

## DNBSEQ-G50

# Manual do usuário do conjunto de sequenciamento de alto rendimento



Número de catálogo	Mod	Especificação
1000018583	FCL SE35	SE35,45cic/Kit
1000018584	FCL SE50	SE50,60cic/Kit
1000018585	FCL SE100	SE100,110cic/Kit
1000018586	FCL PE50	PE50,110cic/Kit
1000018587	FCL PE100	PE100,210cic/Kit

Versão do kit: V3.0 (Observação: o uso misto de componentes de reagentes de diferentes lotes é estritamente proibido)

Versão do manual do usuário: A0

## Índice

<b>1 Introdução</b> .....	- 1 -
<b>1.1</b> Uso pretendido.....	- 1 -
<b>1.2</b> Tecnologia de sequenciamento .....	- 1 -
<b>1.3</b> Análise de dados .....	- 1 -
<b>1.4</b> Comprimento da leitura de sequenciamento .....	- 1 -
<b>1.5</b> Tempo de sequenciamento .....	- 2 -
<b>2</b> Fluxo de trabalho de sequenciamento .....	- 2 -
<b>3</b> Preparação da biblioteca.....	- 4 -
<b>3.1</b> Recomendação do tamanho da inserção.....	- 4 -
<b>3.2</b> Requisito da biblioteca .....	- 4 -
<b>3.3</b> Segurança da amostra.....	- 4 -
<b>3.4</b> Preparar reagentes para a fabricação de DNB .....	- 4 -
<b>3.4.2</b> Como fazer a DNB.....	- 4 -
<b>3.6</b> Quantificar DNB .....	- 6 -
<b>3.7</b> Carregar DNB .....	- 6 -
<b>3.7.1</b> Carregamento de DNB.....	- 6 -
<b>4</b> Preparar o kit de sequenciamento .....	- 7 -
<b>5</b> Preparar uma célula de fluxo.....	- 11 -
<b>6</b> Sequenciamento.....	- 12 -
<b>6.1</b> Acessar a interface principal.....	- 12 -
<b>6.2</b> Carregar as amostras .....	- 13 -
<b>6.3</b> Selecionar parâmetros de sequenciamento .....	- 15 -
<b>6.4</b> Carregar o kit de reagentes.....	- 16 -
<b>6.5</b> Carregar a célula de fluxo.....	- 18 -
<b>6.6</b> Revisar os parâmetros.....	- 21 -
<b>6.7</b> Iniciar o sequenciamento .....	- 21 -
<b>7</b> Manutenção do dispositivo .....	- 22 -
<b>7.1</b> Terminologia e definição .....	- 22 -
<b>7.2</b> Instrução de lavagem .....	- 22 -
<b>7.3</b> Preparar reagentes de lavagem.....	- 23 -
<b>7.4</b> Lavar o cartucho de limpeza.....	- 24 -
<b>7.5</b> Procedimentos de lavagem.....	- 25 -
<b>7.5.1</b> Lavagem regular.....	- 25 -
<b>7.5.2</b> Lavagem de manutenção.....	- 26 -

7.5.3 Procedimentos de lavagem completa .....	- 27 -
8 Solução de problemas.....	- 27 -
8.1 Baixa concentração de DNB.....	- 27 -
8.2 Pressão negativa anormal .....	- 27 -
8.3 Bolhas.....	- 27 -
8.4 Impurezas .....	- 28 -
8.5 Falhas na bomba .....	- 28 -
8.6 Armazenamento do kit de reagentes.....	- 28 -
9 Equipamentos e consumíveis necessários, mas não fornecidos .....	- 29 -
10 Componentes .....	- 30 -
11 Interpretação dos resultados dos testes .....	- 35 -
12 Especificação de desempenho do produto .....	- 35 -
12.1 Precisão .....	- 35 -
12.2 Repetibilidade.....	- 35 -
12.3 Variações de lote .....	- 35 -
13 Precauções .....	- 35 -
14 Referências da literatura.....	- 36 -
15 Detalhes de contato.....	- 36 -
16 Edição de idioma .....	- 37 -
17 Data da versão do manual do usuário .....	- 37 -
18 Legenda dos símbolos usados.....	- 37 -

## **1 Introdução**

Este manual explica como executar o sequenciamento usando o DNBSEQ-G50 Conjunto de sequenciamento de alto rendimento e inclui instruções sobre preparação da amostra, preparação da célula de fluxo, armazenamento de kit de sequenciamento, o protocolo de sequenciamento e a manutenção do dispositivo.

### **1.1 Uso pretendido**

Este produto é um conjunto de reagentes comumente usados para a detecção da biblioteca de DNA genômico humano. Como um reagente geral para o sistema de reação de sequenciamento, ele é usado com o instrumento de sequenciamento de genes, que visa a obter informações de sequência de amostras através de um processo de sequenciamento de alto rendimento.

### **1.2 Tecnologia de sequenciamento**

Este conjunto de sequenciamento utiliza a tecnologia DNBSEQ™. Uma execução de sequenciamento começa com a hibridização de uma âncora de DNA, em seguida, uma sonda fluorescente é conectada à nanoesfera de DNA (DNB) usando a química de sequenciamento combinatório de âncora-sonda (cPAS). Por fim, o sistema de criação de imagens de alta resolução captura o sinal fluorescente. Após o processamento digital do sinal óptico, o sequenciador gera informações de sequenciamento de alta qualidade e alta precisão.

### **1.3 Análise de dados**

Durante a execução de sequenciamento, o software de controle opera automaticamente o software de análise basecalling e fornece saídas de dados de sequenciamento bruto para análise secundária.

### **1.4 Comprimento da leitura de sequenciamento**

Na execução de sequenciamento, o número de ciclos de sequenciamento depende do comprimento da leitura do mesmo. Por exemplo, uma execução de ciclo PE100 realiza leituras de 100 ciclos ( $2 \times 100$ ) para um total de 200 ciclos. No final da execução de sequenciamento, um adicional de 10 ciclos de leitura de índice pode ser realizado, se necessário.

**Tabela 1-1: Ciclo de sequenciamento**

Comprimento da leitura de sequenciamento	Leitura 1 comprimento da leitura	Leitura 2 comprimento da leitura	Código de barras comprimento da leitura	Comprimento total da leitura	Ciclos máximos
SE35	35	–	10	35+10	55
SE50	50	–	10	50+10	70
SE100	100	–	10	100+10	120
PE50	50	50	10	100+10	120
PE100	100	100	10	200+10	220

## 1.5 Tempo de sequenciamento

**Tabela 1-2: Tempo de sequenciamento para cada comprimento de leitura (horas)**

Tempo (horas)	SE35	SE50	SE100	PE50	PE100
Chip único	11,9	14,5	20,3	26,5	50,6
Análise de dados	0,3	0,5	1,2	1,2	2,4

## 2 Fluxo de trabalho de sequenciamento



Fabricação de DNB: use o kit de preparação de DNB para fazer DNB



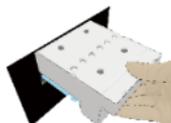
Prepare uma nova célula de fluxo: remova a célula de fluxo da embalagem e inspecione para garantir que a célula de fluxo esteja intacta



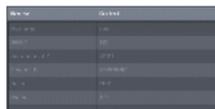
Prepare um novo kit de reagentes: inspecione e descongele o cartucho de reagentes e, em seguida, carregue e misture os reagentes necessários



Carregue a célula de fluxo: coloque a célula de fluxo no estágio do sequenciador



Carregue o kit de reagentes no sequenciador



Siga as instruções para inserir as informações de sequenciamento e iniciar a execução



Monitore a execução de sequenciamento a partir da interface do software de controle



Realize a manutenção do dispositivo quando o sequenciamento for concluído

### 3 Preparação da biblioteca

#### 3.1 Recomendação do tamanho da inserção

Esse conjunto de sequenciamento é compatível com as bibliotecas preparadas pelos Kits de preparação da biblioteca da MGI.

Recomendação da biblioteca para o tamanho da inserção:

Para SE50/ SE100/PE50, a distribuição de tamanho das inserções é preferida para ser centralizada em torno de 160-170 bp. Para PE100, a distribuição de tamanho das inserções é preferida para ser centralizada em torno de 280 bp.

#### 3.2 Requisito da biblioteca

Recomendamos a biblioteca ssDNA 40 fmol para cada reação. Realize a quantificação da biblioteca ssDNA utilizando o Kit de Ensaio ssDNA Qubit® e o Fluorômetro Qubit®. E a concentração da biblioteca ssDNA é maior que 2 fmol/μL. Caso contrário, o volume de biblioteca ssDNA necessário é determinado pela seguinte equação.

volume necessário (μL) =  $N * 330 * 40 / (1000 * 1000 * C)$

N representa o número de nucleotídeos N representa o número total de nucleotídeos incluindo o adaptador. C representa a concentração da biblioteca ssDNA (ng/μL).

Se houver requisitos especiais para as especificações do kit de biblioteca, então, os requisitos para as especificações do kit serão atendidos.

#### 3.3 Segurança da amostra

Todas as amostras devem ser consideradas para conter agentes potencialmente infecciosos e devem ser manuseadas de acordo com os regulamentos nacionais relevantes.

#### 3.4 Preparar reagentes para a fabricação de DNB

Retire as bibliotecas, o tampão de fabricação de DNB, a mistura I de enzimas de fabricação de DNB, o tampão de TE baixo e o tampão para interromper a reação de DNB do armazenamento. Descongele os reagentes por aproximadamente 0,5 hora no gelo. Após descongelá-los, misture os reagentes usando um misturador de vórtice por 5 segundos, centrifugue brevemente e coloque-os no gelo.

##### 3.4.2 Como fazer a DNB

- Após a reação de fabricação de DNB, a reação de fabricação de DNB de 100 μL é carregada para uma faixa na célula de fluxo de sequenciamento.
  
- Pegue tiras de 8 tubos de PCR de 0,2 mL ou tubos de PCR. Prepare a mistura de reação seguindo a Tabela 3-1 abaixo.

**Tabela 3-1: Reação 1 de fabricação de DNB**

Componente	volume ( $\mu\text{L}$ )
Bibliotecas ssDNA	V
Tampão de TE baixo	20-V
Tampão de fabricação de DNB	20
Volume total	40

- V representa o volume de amostra variável, conforme determinado na seção 3.2. Misture cuidadosamente por vórtice e gire por 5 segundos usando a mini centrífuga. Coloque a mistura em uma máquina de PCR e inicie a reação. As configurações da máquina de PCR estão descritas na Tabela 3-2:

**Tabela 3-2: Condições da reação de DNB 1**

Temperatura	Hora
Tampa aquecida (105 °C)	Ligado
95 °C	1 min
65°C	1 min
40°C	1 min
4°C	Comporta

- Retire a mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB do armazenamento e coloque-a em gelo. Centrifugue brevemente por 5 segundos e mantenha no gelo.

**Observação:**

**Não coloque a mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB em temperatura ambiente e evite segurar o tubo de forma a aquecer o conteúdo.**

- Retire o tubo de PCR da máquina de PCR depois que a reação entrar na fase de manutenção a 4 °C. Centrifugue brevemente por 5 segundos, coloque o tubo no gelo e prepare a mistura 2 de reação de fabricação de DNB.

**Tabela 3-3: Mistura 2 da reação de fabricação de DNB**

Componente	volume ( $\mu\text{L}$ )
Mistura da enzima de fabricação de DNB	40
Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	4

- Adicione toda a mistura 2 da reação de fabricação de DNB na reação 1 de fabricação de DNB. Misture cuidadosamente por vórtice, centrifugue por 5 segundos usando uma mini centrífuga e coloque os tubos na máquina de PCR para obter a próxima reação. As condições são mostradas na Tabela 3-5 abaixo:

**Tabela 3-4: Condições da reação de DNB 2**

Temperatura	Hora
Tampa aquecida (35°C)	Ligado
30°C	25 min
4°C	Comporta

Observação:

Recomenda-se ajustar a temperatura da tampa aquecida a 35 °C ou a temperatura mais próxima a 35 °C.

- Adicione 20 µL de tampão para interromper a reação de DNB imediatamente após a reação entrar em manutenção a frio a 4 °C. Misture cuidadosamente por pipetagem de orifício largo 5 a 8 vezes. Não provoque um redemoinho ou agite o tubo. Armazene DNB a 4 °C e execute o sequenciamento dentro de 48 horas.



**Observação:**

**É muito importante misturar cuidadosamente DNB por pipetagem de orifício largo. Não centrifugue, misture por vórtice ou agite o tubo.**

### 3.6 Quantificar DNB

Depois que a fabricação de DNB for concluída, use o Kit de ensaio ssDNA Qubit® e o Fluorômetro Qubit® para quantificar as DNB. O sequenciamento requer que a concentração de DNB esteja acima de 8 ng/µL. Se a concentração for inferior a 8 ng/µL, faça uma nova preparação de DNB.

Observação:

- Como a DNB é viscosa, recomenda-se usar 2 µL para quantificação. Se o número de amostras for grande, recomenda-se quantificar em lotes para evitar a quantificação imprecisa de DNB devido à temperatura de fluorescência.
- Se a concentração exceder 40 ng/µL, a DNB precisará ser diluída a 20 ng/µL com tampão 1 de carga de DNB para carregamento.

### 3.7 Carregar DNB

#### 3.7.1 Carregamento de DNB

- Pegue tubos de microcentrífuga de 0,5 mL e adicione reagentes seguindo a tabela 3-6 abaixo.

**Tabela 3-5: Mistura 1 de carregamento de DNB**

Componente	volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampão I de carga de DNB	50 $\mu\text{L}$
Tampão II de carga de DNB	50 $\mu\text{L}$
Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	1 $\mu\text{L}$
DNB	100 $\mu\text{L}$

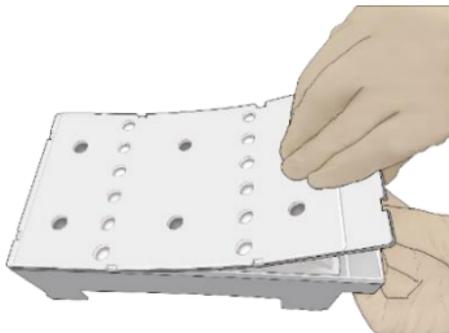
- Combine os componentes para criar a mistura 1 de carregamento de DNB e misture cuidadosamente por pipetagem de orifício largo 5 a 8 vezes. Não centrifugue, misture por vórtice ou agite o tubo. Coloque a mistura em 4 °C até a utilização.

Observação:

Prepare uma nova mistura de carregamento de DNB antes da execução de sequenciamento.

#### 4 Preparar o kit de sequenciamento

- Remova o cartucho de reagentes de sequenciamento de -20 °C e descongele em um banho de água em temperatura ambiente até ser descongelado. Armazene os kits entre 2 e 8 °C de armazenamento até o uso (ou descongele os kits em refrigerador entre 2 e 8 °C com um dia de antecedência). Inverta o tubo 3 vezes antes do uso.
- Abra a tampa do kit e limpe qualquer condensação de água com papel sem fiapos.



**Figura 4-1: Abra e limpe o kit**

- Remova a mistura III de dNTPs e mistura II de dNTPs de armazenamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 hora de antecedência para descongelar em temperatura ambiente e coloque a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

- Remova a mistura de enzimas de sequenciamento do armazenamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e coloque a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Observação:

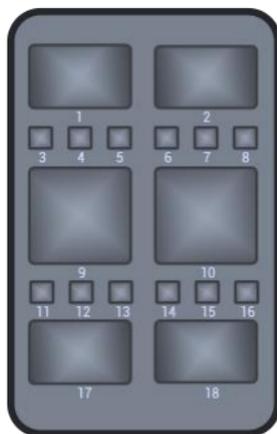
Consulte o nome da mistura de enzimas de sequenciamento para cada comprimento da leitura de sequenciamento no Capítulo "Lista de componentes do kit".

- Perfure o lacre para fazer um orifício de 1 cm ou menos de diâmetro usando uma ponta estéril no poço nº 1 e nº 2 (ver Figura 4-2):



**Figura 4-2: Perfure o selo no kit**

- Poço nº 1 (ver Figura 4-3)



**Figura 4-3: Posição do poço**

Pegue uma pipeta com o intervalo de volume apropriado e adicione reagentes ao poço n° 1 de acordo com a tabela a seguir:

**Tabela 4-1: Carregamento da mistura de dNTPs**

Kit de sequenciamento	Nome da mistura III de dNTPs	Volume de carregamento (mL)
DNBSEQ-G50 FCL SE35	Mistura III de dNTPs	0,300
DNBSEQ-G50 FCL SE50	Mistura III de dNTPs	0,400
DNBSEQ-G50 FCL SE100	Mistura III de dNTPs	0,500
DNBSEQ-G50 FCL PE50	Mistura III de dNTPs	0,500
DNBSEQ-G50 FCL PE100	Mistura III de dNTPs	0,800

➤ Poço n° 2 (ver Figura 4-3)

Pegue uma pipeta com o intervalo de volume apropriado e adicione reagentes ao poço n° 2 de acordo com a tabela a seguir:

**Tabela 4-2: Carregamento da mistura II de dNTPs**

Kit de sequenciamento	Nome da mistura II de dNTPs	Volume de carregamento (mL)
DNBSEQ-G50 FCL SE35	Mistura II de dNTPs	0,600
DNBSEQ-G50 FCL SE50	Mistura II de dNTPs	0,800
DNBSEQ-G50 FCL SE100	Mistura II de dNTPs	1,000
DNBSEQ-G50 FCL PE50	Mistura II de dNTPs	1,000
DNBSEQ-G50 FCL PE100	Mistura II de dNTPs	1,600

- Poço nº 1 e nº 2 (ver Figura 4-3)

Pegue uma pipeta com o intervalo de volume apropriado e adicione reagentes ao poço nº 1 e nº 2 de acordo com a tabela a seguir:

**Tabela 4-3: Carregamento da mistura das enzimas de sequenciamento**

Kit de sequenciamento	Nome da mistura das enzimas de sequenciamento	Volume de carregamento (mL)
DNBSEQ-G50 FCL SE35	Mistura das enzimas de sequenciamento de DNA	0,300
DNBSEQ-G50 FCL SE50	Mistura das enzimas de sequenciamento de DNA	0,400
DNBSEQ-G50 FCL SE100	Mistura das enzimas de sequenciamento de DNA	0,500
DNBSEQ-G50 FCL PE50	Mistura das enzimas de sequenciamento de DNA	0,500
DNBSEQ-G50 FCL PE100	Mistura das enzimas de sequenciamento de DNA	0,800

- Lacre o poço de carregamento com o filme de vedação transparente. Não cubra o centro do poço para evitar bloquear a agulha de amostragem.



**Figura 4-4: Lacre com o poço de carregamento**

- Coloque o kit horizontalmente sobre a mesa, segure ambos os lados do kit com as duas mãos. Mova-o no sentido horário de 10 a 20 vezes e, em seguida, no sentido anti-horário 10 a 20 vezes. Certifique-se de ver o vórtice para garantir que os reagentes estejam totalmente misturados.



**Figura 4-5: Reagentes da mistura após o carregamento**

- Poço nº 15 (ver Figura 4-3): As instruções a seguir são apenas para kits de PE. Adicione 200  $\mu$ L de mistura de enzimas de MDA ao tubo de reagente de MDA com uma pipeta de 1 mL. Provoque um redemoinho por 5 segundos, misture bem e, em seguida, acrescente a mistura ao poço nº 15. Ao adicionar a mistura, certifique-se de que não haja bolhas na parte inferior do tubo.



**Observação:**

Ao usar a mistura de enzimas de MDA, não toque na parede do tubo para evitar influências sobre a atividade enzimática!

## 5 Preparar uma célula de fluxo

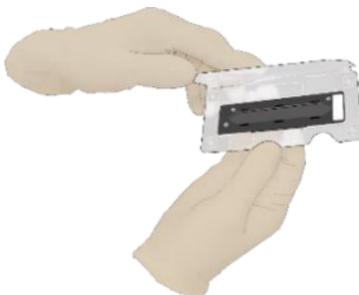
- Remova a célula de fluxo de sequenciamento do armazenamento.

- Desembrulhe a embalagem externa.



**Figura 5-1: Desembrulhe a embalagem externa**

- Remova a célula de fluxo da embalagem interna e inspecione para garantir que a célula de fluxo esteja intacta.

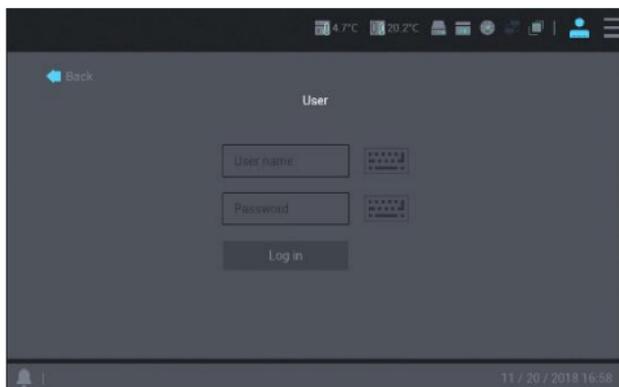


**Figura 5-2: Inspeção a célula de fluxo**

## **6 Sequenciamento**

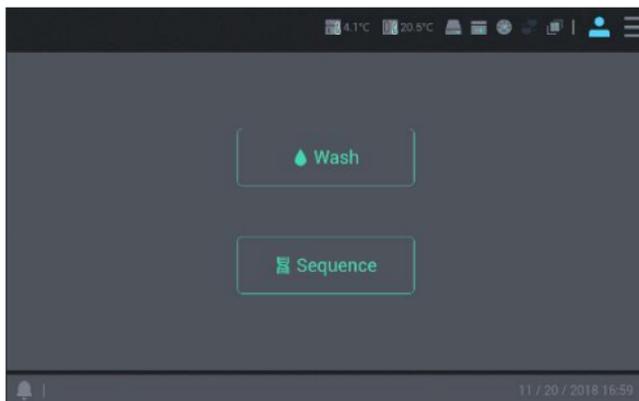
### **6.1 Acessar a interface principal**

- Digite o nome de usuário "user" (usuário) e a senha "123", clique em "Log in" (Fazer login) para acessar a interface principal.



**Figura 6-1: Interface de login**

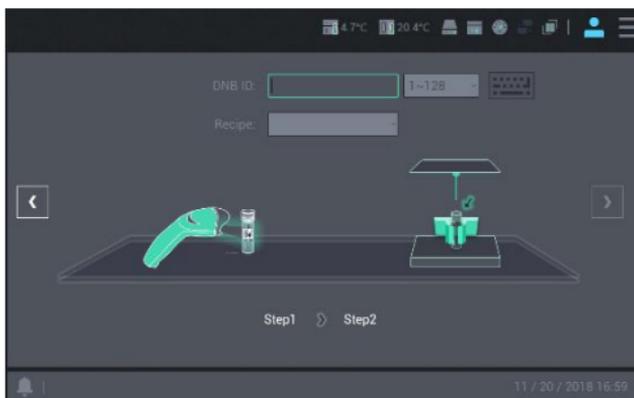
- Consulte a interface abaixo.



**Figura 6-2: Interface principal**

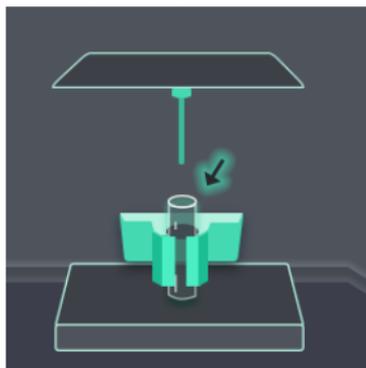
## 6.2 Carregar as amostras

- Clique na opção "Sequence" (Sequência) na interface para acessar a seguinte interface:



**Figura 6-3: Interface de carregamento de DNB**

- Mova o cursor para a área em branco ao lado de "DNB ID" (ID de DNB) e insira o nome ou o número da biblioteca.
- Abra a porta do compartimento de reagentes, levante cuidadosamente a agulha de amostragem com uma mão, remova o tubo de reagente de limpeza com a outra mão, carregue o tubo de amostra e, em seguida, abaixe lentamente a ponta da agulha de amostragem até atingir a parte inferior do tubo.



**Figura 6-4: Carregue o tubo de DNB**

- Feche a porta do compartimento de reagentes.

### 6.3 Selecionar parâmetros de sequenciamento

- Selecione a receita de sequenciamento no menu suspenso “Recipe” (Receita), clique uma vez na execução de sequenciamento (SE50, SE100, PE50, PE100, etc.), e execução personalizada pelo usuário (Personalizar).



Figura 6-5: Selecione as soluções de sequenciamento

- No início, selecione uma etapa para iniciar a execução de sequenciamento.

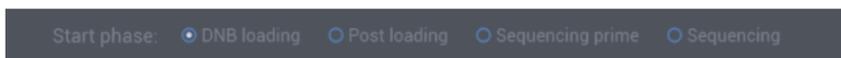


Figura 6-6: Selecione a etapa para iniciar o sequenciamento

- Selecione o comprimento da leitura. Por exemplo, com PE100, insira 100 para leitura 1 e 100 para leitura 2.

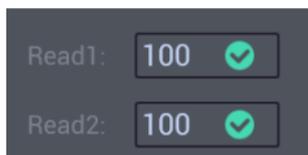
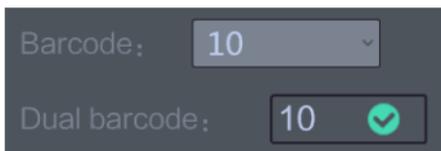


Figura 6-7: Escolha o comprimento da leitura

- Selecione o comprimento do código de barras de 6 ou 10. Se for sequenciamento de código de barras duplo,

será necessário preencher o comprimento do código de barras duplo. Deixe o código de barras duplo em branco se for uma única execução de sequenciamento de código de barras.



**Figura 6-8:** Selecione o comprimento do código de barras

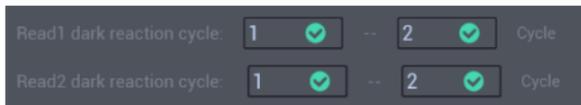
- Selecione a faixa para a demultiplexação do código de barras.



**Figura 6-9:** Demultiplexação do código de barras em faixas diferentes

- Selecione a reação escura para qualquer posição de comprimento da leitura na leitura 1 ou 2.

Reação escura: somente reação química sem captura óptica das informações

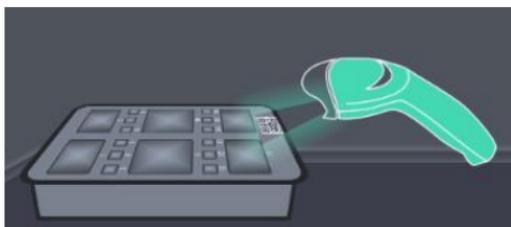


**Figura 6-10:** Selecione a reação escura

- Clique em "Confirm" (Confirmar)

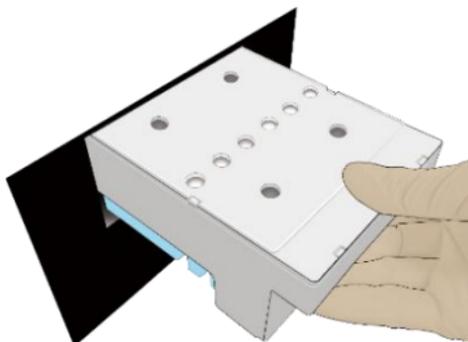
#### 6.4 Carregar o kit de reagentes

- Mova o cursor para o espaço em branco "Reagent ID" (ID do reagente), insira as informações do kit manualmente ou use o leitor de código de barras para ler o código de barras do kit.



**Figura 6-11: Interface de entrada das informações do kit de reagentes**

- Abra a porta do compartimento de reagentes. Segure a haste do cartucho de limpeza 1 com uma mão, coloque a outra mão sob o cartucho para suporte e remova-o lentamente do compartimento.



**Figura 6-12: Remova o cartucho de limpeza**

- Umedeça o papel livre de poeira ou um pano livre de poeira com água de grau laboratorial e use-o para limpar a parte inferior e as laterais do compartimento para mantê-lo limpo e seco.



**Figura 6-13: Mantenha o compartimento de reagentes**

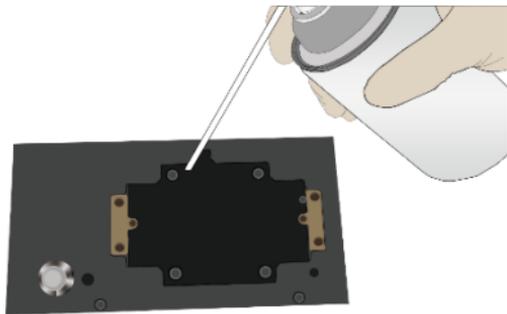
- Segure a haste do kit de reagentes com uma mão e coloque a outra mão embaixo para obter suporte. Deslize o novo kit para dentro do compartimento seguindo a direção impressa na tampa até que ele pare. Verifique se o kit de reagentes está na posição correta e feche a porta do compartimento de reagentes.



**Figura 6-14: Deslize o novo kit de reagentes no compartimento de reagentes**

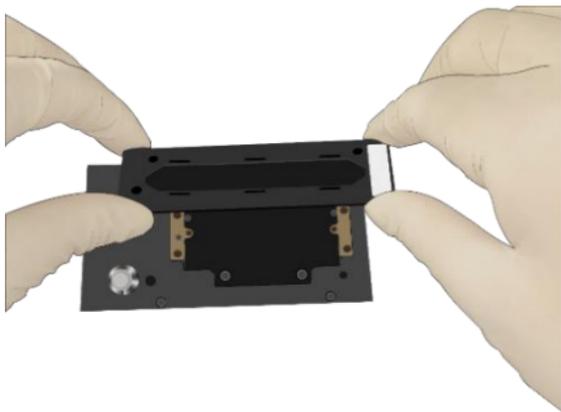
### 6.5 Carregar a célula de fluxo

- Abra a porta do compartimento da célula de fluxo, pressione um lado da célula de fluxo usada para lavagem e pressione o botão de anexo da célula de fluxo com a outra mão. Depois que o vácuo for liberado, remova a célula de fluxo para lavagem do estágio.
- Use o removedor de poeira para remover a poeira no estágio da célula de fluxo e na parte de trás da célula de fluxo. Se houver impurezas na superfície do estágio, limpe-a com cuidado com papel úmido livre de poeira para garantir que a célula de fluxo possa ser mantida adequadamente.



**Figura 6-15: Limpe o estágio da célula de fluxo**

- Pressione o botão de anexo da célula de fluxo.
- Retire um novo chip ou o chip carregado. Há dois orifícios de alinhamento no lado esquerdo e um no lado direito. O rótulo está à direita. Segure a célula de fluxo pelas bordas com as duas mãos.



**Figura 6-16: Carregue a célula de fluxo**

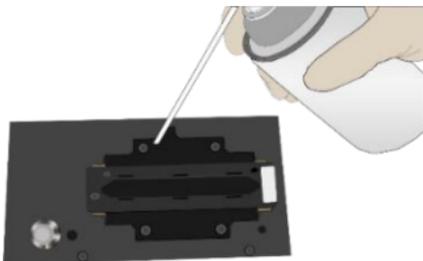
- Alinhe os orifícios na célula de fluxo com os pinos de localização no estágio da célula de fluxo. Deslize cuidadosamente a célula de fluxo para manter a célula de fluxo alinhada com o pino. Pressione os lados esquerdo e direito da célula de fluxo no estágio ao mesmo tempo para garantir que a célula de fluxo esteja

corretamente posicionada no estágio.

 **Observação:**

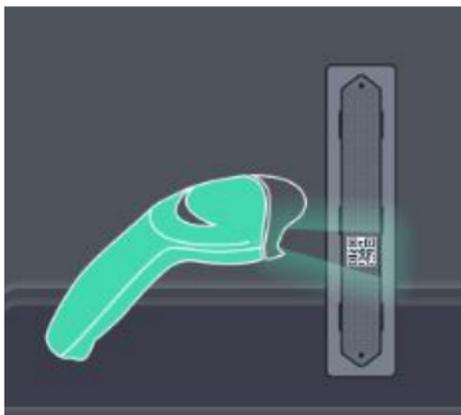
**A célula de fluxo é frágil, tenha cuidado ao manusear a célula de fluxo**

- Use um removedor de poeira para remover a poeira da superfície da célula de fluxo e feche a porta do compartimento da célula de fluxo.



**Figura 6-17: Limpe a célula de fluxo**

- Clique em "Next" (Avançar), o dispositivo vai inserir automaticamente a ID da célula de fluxo; se a entrada automática não funcionar, mova o cursor para o espaço em branco "Chip ID" (ID do chip) e insira manualmente a ID.



**Figura 6-18: Interface de entrada das informações da célula de fluxo**

- Clique em “Next” (Avançar)

## 6.6 Revisar os parâmetros

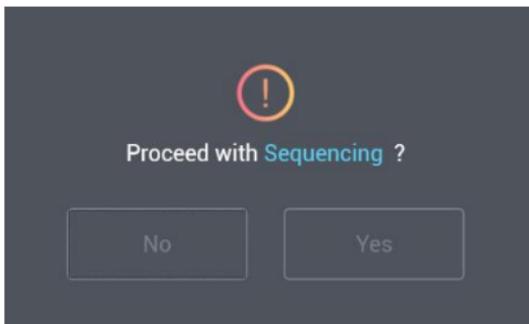
Revise os parâmetros da execução para garantir que todas as informações estejam corretas.

Review	Content
User name	user
DNB ID	123
Sequencing kit ID	A0001
Flow cell ID	S100000001
Recipe	Customize
Cycles	212

**Figura 6-19: Informações da revisão**

## 6.7 Iniciar o sequenciamento

- Depois de confirmar que as informações estão corretas, clique em “Start” (Iniciar).
- O sistema exibirá a caixa de diálogo "Start the sequencing" (Iniciar o sequenciamento). Clique em “Yes” (Sim) para iniciar o sequenciamento.



**Figura 6-20: Confirme a interface de sequenciamento**

- Uma vez iniciado o sequenciamento, abra imediatamente a porta do compartimento da célula de fluxo para garantir que DNB (ou reagentes) esteja fluindo através da célula de fluxo.

## 7 Manutenção do dispositivo

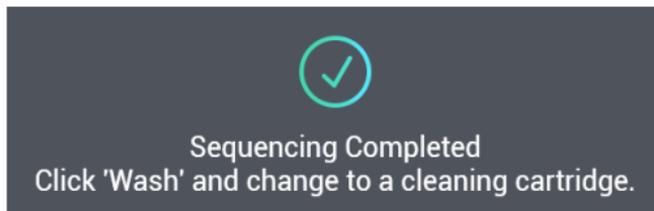
### 7.1 Terminologia e definição

**Tabela 7-1: Solução de lavagem**

Tipo de lavagem	Descrição
Lavagem completa	Etapa 1 - Lavagem de manutenção, Etapa 2 - Lavagem regular. Procedimento: Cartucho de limpeza 4 → Cartucho de limpeza 3 → Cartucho de limpeza 2
Lavagem de manutenção	Para remover reagentes residuais e proteínas da tubulação, reduzindo o risco de obstrução. Procedimento: Cartucho de limpeza 1 → Ar fundamental
Lavagem regular	Para remover reagentes residuais, reduzindo o risco de contaminação cruzada.

### 7.2 Instrução de lavagem

- Quando a interface a seguir for exibida, você poderá realizar uma lavagem.



**Figura 7-1: Interface de lavagem**

- Após a conclusão do sequenciamento, o dispositivo precisa ser lavado dentro de 24 horas.
- Uma lavagem completa é necessária se o sequenciador foi usado para uma execução de PE. Uma lavagem regular é suficiente para uma execução de SE.
- Após a conclusão de uma lavagem completa, se o dispositivo ficar ocioso por mais de 12 horas, realize uma

lavagem regular novamente antes do uso.

- Depois que um engenheiro realizar a manutenção do sistema, realize uma lavagem regular.
- Depois de substituir a tubulação, as agulhas de amostragem ou outros acessórios expostos aos reagentes, realize uma lavagem completa.
- Se o sequenciador for ser desligado por mais de 7 dias, realize uma lavagem de manutenção antes de desligar e depois de ligar.
- Se o sequenciador permanecer ocioso por sete dias ou mais, realize uma lavagem completa antes do sequenciamento.
- Se impurezas forem encontradas na célula de fluxo, realize uma lavagem completa.

### 7.3 Preparar reagentes de lavagem

- Preparar Tween-20 a 0,05% seguindo a tabela abaixo (Pode ser usado por até 28 dias se armazenado a 4 °C)

**Tabela 7-2: Preparação dos reagentes de lavagem (1)**

Reagente	Volume
Tween-20 a 100%	0,5 mL
Água de grau laboratorial	999,5 mL

- Preparar 1M NaCl + Tween-20 a 0,05% seguindo a tabela abaixo (Pode ser usado por até 28 dias se armazenado a 4 °C).

**Tabela 7-3: Preparação do reagente de lavagem (2)**

Reagente	Peso/Volume
Solução 5M de NaCl	200 mL
Tween-20 a 100%	0,5 mL
Água de grau laboratorial	799,5 mL

- Prepare NaOH 0,1 M seguindo a tabela abaixo (válido por 28 dias se armazenado a 4 °C).

**Tabela 7-4: Preparação do reagente de lavagem (3)**

Reagente	Peso/Volume
Solução de NaOH 2 M	50 mL
Água de grau laboratorial	950 mL

#### 7.4 Lavar o cartucho de limpeza

- Um cartucho de limpeza vazio e a célula de fluxo de lavagem para uma lavagem completa são fornecidos juntamente com o dispositivo.
- Lave o cartucho de limpeza antes de enchê-lo novamente com reagentes de limpeza. Substitua os reagentes de limpeza após 20 usos.
- As células de fluxo usadas de execuções anteriores podem ser usadas como células de fluxo de lavagem. Cada célula de fluxo pode ser usada por até 20 lavagens completas.
- Lave o cartucho de limpeza 1: Pegue um cartucho de limpeza limpo e um criotubo de 0,5 mL, adicione água de grau laboratorial ao criotubo e ao cartucho de limpeza (todos os poços) para um volume final de 90% e marque-o como o cartucho de reagente de limpeza 1.
- Lave o cartucho de limpeza 2: Pegue um cartucho de limpeza limpo e um criotubo de 0,5 mL, adicione água de grau laboratorial ao criotubo e ao cartucho de limpeza (todos os poços) para um volume final de 90% e marque-o como o cartucho de reagente de limpeza 2.
- Lave o cartucho de limpeza 3: Pegue um cartucho de limpeza limpo e um criotubo de 0,5 mL, adicione 50 mL de NaOH 0,1 M nos poços grandes, 6 mL de NaOH 0,1 M nos poços pequenos e 400 µL de NaOH 0,1 M no criotubo de 0,5 mL. Marque-o como o cartucho de reagente de limpeza 3.
- Lave o cartucho de limpeza 4: Pegue um cartucho de limpeza limpo e um criotubo de 0,5 mL, adicione 50 mL de solução Tween-20 a 0,05% nos poços grandes, 6 mL de NaCl 1 M + solução Tween-20 a 0,05% no poço nº 15, 400 µL de NaCl 1 M + solução Tween-20 a 0,05% no criotubo de 0,5 mL e 6 mL de solução Tween-20 a 0,05% nos demais poços. Marque-o como o cartucho de reagente de limpeza 4.

Observação:

Poços grandes são nº 1, 2, 9, 10, 17, 18

Poços pequenos são nº 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16

## 7.5 Procedimentos de lavagem

### 7.5.1 Lavagem regular

- Use o cartucho de limpeza 1. Abra a porta do compartimento de reagentes. Segure a haste do cartucho de limpeza 1 com uma mão e coloque a outra mão embaixo do cartucho 1 para obter suporte. Deslize-o para dentro do compartimento de reagentes lentamente seguindo a direção impressa na tampa do cartucho até que ele pare. Feche a porta do compartimento de reagentes.
- Clique no botão de lavagem na interface.
- Coloque a célula de fluxo para lavagem.
- Selecione lavagem regular no menu suspenso para iniciar a lavagem regular que leva cerca de 30 minutos.
- Se você realizar apenas a lavagem regular, observe o status da célula do fluxo de lavagem nesta etapa. Se você observar muitas bolhas, continue a lavagem. Caso contrário, pare a lavagem, substitua a célula de fluxo e inicie a lavagem. Se você realizar a lavagem regular após a lavagem de manutenção, pule esta etapa.

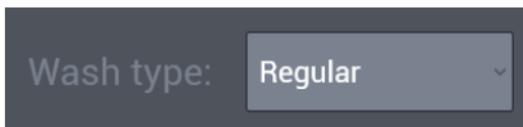


Figura 7-2: Selecione o tipo de lavagem

- Quando a interface é exibida como a figura abaixo, a lavagem regular termina.



Figura 7-3: Interface final da lavagem regular

### 7.5.2 Lavagem de manutenção

- Use o cartucho de limpeza 4. Abra a porta do compartimento de reagentes. Segure a haste do cartucho de limpeza 4 com uma mão e coloque a outra mão embaixo para obter suporte. Deslize-o no compartimento de reagentes lentamente seguindo a direção impressa na tampa do cartucho até que ele pare. Feche a porta do compartimento de reagentes.
- Clique no botão de lavagem na interface.
- Coloque a célula de fluxo para lavagem.
- Selecione lavagem de manutenção no menu suspenso para iniciar a lavagem de manutenção que leva cerca de 15 minutos.
- Observe o status da célula de fluxo para lavagem nesta etapa. Se você observar muitas bolhas, continue a lavagem. Caso contrário, pare a lavagem, substitua a célula de fluxo e inicie a lavagem.
- Quando a interface é exibida como na Figura 7-4, clique em “Yes” (Sim) para levantar a agulha e substituir o cartucho de limpeza.
- Use o cartucho de limpeza 3 e continue a lavagem de manutenção que leva cerca de 15 minutos.

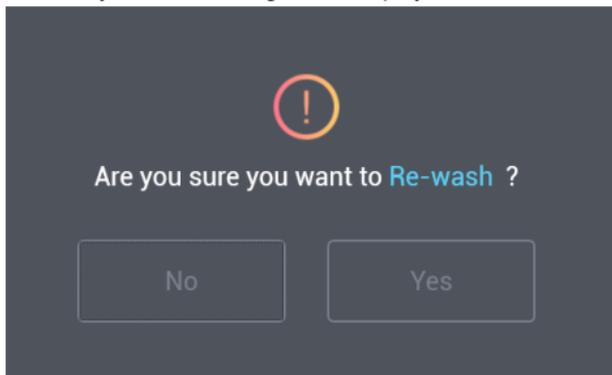


Figura 7-4: Interface final da lavagem de manutenção

- Quando a interface é exibida como na figura 7-4, clique em “Yes” (Sim) para levantar a agulha e substituir o cartucho de limpeza.
- Use o cartucho de limpeza 2 e continue a lavagem de manutenção que leva cerca de 15 minutos.
- Quando a interface é exibida como na Figura 7-4, a lavagem de manutenção termina.

### 7.5.3 Procedimentos de lavagem completa

Etapa 1 - Lavagem de manutenção, Etapa 2 - Lavagem regular. O tempo total é de 70 minutos

## 8 Solução de problemas

### 8.1 Baixa concentração de DNB

- Verifique se o kit expirou.
- Verifique se a biblioteca atende aos requisitos.
- Se a concentração de DNB ainda não atender aos requisitos após uma nova preparação da amostra, entre em contato com o engenheiro de serviço em campo.

### 8.2 Pressão negativa anormal

- Limpe cuidadosamente a superfície do estágio com um papel úmido e sem fiapos ou um pano sem fiapos e sobre o estágio com um removedor de poeira elétrico e verifique se não há mais poeira.
- Sobre a parte de trás da célula de fluxo com um removedor de poeira para garantir que não haja poeira.
- Se essas soluções não puderem resolver o problema, entre em contato com o engenheiro.

### 8.3 Bolhas

- Substitua a célula de fluxo usada e inspecione a bomba.
- Se o problema persistir, entre em contato com o engenheiro.

#### **8.4 Impurezas**

- Realize uma lavagem completa no sequenciador.
- Se o problema persistir após uma lavagem completa, entre em contato com o engenheiro.

#### **8.5 Falhas na bomba**

- Sequenciador: remova a célula de fluxo, verifique se há impurezas na vedação e remova a poeira com o removedor de poeira. Coloque a célula de fluxo seguindo a instrução e ligue a bomba novamente.
- Verifique se o s se move corretamente.
- Se as agulhas de amostragem não se moverem corretamente, reinicie o software de sequenciamento.
- Se o problema persistir, entre em contato com o engenheiro.

#### **8.6 Armazenamento do kit de reagentes**

- Se o kit tiver sido descongelado (incluindo dNTPs) e não puder ser usado dentro de 24 horas, ele poderá ser congelado e descongelado no máximo uma vez.
- Se o kit tiver sido descongelado (incluindo dNTPs), mas não puder ser usado imediatamente, armazene-o a 4 °C e use-o dentro de 24 horas.
- Se dNTPs e enzima tiverem sido adicionados ao kit, ou seja, o kit foi preparado, mas não pode ser usado imediatamente, armazene-o a 4 °C e use-o dentro de 24 horas.
- Se dNTPs e enzima tiverem sido adicionados ao kit, ou seja, o kit foi preparado e o s começou a aspiração, mas o kit não pode ser usado a tempo, o kit deve ser lacrado com papel alumínio ou filme plástico. Armazene o kit a 4 °C e use-o dentro de 24 horas.

## 9 Equipamentos e consumíveis necessários, mas não fornecidos

Tabela 9-1: Equipamentos e consumíveis necessários, mas não fornecidos

Equipamentos e consumíveis	Marca recomendada	Número de catálogo
Fluorômetro Qubit® 3.0	ThermoFisher	Q33216
Minicentrífuga	Principal Fornecedor do Laboratório (MLS)	/
Misturador de vórtice	MLS	/
Máquina de PCR	Bio-Rad	/
Pipeta	Eppendorf	/
Refrigerador 2-8°C	MLS	/
Freezer -25 °C~-15 °C	MLS	/
Kit de ensaio ssDNA Qubit®	Thermo Fisher	Q10212
Removedor de poeira elétrico	MATIN	M-6318
Ponteira da pipeta estéril (caixa)	AXYGEN	/
Ponteiras de pipeta de orifício largo de 200 µL	AXYGEN	T-205-WB-C
Tubos de ensaio Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Tween-20 a 100%	MLS	/
Solução 5M de NaCl	MLS	/
Solução de NaOH 2 M	MLS	/
Tira de 8 tubos de PCR de 0,2 mL	AXYGEN	/
1,5 mL Eppendorf	AXYGEN	MCT-150-C
Rack de gelo	MLS	/

## 10 Componentes

**Tabela 10-1: Lista de componentes do kit 1**

Produto	Kit de sequenciamento	Componente	Especificação e quantidade	Temperatura de armazenamento
DNBSEQ-G50 Conjunto de sequenciamento de alto rendimento (FCL SE35) Número de catálogo: 1000018583	Pacote I	DNBSEQ-G50 Célula de fluxo de sequenciamento	1	RT
		Tampão de TE baixo	100 µL×1 tubo	
		Tampão de fabricação de DNB	50 µL×1 tubo	
		Mistura I da enzima de fabricação de DNB	100 µL×1 tubo	
		Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	13 µL×1 tubo	
		Tampão para interromper a reação de DNB	50 µL×1 tubo	
	Pacote II	Tampão I de carga de DNB	300 µL×1 tubo	-25 °C~-15 °C
		Tampão II de carga de DNB	120 µL×1 tubo	
		Microtubo de 0,5 mL (Vazio)	1 tubo	
		Mistura III de dNTPs	0,40 mL×1 tubo	
		Mistura II de dNTPs	0,70 mL×1 tubo	
		Mistura das enzimas de sequenciamento	0,90 mL×1 tubo	
		Cartucho de reagentes de sequenciamento	1	
filme de vedação transparente	2 folhas.			

**Tabela 10-2: Lista de componentes do kit 2**

Produto	Kit de sequenciamento	Componente	Especificação e quantidade	Temperatura de armazenamento	
DNBSEQ-G50 Conjunto de sequenciamento de alto rendimento (FCL SE35) FCL SE50 Número de catálogo: 1000018584	Pacote I	DNBSEQ-G50 Célula de fluxo de sequenciamento	1	RT	
		Tampão de TE baixo	100 µL×1 tubo		
		Tampão de fabricação de DNB	50 µL×1 tubo		
		Mistura I da enzima de fabricação de DNB	100 µL×1 tubo		
		Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	13 µL×1 tubo		
			Tampão para interromper a reação de DNB	50 µL×1 tubo	
		Pacote II	Tampão I de carga de DNB	300 µL×1 tubo	-25 °C~-15 °C
			Tampão II de carga de DNB	120 µL×1 tubo	
			Microtubo de 0,5 mL (Vazio)	1 tubo	
			Mistura III de dNTPs	0,50 mL×1 tubo	
	Mistura II de dNTPs		0,90 mL×1 tubo		
		Mistura das enzimas de sequenciamento	1,10 mL×1 tubo		
		Cartucho de reagentes de sequenciamento	1		
		filme de vedação transparente	2 folhas.		

**Tabela 10-3: Lista de componentes do kit 3**

Produto	Kit de sequenciamento	Componente	Especificação e quantidade	Temperatura de armazenamento
DNBSEQ-G50 Conjunto de sequenciamento de alto rendimento (FCL SE35) FCL SE100 Número de catálogo: 1000018585	Pacote I	DNBSEQ-G50 Célula de fluxo de sequenciamento	1	RT
		Tampão de TÊ baixo	100 µL×1 tubo	
		Tampão de fabricação de DNB	50 µL×1 tubo	
		Mistura I da enzima de fabricação de DNB	100 µL×1 tubo	
		Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	13 µL×1 tubo	
	Pacote II	Tampão para interromper a reação de DNB	50 µL×1 tubo	-25 °C--15 °C
		Tampão I de carga de DNB	300 µL×1 tubo	
		Tampão II de carga de DNB	120 µL×1 tubo	
		Microtubo de 0,5 mL (Vazio)	1 tubo	
		Mistura III de dNTPs	0,60 mL×1 tubo	
Mistura II de dNTPs		1,10 mL×1 tubo		
Mistura das enzimas de sequenciamento		1,30 mL×1 tubo		
Cartucho de reagentes de sequenciamento	1			
filme de vedação transparente	2 folhas.			

**Tabela 10-4: Lista de componentes do kit 4**

Produto	Kit de sequenciamento	Componente	Especificação e quantidade	Temperatura de armazenamento
DNBSEQ-G50 Conjunto de sequenciamento de alto rendimento (FCL SE35) FCL PE50 Número de catálogo: 1000018586	Pacote I	DNBSEQ-G50 Célula de fluxo de sequenciamento	1	RT
		Tampão de TE baixo	100 µL×1 tubo	
		Tampão de fabricação de DNB	50 µL×1 tubo	
		Mistura I da enzima de fabricação de DNB	100 µL×1 tubo	
		Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	13 µL×1 tubo	
		Tampão para interromper a reação de DNB	50 µL×1 tubo	
	Pacote II	Tampão I de carga de DNB	300 µL×1 tubo	-25 °C~-15 °C
		Tampão II de carga de DNB	120 µL×1 tubo	
		Microtubo de 0,5 mL (Vazio)	1 tubo	
		Mistura III de dNTPs	0,60 mL×1 tubo	
		Mistura II de dNTPs	1,10 mL×1 tubo	
		Mistura das enzimas de sequenciamento	1,30 mL×1 tubo	
		Reagente MDA	1,40 mL×1 tubo	
Mistura das enzimas de MDA	0,30 mL×1 tubo			
Cartucho de reagentes de sequenciamento	1			
filme de vedação transparente	2 folhas.			

**Tabela 10-5: Lista de componentes do kit 5**

Produto	Kit de sequenciamento	Componente	Especificação e quantidade	Temperatura de armazenamento	
DNBSEQ-G50 Conjunto de sequenciamento de alto rendimento (FCL SE35) FCL PE100 Número de catálogo: 1000018587	Pacote I	DNBSEQ-G50 Célula de fluxo de sequenciamento	1	RT	
		Tampão de TÊ baixo	100 µL×1 tubo		
		Tampão de fabricação de DNB	50 µL×1 tubo		
		Mistura I da enzima de fabricação de DNB	100 µL×1 tubo		
			Mistura II (LC) da enzima de fabricação de DNB	13 µL×1 tubo	
			Tampão para interromper a reação de DNB	50 µL×1 tubo	
			Tampão I de carga de DNB	300 µL×1 tubo	
			Tampão II de carga de DNB	120 µL×1 tubo	
		Pacote II	Microtubo de 0,5 mL (Vazio)	1 tubo	-25 °C~-15 °C
			Mistura III de dNTPs	0,90 mL×1	
			Mistura II de dNTPs	1,70 mL×1 tubo	
			Mistura das enzimas de sequenciamento	1,90 mL×1 tubo	
			Reagente MDA	1,40 mL×1 tubo	
			Mistura das enzimas de MDA	0,30 mL×1 tubo	
		Cartucho de reagentes de sequenciamento	1		
		filme de vedação transparente	2 folhas.		

## **11 Interpretação dos resultados dos testes**

**11.1** As seguintes condições podem comprometer os resultados da sequenciamento:

- Armazenamento prolongado das amostras de DNB;
- Contaminação da amostra;
- Diferença na proporção de mistura de bibliotecas contendo diferentes códigos de barras moleculares com defeito;

**11.2** Outros fatores que podem comprometer os resultados incluem: uso de um kit de reagentes expirado, baixa precisão de pipetas, alta temperatura ambiente e não cumprimento das instruções.

## **12 Especificação de desempenho do produto**

### **12.1 Precisão**

Quando os testes são realizados no produto de referência Q, a taxa de coincidência entre os resultados de sequenciamento e a sequência de referência conhecida deve ser superior a 99%.

### **12.2 Repetibilidade**

Repita os testes no produto de referência Q 5 vezes, o valor CV da taxa de coincidência entre os resultados de sequenciamento e a sequência de referência conhecida não deve ser superior a 5% (n=5).

### **12.3 Variações de lote**

Quando os testes forem realizados no produto de referência Q, use os kits de sequenciamento de três lotes diferentes e repita os testes 5 vezes, respectivamente. O valor CV da taxa de coincidência entre os resultados de sequenciamento e a sequência de referência conhecida não deve ser superior a 5% (n=15).

## **13 Precauções**

**13.1** Somente para uso diagnóstico in vitro. Leia este manual cuidadosamente antes de usar.

**13.2** Os componentes de diferentes lotes são proibidos de serem misturados.

**13.3** Certifique-se de compreender a operação sofisticada do dispositivo e estar totalmente ciente das precauções antes de iniciar o ensaio.

**13.4** Todas as amostras e reagentes devem ser evitados do contato direto com a pele e os olhos, e proibidos de engolir.

Quando isso acontecer, lave imediatamente com bastante água limpa e vá para o hospital para tratamento o mais rápido possível.

**13.5** Todas as amostras e vários resíduos são considerados como tendo potencial contaminação e devem ser tratados como poluentes.

**13.6** Entre em contato com nossos representantes de vendas para obter as informações mais atualizadas em caso de danos à embalagem de proteção.

**13.7** Sugere-se que cada operador tenha recebido treinamento profissional antes da operação.

## **14 Referências da literatura**

### **14.1**

Dean, F. B. et al. Comprehensive human genome amplification using multiplex displacement amplification. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 99, 5261–5266 (2002).

### **14.2**

Peters, B.A., et al. Accurate whole genome sequencing and haplotyping from 10 to 20 human cells. Nature 487, 190-195 (2012).

### **14.3**

Drmanac, R. Nucleic acid analysis by random mixtures of non-overlapping fragments. US patent 7,901 891 (2006).

### **14.4**

Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921 (2001).

### **14.5**

Drmanac, R. et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. Science 327, 78–81 (2010).

## **15 Detalhes de contato**

**Fabricante:** Wuhan MGI Tech Co., Ltd

**Endereço Fabricante:** Building 24, Stage 3.1, BioLake Accelerator, No.388, 2nd Gaoxin Road, East Lake High-Tech

Development Zone, 430075, Wuhan, China

**Entre em contato com:** Latvia MGI Tech, SIA

**Linha direta do serviço:** 4000-966-988

**Site:** [www.mgitech.cn](http://www.mgitech.cn)

## 16 Edição de idioma

Para os requisitos de Instruções de uso em outros idiomas, entre em contato com a Latvia MGI Tech, SIA

## 17 Data da versão do manual do usuário

Este manual foi lançado em outubro de 2018.

## 18 Legenda dos símbolos usados



DISPOSITIVO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO



FABRICANTE



USAR ATÉ



CÓDIGO DO LOTE



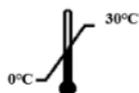
NÚMERO DE CATÁLOGO



CUIDADO



LIMITE SUPERIOR DE TEMPERATURA



LIMITE DE TEMPERATURA



MARCA CE



CONSULTE AS INSTRUÇÕES DE USO



MANTER PROTEGIDO DA LUZ SOLAR



MANTER SECO



NÃO REUTILIZE



CONTEÚDO SUFICIENTE PARA N TESTES



MGI WeChat

■ Informações para contato

---

Wuhan MGI Tech Co.,Ltd.

Endereço: Prédio 24, Estágio 3.1, BioLake Accelerator, N.º 388 2nd GaoXin Road, East Lake High-Tech  
Zona de Desenvolvimento, 430075 Wuhan, China

E-mail: [MGI-service@genomics.cn](mailto:MGI-service@genomics.cn)

Website: [en.mgitech.cn](http://en.mgitech.cn)

