ **Análisis en tiempo real (RTA)**: El software integrado del análisis principal lleva a cabo un análisis de datos integrado en el instrumento en tiempo real durante el experimento de secuenciación, que incluye el análisis de imágenes y las llamadas de bases, y ahorra un tiempo muy valioso en los análisis sucesivos.
- ▶ **MiSeq Reporter**: El software integrado de análisis secundario procesa los datos del análisis principal para realizar una alineación y proporcionar información sobre cada muestra analizada.

Recursos adicionales

La documentación siguiente está disponible para su descarga del sitio web de Illumina.

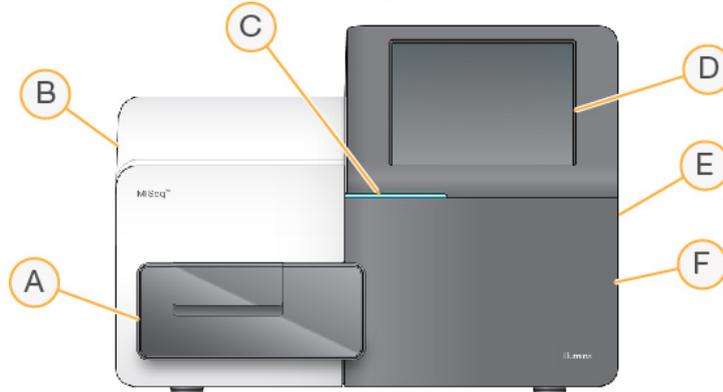
Recurso	Descripción
Guía de preparación en el centro del sistema MiSeq	Proporciona especificaciones para el espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales.
Guía de cumplimiento y seguridad del sistema MiSeq	Proporciona información sobre el etiquetado del instrumento, las certificaciones de conformidad y las consideraciones de seguridad.
Tarjetas de referencia rápida del flujo de trabajo de MiSeq	Proporciona una representación gráfica de dos páginas del flujo de trabajo para el usuario experimentado. Las tarjetas de referencia rápida resumen la preparación de muestras, la configuración del experimento y la supervisión del experimento, y proporcionan una descripción general del análisis realizado por MiSeq Reporter.
Guía del usuario de Illumina Experiment Manager	Proporciona instrucciones para la creación de placas de muestras y hojas de muestras para diferentes flujos de trabajo y tipos de bibliotecas. Illumina le recomienda que cree su hoja de muestras durante el paso de preparación de muestras.
Guía de referencia del gestor de flujo de trabajo de BlueFuse	Proporciona instrucciones para la creación de placas de muestras y hojas de muestras para clientes que realicen el flujo de trabajo de VeriSeq. Illumina le recomienda que cree su hoja de muestras durante el paso de preparación de muestras.
Guía de referencia rápida de la hoja de muestras de MiSeq	Proporciona información sobre cómo añadir ajustes de la hoja de muestras a su hoja de muestras.
Guía de preparación de reactivos de MiSeq	Proporciona una descripción del contenido del kit e instrucciones para preparar el cartucho de reactivo antes de comenzar el experimento de secuenciación.
Preparación de bibliotecas de ADN para la secuenciación en MiSeq	Proporciona instrucciones para la desnaturalización y dilución de bibliotecas de muestras preparadas antes de la secuenciación en MiSeq y la preparación de un control PhiX. Este paso se aplica a la mayoría de los tipos de bibliotecas.

Recurso	Descripción
Uso de cebadores personalizados en MiSeq	Proporciona instrucciones para la preparación y carga de cebadores personalizados, así como para la edición de la hoja de muestras para los cebadores personalizados.
Guía del usuario de MiSeq Reporter	Proporciona una descripción general completa de los procedimientos de análisis, los flujos de trabajo de análisis y los archivos de resultados generados por MiSeq Reporter, así como de los requisitos y de las instrucciones de instalación fuera del instrumento; también proporciona información sobre la solución de problemas.
Guía de referencia de BlueFuse Multi	Para los clientes que realicen el flujo de trabajo de VeriSeq, ofrece una descripción general completa de los procedimientos del análisis, los flujos de datos del análisis y los archivos generados por BlueFuse Multi, así como los requisitos informáticos e información sobre la solución de problemas.
Ayuda en línea de MiSeq Reporter	Proporciona instrucciones para utilizar el software MiSeq Reporter.
Ayuda en línea de BaseSpace	Proporciona instrucciones sobre el uso de BaseSpace y descripciones de los gráficos generados para cada flujo de trabajo del análisis.

Visite la página del servicio de asistencia técnica de Sistema MiSeq del sitio web de Illumina para acceder a la documentación, las descargas de software, la formación en línea y las preguntas frecuentes.

Componentes

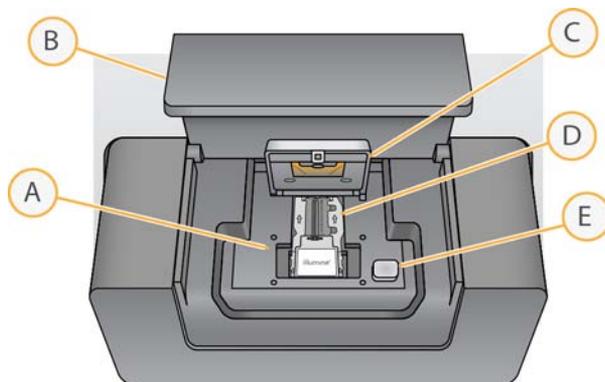
MiSeq consta de los siguientes componentes exteriores:



- A** **Compartimento de la celda de flujo:** contiene la platina de la celda de flujo que alberga la celda de flujo durante el experimento. Los motores de la platina de celdas de flujo sacan la platina del módulo óptico cerrado para la carga de celdas de flujo y la devuelven a su sitio cuando empieza el experimento.
- B** **Módulo óptico cerrado:** contiene componentes ópticos que permiten la captura de imágenes de la celda de flujo.
- C** **Barra de estado:** utiliza tres colores para indicar el estado del instrumento. El azul indica que el instrumento está en funcionamiento, el naranja indica que el instrumento necesita atención y el verde indica que el instrumento está listo para empezar el siguiente experimento.
- D** **Monitor de pantalla táctil:** permite la configuración integrada en el instrumento y la configuración del experimento utilizando la interfaz del software.
- E** **Puertos USB externos:** facilitan la transferencia de los archivos y los datos al ordenador del instrumento desde el monitor de pantalla táctil.
- F** **Compartimento de reactivos:** mantiene los reactivos a las temperaturas adecuadas, las soluciones de lavado y la botella de residuos. La puerta del compartimento de reactivos se asegura mediante un cierre magnético.

La interfaz de MiSeq le guía a través de los pasos de configuración del experimento mediante el monitor de pantalla táctil. Para cargar los componentes del experimento, debe acceder al compartimento de reactivos y al compartimento de la celda de flujo.

Compartimento de la celda de flujo

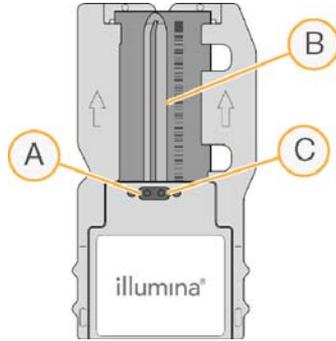


- A Platina de la celda de flujo
- B Puerta del compartimento de la celda de flujo
- C Cierre de la celda de flujo
- D Celda de flujo
- E Botón de apertura del cierre de la celda de flujo

El compartimento de la celda de flujo contiene la platina de la celda de flujo, la estación térmica y las conexiones de fluídica para la celda de flujo. La platina de la celda de flujo sostiene la celda de flujo, y el cierre la fija y la posiciona. Una vez que se cierra la celda de flujo, queda posicionada automáticamente mediante dos pasadores situados cerca de la bisagra del cierre.

La estación térmica, situada bajo la platina de la celda de flujo, controla los cambios de temperatura de la celda de flujo y es necesaria para generar y secuenciar grupos.

Celda de flujo



- A Puerto de salida
- B Área de digitalización
- C Puerto de entrada

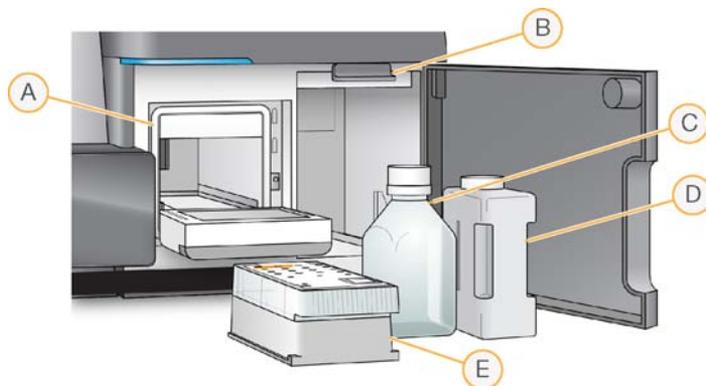
La celda de flujo de MiSeq es un sustrato de vidrio, de un solo uso, en el que se generan grupos y se lleva a cabo la reacción de secuenciación.

Los reactivos entran en la celda de flujo a través del puerto de entrada, pasan por el área de digitalización de carril único y salen de la celda de flujo por el puerto de salida. Los residuos que salen de la celda de flujo se depositan en la botella de residuos.

Se cargan las muestras en el cartucho de reactivo antes de configurar el experimento y, después, se transfieren automáticamente a la celda de flujo, tras empezar el experimento.

Durante el experimento de secuenciación, el carril único se digitaliza en pequeñas áreas de digitalización, llamadas placas. Todas las celdas de flujo de MiSeq tienen un único carril, pero el número de placas difiere según el tipo de celda de flujo que utilice.

Compartimento de reactivos



- A Refrigerador de reactivos
- B Mango del dispensador (se muestra en posición elevada)
- C Botella de PR2
- D Botella de residuos
- E Cartucho de reactivo

El compartimento de reactivos contiene el refrigerador de reactivos y las posiciones para la botella del tampón de lavado (PR2) y la botella de residuos.

El refrigerador de reactivos sujeta un cartucho de reactivo de un solo uso durante el experimento. Durante el lavado del instrumento, sujeta la bandeja de lavado. El software baja automáticamente los dispensadores al interior del depósito del cartucho de reactivo en el momento adecuado del experimento, en función del proceso que se esté realizando.

A la derecha del refrigerador de reactivos hay dos ranuras que se adaptan a la forma de las botellas de PR2 y de residuos. El mango del dispensador bloquea las botellas en su sitio y baja el dispensador adecuado al interior de cada botella. Los reactivos se bombearán por los dispensadores, los conductos de fluidica y, a continuación, la celda de flujo. El residuo de reactivo se enviará a la botella de residuos durante el proceso.

Cartucho de reactivo

El cartucho de reactivo de MiSeq es un consumible de un solo uso que consta de depósitos con sellos metálicos precargados con reactivos de secuenciación y de generación de grupos suficientes para la secuenciación de una celda de flujo.

Todos los depósitos del cartucho están numerados. Las bibliotecas de muestras se cargan en el cartucho en la posición 17, etiquetada como **Load Samples** (Carga de muestras).

Resumen del kit de reactivos de MiSeq

Para realizar un experimento en MiSeq, necesita un kit de reactivos de MiSeq de un solo uso, disponible en varios tipos y tamaños. Cada tipo de kit de reactivos de MiSeq incluye un tipo de celda de flujo específico del kit y todos los reactivos necesarios para realizar un experimento.

La celda de flujo, la botella de PR2 y el cartucho de reactivo incluidos en el kit utilizan la identificación por radiofrecuencia (RFID) para ofrecer precisión en la compatibilidad y el seguimiento de los consumibles.

Deberá utilizar siempre el cartucho de reactivo asociado a su tipo de celda de flujo. Si el cartucho de reactivo no es compatible, aparecerá un mensaje durante la configuración del experimento que le indicará que cargue un cartucho de reactivo compatible.

Para obtener una descripción de los kits de reactivos disponibles, visite el sitio web de Illumina en support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.ilmn.

Para obtener información sobre el contenido y los requisitos de los kits, consulte la documentación de preparación de reactivos correspondiente al kit que utilice.

Consumibles proporcionados por el usuario

Antes de iniciar un experimento, asegúrese de que estén disponibles los siguientes consumibles proporcionados por el usuario.

Consumible	Proveedor	Propósito
Preparado de 1,0 N NaOH para biología molecular	Proveedor de laboratorio general	Desnaturalización de bibliotecas de muestras y ADN de control PhiX
Paños humedecidos en alcohol isopropilo al 70 % o etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714* Proveedor de laboratorio general	Limpieza del soporte de la celda de flujo
Guantes desechables, sin polvo	Proveedor de laboratorio general	Uso general
Toallita de laboratorio, sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026*	Limpieza de la platina de la celda de flujo y del sello metálico que cubre el depósito de carga de muestras
Toallitas limpiantes, 4 in x 6 in	VWR, n.º de catálogo 52846-001*	Limpieza de la celda de flujo
Tubo de microcentrífuga	Proveedor de laboratorio general	Desnaturalización y dilución de bibliotecas de muestras y ADN de control PhiX
Hipocloruro sódico	Proveedor de laboratorio general	Limpieza del conducto de cadena molde para su empleo en el flujo de trabajo de VeriSeq (opcional para otros flujos de trabajo)
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Limpieza del instrumento
Pinzas de plástico de punta cuadrada (opcionales)	McMaster-Carr, n.º de catálogo 7003A22*	Extracción de la celda de flujo del contenedor de transporte de celdas de flujo
Agua de laboratorio	Proveedor de laboratorio general	Limpieza del instrumento

* o equivalente

Directrices para el agua de laboratorio

Utilice siempre agua de laboratorio para los procedimientos del instrumento. No utilice nunca agua de grifo ni desionizada.

A continuación, se proporcionan ejemplos de agua de laboratorio aceptable:

- ▶ Illumina PW1
- ▶ Agua de 18 Megohmios (M Ω)
- ▶ Agua Milli-Q
- ▶ Agua Super-Q
- ▶ Agua de biología molecular

Inicio del sistema MiSeq

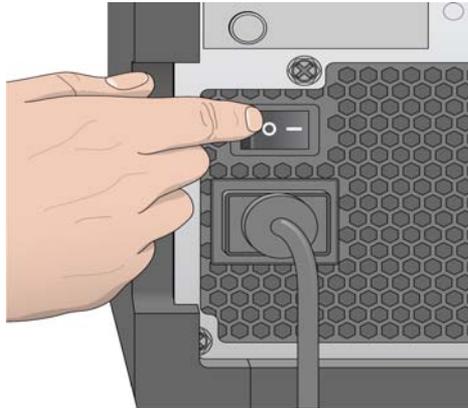


NOTA

Ilumina recomienda dejar siempre encendido el instrumento. Sin embargo, si es preciso apagar el instrumento, siga el procedimiento de apagado descrito en *Apagado del instrumento* en la página 81. Espere como **mínimo** 60 segundos antes de volver a poner el interruptor de encendido en la posición ON (Encendido).

- 1 Si MiSeq todavía no está encendido, inspeccione el lateral derecho del instrumento para ubicar el interruptor de encendido del panel trasero. Está situado en la esquina inferior, directamente encima del cable de alimentación.

Figura 1 Ubicación del interruptor de encendido



- 2 Ponga el interruptor principal en la posición **ON** (Encendido). El ordenador integrado del instrumento se iniciará.
- 3 Inicie sesión en el sistema operativo con el nombre de usuario y la contraseña predeterminados.
 - Nombre de usuario: sbsuser
 - Contraseña: sbs123

Espere hasta que el sistema operativo se haya cargado completamente. Cuando el sistema esté preparado, Software MiSeq Control (MCS) se iniciará e inicializará el sistema automáticamente.

Una vez completado el paso de inicialización, aparecerá la pantalla Welcome (Bienvenida).

Conceptos de MiSeq

Los conceptos y términos siguientes son comunes para los pasos de configuración del experimento en MiSeq.

Concepto	Descripción
Flujo de trabajo del análisis	Procedimiento del análisis secundario realizado por MiSeq Reporter. El flujo de trabajo del análisis de cada experimento se especifica en la hoja de muestras.
Manifiesto	Archivo que especifica el genoma de referencia y las regiones de referencia objetivo que se deben utilizar en el paso de alineación. En el caso de los flujos de trabajo que requieren un manifiesto, el archivo de manifiesto se especifica en la hoja de muestras y se copia en la carpeta de manifiesto designada en MCS.
Genoma de referencia	Archivo de formato FASTA que contiene las secuencias de genoma usadas durante el análisis. En el caso de la mayoría de los flujos de trabajo del análisis, el archivo del genoma de referencia se especifica en la hoja de muestras.
Carpeta del experimento	Estructura de carpetas que contiene el software de análisis principal RTA (carpeta ResultadoMiSeq) o carpeta que contiene MiSeq Reporter (MiSeqAnalysis). Para obtener información adicional, consulte <i>Carpetas del experimento</i> en la página 32.
Hoja de muestras	Archivo de valores separados por comas (*.csv) que almacena la información necesaria para configurar y analizar un experimento de secuenciación, incluida una lista de muestras y sus secuencias de índice. La hoja de muestras debe proporcionarse durante los pasos de configuración del experimento en MiSeq. Una vez iniciado el experimento, se cambia el nombre de la hoja de muestras a SampleSheet.csv y se copia en las carpetas de experimentos: MiSeqTemp, MiSeqOutput y MiSeqAnalysis.

Para obtener información adicional sobre los flujos de trabajo del análisis y los formatos de archivo de manifiesto, consulte la *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15042295).

Para obtener más información sobre las hojas de muestras, consulte la *Guía de referencia rápida de la hoja de muestras de MiSeq* (n.º de referencia 15028392).

Software MiSeq

Hay tres aplicaciones de software preinstaladas en el ordenador del instrumento:

- ▶ **Software MiSeq Control (MCS):** controla el funcionamiento del instrumento. La interfaz de Software MiSeq Control (MCS) le guía por los pasos para cargar la celda de flujo y los reactivos antes de iniciar el experimento. A medida que el experimento avanza, se muestra un resumen de las estadísticas de calidad. Durante el experimento, MCS activa la platina de la celda de flujo, dispensa reactivos, controla la temperatura de la celda de flujo y captura imágenes de los grupos de la celda de flujo. MCS lleva a cabo el experimento en función de los parámetros especificados en la hoja de muestras.
- ▶ **Software de análisis en tiempo real (RTA):** realiza el análisis principal. El análisis en tiempo real (RTA) es un software de análisis principal integrado que analiza imágenes y realiza llamadas de bases, y asigna una puntuación de calidad a cada base para cada ciclo. Las imágenes se almacenan temporalmente en la carpeta del experimento para su procesamiento con RTA y, a continuación, se eliminan automáticamente cuando el análisis de RTA finaliza.
- ▶ **MiSeq Reporter:** realiza el análisis secundario. El software de análisis MiSeq Reporter procesa las llamadas de bases generadas durante el análisis principal y proporciona información sobre la alineación, las variantes y los conjuntos de cóntigos para cada genoma solicitado. El flujo de trabajo de análisis especificado en la hoja de muestras determina el tipo de análisis realizado. Para obtener información adicional, consulte *Descripción general de MiSeq Reporter* en la página 31.

El software opcional utilizado fuera del instrumento incluye el visor del análisis de secuenciación (SAV). Para obtener información adicional, consulte *Visor del análisis de secuenciación* en la página 27.

Pantalla Welcome (Bienvenida)

La interfaz de MCS se abre en la pantalla Welcome (Bienvenida) cuando se inicia el software.

Figura 2 Pantalla Welcome (Bienvenida)



- ▶ **Sequence** (Secuenciar): esta opción abre una serie de pantallas de configuración del experimento que le guiarán por los pasos de configuración. Consulte *Pantallas de configuración del experimento* en la página 18.
- ▶ **Perform Wash** (Realizar lavado): proporciona opciones para iniciar dos tipos de lavados de instrumento, un lavado de mantenimiento o un lavado en modo en espera. Consulte *Lavados del instrumento* en la página 65.
- ▶ **Manage Files** (Administrar archivos): permite mover, eliminar y cargar archivos en el ordenador del instrumento. Consulte *Pantalla Manage Files (Administrar archivos)* en la página 19.
- ▶ **Run Options** (Opciones de experimento): proporciona opciones para el lavado posterior al experimento, el cambio de las ubicaciones predeterminadas de las carpetas de datos y la especificación de las preferencias de notificaciones por correo electrónico. Consulte *Pantalla Run Options (Opciones de experimento)* en la página 22.
- ▶ **Manage Instrument** (Administrar instrumento): proporciona opciones para ir a la configuración del sistema, realizar una comprobación del sistema, actualizar manualmente el software y reiniciar o apagar el instrumento. Consulte *Pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento)* en la página 26.
- ▶ **Updates Available** (Actualizaciones disponibles): esta opción aparece en la pantalla Welcome (Bienvenida) solo si hay una actualización de software disponible.

MiSeq debe estar conectado a una red con acceso a Internet para que se active esta opción. Consulte *Actualizaciones de software* en la página 80.

Indicadores de actividad

Todas las pantallas de la interfaz presentan una serie de iconos en la esquina inferior derecha. Cada icono es un indicador de actividad que muestra qué actividad está realizando el instrumento.

Figura 3 Indicadores de actividad



De izquierda a derecha, los indicadores de actividad representan las siguientes actividades:

- ▶ Movimiento de la platina Y
- ▶ Movimiento de la platina Z
- ▶ Activación de la funcionalidad de los componentes electrónicos
- ▶ Uso de la cámara
- ▶ Bombeo por el sistema de fluídica

Indicadores del sensor

Existen cuatro indicadores del sensor en la base de cada pantalla de la interfaz y cada uno representa el estado de un componente del instrumento.

Figura 4 Indicadores del sensor



De izquierda a derecha, los indicadores del sensor representan los siguientes componentes:

- ▶ Puerta del compartimento de la celda de flujo en las posiciones abierta o cerrada
- ▶ Temperatura del refrigerador de reactivos en °C
- ▶ Temperatura de la celda de flujo en °C
- ▶ Estado de la conexión de BaseSpace® (se muestra no conectado)

Iconos de estado

En la esquina superior derecha de la pantalla Welcome (Bienvenida) verá un icono de estado que le notificará de los cambios de las condiciones durante la configuración del experimento o durante el experimento.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado correcto	No hay cambios. El sistema está normal.
	Atención	Información importante. Se recomienda realizar una acción.
	Advertencia	Las advertencias no detienen un experimento. Sin embargo, algunas podrían requerir una acción antes de continuar.
	Error	Los errores normalmente detienen los experimentos y suelen requerir acciones antes de continuar con el experimento.

Cuando se produce un cambio de estado, el icono cambia a la imagen asociada y parpadea para avisarle. Seleccione el icono para abrir la ventana de estado y visualizar una descripción de la condición.

- ▶ Seleccione cualquier elemento de la lista para ver una descripción detallada del estado, así como las instrucciones para resolver el problema, si lo hay.
- ▶ Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para aceptar el mensaje y **Close** (Cerrar) para cerrar el cuadro de diálogo.

Puede filtrar los tipos de mensaje que desea que aparezcan en la ventana de estados seleccionando los iconos situados a lo largo del margen superior de la ventana. Al seleccionar un icono se muestra o se oculta el estado.

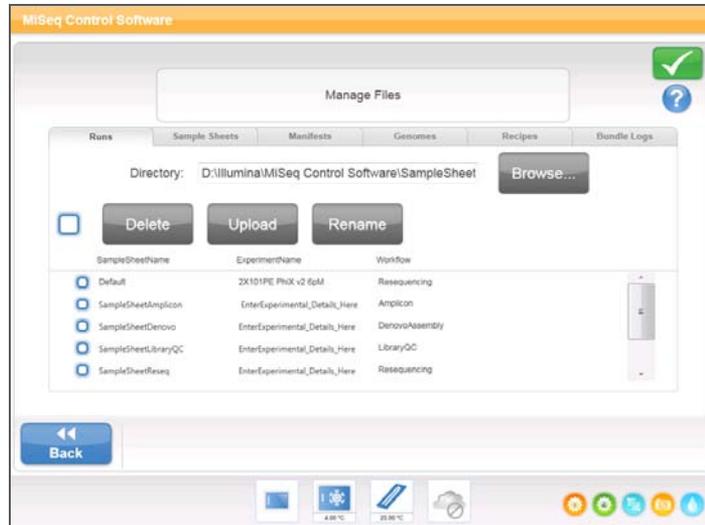
Pantallas de configuración del experimento

Al seleccionar **Sequence** (Secuenciar) en la pantalla Welcome (Bienvenida), se abrirá una serie de pantallas de configuración del experimento en el siguiente orden: BaseSpace Option (Opción BaseSpace), Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), Load Reagents (Cargar reactivos), Review (Revisar) y Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento). Para obtener más información, consulte *Configuración de un experimento con MCS* en la página 43.

Pantalla Manage Files (Administrar archivos)

Utilice la función Manage Files (Administrar archivos) para mover, cargar o eliminar archivos en el ordenador del instrumento. La pantalla se divide en seis fichas: Runs (Experimentos), Sample Sheets (Hojas de muestras), Manifests (Manifiestos), Genomes (Genomas), Recipes (Fórmulas) y Bundle Logs (Empaquetar registros).

Figura 5 Pantalla Manage Files (Administrar archivos)



Opciones de Manage Files (Administrar archivos)

Desde cualquier ficha de la pantalla Manage Files (Administrar archivos), seleccione **Browse** (Examinar) para navegar hasta cualquier archivo accesible para el instrumento.

Ficha	Funciones
Runs (Experimentos)	Delete (Eliminar) o Move (Mover)
Sample Sheets (Hojas de muestras)	Delete (Eliminar), Upload (Cargar) o Rename (Renombrar)
Manifests (Manifiestos)	Delete (Eliminar) o Upload (Cargar)
Genomes (Genomas)	Delete (Eliminar) o Upload (Cargar)
Recipes (Fórmulas)	Delete (Eliminar) o Upload (Cargar)
Bundle Logs (Empaquetar registros)	Bundle Logs (Empaquetar registros)

- ▶ **Delete** (Eliminar): seleccione la casilla de verificación situada junto al archivo o la carpeta recogida y, a continuación, seleccione **Delete** (Eliminar). La función Delete (Eliminar) está disponible en todas las fichas, excepto en Bundle Logs (Empaquetar registros).
- ▶ **Move** (Mover): solo está disponible para las carpetas de experimentos. Seleccione la casilla de verificación situada junto al nombre de la carpeta, seleccione **Move** (Mover) y, a continuación, vaya hasta una ubicación adecuada. **Move** (Mover) *copia* la carpeta del experimento en la nueva ubicación y, a continuación, *elimina* la carpeta de su ubicación anterior.
- ▶ **Select All Files** (Seleccionar todos los archivos): seleccione la casilla de verificación situada a la izquierda del botón Delete (Eliminar) y, a continuación, escoja una acción: Delete (Eliminar) o Move (Mover). La acción se aplicará a todos los archivos o carpetas.
- ▶ **Upload Files** (Cargar archivos): disponible para hojas de muestras, manifiestos, genomas y fórmulas. Si el sistema MiSeq no está conectado a una red, utilice esta función para cargar archivos al ordenador del instrumento desde una unidad USB. Seleccione **Upload** (Cargar) y vaya hasta la ubicación de la unidad USB donde esté

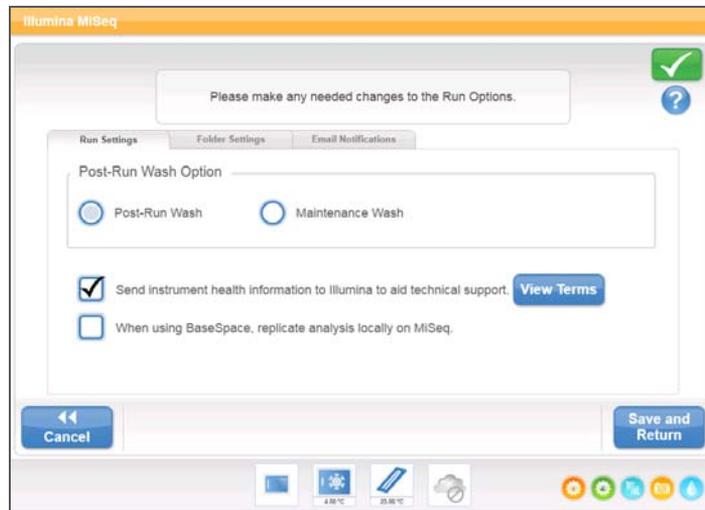
alojado el archivo. El archivo se cargará en la carpeta indicada en el campo Directory (Directorio).

- ▶ **Rename** (Renombrar): disponible únicamente para hojas de muestras. Seleccione la casilla de verificación del archivo de hoja de muestras y, a continuación, seleccione **Rename** (Renombrar). Utilice el teclado en pantalla para cambiar el nombre de la hoja de muestras.
- ▶ **Bundle Logs** (Empaquetar registros): combina y empaqueta en un archivo ZIP los grupos de archivos que requiere el servicio de asistencia técnica de Illumina para solucionar problemas. Para obtener más información, consulte *Empaquetado de registros para solucionar problemas* en la página 85.

Pantalla Run Options (Opciones de experimento)

La pantalla Run Options (Opciones de experimento) tiene tres fichas para especificar la configuración predeterminada de un experimento: Run Settings (Configuración de experimento), Folder Settings (Configuración de carpeta) y Email Notifications (Notificaciones por correo electrónico).

Figura 6 Ficha Run Settings (Configuración de experimento) en la pantalla Run Options (Opciones de experimento)



Ficha Run Settings (Configuración de experimento)

- ▶ **Post-Run Wash Option** (Opción de lavado posterior al experimento): se debe realizar un lavado del instrumento después de cada experimento. El software requiere que se realice un lavado antes de la configuración de un experimento posterior. Puede especificar el tipo de lavado que se realizará de forma predeterminada. El lavado posterior al experimento dura aproximadamente 30 minutos. El lavado de mantenimiento dura aproximadamente 1 hora.
- ▶ **Send Instrument Health** (Enviar estado del instrumento): Illumina recomienda seleccionar esta opción para ayudar al servicio de asistencia técnica de Illumina a solucionar posibles problemas. Los únicos archivos que se envían a Illumina son

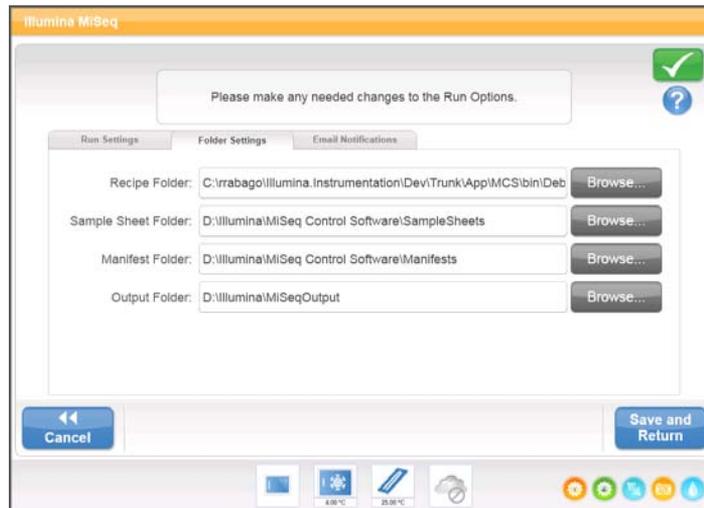
archivos de registro (archivos InterOp y archivos de registro). El instrumento debe estar conectado a una red con acceso a Internet para poder utilizar esta función.

- ▶ **Replicate Analysis Locally** (Replicar análisis de forma local): Esta configuración proporciona la opción de realizar el análisis tanto localmente en el instrumento como en BaseSpace.
 - Si está usando BaseSpace y selecciona esta opción, MiSeq Reporter se inicia automáticamente después del experimento y se realiza el análisis de forma local.
 - Si está usando BaseSpace y no selecciona esta opción, MiSeq Reporter no se inicia automáticamente después del experimento y el análisis solo se realiza en BaseSpace.
 - Si realiza el flujo de trabajo de VeriSeq con BlueFuse Multi, seleccione esta opción.

Ficha Folder Settings (Configuración de carpeta)

Puede especificar las ubicaciones predeterminadas de las carpetas en la ficha Folder Settings (Configuración de carpeta). Las carpetas se pueden ubicar en una red local o en el ordenador del instrumento.

Figura 7 Ficha Folder Settings (Configuración de carpeta)



- ▶ **Recipes** (Fórmulas): define la ubicación predeterminada de las fórmulas. Las fórmulas son archivos XML que utiliza el software para realizar el experimento de secuenciación. Al principio del experimento, se crea una fórmula a partir de los

parámetros proporcionados en la hoja de muestras y, a continuación, la fórmula se copia en la carpeta de resultados.

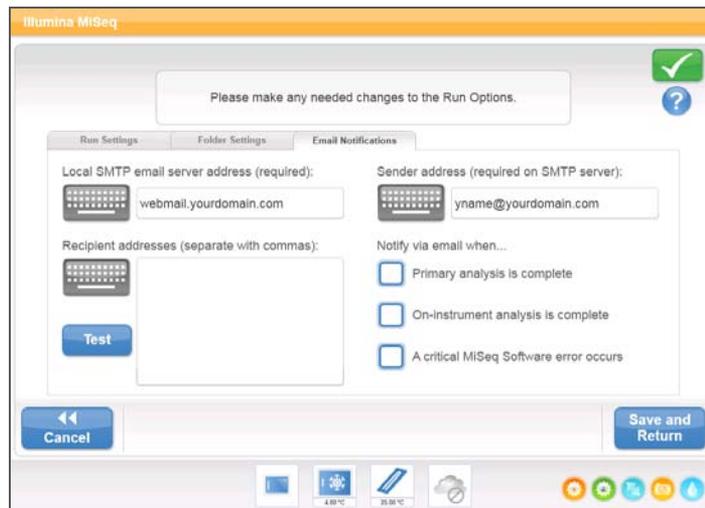
- ▶ **Sample Sheets** (Hojas de muestras): define la ubicación predeterminada de las hojas de muestras. Las hojas de muestras se crean antes de la preparación de las bibliotecas y contienen los parámetros del experimento.
- ▶ **Manifests** (Manifiestos): define la ubicación predeterminada de los archivos de manifiesto. Los archivos de manifiesto son necesarios para algunos tipos de bibliotecas. Consulte la documentación sobre la preparación de muestras para su kit de preparación de muestras, así como la *Guía de referencia rápida de la hoja de muestras* (n.º de referencia 15028392).
- ▶ **MiSeqOutput**: define la ubicación predeterminada de los archivos de resultados del análisis. Illumina recomienda cambiar la ubicación predeterminada de la carpeta de resultados a una ubicación de red para compartirla, almacenarla a largo plazo y, de forma opcional, utilizar MiSeq Reporter fuera de línea.

Para obtener información adicional, consulte *Carpetas del experimento* en la página 32.

Ficha Email Notifications (Notificaciones por correo electrónico)

MiSeq se puede configurar para que envíe una notificación por correo electrónico cuando haya finalizado el análisis principal, cuando haya finalizado el análisis secundario integrado en el instrumento o si se produce un error grave de software de MiSeq.

Figura 8 Ficha Email Notifications (Notificaciones por correo electrónico)

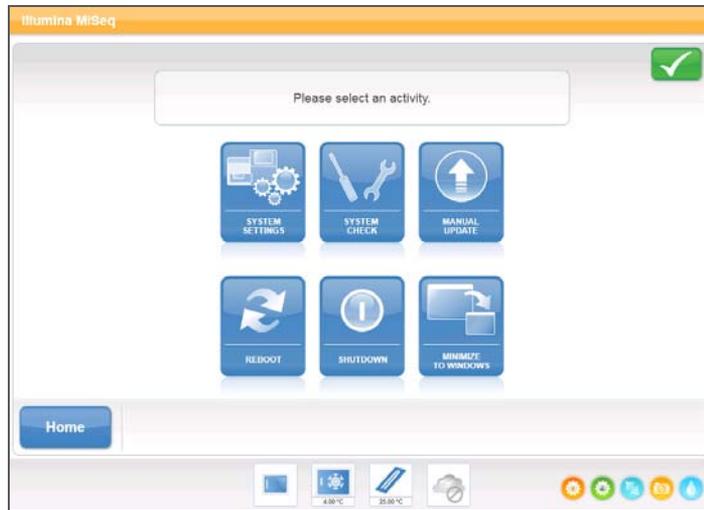


- ▶ **Local SMTP email server address** (Dirección de servidor de correo electrónico SMTP local): utilice el teclado en pantalla para introducir la dirección del servidor de correo electrónico de SMTP local. En caso necesario, póngase en contacto con el administrador de las instalaciones para obtener esta información.
- ▶ **Sender email address** (Dirección de correo electrónico del remitente): utilice el teclado en pantalla para introducir la dirección del correo electrónico del remitente. Esta puede ser su dirección de correo electrónico u otra dirección diferente especificada para el envío de notificaciones por correo electrónico. La dirección de correo electrónico del remitente debe tener el mismo nombre de dominio que la dirección del servidor de correo electrónico.
- ▶ **Email addresses** (Direcciones de correo electrónico): utilice el teclado en pantalla para introducir las direcciones de correo electrónico de todos los destinatarios de las notificaciones. Separe cada dirección de correo electrónico con una coma. Seleccione **Test** (Probar) para enviar un mensaje de correo electrónico de prueba a los destinatarios de las notificaciones.
- ▶ **Notify via email when** (Notificar por correo electrónico cuando): seleccione la casilla de verificación de cada uno de los eventos del experimento que desee que active una notificación.

Pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento)

La pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) contiene los controles para la configuración del sistema, la solución de problemas, la actualización manual del software y el reinicio o apagado seguros del software del instrumento.

Figura 9 Pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento)



- ▶ **System Settings** (Configuración del sistema): permite cambiar la configuración de IP, el nombre de la máquina o el dominio. Consulte *Pantalla System Settings (Configuración del sistema)* en la página 87.
- ▶ **System Check** (Comprobación del sistema): proporciona soluciones para problemas con el fin de que compruebe el estado operativo de los componentes del instrumento. Consulte *Pantalla System Check (Comprobación del sistema)* en la página 89.
- ▶ **Manual Update** (Actualización manual): permite actualizar manualmente el software del ordenador del instrumento. Consulte *Pantalla Manual Update (Actualización manual)* en la página 80.
- ▶ **Reboot** (Reiniciar): utilice el comando Reboot (Reiniciar) para reiniciar el software del sistema.
- ▶ **Shut Down** (Apagar): utilice el comando Shut Down (Apagar) para apagar el software de control y Windows en el ordenador del instrumento. Consulte *Apagado del instrumento* en la página 81.

- ▶ **Minimize to Windows** (Minimizar a Windows): proporciona un acceso rápido al sistema operativo del instrumento y a cualquier carpeta que se encuentre en el ordenador del instrumento cuando se ejecute MCS en modo de pantalla completa en lugar de en modo Windows.

Visor del análisis de secuenciación

Puede supervisar su experimento con mayor detalle sin interferir en él mediante el visor del análisis de secuenciación (SAV) de Illumina. El sistema MiSeq debe estar conectado a la red para ver los resultados del análisis principal con SAV.

SAV permite revisar las métricas durante un experimento a medida que se generan y, posteriormente, una vez finalizado el experimento. Instale SAV en un ordenador independiente de MiSeq con acceso a la misma red que la conectada al instrumento. Después de ejecutar el software, puede ir a la carpeta de resultados de su experimento.

Después de la generación de plantillas, SAV proporciona métricas generadas por RTA y organiza las métricas en diagramas, gráficos y tablas.



NOTA

SAV es universal para los sistemas de secuenciación de Illumina, la mayor parte de los cuales utiliza una celda de flujo de ocho carriles. Algunas vistas incluyen listas desplegables que muestran los carriles 1–8. La celda de flujo de MiSeq es una celda de flujo con un único carril, por lo que los datos aparecen al seleccionar **All** (Todo) o **Lane 1** (Carril 1).

Para obtener información adicional, consulte la *Guía de usuario del Visor del análisis de secuenciación (SAV)*, n.º de referencia 15020619.

Duración del experimento

La duración del experimento depende del número de ciclos que lleve a cabo. Puede realizar un experimento "paired-end" de hasta 2 x 301 ciclos de secuenciación más cualquier lectura de índice con MCS v2.3.

Asimismo, la duración del experimento depende de la versión de los reactivos de MiSeq que esté utilizando y de las actualizaciones de mejora del rendimiento instaladas en su instrumento.

Para obtener información adicional sobre las duraciones esperadas y otras especificaciones, visite la página de especificaciones del sistema MiSeq en el sitio web de Illumina (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn).

Número de ciclos de una lectura

El número de ciclos realizados en una lectura es un ciclo más que el número de ciclos analizados. El ciclo adicional es necesario para los cálculos de fase y prefase.

Por ejemplo, un experimento de 300 ciclos de "paired-end" realiza dos lecturas de 301 ciclos (2×301) para un total de 602 ciclos. Al final del experimento, se habrán analizado 2×300 ciclos.

Opciones de análisis secundario

Los datos de secuenciación de MiSeq pueden analizarse en el ordenador del instrumento con MiSeq Reporter o en la nube con BaseSpace. Si realiza el flujo de trabajo de VeriSeq, utilice el software BlueFuse Multi para realizar el análisis. Tanto BaseSpace como MiSeq Reporter generan información sobre la alineación, las variantes y los conjuntos de cóntigos de cada genoma solicitado y de cada muestra de un experimento de varias muestras.

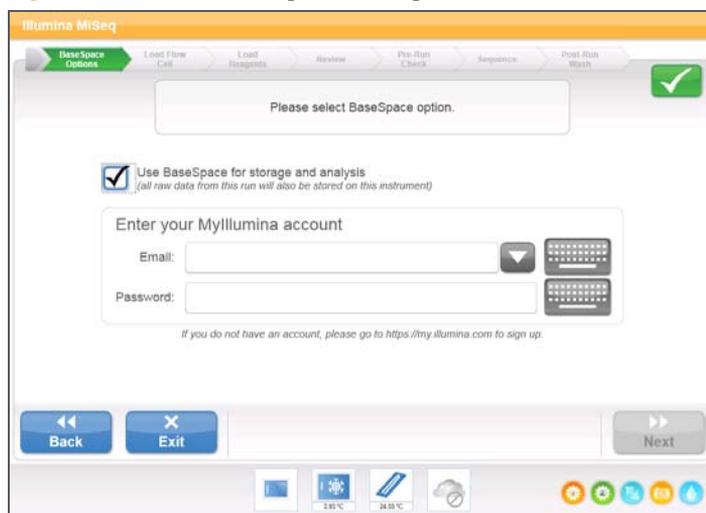
Descripción general de BaseSpace

BaseSpace es el entorno informático basado en nube de Illumina. Si utiliza BaseSpace para almacenar y analizar los datos de los experimentos, disfrutará de estas ventajas:

- ▶ Elimina la necesidad del almacenamiento y el cálculo in situ.
- ▶ Permite la gestión y el análisis de los datos basados en la web.
- ▶ Permite iniciar un nuevo experimento de secuenciación mientras que los datos se están analizando.
- ▶ Proporciona herramientas para la colaboración y la compartición globales.

Puede iniciar sesión en BaseSpace al configurar el experimento de secuenciación. Con BaseSpace, puede configurar el experimento de modo que los datos sin procesar de este también se almacenen de forma local. Para obtener información adicional, consulte *Pantalla Run Options (Opciones de experimento)* en la página 22.

Figura 10 Pantalla de la opción BaseSpace



Cuando se inicia el experimento de secuenciación, el icono BaseSpace cambia para indicar que MiSeq está conectado a BaseSpace y los archivos de datos se están transfiriendo a su ubicación segura. Los archivos de datos se cifran durante el tránsito, se descifran durante el análisis y se vuelven a cifrar cuando se almacenan.

Figura 11 Icono de conexión con BaseSpace



BaseSpace se desconectará automáticamente de MiSeq al final del experimento o en cuanto todos los archivos del análisis principal hayan terminado de cargarse. Si se interrumpe la conexión a Internet, cuando se restablezca la conexión, los archivos de análisis continuarán cargándose desde el punto en el que se produjo la interrupción.

Tan pronto como se cargue el último archivo de llamada de base en BaseSpace, se iniciará el análisis secundario de los datos. En BaseSpace se admiten los mismos flujos de trabajo del análisis que en los análisis integrados en el instrumento con MiSeq Reporter.

Con la instalación de MiSeq Reporter se proporcionan varios genomas. BaseSpace solo admite los genomas incluidos en MiSeq Reporter.

Puede conectarse a BaseSpace en basespace.com. Inicie sesión con sus credenciales de Myllumina.

Para obtener información adicional sobre el uso de BaseSpace, consulte la ayuda en línea de BaseSpace en el sitio web de Illumina:

www.illumina.com/help/BaseSpaceHelp/BaseSpaceHelp.htm.

Descripción general de MiSeq Reporter

MiSeq Reporter es una aplicación de Windows Service que procesa llamadas de bases generadas por análisis principales. MiSeq Reporter inicia los análisis secundarios inmediatamente después de finalizar los análisis principales de un experimento de secuenciación.

MiSeq Reporter se ejecuta en el ordenador del instrumento. Sin embargo, la interfaz de software debe visualizarse utilizando un navegador web de otro ordenador conectado a la misma red que MiSeq Reporter.

Una vez que se complete el análisis secundario, se escribirá un archivo llamado `CompletedJobInfo.xml` en la carpeta del experimento. Para obtener información adicional, consulte la *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15042295).

Secuenciación durante el análisis

Los recursos informáticos del sistema MiSeq se han concebido para secuenciar o analizar. Si se empieza un nuevo experimento de secuenciación en MiSeq antes de que finalice el análisis secundario de un experimento anterior, el análisis secundario se detendrá de manera automática.

Con la función Requeue (Reposicionar en la cola) de la interfaz de MiSeq Reporter podrá reiniciar el análisis secundario de ese experimento, una vez que finalice el experimento de secuenciación nuevo. En ese punto, el análisis secundario comenzará desde el principio.

Carpetas del experimento

Cada experimento de MiSeq genera tres carpetas de experimento, cada una con una finalidad concreta:

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp**: cuando el experimento comienza, la carpeta temporal se copia en la unidad local del ordenador del instrumento y se utiliza como un área de trabajo para MCS y RTA. No es necesario acceder a la carpeta MiSeqTemp. El contenido de esta carpeta se elimina tras siete días.
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqOutput**: RTA copia archivos de la carpeta MiSeqTemp en la carpeta MiSeqOutput. A medida que se generan los archivos del análisis principal, RTA vuelve a copiar los archivos en la carpeta MiSeqTemp y llena la carpeta MiSeqAnalysis. Las imágenes de enfoque y en miniatura no se copian en la carpeta MiSeqAnalysis.

Puede cambiar la ubicación de la carpeta de resultados en el campo Output Folder (Carpeta de resultados) de la pantalla Run Options (Opciones de experimento). Para obtener información adicional, consulte *Pantalla Run Options (Opciones de experimento)* en la página 22.

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis**: cuando haya finalizado el análisis principal, MiSeq Reporter accederá a la carpeta MiSeqAnalysis de la unidad local del instrumento para iniciar el análisis secundario. Todos los archivos copiados en la carpeta MiSeqAnalysis se copian de nuevo en la carpeta MiSeqOutput. Para obtener información adicional, consulte *Contenido de la carpeta MiSeqOutput (ResultadoMiSeq)* en la página 33. Si está usando BaseSpace para el análisis sin replicar los análisis de forma local, la carpeta MiSeqAnalysis de la unidad local del instrumento estará vacía.

Asignación de nombres a la carpeta raíz

El nombre de la carpeta raíz del experimento indica la fecha del experimento, el número del instrumento y la celda de flujo utilizada para el experimento. Las carpetas de experimento tienen el mismo nombre de carpeta raíz en todos los experimentos.

De forma predeterminada, el nombre de la carpeta utiliza este formato:

AAMMDD_<número de instrumento>_<número de experimento>_A<código de barras de la celda de flujo>

El número del experimento sube en incrementos de uno cada vez que se realiza un experimento en un instrumento determinado.

Contenido de la carpeta MiSeqOutput (ResultadoMiSeq)

Después del análisis principal, la carpeta MiSeqOutput (ResultadoMiSeq) contiene los archivos necesarios para el análisis secundario de MiSeq Reporter. Cuando finaliza el análisis secundario, las carpetas MiSeqOutput (ResultadoMiSeq) y MiSeqAnalysis (AnálisisMiSeq) son idénticas excepto en que la carpeta MiSeqOutput (ResultadoMiSeq) contiene dos subcarpetas para los archivos de imágenes: Images (Imágenes) y Thumbnail_Images (Imágenes_miniatuira). Estas no se utilizan para el análisis secundario.

Archivos

Los archivos que se copian en las carpetas de resultados y de análisis incluyen:

- ▶ **SampleSheet.csv**: proporciona parámetros para el experimento y los análisis posteriores. Al inicio del experimento, la hoja de muestras se copia en la carpeta raíz y cambia su nombre a SampleSheet.csv. Se escriben copias en Data\Intensities y Data\Intensities\BaseCalls.
- ▶ **runParameters.xml**: contiene un resumen de los parámetros del experimento e información sobre sus componentes, como la RFID de la celda de flujo y los reactivos asociados al experimento.
- ▶ **RunInfo.xml**: contiene información del experimento de alto nivel, como el número de lecturas y ciclos en el experimento de secuenciación, y sobre si se ha indexado o no una lectura.

Carpetas

Las carpetas que se copian en las carpetas de resultados y de análisis incluyen las carpetas siguientes generadas durante el experimento de secuenciación:

- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\Config**: contiene los archivos de configuración del experimento.
- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\Data**: contiene las subcarpetas Intensities (Intensidades), BaseCalls (Llamadas de bases) y Alignment (Alineación). Los datos generados por MiSeq Reporter se encuentran en la subcarpeta Alignment (Alineación).
- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\Data\RTA Logs**: contiene los archivos de registro que describen cada paso realizado por RTA para cada lectura.
- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\Data\Intensities\BaseCalls**: contiene subcarpetas con archivos de llamadas de bases (*.bcl), archivos de matriz y archivos de fase. MiSeq Reporter escribe archivos FASTQ en esta carpeta durante el análisis

secundario. Para obtener información adicional, consulte la *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15042295).

- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\Recipe**: contiene la fórmula usada para el experimento.
- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\Logs**: contiene los archivos de registro que describen cada paso realizado por el instrumento para cada ciclo.
- ▶ **<Nombre de carpeta de experimento>\InterOp**: contiene los archivos binarios utilizados por el visor del análisis de secuenciación (SAV) para resumir diversos parámetros del análisis principal, como la densidad de grupos, las intensidades, las puntuaciones de calidad y la calidad general del experimento.

Los demás archivos y carpetas creados en la carpeta temporal del experimento no se copian en las carpetas de resultados y de análisis. Contiene los archivos temporales no necesarios para el análisis o la solución de problemas.

MiSeq Reporter añade otras carpetas, como la carpeta *Alignment* (Alineación), durante el análisis secundario. Para obtener información adicional, consulte la *Guía del usuario de MiSeq Reporter* (n.º de referencia 15042295).

Espacio en disco requerido

El ordenador integrado en el instrumento tiene una capacidad de almacenamiento aproximada de 550 GB.

Antes de iniciar un experimento, el software comprueba el espacio disponible en el disco. Si no hay suficiente espacio libre en el disco para el experimento, aparecerá un mensaje del software. Dicho mensaje informará de cuánto espacio en disco se requiere para el experimento y cuánto espacio en disco es preciso liberar para poder continuar con el experimento.

Si se le pide que libere espacio en disco, vaya a la pantalla Welcome (Bienvenida) y seleccione **Manage Files** (Administrar archivos). En la pantalla Manage Files (Administrar archivos), seleccione la ficha **Runs** (Experimentos). Mueva o elimine las carpetas de experimentos anteriores como proceda. Para obtener información adicional, consulte *Pantalla Manage Files (Administrar archivos)* en la página 19. Después de liberar el espacio en disco requerido, seleccione **Restart Check** (Reiniciar comprobación).

Realización de un experimento

Introducción	38
Flujo de trabajo de MiSeq	39
Carga de bibliotecas de muestras	41
Configuración de un experimento con MCS	43
Limpieza de la celda de flujo	44
Carga de la celda de flujo	47
Carga de reactivos	49
Inicio del experimento	53
Supervisión del experimento	55



Introducción

Para realizar un experimento en MiSeq, siga los pasos de configuración descritos en este capítulo. Una vez iniciado el experimento, el usuario no tendrá que intervenir más.

El experimento de secuenciación puede supervisarse en la pantalla Sequencing (Secuenciación) o de forma remota con el visor del análisis de secuenciación (SAV), una aplicación de software opcional que se puede descargar del sitio web de Illumina.

Cuando haya finalizado el experimento de secuenciación, no olvide lavar el instrumento.

Flujo de trabajo de MiSeq



Desnaturalice y diluya bibliotecas (no se aplica a todos los tipos de bibliotecas). Consulte *Preparación de bibliotecas para la secuenciación en MiSeq* (n.º de referencia 15039740).



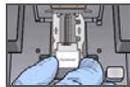
Prepare el cartucho de reactivo precargado para utilizarlo. Consulte la guía de preparación de reactivo correspondiente al cartucho de reactivo de MiSeq que utilice.



Cargue la mezcla de bibliotecas en el cartucho de reactivo del depósito designado.



En la interfaz de software, seleccione **Sequence** (Secuenciar) para iniciar los pasos de configuración del experimento. [Opcional] Conéctese a BaseSpace.



Lave y seque bien la celda de flujo. Cargue la celda de flujo.



Cargue la botella de PR2 y asegúrese de que la botella de residuos está vacía. Cargue el cartucho de reactivo.



Revise los parámetros del experimento y compruebe los resultados antes del experimento. Seleccione **Start Run** (Iniciar experimento).



Supervise el experimento desde la interfaz de MCS o en otro ordenador con visor del análisis de secuenciación (SAV).



Lleve a cabo un lavado posterior al experimento.

Generación de grupos

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

Secuenciación

Después de la generación de grupos, estos se digitalizan con combinaciones de LED y filtros específicos de cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos marcados con tinta luminiscente. Después de finalizar la adquisición de imágenes de una de las placas de la celda de flujo, esta regresa a su sitio para dejar expuesta la siguiente placa. El proceso se repite en cada ciclo de secuenciación. Después del análisis de imágenes, el software realiza un análisis principal, que incluye las llamadas de bases, el filtrado y la puntuación de calidad.

Análisis

Cuando el experimento haya finalizado, el software de análisis MiSeq Reporter se iniciará automáticamente para realizar un análisis secundario, que incluirá la alineación y la llamada de variantes. Puede supervisar el análisis secundario con una conexión a Internet desde otro ordenador. Para obtener información adicional, consulte *Descripción general de MiSeq Reporter* en la página 31.

Carga de bibliotecas de muestras



NOTA

Si el tipo de biblioteca lo requiere, desnaturalice y diluya las bibliotecas, y añada el control PhiX opcional. Consulte *Preparación de bibliotecas para la secuenciación en MiSeq* (n.º de referencia 15039740).

Este paso no es aplicable a todos los tipos de biblioteca. Algunos métodos de preparación de muestras Illumina dan como resultado una concentración de bibliotecas agrupadas normalizada y lista para su uso. Consulte la guía de preparación de muestras del kit usado para preparar bibliotecas de muestras.



NOTA

Si está usando cebadores personalizados, prepare estos y configure la hoja de muestras como se describe en *Uso de cebadores personalizados en MiSeq* (n.º de referencia 15041638).

Cuando el cartucho de reactivo esté completamente descongelado y listo para usar, estará dispuesto para cargar bibliotecas preparadas en el cartucho.

- 1 Utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para limpiar el cierre metálico que cubre el depósito etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).
- 2 Utilice una punta de pipeta limpia de 1 ml para perforar el sello metálico que cubre el depósito etiquetado como **Load Samples** (Carga de muestras).

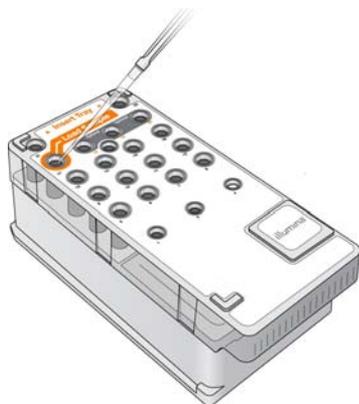


NOTA

No perforo ninguna otra posición de reactivo. Las demás posiciones de reactivo se perforan automáticamente durante el experimento de secuenciación.

- 3 Pipetee 600 µl de sus bibliotecas preparadas en el depósito **Load Samples** (Carga de muestras). Evite tocar el sello metálico cuando dispense la muestra.

Figura 12 Carga de bibliotecas



- 4 Continúe directamente por los pasos de configuración del experimento utilizando la interfaz de Software MiSeq Control (MCS).

Configuración de un experimento con MCS

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
- 2 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **Reboot** (Reiniciar) para reiniciar el software del sistema.
- 3 [Opcional] En la pantalla Run Options (Opciones de experimento), compruebe las ubicaciones de las carpetas de fórmulas, hojas de muestras, manifiestos y la carpeta MiSeqOutput (ResultadoMiSeq). Para obtener información adicional, consulte *Pantalla Run Options (Opciones de experimento)* en la página 22.
- 4 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence** (Secuenciar) para iniciar los pasos de configuración del experimento. Se abrirá la pantalla BaseSpace Options (Opciones de BaseSpace).
Al seleccionar **Sequence** (Secuenciar) en la pantalla Welcome (Bienvenida), se abrirá una serie de pantallas de configuración del experimento en el siguiente orden: BaseSpace Option (Opción BaseSpace), Load Flow Cell (Cargar celda de flujo), Load Reagents (Cargar reactivos), Review (Revisar) y Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento).

Configuración de la opción BaseSpace

Para acceder a BaseSpace, necesita una conexión de red y una cuenta de Myllumina.

- 1 En la pantalla BaseSpace Options (Opciones de BaseSpace), siga uno de estos pasos:
 - a Seleccione la casilla **Use BaseSpace for storage and analysis** (Usar BaseSpace para el almacenamiento y el análisis). El análisis se realiza en BaseSpace.
 - b Desmarque la casilla **Use BaseSpace for storage and analysis** (Usar BaseSpace para el almacenamiento y el análisis). El análisis se realiza en el instrumento.
- 2 Seleccione **Next** (Siguiente). Se abrirá la pantalla Load Flow Cell (Cargar celda de flujo).

Limpieza de la celda de flujo

La celda de flujo está sumergida en tampón de almacenamiento, dentro de un contenedor de celdas de flujo.

El color de la tapa del contenedor de celdas de flujo indica de qué tipo de celda de flujo se trata:

- ▶ La tapa del contenedor de celdas de flujo estándar es transparente.
- ▶ La tapa del contenedor de celdas de flujo PGS es transparente.
- ▶ La tapa del contenedor de celdas de flujo micro es verde.
- ▶ La tapa del contenedor de celdas de flujo nano es amarilla.

- 1 Utilice un nuevo par de guantes sin polvo.
- 2 Utilice unas pinzas de plástico para agarrar la celda de flujo por la base del cartucho de plástico y sáquela del contenedor de celdas de flujo.

Figura 13 Retirada de la celda de flujo



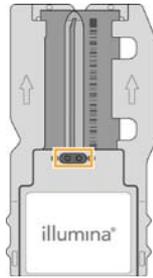
- 3 Enjuague ligeramente la celda de flujo con agua de laboratorio y asegúrese de que tanto el cartucho de plástico como el cristal se enjuagan bien para eliminar el exceso de sales. El exceso de sales puede afectar a la colocación de la celda de flujo en el instrumento. Si las sales se secan en el área de adquisición de imágenes, esta también se verá afectada.

Figura 14 Enjuague de la celda de flujo



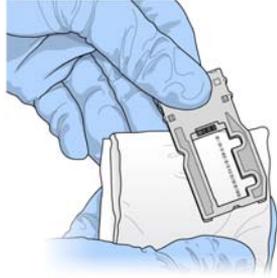
- 4 Seque bien la celda de flujo y el cartucho con una toallita limpiantes sin pelusa, teniendo especial cuidado alrededor de la junta del puerto de la celda de flujo negra. Seque con suaves golpecitos la zona de las juntas y el cristal adyacente.

Figura 15 Puertos de celdas de flujo y juntas



- 5 Con un paño humedecido en alcohol, limpie el cristal de la celda de flujo. Asegúrese de que en el cristal no haya pelusas ni fibras de tejido, huellas u otras marcas. Evite usar el paño humedecido en alcohol en las juntas del puerto de la celda de flujo.

Figura 16 Secado de la celda de flujo

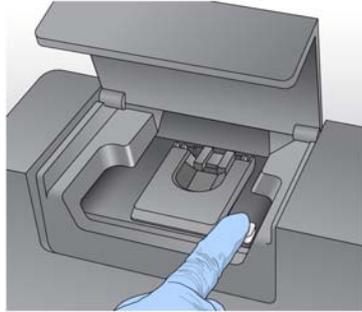


- 6 Seque el exceso de alcohol con una toallita limpiantes sin pelusa. Inspeccione visualmente la zona para asegurarse de que los puertos de las celdas de flujo no están obstruidos y de que las juntas están bien asentadas alrededor de los puertos de las celdas de flujo.
Si las juntas parecen estar desplazadas, vuelva a apretarlas en su sitio con cuidado hasta que queden perfectamente asentadas alrededor de los puertos de las celdas de flujo.

Carga de la celda de flujo

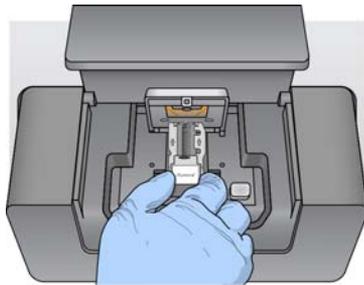
La pantalla Load Flow Cell (Cargar celda de flujo) le solicitará que cargue la celda de flujo.

Figura 17 Abra el cierre de la celda de flujo



- 1 Inspeccione visualmente la platina de la celda de flujo para asegurarse de que no presente pelusas. Si hubiera pelusa o cualquier otro desecho, limpie la platina de la celda de flujo con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol. Limpie con cuidado la superficie de la platina de celda de flujo hasta que esté totalmente limpia y seca.
- 2 Levante la puerta del compartimento de la celda de flujo y, a continuación, pulse el botón de apertura situado a la derecha del cierre de la celda de flujo. Se abrirá el cierre de la celda de flujo.
- 3 Mientras sostiene la celda de flujo por los bordes del cartucho de la celda de flujo, colóquela en la platina.

Figura 18 Coloque la celda de flujo en la platina

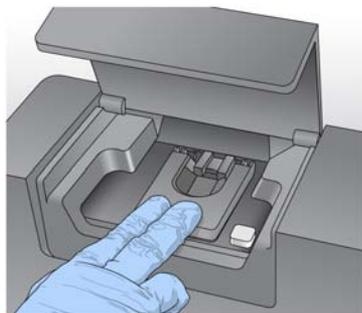


- 4 Presione suavemente el cierre de la celda de flujo para cerrarlo sobre la celda de flujo.

**NOTA**

Al cerrarse la celda de flujo, dos pasadores de alineación situados cerca de la bisagra del cierre de la celda de flujo alinearán y posicionarán correctamente la celda de flujo. Sonará un clic que indica que el cierre de la celda de flujo está en posición segura.

Figura 19 Cierre la celda de flujo



- 5 Compruebe la esquina inferior izquierda de la pantalla para confirmar que la RFID de la celda de flujo se ha leído correctamente.

**NOTA**

Si el sistema no lee la RFID, el software le guiará con mensajes por los pasos que debe seguir para obtener un código de derivación temporal y continuar con la configuración del experimento. Para obtener más información, consulte *Resolución del error de lectura de RFID* en la página 96.

- 6 Cierre la puerta del compartimento de celdas de flujo.
- 7 Seleccione **Next** (Siguiendo) en la pantalla Load Flow Cell (Cargar celda de flujo). Se abrirá la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos).

Carga de reactivos

La carga de reactivos consta de dos pasos. Primero, cargue la botella de PR2, asegúrese de que la botella de residuos está vacía y, a continuación, cargue el cartucho de reactivo.



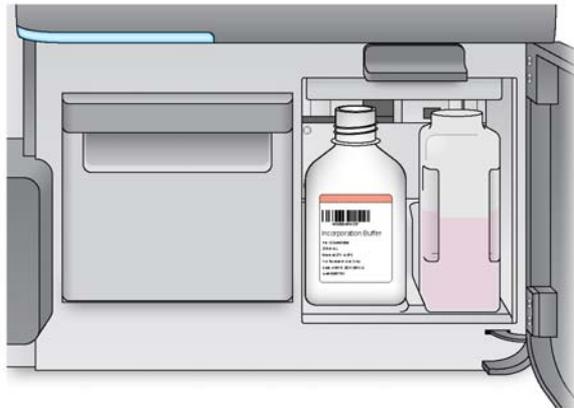
NOTA

Utilice siempre el cartucho de reactivo asociado al tipo de celda de flujo que ha cargado. Si el cartucho de reactivo no es compatible, aparece un mensaje en la pantalla. Seleccione **Back** (Atrás) para cargar el cartucho de reactivo correspondiente o seleccione **Exit** (Salir) para volver a la pantalla Welcome (Bienvenida).

Carga de PR2 y comprobación de la botella de residuos

- 1 Retire la botella de PR2 del almacenamiento a entre 2 y 8 °C. Invierta cuidadosamente la botella de PR2 para mezclarla y, a continuación, retire la tapa.
- 2 Abra la puerta del compartimento de reactivos.
- 3 Levante el mango del dispensador hasta que quede bloqueado en su sitio.
- 4 Coloque la botella de PR2 en la muesca a la derecha del refrigerador de reactivos.

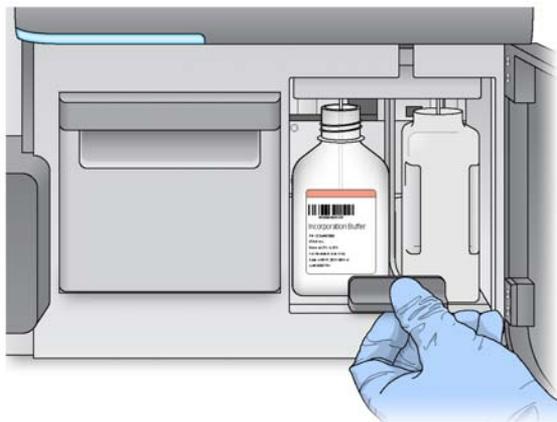
Figura 20 Carga de la botella de PR2



- 5 Asegúrese de que la botella de residuos esté vacía. Si no lo está, vacíe el contenido en el contenedor de residuos adecuado.

- Baje lentamente el mango del dispensador. Asegúrese de que los dispensadores bajan hasta las botellas de PR2 y de residuos.

Figura 21 Baje del mango del dispensador



- Compruebe en la esquina inferior izquierda de la pantalla que la RFID de la botella de PR2 se haya leído correctamente.



NOTA

Si el sistema no lee la RFID, el software le guiará con mensajes por los pasos que debe seguir para obtener un código de derivación temporal y continuar con la configuración del experimento. Para obtener más información, consulte *Resolución del error de lectura de RFID* en la página 96.

- Seleccione **Next** (Siguiente) en la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos).

Carga del cartucho de reactivo



NOTA

No deje la puerta del refrigerador de reactivos abierta durante largos períodos de tiempo.

- Abra la puerta del refrigerador de reactivos.
- Sujete el cartucho de reactivo en el extremo con la etiqueta de Illumina e introduzca el cartucho de reactivo en el refrigerador de reactivos hasta que el cartucho se detenga.

Figura 22 Cargar el cartucho de reactivo



- 3 Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
- 4 Compruebe en la esquina inferior izquierda de la pantalla si la RFID del cartucho de reactivo se ha leído correctamente.



NOTA

Si el sistema no lee la RFID, el software le guiará con mensajes por los pasos que debe seguir para obtener un código de derivación temporal y continuar con la configuración del experimento. Para obtener más información, consulte *Resolución del error de lectura de RFID* en la página 96.

Si el cartucho de reactivo no es compatible con la celda de flujo, aparecerá un mensaje. Seleccione **Back** (Atrás) para cargar un cartucho compatible o seleccione **Exit** (Salir) para volver a la pantalla Welcome (Bienvenida).

- 5 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiente) en la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos). Se abrirá la pantalla Review (Revisar).

Cambiar la hoja de muestras

Todos los experimentos deben tener una hoja de muestras. El software busca de forma predeterminada un archivo de hoja de muestras cuyo nombre coincida con el número del código de barras del cartucho de reactivo cargado en el instrumento. Si no se encuentra una hoja de muestras, aparece un mensaje que le solicita que navegue hasta la ubicación de la hoja de muestras correcta para su experimento.

Para evitar que el software realice búsquedas sin resultados, utilice el comando **Change Sample Sheet** (Cambiar la hoja de muestras) de la pantalla Load Reagents (Cargar reactivos) para dirigir el software hasta la hoja de muestras apropiada.

Inicio del experimento

Tras cargar la celda de flujo y los reactivos, repase los parámetros del experimento y realice una prueba previa al experimento, antes de iniciarlo.

Revisión de parámetros del experimento

- 1 Revise Experiment Name (Nombre del experimento), Analysis Workflow (Flujo de trabajo del análisis) y Read Length (Longitud de la lectura). Estos parámetros se especifican en la hoja de muestras.
- 2 Revise las ubicaciones de las carpetas en la esquina inferior izquierda. Si es necesario realizar algún cambio, seleccione **Change Folders** (Cambiar carpetas). Una vez realizados los cambios, seleccione **Save** (Guardar) y, a continuación, **Next** (Siguiente).
- 3 Seleccione **Next** (Siguiente). Se abrirá la pantalla Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento).

Change Folders (Cambiar carpetas)

En la esquina inferior izquierda de la pantalla Review (Revisar), aparecen las ubicaciones actuales de las carpetas que contienen las fórmulas, las hojas de muestras, los manifiestos y los resultados. Para cambiar la ubicación de alguna carpeta, seleccione **Change Folders** (Cambiar carpetas) y navegue hasta la ubicación deseada. Si utiliza esta opción de la pantalla Review (Revisar), se cambiarán solo las ubicaciones de las carpetas del experimento actual.

Revisión de la comprobación previa al experimento

El sistema lleva a cabo una comprobación de todos los componentes del experimento, del espacio en el disco y de las conexiones de red antes de iniciar el experimento.

Si algún elemento no supera la comprobación previa al experimento, aparecerá un mensaje en pantalla con instrucciones para corregir el error. Para obtener información adicional, consulte *Resolución de errores de configuración de experimentos* en la página 94.

Cuando todos los elementos hayan superado con éxito la comprobación previa al experimento, seleccione **Start Run** (Iniciar experimento).

Notas importantes antes de empezar el experimento



ADVERTENCIA

El sistema MiSeq es sensible a las vibraciones. Si toca el instrumento después de iniciar un experimento, el resultado de la secuenciación se puede ver perjudicado.

Después de seleccionar **Start Run** (Iniciar experimento), no abra las puertas de los compartimentos de la celda de flujo o de reactivos, ni toque el monitor del instrumento, salvo si va a pausar el experimento. Para obtener información adicional, consulte *Pausa de un experimento* en la página 91.



ADVERTENCIA

Asegúrese de cerrar todos los archivos de MiSeq antes de iniciar un experimento y no abra archivos durante un experimento.

Supervisión del experimento

- 1 Durante el experimento, supervise el progreso, las intensidades y las puntuaciones de calidad que aparecen en la pantalla Sequencing (Secuenciación). La pantalla Sequencing (Secuenciación) solo permite la lectura.

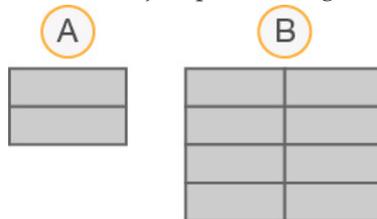
Para supervisar el experimento con más detalles, utilice el visor del análisis de secuenciación (SAV) instalado en otro ordenador, independiente del ordenador del instrumento. Necesita una conexión de red.

Asimismo, si está conectado a BaseSpace, podrá supervisar el experimento con el SAV en BaseSpace.

- ▶ **Run Progress** (Progreso del experimento): muestra el progreso del experimento en una barra de estado y el número de ciclos completados.
- ▶ **Intensity** (Intensidad): muestra el valor de las intensidades de grupos del percentil 90 para cada placa.

El gráfico del área de intensidad representa el número de placas y el número de superficies de las que se adquieren imágenes:

- Si se adquieren imágenes solo de la superficie superior de la celda de flujo, aparece un gráfico con una sola columna.
- Si se adquieren imágenes tanto de la superficie superior como de la inferior de la celda de flujo, aparece un gráfico de dos columnas.



- A Indica dos placas, solamente en la superficie superior.
- B Indica cuatro placas, en la superficie superior e inferior.

- ▶ **Q-Score All Cycles** (Puntuaciones Q de todos los ciclos): muestra el porcentaje medio de bases superiores a Q30, que se trata de una puntuación de calidad (puntuación Q). La puntuación Q es una predicción de la probabilidad de que se realice una llamada de bases incorrecta. Las puntuaciones Q se calculan tras el ciclo 25.

Puntuación Q	Probabilidad de llamada de bases incorrecta
Q40	1 entre 10 000
Q30	1 entre 1000
Q20	1 entre 100
Q10	1 entre 10

- ▶ **Cluster Density (K/mm²)** (Densidad de grupos [K/mm²]): muestra el número de grupos por milímetro cuadrado del experimento.
- ▶ **Clusters Passing Filter (%)** (Grupos que superan el filtro [%]): muestra el porcentaje de grupos que superan el filtro basado en el filtro de castidad de Illumina, que mide la calidad. Este dato aparece solo tras el ciclo 25.



NOTA

La castidad de la llamada de bases es la proporción de la intensidad de la señal más alta dividida entre la suma de las dos señales más altas. Si existe más de una llamada de bases con un valor de castidad inferior a 0,6 en los primeros 25 ciclos, las lecturas no pasan el filtro de calidad.

- ▶ **Estimated Yield (Mb)** (Rendimiento estimado): muestra el número de bases previsto para el experimento, medido en megabases. Este dato aparece solo tras el ciclo 25.
- 2 Cuando el experimento haya finalizado, aparecerá el botón Next (Siguiete). Revise los resultados en la pantalla Sequencing (Secuenciación) antes de continuar.



NOTA

La pantalla Sequencing (Secuenciación) permanecerá visible hasta que seleccione Next (Siguiete). Tras seleccionar Next (Siguiete), no es posible volver a la pantalla Sequencing (Secuenciación).

- 3 Seleccione **Next** (Siguiete) para salir de la pantalla Sequencing (Secuenciación) y proceda con un lavado posterior al experimento.
- Para supervisar el experimento con más detalles, utilice el visor del análisis de secuenciación (SAV) instalado en otro ordenador, independiente del ordenador del instrumento. Necesita una conexión de red.
- Asimismo, si está conectado a BaseSpace, podrá supervisar el experimento con el SAV en BaseSpace.

Generación de plantillas

La generación de plantillas es el proceso por el que se definen las posiciones de los grupos de toda la superficie de la celda de flujo de acuerdo con las coordenadas X e Y. El análisis en tiempo real (RTA) utiliza los primeros ciclos del experimento para generar cadenas molde.

Una vez generada la plantilla de las posiciones de los grupos, las imágenes producidas de cada ciclo de imágenes posterior se alinearán con la plantilla. Se extraen las intensidades de grupos individuales de los cuatro canales de color de nucleótidos y se producen llamadas de bases desde las intensidades de grupos normalizadas.

Métricas de experimento

Las métricas de experimento aparecen en la pantalla Sequencing (Secuenciación) en diferentes puntos de un experimento. Durante los pasos de generación de grupos, no se mostrarán las métricas.

Cuando empiece la secuenciación, las métricas siguientes aparecerán en los ciclos indicados:

Métrica	Kit	Ciclo
Intensidad	Kits de reactivos de MiSeq, v3	Ciclo 1-7
	Kits de reactivos de MiSeq, v2	Ciclo 1-4
	Kits de reactivos de MiSeq, v1	Ciclo 1-4
Intensidad y densidad de grupo	Kits de reactivos de MiSeq, v3	Ciclo 8-25
	Kits de reactivos de MiSeq, v2	Ciclo 5-25
	Kits de reactivos de MiSeq, v1	Ciclo 5-25
Intensidad, densidad de grupo, % PF, rendimiento y puntuaciones Q	Kits de reactivos de MiSeq, v3	Desde el ciclo 26 hasta que finalice el experimento
	Kits de reactivos de MiSeq, v2	
	Kits de reactivos de MiSeq, v1	

Para obtener información adicional sobre las especificaciones de los experimentos de MiSeq, visite la página de especificaciones del sistema MiSeq en el sitio web de Illumina (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn).

Resultados del análisis principal

Los resultados del análisis principal de un experimento de secuenciación consisten en una serie de archivos de llamadas de base con puntuación de calidad (*.bcl), que se generan a partir de los archivos de imagen sin procesar.

En la siguiente tabla se describen las carpetas y los archivos generados por el análisis en tiempo real (RTA) durante el análisis principal. Muchos de estos archivos se utilizan para un análisis secundario con el software MiSeq Reporter.

Archivo principal	Subcarpeta	Descripción
RTAComplete.txt	Carpeta raíz	Archivo de marcador que se genera al completar el análisis de las llamadas de base. La presencia de este archivo desencadena el inicio del análisis secundario.
SampleSheet.csv	Carpeta raíz	Este archivo se lee y se copia en la carpeta del experimento antes del experimento, y se utiliza más tarde para el análisis secundario.
RunInfo.xml	Carpeta raíz	Identifica los límites de las lecturas (incluidas las lecturas de índice) y la tabla de calidad seleccionada para el experimento.
Archivos *.bcl	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	Cada archivo *.bcl contiene las llamadas de base de RTA y los resultados de la puntuación de calidad de un ciclo y una placa.
Archivos *.stats	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	Los archivos *.stats contienen las estadísticas de las llamadas de base de RTA de un ciclo/una placa determinados.
Archivos *.filter	Data\ Intensities\BaseCalls	Los archivos *.filter contienen los resultados del filtro de cada placa.
*.txt	Data\RTALogs	Archivos de registro del análisis principal.
Archivos *.cif	Data\ Intensities\L001\ CX.X	Todos los archivos *.cif binarios contienen los resultados del análisis de imágenes de RTA de un ciclo y una placa. Para obtener información adicional, consulte <i>Numeración de las placas de la celda de flujo</i> en la página 60.
Archivos *.locs	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001	Notifica las coordenadas de los grupos. Cada archivo *.locs representa una placa.

Archivo principal	Subcarpeta	Descripción
Archivos *.jpg	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	Imágenes en miniatura generadas para cada ciclo y base, que pueden utilizarse para solucionar los problemas de un experimento. Estos archivos no son necesarios para un análisis secundario y no se copian en la carpeta de análisis.

Numeración de las placas de la celda de flujo

Cuando las placas se digitalizan durante el experimento de secuenciación, se genera un archivo de resultados para cada placa y se le asigna un nombre con el número de placa en un formato de cuatro dígitos.

Se capturan imágenes de la celda de flujo v3 estándar en 19 placas de la superficie superior y 19 placas de la superficie inferior, lo que conlleva el formato de numeración de placas siguiente:

- ▶ Los archivos de digitalización cuyos nombres incluyen la numeración 1101 a 1119 son las placas 1–19 de la superficie superior.
- ▶ Los archivos de digitalización cuyos nombres incluyen la numeración 2101 a 2119 son las placas 1–19 de la superficie inferior.

Se capturan imágenes de la celda de flujo v2 estándar en 14 placas de la superficie superior y 14 placas de la superficie inferior, lo que conlleva el formato de numeración de placas siguiente:

- ▶ Los archivos de digitalización cuyos nombres incluyen la numeración 1101 a 1114 son las placas 1–14 de la superficie superior.
- ▶ Los archivos de digitalización cuyos nombres incluyen la numeración 2101 a 2114 son las placas 1–14 de la superficie inferior.

Se utiliza el mismo formato de numeración con las celdas de flujo micro:

- ▶ Los archivos de digitalización cuyos nombres incluyen la numeración 1101 a 1104 son las placas 1–4 de la superficie superior.
- ▶ Los archivos de digitalización cuyos nombres incluyen la numeración 2101 a 2104 son las placas 1–4 de la superficie inferior.

Para las celdas de flujo nano, los archivos de digitalización se nombran para las placas 1 y 2 de la superficie superior, 1101 y 1102.

Los archivos de resultados de cada placa se encuentran en la carpeta del experimento en `Data\Intensities\BaseCalls\L001`.

Procedimientos de mantenimiento

Introducción	62
Lavados del instrumento	65
Realización de un lavado posterior al experimento	67
Realización de un lavado de mantenimiento	73
Realización de un lavado en modo en espera	77
Actualizaciones de software	80
Apagado del instrumento	81



Introducción

Realice siempre un lavado del instrumento cuando finalice el experimento de secuenciación.

El lavado periódico del instrumento garantiza un rendimiento continuado por las siguientes razones:

- ▶ Se elimina todo el reactivo restante de los dispensadores y los conductos de fluídica.
- ▶ Se evita la acumulación y cristalización de sales en los dispensadores y los conductos de fluídica.
- ▶ Se previene la contaminación cruzada del experimento anterior.



NOTA

Si realiza un flujo de trabajo de VeriSeq, asegúrese de seguir las directrices específicas de frecuencia del mantenimiento de VeriSeq. Consulte *Frecuencia del mantenimiento del flujo de trabajo de VeriSeq* en la página 63.

Frecuencia del mantenimiento

Realice los procedimientos de mantenimiento siguientes en los intervalos recomendados.

Tabla 1 Mantenimiento durante el funcionamiento normal

Actividad	Frecuencia
Lavado posterior al experimento	Después de cada experimento
Lavado de mantenimiento	Mensual
Lavado en modo en espera	Preparación para el modo de inactividad (si el sistema no se va a usar durante ≥ 7 días)
Apagado del instrumento	Según se requiera

Tabla 2 Mantenimiento durante el modo de inactividad (≥ 7 días sin usar)

Actividad	Frecuencia
Lavado en modo en espera	Mensual
Apagado del instrumento	Según se requiera

Frecuencia del mantenimiento del flujo de trabajo de VeriSeq

Si lleva a cabo el flujo de trabajo de VeriSeq, realice los procedimientos de mantenimiento que se indican a continuación con la periodicidad recomendada.

Tabla 3 Mantenimiento durante el funcionamiento normal

Actividad	Frecuencia
Lavado posterior al experimento	Después de cada experimento
Lavado de mantenimiento	Mensual
Lavado posterior al experimento desde la pantalla Perform Wash (Realizar lavado)	Tras encontrarse en modo de inactividad (sistema no utilizado durante >3 días)
Lavado en modo en espera	Preparación para el modo de inactividad (si el sistema no se va a usar durante ≥ 7 días)
Apagado del instrumento	Según se requiera

Tabla 4 Mantenimiento durante el modo de inactividad (≥ 7 días sin usar)

Actividad	Frecuencia
Lavado en modo en espera	Mensual
Apagado del instrumento	Según se requiera



NOTA

En el caso del flujo de trabajo de VeriSeq, asegúrese de que realiza lavados posteriores al experimento que incluyan un lavado de cadena molde. Consulte *Procedimiento con lavado de conducto de cadena molde* en la página 69.

Lavados del instrumento

Puede iniciar tres tipos de lavados desde la pantalla Perform Wash (Realizar lavado): lavado de mantenimiento, lavado en espera y lavado posterior al experimento.

- ▶ **Maintenance Wash** (Lavado de mantenimiento): el lavado de mantenimiento consiste en tres ciclos de lavado consecutivos que enjuagan en profundidad el sistema. Realice al menos un lavado de mantenimiento cada 30 días. Consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 73.

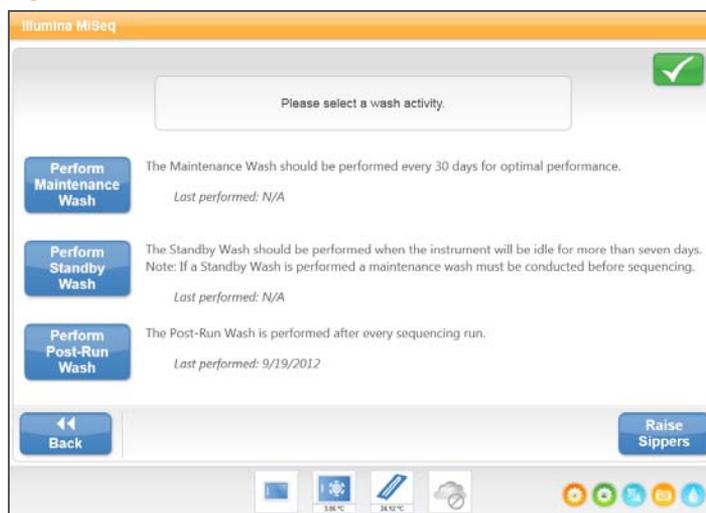
Puede configurar el instrumento para realizar un lavado de mantenimiento entre experimentos. Para obtener información adicional, consulte *Pantalla Run Options* (Opciones de experimento) en la página 22.

- ▶ **Standby Wash** (Lavado en modo en espera): el lavado en modo en espera prepara correctamente los conductos de fluidica para permanecer inactivos y consta de dos ciclos de lavado consecutivos. Realice un lavado en modo en espera si cree que el instrumento permanecerá inactivo durante hasta siete días. Consulte *Realización de un lavado en modo en espera* en la página 77. Cuando el instrumento pasa a estado inactivo, se debe realizar un lavado de mantenimiento antes de configurar un nuevo experimento de secuenciación.

En el caso de clientes que realizan el flujo de trabajo de VeriSeq, se debe consultar *Frecuencia del mantenimiento del flujo de trabajo de VeriSeq* en la página 63 para obtener instrucciones acerca de cuándo se debe realizar un lavado en modo en espera.

- ▶ **Post-Run Wash** (Lavado posterior al experimento): El lavado posterior al experimento es un lavado del instrumento estándar que se realiza entre experimentos de secuenciación. Para realizar un lavado posterior al experimento en otro momento que no sea inmediatamente después de la ejecución de un experimento, utilice el comando de la pantalla Perform Wash (Realizar lavado) para iniciar dicho lavado.

Figura 23 Pantalla Perform Wash (Realizar lavado)



Seleccione **Raise Sippers** (Levantar los dispensadores) para levantar los dispensadores del cartucho de reactivo de forma manual, de modo que el cartucho pueda retirarse del instrumento. Utilice este comando si se ha interrumpido el experimento de forma inesperada o si se ha producido un error durante el experimento. En estas condiciones, los dispensadores no se levantan automáticamente.

Realización de un lavado posterior al experimento

Lleve a cabo siempre un lavado del instrumento después de terminar un experimento de secuenciación. Siga las indicaciones del software para cargar los componentes del lavado y realizar dicho lavado. El lavado posterior al experimento dura aproximadamente 20 minutos.

Ilumina recomienda realizar el lavado inmediatamente después de finalizar un experimento. Debe lavar el instrumento antes de configurar el experimento siguiente.



NOTA

Deje la celda de flujo usada en el instrumento. Debe haber una celda de flujo cargada en el instrumento para llevar a cabo un lavado del instrumento.

Los clientes que ejecuten MCS v2.5 o superior podrán seleccionar un lavado posterior al experimento que incluye un lavado del conducto de cadena molde. La opción de lavado del conducto de cadena molde se selecciona en la pantalla de lavado posterior al experimento. Esta opción de lavado posterior al experimento se recomienda para aquellos clientes que realicen el flujo de trabajo de VeriSeq u otras aplicaciones con alta sensibilidad, como la llamada de variantes somáticas.

El lavado posterior al experimento que incluye un lavado del conducto de cadena molde requiere el empleo de hipoclorito de sodio y un tubo MiSeq (n.º de referencia MS-102-9999). El lavado dura aproximadamente 30 minutos. Consulte *Procedimiento con lavado de conducto de cadena molde* en la página 69.



NOTA

No utilice hipoclorito de sodio para un lavado de mantenimiento o un lavado en modo en espera.

Consumibles proporcionados por el usuario

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949)
- ▶ Agua de laboratorio
- ▶ Hipoclorito de sodio (debe emplearse en un lavado posterior al experimento que incluya un lavado del conducto de cadena molde)

Procedimiento

- 1 Prepare una solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio como se explica a continuación:
 - a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan el resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan el resultado de una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
 - 2 Prepare los componentes de lavado con solución de lavado nueva como sigue:
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
 - 3 Una vez se complete el experimento, seleccione **Start Wash** (Iniciar lavado). El software eleva automáticamente los dispensadores del refrigerador de reactivos.
 - 4 *No* seleccione la opción **Perform optional template line wash** (Realizar lavado opcional de conducto de cadena molde) en la pantalla de lavado posterior al experimento. El lavado del conducto de cadena molde requiere un procedimiento diferente. Consulte *Procedimiento con lavado de conducto de cadena molde* en la página 69.
 - 5 Abra la puerta del refrigerador de reactivos y del compartimento de reactivos, y extraiga el cartucho de reactivo usado del refrigerador.
 - 6 Deslice la bandeja de lavado para introducirla en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope y seguidamente, cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
 - 7 Levante el mango del dispensador situado delante de la botella de PR2 y de la botella de residuos hasta que quede bloqueado en su sitio.
 - 8 Quite la botella de PR2 y sustitúyala por la botella de lavado.
-  **NOTA**
Deseche la botella de PR2 después de cada experimento. No reutilice el PR2 restante.
- 9 Quite la botella de residuos y deseche el contenido de manera adecuada. Devuelva la botella de residuos al compartimento de reactivos.

**ADVERTENCIA**

Esta serie de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. Evite su inhalación o ingestión, así como el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y el contenido no utilizado de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener información adicional, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) de este kit en support.illumina.com/sds.html.

- 10 Baje despacio el mango del dispensador, asegurándose de que los dispensadores bajan en la botella de lavado y la de residuos.
- 11 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 12 Seleccione **Next** (Siguiente). Comenzará el lavado posterior al experimento.

Cuando haya terminado el lavado, deje la celda de flujo utilizada, la bandeja de lavado y la botella de lavado que contiene la solución de lavado restante sobre el instrumento.

**NOTA**

Los dispensadores permanecen en la posición bajada, lo que es normal. Deje la solución de lavado sin utilizar en la bandeja de lavado y la botella de lavado para evitar que los dispensadores se sequen y que entre aire en el sistema.

Procedimiento con lavado de conducto de cadena molde

**NOTA**

Deberá emplear MCS v2.5 o superior para llevar a cabo este procedimiento de lavado posterior al experimento que incluye un lavado del conducto de cadena molde. Para obtener información adicional, consulte *Realización de un lavado posterior al experimento* en la página 67.

- 1 Prepare una solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio como se explica a continuación:
 - a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Prepare una solución de lavado de hipoclorito de sodio con agua de laboratorio según se explica a continuación:

- a Añada 30 μ l de hipoclorito de sodio al 6 % a 870 μ l de agua de laboratorio. Estos volúmenes dan como resultado una dilución de hipoclorito de sodio con una proporción de 1:30.
- b Añada 50 μ l de la dilución de hipoclorito de sodio 1:30 a 950 μ l de agua de laboratorio en un tubo MiSeq suministrado por Illumina (n.º de referencia MS-102-9999).



NOTA

Es importante emplear la concentración correcta de hipoclorito de sodio. Asegúrese de comprobar el porcentaje de hipoclorito de sodio en la etiqueta del producto. Si la concentración es demasiado elevada, puede provocar errores en la generación de grupos en experimentos posteriores. Si no dispone de hipoclorito de sodio al 6 %, obtenga 1 ml de solución de hipoclorito de sodio al 0,01 % en agua de laboratorio.

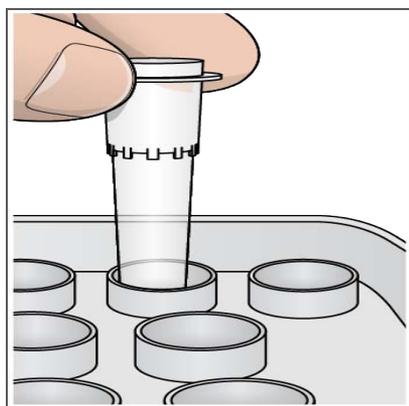


NOTA

No utilice hipoclorito de sodio para un lavado de mantenimiento o un lavado en modo en espera.

- 3 Prepare los componentes de lavado con solución de lavado nueva como se explica a continuación:
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
- 4 Introduzca el tubo MiSeq que contiene la solución de lavado de hipoclorito de sodio al 0,01 % en la posición 17 de la bandeja de lavado hasta que el cuello del tubo esté alineado con la bandeja. El tubo desplazará la solución de lavado de Tween 20 y agua de laboratorio de la posición 17.

Figura 24 Tubo MiSeq en la posición 17 de la bandeja de lavado



**NOTA**

Asegúrese de introducir el tubo MiSeq con hipoclorito de sodio únicamente en la posición 17 de la bandeja. Si introduce el tubo en otra posición, puede provocar errores en la generación de grupos durante experimentos posteriores, así como daños en el sistema de fluidica del instrumento MiSeq.

- 5 Una vez finalizado el experimento, seleccione **Start Wash** (Iniciar lavado). El software eleva automáticamente los dispensadores del refrigerador de reactivos.
- 6 Seleccione la opción **Perform optional template line wash** (Realizar lavado opcional de conducto de cadena molde) en la pantalla de lavado posterior al experimento.

**NOTA**

En el caso de clientes que realicen el flujo de trabajo de VeriSeq, la opción **Perform optional template line wash** (Realizar lavado opcional de conducto de cadena molde) estará seleccionada previamente. El MCS realiza un seguimiento del tipo de lavado posterior al experimento realizado después de cada experimento. Si no se selecciona la opción **Perform optional template line wash** (Realizar lavado opcional de conducto de cadena molde) para el lavado posterior al experimento, aparece un mensaje en la pantalla de revisión del experimento para recordárselo la próxima vez que inicie un experimento de secuenciación.

- 7 Abra la puerta del refrigerador de reactivos y del compartimento de reactivos, y extraiga el cartucho de reactivo utilizado del refrigerador.
- 8 Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope y, a continuación, cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
- 9 Levante el mango del dispensador situado delante de la botella de PR2 y de la botella de residuos hasta que quede en su sitio.
- 10 Quite la botella de PR2 y sustitúyala por la botella de lavado.

**NOTA**

Deseche la botella de PR2 después de cada experimento. No reutilice el PR2 restante.

- 11 Quite la botella de residuos y deseche el contenido como corresponda. Vuelva a colocar la botella de residuos en el compartimento de reactivos.

**ADVERTENCIA**

Esta serie de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. Evite su inhalación o ingestión, así como el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y el contenido no utilizado de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener información adicional, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) de este kit en support.illumina.com/sds.html.

- 12 Baje despacio el mango del dispensador y asegúrese de que los dispensadores bajan hasta la botella de lavado y la de residuos.
- 13 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 14 Seleccione **Next** (Siguiete). Comenzará el lavado posterior al experimento.

Cuando el lavado haya finalizado, deje en el instrumento la celda de flujo, la bandeja de lavado y la botella de lavado con los restos de solución de lavado que ha utilizado.



NOTA

Los dispensadores permanecen en posición bajada, que es lo normal. Deje la solución de lavado sin utilizar en la bandeja de lavado y en la botella de lavado para evitar que los dispensadores se sequen y que entre aire en el sistema.

Realización de un lavado de mantenimiento

Realice un lavado de mantenimiento cada 30 días para garantizar un rendimiento óptimo. El lavado de mantenimiento incluye una serie de tres pasos de lavado con una solución de lavado de agua de laboratorio mezclada con Tween 20. Espere unos 90 minutos a que finalice el lavado.

Consumibles proporcionados por el usuario

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949)
- ▶ Agua de laboratorio

Procedimiento

- 1 Asegúrese de cargar una celda de flujo usada en el instrumento.
- 2 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado).
- 3 En la pantalla Perform Wash (Realizar lavado), seleccione **Maintenance Wash** (Lavado de mantenimiento). El software eleva automáticamente los dispensadores del refrigerador de reactivos.

Realización del primer lavado

- 1 Prepare solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio, como se explica a continuación:
 - a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Prepare los componentes de lavado con solución de lavado nueva como sigue:
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
- 3 Cargue la bandeja de lavado y la botella de lavado en el instrumento:

- a Abra la puerta del compartimento de reactivos y la puerta del refrigerador de reactivos, y extraiga la bandeja de lavado o el cartucho de reactivo utilizado del refrigerador.
- b Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope. Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
- c Levante el mango del dispensador situado frente a la botella de PR2 y la botella de residuos hasta que quede en su sitio, y sustituya la botella de PR2 por la botella de lavado.



NOTA

Deseche la botella de PR2 después de cada experimento. No reutilice el PR2 restante.

- d Quite la botella de residuos y deseche el contenido como corresponda. Vuelva a colocar la botella de residuos en el compartimento de reactivos.
 - e Baje despacio el mango del dispensador y asegúrese de que los dispensadores bajan hasta la botella de lavado y la de residuos.
 - f Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente). Comenzará el primer lavado.

Realización del segundo lavado



NOTA

Utilice siempre solución de lavado nueva para cada paso de lavado. La reutilización de la solución de lavado de un lavado anterior puede devolver residuos a los conductos de fluidica.

- 1 Prepare una solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio como se explica a continuación:
 - a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Cuando haya finalizado el primer lavado, retire la bandeja de lavado y la botella de lavado y deseche la solución de lavado restante.
- 3 Vuelva a llenar los componentes de lavado con solución de lavado nueva como se explica a continuación:

- a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
- 4 Cargue la bandeja de lavado y la botella de lavado como se explica a continuación:
 - a Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope. Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
 - b Cargue la botella de lavado y baje despacio el mango del dispensador; asegúrese de que los dispensadores bajan hasta la botella de lavado y la de residuos.
 - c Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
 - 5 Seleccione **Next** (Siguiete). Comenzará el segundo lavado.

Realización del lavado final

- 1 Prepare una solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio como se explica a continuación:
 - a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Cuando haya finalizado el segundo lavado, retire la bandeja de lavado y la botella de lavado y deseche la solución de lavado restante.
- 3 Vuelva a llenar los componentes de lavado con solución de lavado nueva como se explica a continuación:
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
- 4 Cargue la bandeja de lavado y la botella de lavado como se explica a continuación:
 - a Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope. Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
 - b Cargue la botella de lavado y baje despacio el mango del dispensador; asegúrese de que los dispensadores bajan hasta la botella de lavado y la de residuos.
 - c Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 5 Seleccione **Next** (Siguiete). Comenzará el lavado final.

Después del lavado

Cuando el lavado haya finalizado, deje la celda de flujo que ha utilizado, la bandeja de lavado y la botella de lavado que contiene la solución de lavado restante en el instrumento.



NOTA

Los dispensadores permanecen en posición bajada, que es lo normal. Deje la solución de lavado sin utilizar en la bandeja de lavado y en la botella de lavado para evitar que los dispensadores se sequen y que entre aire en el sistema.

Realización de un lavado en modo en espera

Si no tiene planeado utilizar el instrumento en los próximos siete días, prepárelo para que permanezca inactivo realizando un lavado en modo en espera. Un lavado en modo en espera realiza dos lavados consecutivos que irrigan cada posición para limpiar cualquier residuo de reactivos o acumulación de sal. Cada lavado lleva unos 60 minutos. Espere unas 2 horas para que el lavado en modo en espera finalice.

Cuando el lavado en modo en espera haya finalizado, el instrumento estará en modo en espera y aparecerá un mensaje en la pantalla Welcome (Bienvenida) indicando el estado del instrumento. Cuando el instrumento está en el modo de espera, es preciso realizar un lavado de mantenimiento antes de iniciar un experimento de secuenciación.



NOTA

Illustra recomienda repetir el lavado en espera *cada 30 días* de inactividad del instrumento. Si realiza el flujo de trabajo de VeriSeq, consulte la sección *Frecuencia del mantenimiento del flujo de trabajo de VeriSeq* en la página 63

Consumibles proporcionados por el usuario

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949)
- ▶ Agua de laboratorio

Procedimiento

- 1 Asegúrese de cargar una celda de flujo usada en el instrumento.
- 2 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado).
- 3 En la pantalla Wash Options (Opciones de lavado), seleccione **Standby Wash** (Lavado en modo en espera). El software eleva automáticamente los dispensadores del refrigerador de reactivos.

Realización del primer lavado

- 1 Prepare solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio, como se explica a continuación:

- a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Prepare los componentes de lavado con solución de lavado nueva como sigue:
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
 - 3 Cargue la bandeja de lavado y la botella de lavado en el instrumento:
 - a Abra la puerta del compartimento de reactivos y la puerta del refrigerador de reactivos, y extraiga la bandeja de lavado o el cartucho de reactivo utilizado del refrigerador.
 - b Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope. Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
 - c Levante el mango del dispensador situado frente a la botella de PR2 y la botella de residuos hasta que quede en su sitio, y sustituya la botella de PR2 por la botella de lavado.
-  **NOTA**
Deseche la botella de PR2 después de cada experimento. No reutilice el PR2 restante.
- d Quite la botella de residuos y deseche el contenido como corresponda. Vuelva a colocar la botella de residuos en el compartimento de reactivos.
 - e Baje despacio el mango del dispensador y asegúrese de que los dispensadores bajan hasta la botella de lavado y la de residuos.
 - f Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 4 Seleccione **Next** (Siguiente). Comenzará el primer lavado.

Realización del segundo lavado



NOTA

Utilice siempre solución de lavado nueva para cada paso de lavado. La reutilización de la solución de lavado de un lavado anterior puede devolver residuos a los conductos de fluidica.

- 1 Prepare una solución de lavado nueva con Tween 20 y agua de laboratorio como se explica a continuación:

- a Añada 5 ml de Tween 20 al 100 % a 45 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan un resultado de Tween 20 al 10 %.
 - b Añada 25 ml de Tween 20 al 10 % a 475 ml de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan como resultado una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 %.
 - c Invierta cinco veces para mezclar.
- 2 Cuando haya finalizado el primer lavado, retire la bandeja de lavado y la botella de lavado y deseche la solución de lavado restante.
 - 3 Vuelva a llenar los componentes de lavado con solución de lavado nueva como se explica a continuación:
 - a Añada 6 ml de solución de lavado a cada depósito de la bandeja de lavado.
 - b Añada 350 ml de solución de lavado a la botella de lavado de 500 ml.
 - 4 Cargue la bandeja de lavado y la botella de lavado como se explica a continuación:
 - a Introduzca la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que llegue al tope. Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
 - b Cargue la botella de lavado y baje despacio el mango del dispensador; asegúrese de que los dispensadores bajan hasta la botella de lavado y la de residuos.
 - c Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
 - 5 Seleccione **Next** (Siguiente). Comenzará el segundo lavado.

Después del lavado

Cuando el lavado haya finalizado, deje la celda de flujo que ha utilizado, la bandeja de lavado y la botella de lavado que contiene la solución de lavado restante en el instrumento.



NOTA

Los dispensadores permanecen en posición bajada, que es lo normal. Deje la solución de lavado sin utilizar en la bandeja de lavado y en la botella de lavado para evitar que los dispensadores se sequen y que entre aire en el sistema.

Actualizaciones de software

Si su sistema está conectado a una red con acceso a Internet, puede actualizar el software del instrumento automáticamente mediante la pantalla Welcome (Bienvenida).

Cuando haya actualizaciones de software disponibles, aparecerá el botón **Update Available** (Actualización disponible) en la pantalla Welcome (Bienvenida). De lo contrario, este botón no está visible.

Para iniciar una actualización del software, seleccione **Update Available** (Actualización disponible). Se abrirá un cuadro de diálogo para confirmar el comando, momento en el que se deberá reiniciar el instrumento. La instalación de la actualización comenzará automáticamente tras el reinicio.

Si su instrumento no está conectado a una red con acceso a Internet, puede actualizar el software de forma manual.

Pantalla Manual Update (Actualización manual)

Utilice la función Manual Update (Actualización manual) para actualizar el software de control del instrumento y el software de análisis desde la interfaz de MiSeq navegando hasta la ubicación del archivo de software instalable.

Seleccione **Browse** (Examinar) para navegar hasta la ubicación donde está el archivo instalable de la nueva versión del software. Cuando la ruta del archivo instalable del software aparezca en la pantalla, seleccione **Update** (Actualizar).

Si el instrumento está conectado a una red, también puede actualizar automáticamente su software. Para obtener información adicional, consulte *Actualizaciones de software* en la página 80.

Apagado del instrumento

Se recomienda dejar siempre encendido el instrumento. Sin embargo, si es preciso apagar el instrumento, utilice el procedimiento siguiente para apagar Windows y preparar los conductos de fluídica.

- 1 Realice un lavado de mantenimiento. Para obtener información adicional, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 73.
- 2 Quite la botella de residuos y deseche el contenido de manera adecuada. Devuelva la botella de residuos al compartimento de reactivos.
- 3 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.
- 4 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **Shut Down** (Apagar). Este comando apaga el software.
- 5 Mueva el interruptor de encendido a la posición OFF (Apagado).



NOTA

Cada vez que apague el instrumento, espere como *mínimo* 60 segundos antes de volver a poner el interruptor de encendido en la posición ON (Encendido).

Solución de problemas

Introducción	84
Empaquetado de registros para solucionar problemas	85
Configuración del software	87
Pausa o detención de un experimento	91
Resolución de errores de configuración de experimentos	94
Resolución del error de lectura de RFID	96
Solución de problemas de velocidad de flujo	98
Realización de una prueba de volumen	99
Medición de los volúmenes de lavado esperados	103



Introducción

Esta sección describe los pasos de solución de problemas habituales que puede tomar antes de ponerse en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Para la mayoría de los errores, aparecerá un mensaje en pantalla con las instrucciones para corregir el error.

Para cuestiones técnicas, visite las páginas de asistencia de MiSeq del sitio web de Illumina para acceder a las preguntas frecuentes o inicie una sesión en su cuenta de MyIllumina con el fin de acceder a los boletines de asistencia.

Si tiene problemas con la calidad o el rendimiento de los experimentos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Para obtener información adicional, consulte *Asistencia técnica* en la página 109.

Normalmente, los representantes del servicio de asistencia técnica de Illumina solicitan copias de archivos específicos del experimento para solucionar problemas. Puede utilizar la ficha Bundle Logs (Empaquetar registros) de la pantalla Manage Files (Administrar archivos) para agrupar y empaquetar en un archivo ZIP los archivos requeridos para solucionar problemas. Consulte *Empaquetado de registros para solucionar problemas* en la página 85.

Empaquetado de registros para solucionar problemas

Bundle Logs (Empaquetar registros) es una función que ayuda a los clientes a agrupar y empaquetar registros en un archivo ZIP para enviárselos al servicio de asistencia técnica de Illumina.

Ficha Bundle Logs (Empaquetar registros)

Utilice la ficha Bundle Logs (Empaquetar registros) de la pantalla Manage Files (Administrar archivos) para seleccionar un grupo de archivos, llamado *paquete*. El paquete se comprime en un archivo ZIP automáticamente.



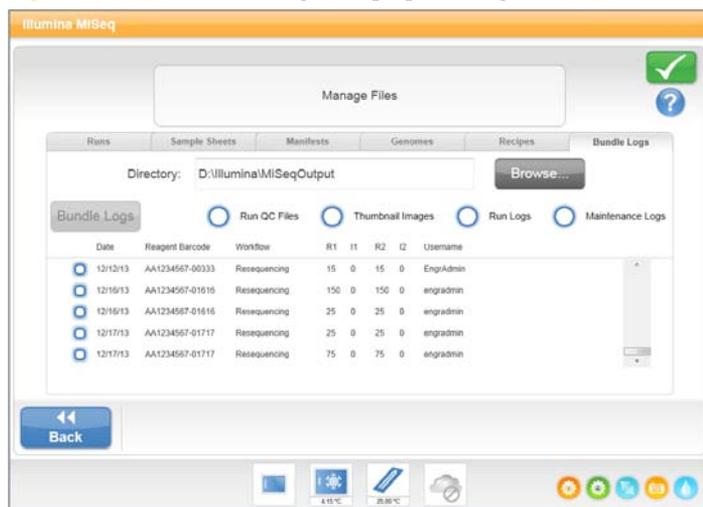
NOTA

La función Bundle Logs (Empaquetar registros) agrupa los archivos de un experimento en un tipo de paquete cada vez. Repita el procedimiento por cada experimento y tipo de paquete que el servicio de asistencia técnica de Illumina le solicite.

- 1 En la pantalla Manage Files (Administrar archivos), seleccione la ficha **Bundle Logs** (Empaquetar registros).
- 2 Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de la carpeta MiSeqOutput (ResultadoMiSeq).
- 3 Haga clic en la casilla azul situada junto al experimento y en el círculo azul situado junto al tipo de paquete que le haya solicitado el servicio de asistencia técnica de Illumina.
- 4 Seleccione **Bundle Logs** (Empaquetar registros).
- 5 Se abrirá la pantalla Bundle Files (Archivos del paquete), que mostrará la información del paquete, incluida la lista de archivos concretos que contiene.
Para obtener más información sobre cada carpeta y archivo de la función Bundle Logs (Empaquetar registros), consulte la *tarjeta de referencia rápida de carpetas de análisis y de salida de MiSeq (n.º de referencia 15034791)*.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiente).
- 7 Vaya a la ubicación donde desea guardar los archivos del paquete comprimidos en formato ZIP.
- 8 Haga clic en **Save** (Guardar).
- 9 Se abrirá el mensaje "Bundling Files" (Empaquetando archivos).

- 10 Cuando el proceso finalice, se volverá a abrir la ficha Bundle Logs (Empaquetar registros).
- 11 Envíe el archivo ZIP al servicio de asistencia técnica de Illumina.

Figura 25 Ficha Bundle Logs (Empaquetar registros)



Configuración del software

MCS incluye numerosas pantallas que permiten acceder a comandos para configurar el sistema y administrar el instrumento.

Pantalla System Settings (Configuración del sistema)

La configuración del sistema suele definirse cuando el instrumento se instala y se inicia por primera vez. Si necesita modificar algún parámetro de la configuración debido a un cambio de red o de centro, utilice la función System Settings (Configuración del sistema).

Figura 26 System Settings (Configuración del sistema)



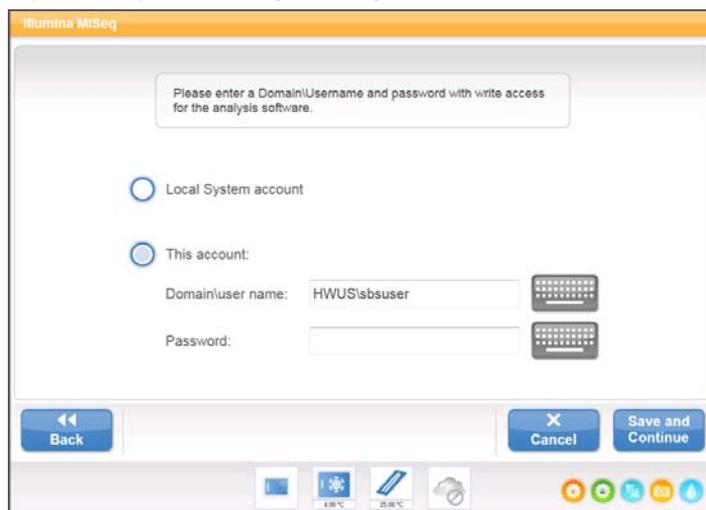
Póngase en contacto con el administrador de la instalación para informarse acerca de qué configuración de red debe especificar.

Cambio de los credenciales del sistema

Modifique el nombre de usuario y la contraseña del sistema en la pantalla System Settings (Configuración del sistema). Seleccione **System Settings** (Configuración del sistema) en la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) y, a continuación, seleccione **Save and Continue** (Guardar y continuar) para pasar a la tercera pantalla de la serie de pantallas.

Seleccione **This account** (Esta cuenta). Introduzca el nombre de dominio (Domain\MiSeq1, por ejemplo) y la contraseña. Seleccione **Save and Continue** (Guardar y continuar). Las credenciales de MiSeq Reporter y de BaseSpace también se actualizarán.

Figura 27 System Settings (Configuración del sistema)



Pantalla System Check (Comprobación del sistema)

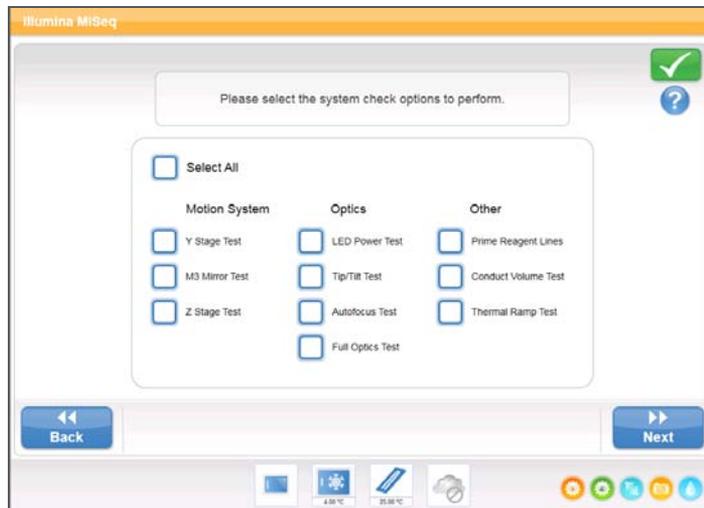
System Check (Comprobación del sistema) es una pantalla que normalmente se utiliza para conectar con un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina durante una sesión de Live Help. No es necesario utilizar esta función durante el funcionamiento normal ni para el mantenimiento del instrumento.

Algunas comprobaciones del sistema pueden realizarse antes de contactar con el servicio de asistencia técnica de Illumina, como la prueba de volumen. Una prueba de volumen comprueba el estado del sistema de fluídica calculando el volumen de flujo a medida que las burbujas pasan por los sensores. Para obtener información adicional, consulte *Realización de una prueba de volumen* en la página 99.

Una vez finalizada la comprobación del sistema, los resultados de la prueba aparecerán en la pantalla:

- ▶ Seleccione **Show Details** (Mostrar detalles) para ver un resumen de los resultados en la interfaz del software.
- ▶ Seleccione **Export Results** (Exportar resultados) para exportar los resultados a un formato *.csv en una unidad USB.

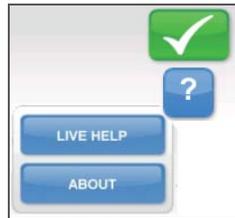
Figura 28 Opciones de System Check (Comprobación del sistema)



Live Help

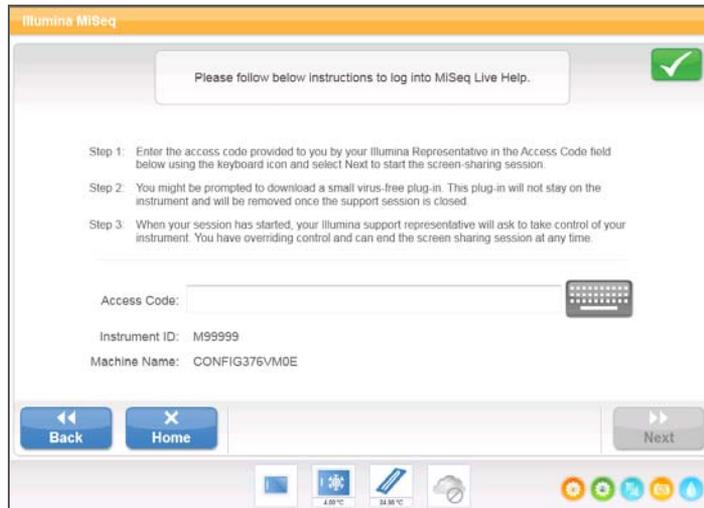
MiSeq debe estar conectado a una red con acceso a Internet para que se active la opción Live Help. La función Live Help es una herramienta de asistencia en línea que permite a un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina visualizar su pantalla de MiSeq con su permiso y compartir el control del instrumento. Usted tendrá el control principal y podrá cerrar la sesión de uso compartido de la pantalla en cualquier momento. Puede acceder a Live Help desde el icono de ayuda de la pantalla Welcome (Bienvenida).

Figura 29 Menú Help (Ayuda)



Para activar una conexión, solicite un código único de acceso al servicio de asistencia técnica de Illumina, introduzca dicho código en la pantalla Live Help y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

Figura 30 Pantalla Live Help



Pausa o detención de un experimento

El sistema MiSeq está diseñado para completar un experimento de principio a fin sin necesidad de que intervenga el usuario. No obstante, se puede pausar o detener un experimento en la pantalla Sequencing (Secuenciación).

Pausa de un experimento

Puede poner en pausa temporalmente un experimento antes de que haya finalizado. Puede hacerlo, por ejemplo, si sospecha que la botella de residuos está llena. Puede reanudar un experimento en pausa.



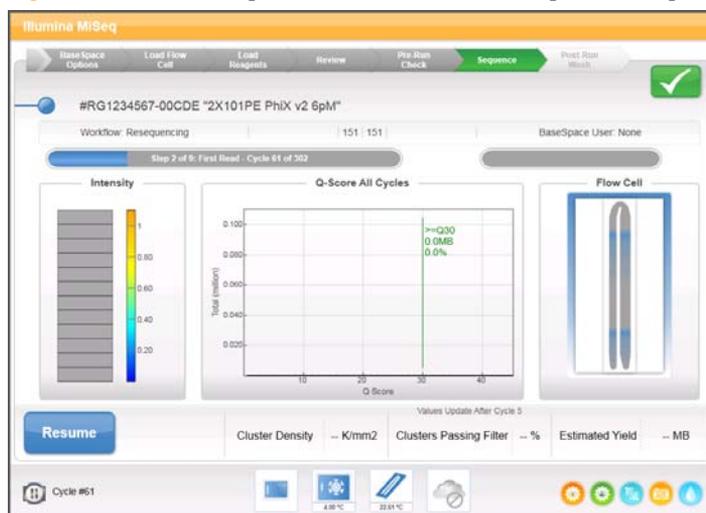
PRECAUCIÓN

No pause un experimento durante la generación de grupos o en los primeros ocho ciclos de la secuenciación. No es posible reanudar un experimento puesto en pausa en ese momento. Consulte la sección *Métricas de experimento* en la página 57 para obtener información sobre los ciclos de los kits de cartucho de reactivo de MiSeq.

Cuando seleccione **Pause** (Pausa), el comando actual finalizará. A continuación, el experimento se pausará y la celda de flujo se pondrá en un estado seguro.

Para pausar un experimento desde la pantalla Sequencing (Secuenciación), seleccione **Pause** (Pausa). El botón cambiará a Resume (Reanudar). Cuando esté listo para reanudar el experimento, seleccione **Resume** (Reanudar).

Figura 31 Pantalla Sequence (Secuenciar) de un experimento pausado

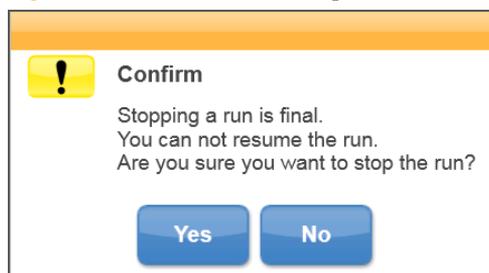


Detención de un experimento

Puede detener un experimento durante la secuenciación antes de que finalice con el botón **Stop** (Detener) de la pantalla Sequencing (Secuenciación). Puede detener un experimento si este se ha configurado incorrectamente, si la calidad de los datos es mala o si detecta un error de hardware.

Cuando se detiene un experimento, el comando actual no se realiza y la platina de la celda de flujo se mueve hacia delante. El análisis principal continúa en el último ciclo finalizado.

Figura 32 Detención de un experimento



La detención de un experimento es definitiva. No es posible reanudar un experimento tras detenerlo. La única opción disponible es pasar a realizar un lavado del instrumento.

Resolución de errores de configuración de experimentos

Si falla alguna de las comprobaciones previas al experimento, aparecerá un icono rojo **X** junto al elemento. Aparecerá un mensaje en pantalla que describirá el error y la acción necesaria para corregirlo.

Error	Acción
X Flow Rate Measured (Velocidad de flujo medida)	<p>Se abre la pantalla de comprobación de la velocidad de flujo. Utilice la lista desplegable o el teclado en pantalla para introducir lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solución: PR2 • Volumen: 250 • Velocidad de aspiración: 2500 • Velocidad de dispensación: 2500 <p>Seleccione Pump (Bombear). Si el error persiste, defina el volumen para que bombee 500 µl de PR2 y repita el proceso. Una vez bombeados los fluidos, seleccione Restart Check (Reiniciar comprobación).</p> <p>Cuando la comprobación previa al experimento se realice correctamente, el botón Start Run (Iniciar experimento) se activará.</p> <p>Si la comprobación del flujo vuelve a fallar, recoleque la celda de flujo para asegurarse de que el flujo no se interrumpa debido a una alineación incorrecta. Compruebe que no haya pelusas ni irregularidades en las juntas de la celda de flujo.</p>
X Free Disk Space (Liberar espacio en disco)	<p>Si queda poco espacio en el disco, aparecerá un mensaje que indicará la cantidad de espacio en el disco necesaria. Utilice la función Manage Files (Administrar archivos) para obtener el espacio necesario en el ordenador del instrumento.</p>
X Network Connection Active (Conexión de red activa)	<p>Asegúrese de que el cable de red está conectado al instrumento.</p> <p>Si la conexión de red no se restablece, seleccione Reboot (Reiniciar) en la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) para reiniciar el software.</p> <p>Si la conexión de red sigue sin restablecerse, seleccione Shut Down (Apagar) en la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) y, a continuación, apague el instrumento con el interruptor de encendido. Espere al menos 60 segundos y, a continuación, encienda el instrumento e inicie el software.</p>

Error	Acción
<p>✘ Primary Analysis Ready (Análisis principal preparado)</p>	<p>El análisis principal del experimento anterior no ha finalizado. El tiempo predeterminado para la finalización del análisis principal es 1 hora y aparece una cuenta atrás en la pantalla. Las opciones son esperar 1 hora o seleccionar la opción Terminate Analysis (Finalizar análisis). Los ciclos incompletos conllevan la detención de los análisis secundarios.</p>
<p>✘ Sample Sheet Present (Hoja de muestras presente)</p>	<p>Si no ha asignado un nombre a la hoja de muestras con el ID del cartucho de reactivo de su experimento, el instrumento no podrá localizar la hoja de muestras adecuada automáticamente. Vaya hasta la hoja de muestras de su experimento.</p> <p>Si ha asignado un nombre a la hoja de muestras con el ID del cartucho de reactivo de su experimento, asegúrese de que la hoja de muestras se encuentre en la carpeta predeterminada de la hoja de muestras. Compruebe la ubicación de la carpeta predeterminada en Run Options (Opciones de experimento) de la pantalla Welcome (Bienvenida).</p> <p>Asegúrese de que la extensión del archivo de la hoja de muestras sea *.csv.</p> <p>Si falta la hoja de muestras, cree una y cópiela en las ubicaciones de las hojas de muestras especificadas en Run Options (Opciones de experimento).</p> <p>Cuando haya localizado la hoja de muestras, seleccione Restart Check (Reiniciar comprobación).</p>

Resolución del error de lectura de RFID

Si el sistema no puede leer la RFID de un consumible, podrá obtener un código de derivación temporal en el sitio web de Illumina. Un código de derivación temporal caduca en siete días.

- 1 Seleccione siempre **Retry** (Reintentar) antes de continuar. Si la RFID vuelve a fallar, seleccione **Get Code** (Obtener código).
- 2 Desde un ordenador con acceso a Internet, vaya a my.illumina.com e inicie sesión en su cuenta de MyIllumina.
- 3 Desde la página de MyIllumina, haga clic en **Account** (Cuenta). En la columna Resources (Recursos), haga clic en **MiSeq Self-Service** (Automantenimiento de MiSeq).
- 4 En la página MiSeq Self-Service (Automantenimiento de MiSeq), introduzca el **MiSeq serial number** (Número de serie de MiSeq).
- 5 En la lista desplegable Type of Override Code (Código de tipo de anulación de control), seleccione la opción **RFID Override** (Anulación de control de RFID).

Figura 33 Página MiSeq Self-Service (Automantenimiento de MiSeq)

MyIllumina / Account / MiSeq Self Service

Self Service for MiSeq

MiSeq Serial Number

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

Description of the Issue

Type of Override Code

Please select...

GET CODE

- 6 Para generar el código, seleccione **Get Code** (Obtener código).
- 7 Vuelva a la interfaz de MCS y seleccione **Enter Code** (Introducir código).

- 8 Introduzca el código de derivación temporal mediante el teclado en pantalla y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
- 9 Introduzca el número del código de barras de la celda de flujo, la botella de PR2 o el cartucho de reactivo.

Consumible	Ubicación del número de código de barras
Celda de flujo	Encima del código de barras, en la etiqueta del contenedor de la celda de flujo. Los números de códigos de barras de las celdas de flujo empiezan por una A (estándar), una G (micro) o una D (nano). Ejemplo: A0E61
Botella de PR2	Debajo del código de barras, en la etiqueta de la botella de PR2. Ejemplo: MS0011881-PR2
Cartucho de reactivo	Debajo del código de barras, en la etiqueta del cartucho de reactivo. Ejemplo: MS0010744-300

- 10 Si va a introducir un código de derivación para el cartucho de reactivo, introduzca el número de versión del kit. Seleccione **Enter Reagent Kit Barcode** (Introducir el código de barras del kit de reactivos) para introducir manualmente el número del código de barras del cartucho de reactivo y el número de versión del kit.



PRECAUCIÓN

Si introduce una versión de kit de reactivos incorrecta, esto podría afectar negativamente a los datos de secuenciación.

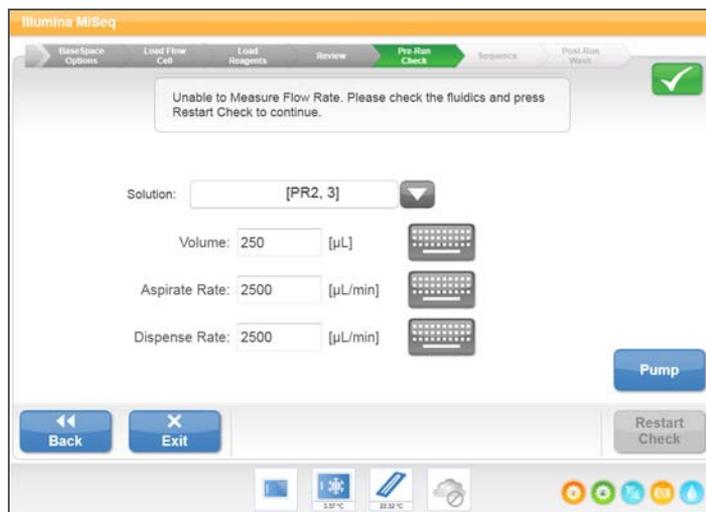
- 11 Seleccione **Enter** (Entrar).

Solución de problemas de velocidad de flujo

La velocidad de flujo es la velocidad a la que los fluidos pasan por el sistema de fluidica ($\mu\text{l}/\text{min}$). Se mide antes de cada experimento, durante la comprobación previa. Si el sistema no puede medir la velocidad de flujo, se le indicará que bombee cierta cantidad de reactivo (PR2) a través del sistema antes de volver a comprobar la velocidad de flujo.

- 1 Utilice la lista desplegable o el teclado que aparece en la pantalla para introducir la información siguiente:
 - Solución: **PR2**
 - Volumen: **250 μl**
 - Velocidad de aspiración: **2500 $\mu\text{l}/\text{min}$**
 - Velocidad de dispensación: **2500 $\mu\text{l}/\text{min}$**
- 2 Seleccione **Pump** (Bombear).

Figura 34 Medición de la velocidad de flujo



- 3 Cuando haya finalizado el bombeo, seleccione **Restart Check** (Reiniciar comprobación).
- 4 Si el error persiste, defina el volumen para que bombee 500 μl de PR2 y repita el proceso una vez más. Si en el segundo intento no resuelve el error, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

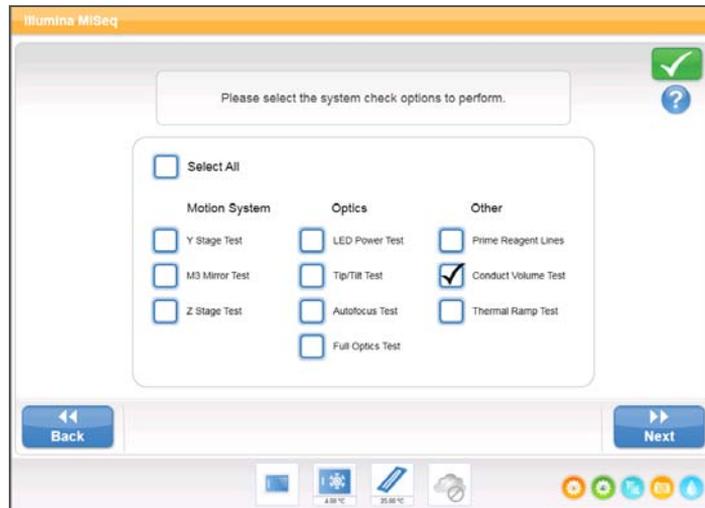
Realización de una prueba de volumen

Una obstrucción de los conductos de fluídica podría ser la causa de una administración de reactivos incorrecta y afectar a los resultados de secuenciación. Si sospecha que existe una obstrucción en los conductos de fluídica, realice una prueba de volumen.

Una prueba de volumen comprueba el estado del sistema de fluídica calculando el volumen entre dos burbujas a medida que pasan por los sensores. Para realizar una prueba de volumen, debe cargar la bandeja de lavado y la botella de lavado con agua de laboratorio y debe disponer de una celda de flujo usada, colocada en su sitio. Siga las indicaciones que aparezcan en pantalla para realizar la prueba.

- 1 Asegúrese de cargar una celda de flujo usada en el instrumento.
- 2 En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Check** (Comprobación del sistema).
- 3 Seleccione **Conduct Volume Test** (Realizar prueba de volumen) y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

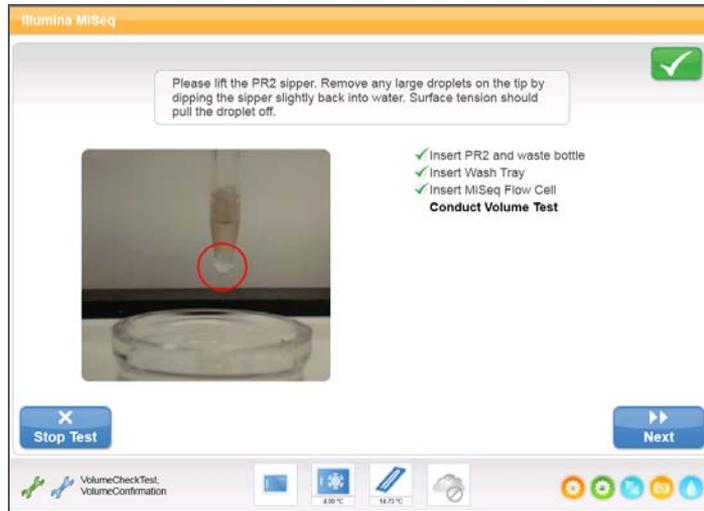
Figura 35 Pantalla System Check (Comprobación del sistema)



- 4 Llene cada depósito de la bandeja de lavado con 6 ml de agua de laboratorio.
- 5 Llene la botella de lavado de 500 ml con 350 ml de agua de laboratorio.

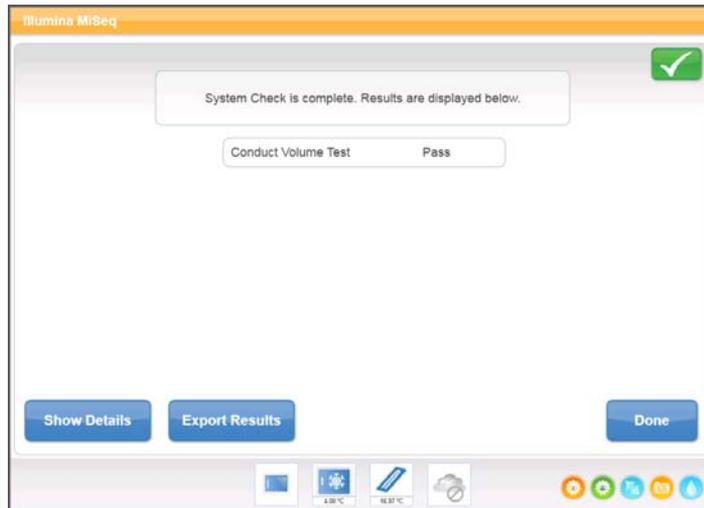
- 6 Cargue la bandeja de lavado y la botella de lavado en el instrumento.
 - a Abra la puerta del compartimento de reactivos y la puerta del refrigerador de reactivos, y deslice la bandeja de lavado en el refrigerador de reactivos hasta que se detenga. Cierre la puerta del refrigerador de reactivos.
 - b Levante el mango del dispensador hasta que quede bloqueado en su sitio y cargue la botella de lavado.
 - c Quite la botella de residuos y deseche el contenido de manera adecuada. Devuelva la botella de residuos al compartimento de reactivos.
 - d Baje despacio el mango del dispensador, asegurándose de que los dispensadores bajan en la botella de lavado y la de residuos.
- 7 De acuerdo con las indicaciones en pantalla, elimine las gotas del dispensador de la botella de lavado, como sigue:
 - a Cuando se le indique, levante lentamente el mango del dispensador y compruebe que no haya una gota grande de agua en el dispensador de la botella de lavado.
 - b Cuando se le indique, baje lentamente el mango del dispensador hacia el agua lo suficiente como para permitir que la tensión superficial elimine la gota.
 - c Cuando se le indique, levante lentamente el mango del dispensador y compruebe que no haya una gota grande de agua en el dispensador de la botella de lavado.
 - d Cuando se le indique, baje lentamente el mango del dispensador hasta el punto máximo, asegurándose de que los dispensadores bajan en la botella de lavado y la de residuos.

Figura 36 Eliminación de la gota del dispensador



- 8 Seleccione **Next** (Siguiente). Se iniciará la prueba de volumen. Cuando la prueba de volumen haya finalizado, los resultados aparecerán en la pantalla.

Figura 37 Resultados de la prueba de volumen



Si no se supera la prueba, realice un lavado de mantenimiento. Consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 73.

- 9 Cuando haya finalizado el lavado de mantenimiento, repita la prueba de volumen.

Medición de los volúmenes de lavado esperados

La medición de los volúmenes de lavado esperados confirma que la fluídica de lavado funciona correctamente.

- 1 Antes de empezar el lavado, vacíe la botella de residuos.
- 2 Cuando haya terminado el lavado, mida el volumen de lavado de la botella de residuos.

Tipo de lavado	Volumen de lavado esperado
Lavado posterior al experimento	17,25 ml
Lavado posterior al experimento que incluye un lavado del conducto de cadena molde	25,5 ml
Lavado en modo en espera	46 ml
Lavado de mantenimiento	17,25 ml

A

- abrazadera de la celda de flujo 6
- actualizar software 80
- alerta de estado, icono 18
- alertas de correo electrónico 22
- análisis
 - durante secuenciación 31
 - opciones 29
- análisis en tiempo real 2
 - carpeta del experimento 32
 - generación de cadenas molde 57
 - resultados 58
- análisis secundario 31
- apagar el instrumento 26, 81
- archivo de manifiesto
 - copiar en instrumento 19
 - definición 14
- asistencia al cliente 109
- asistencia técnica 109
- automantenimiento de MiSeq 96
- ayuda Live Help 90

B

- BaseSpace
 - conexión 17
 - credenciales 88
- BlueFuse 29
- botella de residuos 8

C

- cambiar contraseña 88
- cargar reactivos
 - cartucho 50
 - PR2 49
- carpeta del experimento
 - definición 14
- carpeta InterOp 33

- carpetas de experimento
 - archivos del análisis principal 58
 - asignación de nombres 32
 - contenido 33
 - gestionar 19
 - temp, resultados, análisis 32
- cartucho de reactivo 9
- celda de flujo
 - carril único 27
 - color de tapa 44
 - designador de letra 96
 - limpiar 44
 - numeración de placas 60
 - resumen 7
- ciclos en una lectura 28
- compartimento de la celda de flujo 5-6
- compartimento de reactivos 5, 8
- CompletedJobInfo.xml 31
- componentes
 - cartucho de reactivo 9
 - celda de flujo 7
 - compartimento de la celda de flujo 5-6
 - compartimento de reactivos 5, 8
 - módulo óptico 5
- conexión de red 95
- configuración de red 87
- configuración del instrumento 26
- configuración del sistema 87
- consumibles
 - agua de laboratorio 12
 - proporcionados por el usuario 11
 - suministrados por Illumina 10
- contraseña 13
- copiar archivos y carpetas 19

D

- detención de un experimento 92
- dirección IP 87

directrices de agua de laboratorio 12
 documentación 109
 duración del experimento 27

E

eliminar archivos y carpetas 19
 empaquetar registros 21, 84-85
 en espera, lavado 65
 encender el instrumento 13
 espacio en disco
 comprobación 35
 poco espacio en disco 95

F

fluídica
 lavar 73, 77
 solucionar problemas 98-99
 flujo de trabajo 39
 duración del experimento 27
 flujo de trabajo de VeriSeq
 análisis secundario 29
 celda de flujo 44
 frecuencia del mantenimiento 63
 replicate analysis locally 22
 flujo de trabajo del análisis
 definición 14

G

generación de cadenas molde 57
 generación de grupos 39
 generación de plantillas 27
 genoma de referencia
 formato de archivo 14
 gestionar fórmulas 19

H

hoja de muestras
 cambiar 51
 copiar en instrumento 19
 definición 14
 en la carpeta del experimento 58
 no encontrada 95

I

iconos
 alerta de estado 18

errores y advertencias 18
 indicadores de actividad 17
 sensores 17

inactivar el instrumento 77
 indicadores de actividad 17
 indicadores del sensor 17
 inicialización 95
 interruptor de encendido 13

L

lavado
 volúmenes esperados 103
 lavado del conducto de cadena de
 molde 67
 lavado en modo en espera 77
 lavado posterior al experimento 67
 lavados
 configuración de lavado posterior al
 experimento 22
 en espera 65
 mantenimiento 65, 73
 modo en espera 77
 posterior al experimento 67
 preparar para apagar 81
 preparar para inactividad 77
 ventajas 62
 Live Help 90
 longitud de lectura 27-28

M

mango del dispensador 8
 mantenimiento, lavado 65, 73
 MiSeq Reporter 2
 credenciales 88
 descripción general 31
 MiSeq Self-Service 96
 módulo óptico 5
 mover archivos y carpetas 19

N

nombre de cuenta del sistema 88
 nombre de dominio 87-88
 nombre de usuario 13
 numeración de placas 60

O

opciones de experimento 22

P

- pantalla de secuenciación 55
- pantalla Welcome (Bienvenida) 15
- pantallas de configuración del experimento 18, 43
- pausa de un experimento 91
- PGS 44
- PR2, cargar 49
- proporcionados por el usuario, consumibles 11
- prueba de volumen 99

R

- reactivos
 - cargar 49
 - en kit 10
- referencias del genoma 19
- refrigerador de reactivos, temperatura 17
- reiniciar software 26
- RFID
 - cartucho de reactivo 50
 - PR2 49
 - seguimiento 2
 - solucionar problemas 96
- RTAcomplete.txt 58
- RunInfo.xml 33, 58
- runParameters.xml 33

S

- secuenciación 39
- sensor de puerta de la celda de flujo 17
- software
 - actualizar 80
 - comprobación de espacio en disco 35
 - configuración del instrumento 26
 - duración del experimento 27
 - en el instrumento 15
 - inicialización 13
- solucionar problemas
 - archivos específicos del experimento 84
 - empaquetar registros 21, 84-85
 - errores de configuración de experimento 95

fluídica 99

RFID 96

velocidad de flujo 98

status.xml 58

supervisión del experimento 55

T

técnica, ayuda 109

U

- ubicaciones de las carpetas
 - configuración predeterminada 22
 - para el experimento actual 53

V

- velocidad de flujo, solucionar problemas 98
- visor del análisis de secuenciación 27, 55
- volúmenes de lavado 103

W

Windows, minimizar 26

Asistencia técnica

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

Tabla 5 Información de contacto general de Illumina

Dirección	5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 (EE. UU.)
Sitio web	www.illumina.com
Correo electrónico	techsupport@illumina.com

Tabla 6 Números de teléfono del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Zona	Número de contacto	Zona	Número de contacto
Norteamérica	1.800.809.4566	Irlanda	1.800.812949
Alemania	0800.180.8994	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Noruega	800.16836
Bélgica	0800.81102	Países Bajos	0800.0223859
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
España	900.812168	Suecia	020790181
Finlandia	0800.918363	Suiza	0800.563118
Francia	0800.911850	Otros países	+44.1799.534000

Hojas de datos de seguridad

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

Documentación del producto

La documentación del producto en PDF está disponible para su descarga en el sitio web de Illumina. Vaya a support.illumina.com, seleccione un producto y, a continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación y literatura).

