



Carregamento e operação do Illumina MiSeq

Materiais

Equipamento:

- Sequenciador Illumina MiSeq
- Pipeta P20
- Pipeta P200
- Pipeta P1000
- Vórtex
- Mini centrífugadora
- Banho de água

Consumíveis:

- Pontas de pipetas com filtro esterilizadas: P20, P200, P1000
- Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml
- Criotubos com tampa de rosca sem RNase
- Toalhetes de tecido sem algodão

Reagentes:

- Kit de reagentes Illumina MiSeq
- Água sem nuclease
- Água de laboratório
- Tween 20
- NaOH (pastilhas ou solução aquosa)



Criação de fichas de amostra

A ficha de amostra é usada para informar ao Illumina MiSeq quais códigos de barras foram adicionados a quais amostras. Essas informações serão usadas no processo de demultiplexação que ocorre na máquina MiSeq. As fichas de amostras podem ser criadas no próprio instrumento usando o software de gestão de experimentos da Illumina ou usando o modelo de ficha de amostras do Illumina MiSeq. Se utilizar o modelo de ficha de amostra para criar a ficha de amostra, edite-a num software de cálculo como o Excel e transfira a ficha de amostra concluída para o MiSeq utilizando o USB.

Os itens que devem ser preenchidos no modelo de ficha de amostra estão explicados abaixo:

[Título]

- **Experiment Name:** Introduza um nome de experiência único para a sua execução (por exemplo, "20220530_SC2_batch1")
- **Date:** Introduza a data da execução no formato MES/DIA/ANO
- **Workflow:** Existem vários fluxos de trabalho diferentes que pode escolher. Se estiver a sequenciar um conjunto de várias amostras indexadas e pretender efetuar a demultiplexação na máquina, introduza "Gerar Q RÁPIDO".
- **Chemistry:** Para todos os fluxos de trabalho que utilizam indexação dupla, como Nextera e TruSeq Personalizado com Amplicon, o espaço de química é obrigatório e deve ser definido como "amplicon". Caso contrário, deixe esse espaço em branco.

[Leituras]:

- Introduza os comprimentos de leitura para a frente e para trás nas linhas abaixo (Leituras). Para a sequenciação de extremidades emparelhadas, o comprimento de leitura em cada direção é o número de ciclos indicado no kit MiSeq utilizado, dividido por dois, mais um. Por outras palavras, os comprimentos de leitura para a frente e para trás são 151 para um kit de 300 ciclos.

[Dados]

- **Identificação da amostra:** Obrigatório. Liste as identificações das amostras para todas as sequências incluídas nesta execução de sequenciação. Podem ser tão simples como 1, 2, 3, etc. Cada amostra tem de ter uma identificação de amostra única.
- **Nome da amostra:** Obrigatório. Enumere os mesmos nomes para todas as sequências incluídas neste ensaio de sequenciação. Estes serão utilizados para nomear os ficheiros de saída, pelo que têm de ser únicos.
- **Índice:** Obrigatório. Introduza o nome do índice i7 utilizado na amostra correspondente.
- **I7_index_Identificação:** Opcional. Introduza o nome do índice i7 utilizado na amostra correspondente. Se não souber o nome do índice, pode introduzir novamente a sequência do índice.
- **Index2:** Obrigatório. Introduza o nome do índice i5 utilizado na amostra correspondente.
- **I5_index_Identificação:** Opcional. Introduza o nome do índice i5 utilizado na amostra correspondente. Se não souber o nome do índice, pode introduzir novamente a sequência do índice.
- **Projecto_amostra:** Opcional. Espaço onde pode indicar o nome do projeto de amostra. Pode ser deixado em branco.
- **Descrição:** Opcional. Espaço onde pode fornecer informações adicionais. Pode ser deixado em branco.



Preparação de reagentes

Equipamento:

- Banho de água
- Balde de gelo

Reagentes:

- MiSeq kit de Reagentes

Protocolo:

1. Os reagentes MiSeq têm de ser descongelados antes da sequenciação. Retire o kit de reagentes do congelador a -20°C e descongele-o num recipiente com água à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se não tiver um recipiente com água, uma caixa de gelo ou outro recipiente vedado com água à temperatura ambiente funciona igualmente bem. Certifique-se de que o nível da água não excede a "Linha de enchimento" indicada no cartucho.

Nota: Retirar o tampão de hibridação (tampão HT1) da caixa de reagentes antes de o deitar fora e descongelar na bancada. Colocar o tampão em gelo após a descongelação.

2. Quando o cartucho de reagente estiver descongelado, coloque-o em gelo ou no frigorífico a 4°C até à sua utilização. Utilizar o cartucho no prazo de 24 horas após a descongelação.
3. Manter o tampão de hibridação em gelo. Este será utilizado para diluir a amostra numa fase posterior.

Preparação de hidróxido de sódio

Tenha em atenção que o NaOH é um reagente cáustico, que pode causar queimaduras químicas. Utilize equipamento de proteção adequado quando o manusear, tanto na forma de peletes como de solução.

Equipamento e consumíveis:

- Pipeta P20, pipeta P200
- Tubo cónico de 50 ml
- Tubo Eppendorf de 1,5 mL
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- NaOH (hidróxido de sódio) em péletes ou na forma líquida
- Água sem nuclease
- Água de laboratório

OPÇÃO A: Preparar NaOH a partir de péletes

1. Preparar uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4M (=4N). A solução 4M pode ser utilizada durante um período máximo de 3 meses após a preparação inicial. Se for necessária uma nova diluição, prepará-la pelo menos um dia antes da sequenciação



Carregamento e operação do Illumina MiSeq

- a. Pesar 8 g de péletes de NaOH e transferir para um tubo cónico de 50 mL.
 - b. Adicionar lentamente 35 mL de água de laboratório ao tubo. Tenha em atenção que esta reação é exotérmica e que o tubo ficará quente.
 - c. Adicionar mais 15 mL de água e inverter o tubo para misturar.
2. Deixar a solução 4M repousar durante a noite antes de a utilizar. Escreva a data de preparação no tubo.
 3. Prepare uma solução fresca de NaOH 0,2M (=0,2N) que será utilizada para desnaturar o agrupamento de bibliotecas de DNA:

Componente	Volume
4 M NaOH	5 µL
Água sem nuclease	95 µL
Volume total	100 µL

OPÇÃO B: Preparar NaOH a partir de uma solução-mãe 2N

1. Preparar uma solução fresca de NaOH 0,2M (=0,2N) que será utilizada para desnaturar o agrupamento de bibliotecas de DNA:

Componente	Volume
2 M NaOH	10 µL
Água sem nuclease	90 µL
Volume Total	100 µL

Preparação da amostra

Seguir o protocolo de preparação de amostras adequada, dependendo da concentração final do agrupamento final de bibliotecas. Utilize a ficha MiSeq de carregamento Rápido (transferir como ficheiro .xlsx) para facilitar a preparação das diluições de amostras

Equipamento e consumíveis:

- Pipeta P20, pipeta P200
- Vortex
- Tubo Eppendorf de 1,5 ml
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Biblioteca final de DNA agrupado
- Tampão de hibridação Illumina MiSeq (do kit de reagentes MiSeq)
- Água sem nuclease
- NaOH 0,2N
- Tampão de eluição (por exemplo, de um kit de extração Qiagen)



Caso o conjunto final de bibliotecas for igual ou superior a 4nM:

1. Diluir o agrupamento de bibliotecas para 4 nM com a solução de eluição utilizando a fórmula $(C1)*(V1)=(C2)*(V2)$.
2. Alíquota de 5 µL da diluição de 4 nM para um novo tubo de 1,5 mL.
3. Adicionar 5 µL de NaOH 0,2 N aos 5 µL de agregado de bibliotecas diluídas. Agite em vórtice, centrifugue e deixe repousar à temperatura ambiente durante 5 minutos para desnaturar o DNA na amostra.

Nota: A concentração do agregado de bibliotecas desnaturado é agora de 2 nM.

4. Adicione 990 µL de Tampão de hibridação ao agregado de bibliotecas desnaturadas de 2 nM. Misture por inversão e centrifugue.

Nota: O DNA na biblioteca agrupada é agora de cadeia simples e tem uma concentração de 20 pM.

5. Diluir até à concentração de carga final de 10 pM (ajustar conforme necessário) da seguinte forma:

Componente	Volume
Tampão de hibridação	300 µL
Biblioteca a 20 pM	300 µL
Total Volume	600 µL

Nota: Misturar a amostra por inversão. Centrifugar e colocar em gelo até à utilização.

Caso o conjunto final de bibliotecas for 1,2 - 3,9nM:

1. Adicione 5 µL da sua biblioteca agrupada a um tubo de 1,5 mL.
2. Adicione 5 µL de NaOH 0,2 N aos 5 µL do conjunto de bibliotecas. Vortex, centrifugue e deixe repousar à temperatura ambiente durante 5 minutos para desnaturar o DNA na amostra.
3. Determinar a quantidade de tampão de hibridação a adicionar para obter uma concentração de carga final de 10 pM utilizando a fórmula $(C1)*(V1)=(C2)*(V2)$.

Exemplo prático:

Após o Passo 2, uma biblioteca de 1,2 nM estará a 0,6 nM ou 600 pM.

$(\text{Conjunto de 600 pM}) * (10 \mu\text{L de biblioteca}) = (\text{concentração final de 10 pM}) * (X \mu\text{L de tampão de hibridação})$

$(6000) = (\text{concentração final de 10 pM}) * (X \mu\text{L de tampão de hibridação})$

$(X \mu\text{L de tampão de hibridação}) = (6000) / (\text{concentração final de 10 pM})$

$X \mu\text{L de tampão de hibridação} = 600 \mu\text{L}$

Neste exemplo, 10 µL de Biblioteca de DNA 600 pM devem ser adicionados a 590 µL de tampão de hibridação. Isto fará com que a concentração final seja de 10 pM (volume total: 600 µL)



- Adicionar a quantidade calculada de tampão de hibridação ao conjunto de bibliotecas desnaturadas para obter a concentração de carga de 10 pM utilizada acima:

Componente	Volume
Tampão de hibridação	Usar a fórmula
Biblioteca desnaturada	10 μ L
Volume Total	600 μL

Nota: Misturar a amostra por inversão. Centrifugar e colocar em gelo até à utilização.

Caso o conjunto final de bibliotecas seja inferior a 1,2 nM:

- Este agrupamento de bibliotecas pode ter uma concentração demasiado baixa para produzir bons resultados de sequenciação. Se pretender continuar, utilize o MiSeq ficha de carregamento Rápido (descarregar como ficheiro .xlsx) para calcular a diluição adequada.

Preparação e lavagem da máquina

É importante certificar-se de que as linhas de fluidos do MiSeq sejam completamente lavadas entre as execuções de sequenciamento para evitar qualquer acúmulo de precipitado. Também é importante que os sistemas de fluidos sejam bem mantidos quando o instrumento estiver inativo. O MiSeq deve ser lavado com 0,5% de Tween 20 em água de laboratório antes e depois de cada uso. O software solicitará a realização da lavagem pós-execução após a conclusão da execução e não permitirá que outra execução seja iniciada a menos que uma lavagem tenha sido realizada. Terá de iniciar uma lavagem manualmente antes de cada processamento.

Equipamento:

Sequenciador Illumina MiSeq

→ Recipiente de lavagem MiSeq

→ Frasco de lavagem MiSeq

Reagentes:

→ Água de qualidade laboratorial

→ Tween 20

Protocolo:

- Para preparar um estoque de lavagem a 10%, adicionar 5 mL de 100% Tween 20 a 45 mL de água de laboratório. Isto resulta em 10% de Tween 20. Guarde esta solução de estoque para uso futuro.
- Para preparar 0,5% de Tween 20, adicione 25 mL de 10% de Tween 20 a 475 mL de água de laboratório. Inverter várias vezes para misturar.
- Abra o software de controlo MiSeq e seleccione o ícone Instrumento de lavagem. Em seguida, seleccione Pós-lavagem.
- Verifique se existe uma célula de fluxo no local.



Nota: NÃO EXECUTE NENHUMA LAVAGEM SEM UMA CÉLULA DE FLUXO. A célula de fluxo assegura a existência de vácuo no interior das linhas de reagentes. Este vácuo mantém as bolhas de ar fora dos fluidos da máquina.

5. A máquina pede-lhe que encha o tabuleiro de lavagem MiSeq com a solução de lavagem MiSeq (solução de Tween a 0,5%).
 - a. Abra a porta do refrigerador de reagentes e verifique o volume da garrafa de lavagem. Encha a garrafa pelo menos até meio se estiver num nível baixo. Nota: Levante o sifão até ao fim quando retirar e voltar a colocar a garrafa.
 - b. Deite o líquido na garrafa de resíduos.
 - c. Abra a porta do refrigerador para retirar o cartucho de lavagem.
 - d. Encha cada espaço do tabuleiro de lavagem com solução de lavagem e volte a colocá-lo no instrumento. Não é necessário encher completamente cada compartimento, recomenda-se 1-5 mm de espaço livre.
 - e. Feche ambas as portas do refrigerador, certificando-se de que o sifão PR2 foi colocado na posição descida.
6. Seleccione Iniciar lavagem para iniciar a lavagem.
7. Deixe todos os componentes de lavagem no lugar até iniciar a lavagem seguinte ou o ciclo de sequenciação.
8. Uma vez por mês, efectue uma lavagem de manutenção na máquina. Esta lavagem é uma lavagem mais completa, que efectua vários enxaguamentos dos fluidos e demora cerca de 90 minutos. A preparação para esta lavagem é a mesma que para uma lavagem pós-execução. Terá de regressar à máquina duas vezes durante esta lavagem para voltar a encher o tabuleiro de lavagem e o frasco de lavagem e iniciar o passo seguinte. Se a lavagem de manutenção estiver atrasada, o MiSeq não iniciará uma nova execução até que ela seja realizada.
9. Se você não planeja usar o MiSeq por um período de tempo significativo, execute uma lavagem de espera. Isso colocará o MiSeq em um estado de espera. Repita a lavagem de espera a cada 30 dias em que a máquina estiver inativa. Será necessário realizar uma lavagem de manutenção antes de iniciar a próxima execução de sequenciamento.

Nota: Se notar indícios de contaminação entre execuções, pode considerar a realização de uma lavagem de linha de modelo como parte da lavagem pós-execução. Para obter mais informações sobre este assunto, consulte a página 30 do Guia do sistema MiSeq



Limpeza da lâmina de fluxo e carregamento do cartucho de reagente

Assim que a biblioteca final for diluída para a concentração de carga, limpar a célula de fluxo e carregar o conjunto no cartucho MiSeq.

Equipamento:

Lavatório ou outro recipiente para coletar água

→ Pipeta P1000

Consumíveis:

→ Pontas de pipeta P1000

→ Frasco de esguicho cheio com água destilada ou pipeta de 1 mL e frasco de água de laboratório

→ Toalhetes Kim ou outro tecido que não liberte pêlos

Reagentes:

→ Cartucho de reagentes MiSeqConsumables:

Protocolo:

1. Inverta o cartucho de reagentes MiSeq e verifique se todos os reservatórios de reagentes estão completamente descongelados.
2. Bater com o cartucho no balcão para assentar todos os reagentes no fundo do kit.
3. Utilizando uma ponta de pipeta de 1 ml, perfure a folha de alumínio para a posição 17 (rodeada por um círculo cor de laranja). Deitar fora a ponta da pipeta após a utilização.
4. Adicionar 600 μ L do conjunto de bibliotecas de 10 pM ao orifício criado no passo anterior. Evitar tocar na folha perfurada com a ponta da pipeta e evitar dispensar nas paredes do recipiente.
5. Retire a lâmina de fluxo do frigorífico a 4°C e retire-a cuidadosamente do recipiente.

Nota: Guarde o recipiente da lâmina de fluxo e o restante do tampão de hibridação na eventualidade de haver um atraso no início da execução e a lâmina de fluxo precisar de ser novamente armazenada.

6. Num lavatório ou com toalhas de papel, enxaguar bem a lâmina de fluxo com água de qualidade laboratorial.
7. Seque a lâmina de fluxo com toalhetes de tecido que não libertem pêlos, verificando se a lâmina de fluxo está completamente seca e isenta de manchas ou nódoas. Evite tocar nos dois orifícios pretos situados na parte superior da célula de fluxo.
8. Opcional. Limpar o vidro da célula de fluxo com um toalhete embebido em álcool. Em seguida, seque com toalhetes de tecido que não libertem pêlos, verificando se a célula de fluxo está completamente seca e isenta de manchas ou nódoas.



9. Proceda imediatamente ao carregamento do MiSeq. Não deixe o kit parado por longos períodos com a amostra dentro.

Iniciar uma execução de sequenciação

Equipamento:

→ Sequenciador Illumina MiSeq

Reagentes:

→ Cartucho de reagente MiSeq com biblioteca adicionada
→ Célula de fluxo limpa e seca
→ Tampão PR2

Protocolo:

1. Antes da execução, desligue o MiSeq. Na tela inicial, selecione Gerenciar instrumento e, em seguida, Desligar. Coloque o interruptor de alimentação na posição OFF (desligado) e aguarde pelo menos 60 segundos. Coloque o interruptor de alimentação novamente na posição ON (ligado) e aguarde até que a máquina seja inicializada.
2. Além disso, antes do processamento, confirme se foi criada uma folha de amostras para o agrupamento.
3. Transporte o cartucho MiSeq carregado, a lâmina de fluxo e o tampão PR2 para o MiSeq.
4. Na tela inicial, selecione Sequência.
5. O MiSeq solicitará que a lâmina de fluxo seja carregada.
 - a. Limpe a lâmina de fluxo conforme descrito em Limpeza da lâmina de fluxo e Carregamento do cartucho de reagente acima.
 - b. Abra a porta do suporte da lâmina de fluxo e pressione o botão branco para liberar a lâmina de fluxo usada que está sendo mantida no lugar.
 - c. Coloque a lâmina de fluxo nova e limpa no suporte da lâmina de fluxo. As juntas pretas devem estar viradas para cima e o entalhe na lâmina de fluxo deve estar do lado direito.
 - d. Empurre suavemente a lâmina de fluxo para a parte de trás da sua ranhura enquanto fecha o suporte da lâmina de fluxo e a porta do suporte da lâmina de fluxo.
 - e. Seleccione Seguinte quando o RFID da lâmina de fluxo for identificado.
6. solicitará agora que os reagentes sejam colocados no lugar e que seja selecionada uma folha de amostras.
 - a. Abra a porta grande do refrigerador e a porta pequena do refrigerador de reagentes.
 - b. Levante o sipper PR2 e remova o frasco de tampão de lavagem.



Carregamento e operação do Illumina MiSeq

- c. Esvazie o contentor de resíduos MiSeq. Nota: Os resíduos MiSeq contêm vestígios de formamida e devem ser eliminados corretamente utilizando o procedimento de resíduos perigosos da sua instituição, embora normalmente seja seguro eliminá-los no lava-loiça.
 - d. Destampe o novo frasco de tampão PR2 e coloque-o no MiSeq. Nota: Coloque a tampa do novo frasco de tampão no frasco de lavagem para o manter limpo entre as lavagens.
 - e. Abaixe o sifão de PR2.
 - f. Remova o cartucho de lavagem do pequeno refrigerador de reagentes e substitua-o pelo cartucho de reagente MiSeq carregado. Nota: Deite a solução de lavagem restante no lavatório e deixe o cartucho de lavagem secar antes de o voltar a utilizar.
 - g. Feche o refrigerador de reagentes pequeno e a porta do refrigerador maior.
7. Seleccione a Folha de amostras a partir da localização em que foi guardada.
 8. Seleccione Carregar folha de amostras e confirme se os parâmetros de execução e de ciclo correspondem ao pretendido.
 9. Seleccione Iniciar verificação do fluxo para efetuar a verificação dos fluidos antes da execução. Este processo demora cerca de cinco minutos.
 10. Seleccione Iniciar quando a verificação do fluxo estiver concluída.
 - a. Se a verificação do fluxo falhar, retire a célula de fluxo e limpe-a novamente.
 - b. Se a verificação de fluxo falhar uma segunda vez, realize um teste de volume.
- Nota:** Uma execução do MiSeq 2 x 150 V2 levará aproximadamente 24 horas para ser concluída. As estatísticas importantes da execução estarão disponíveis após aproximadamente 1 hora. Os aglomerados que passam pelo filtro devem ser inferiores a 1000 k/mm² para a química V2. Se for superior, considere a possibilidade de interromper a execução e iniciar outra execução com a concentração da biblioteca de carga reduzida em 2 pM.
11. Após a conclusão, efetuar um ensaio de pós-lavagem.