

NextSeq 1000 y 2000

Guía del sistema de secuenciación

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

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

Historial de revisiones

N.º de documento	Fecha	Descripción del cambio
1000000109376 v04	Abril de 2021	<p>Instrucciones adicionales para importar archivos de referencia.</p> <p>Flujo de trabajo de amplicones de ADN DRAGEN adicional.</p> <p>Características adicionales para el software de control del NextSeq 1000/2000 v1.3.</p> <p>Información adicional para seleccionar un servidor Proxy.</p> <p>RSB actualizado con temperatura de envío y almacenamiento de Tween 20.</p> <p>Flujo de trabajo de RNA de DRAGEN actualizado para incluir la expresión genética diferencial.</p> <p>Estructura de carpetas de resultados de secuenciación actualizada.</p> <p>Recomendaciones de formato de la hoja de muestras v2 actualizada.</p>
1000000109376 v03	Noviembre de 2020	<p>Se han corregido los números de catálogo.</p> <p>Se ha añadido información sobre la adición de usuarios nuevos.</p>

N.º de documento	Fecha	Descripción del cambio
1000000109376 v02	Octubre de 2020	<p>Se ha añadido el kit de reactivos P3 de NextSeq 1000/2000.</p> <p>Se ha añadido el flujo de trabajo DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Se ha añadido el flujo de trabajo DRAGEN Enrichment.</p> <p>Se han añadido las opciones de compresión de FASTQ.</p> <p>Se han añadido instrucciones para instalar las actualizaciones del proceso y la licencia de DRAGEN.</p> <p>Se han añadido instrucciones para importar genomas de referencia personalizados.</p> <p>Se han actualizado el volumen y las concentraciones de carga para tipos de bibliotecas.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones de dilución de bibliotecas.</p> <p>Se han añadido instrucciones para la purga automática del cartucho de reactivo.</p> <p>Se ha actualizado la información sobre el número de ciclos admitidos.</p> <p>Se han actualizado las opciones de personalización del instrumento.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones de configuración del experimento en el instrumento.</p> <p>Se ha actualizado la estructura de los resultados de secuenciación en DRAGEN.</p> <p>Se ha añadido información sobre los informes de CC de DRAGEN.</p> <p>Se ha añadido información sobre la eliminación de genomas de referencia personalizados del disco duro.</p> <p>Se ha añadido información sobre la ejecución de comprobaciones del sistema.</p> <p>Se ha actualizado la configuración de la hoja de muestras v2.</p>

N.º de documento	Fecha	Descripción del cambio
1000000109376 v01	Junio de 2020	<p>Se han actualizado las descripciones del software de NextSeq 1000/2000 Control Software.</p> <p>Se ha aclarado la distinción entre los modos Cloud (Nube), Hybrid (Híbrido), Local y Standalone (Independiente) en la guía.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones para almacenar y descongelar cartuchos.</p> <p>Se ha actualizado la información sobre el número de ciclos admitidos.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones para configurar un análisis secundario.</p> <p>Se han actualizado los números de catálogo del kit de reactivos.</p> <p>Se ha actualizado el diagrama del protocolo de secuenciación.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones para especificar una unidad de red como carpeta de resultados predeterminada.</p> <p>Se ha actualizado la tabla de tipos de bibliotecas compatibles.</p> <p>Se han añadido instrucciones para importar un genoma de referencia personalizado.</p> <p>Se han añadido instrucciones para configurar un experimento usando un kit de índice personalizado y un kit de preparación de bibliotecas personalizado.</p> <p>Se han actualizado los requisitos de la cuenta de usuario y la contraseña.</p> <p>Se han añadido detalles acerca de la estructura de la carpeta de resultados de DRAGEN.</p> <p>Se han aclarado las instrucciones para drenar los reactivos usados del cartucho.</p> <p>Se ha añadido información básica sobre la tabla Q.</p> <p>Se han actualizado las instrucciones acerca de la instalación de actualizaciones del software de control.</p>

N.º de documento	Fecha	Descripción del cambio
		<p>Se han añadido instrucciones para volver a poner en cola un experimento.</p> <p>Se han añadido instrucciones para actualizar los procesos y la licencia de DRAGEN.</p> <p>Se han añadido instrucciones para personalizar el instrumento.</p> <p>Se han actualizado las ilustraciones para reflejar las nuevas etiquetas.</p> <p>Se ha cambiado la palabra "puerta" por "visor" en toda la guía.</p> <p>Se ha añadido una descripción de los dos puertos Ethernet.</p>
1000000109376 v00	Marzo de 2020	Publicación inicial.

Índice

Descripción general del sistema	1
Otros recursos	2
Hardware del instrumento	3
Software integrado	5
Process Management (Gestión del proceso)	6
Diagrama del protocolo de secuenciación	8
Cómo funciona la secuenciación	8
Configuración del sistema	11
Requisitos de la cuenta de usuario	11
Configuración de BaseSpace Sequence Hub y la asistencia de Proactive	13
Especificación de la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada	15
Importación de genomas de referencia personalizados	18
Import Noise Baseline Files (Importar archivos de referencia de ruido)	19
Configuración del modo de experimento	20
Personalización del instrumento	21
Consumibles y equipos	25
Consumibles de secuenciación	25
Consumibles auxiliares	29
Equipo auxiliar	31
Protocolo	32
Consideraciones de secuenciación	32
Planificación de un experimento de secuenciación en BaseSpace Sequence Hub ...	34
Descongelación del cartucho en la bolsa y la celda de flujo	42
Dilución de bibliotecas	45
Carga de consumibles en el cartucho	47
Inicio de un experimento de secuenciación	49
Resultados de secuenciación	58
Descripción general de Análisis en tiempo real	58
Flujo de trabajo de análisis en tiempo real	61
Archivos de resultados de secuenciación	65
Archivos de resultados del análisis secundario de DRAGEN	66
Estructura de carpetas de resultados de análisis secundario de DRAGEN	76
Mantenimiento	80
Liberación de espacio en el disco duro	80
Actualizaciones de software	80
Actualizaciones de flujos de trabajo y licencias de DRAGEN	82

Sustitución del filtro de aire	84
Solución de problemas	86
Resolución de mensajes de error	86
Devolución de los consumibles a almacenamiento	87
Cancelación de un experimento	87
Volver a poner en cola un experimento	88
Ciclo de apagado y encendido del instrumento	88
Realizar una comprobación del sistema	89
Restablecimiento a la configuración de fábrica	90
Captura de una imagen de instalación	90
Restauración de la imagen capturada	91
Recursos y referencias	92
Configuración de la hoja de muestras v2	92
Secuenciación mediante ciclo sin etiquetar	108
Índice alfabético	110
Asistencia técnica	114

Descripción general del sistema

El sistema de secuenciación NextSeq™ 1000 de Illumina® y el sistema de secuenciación NextSeq™ 2000 de Illumina® le ofrecen un método selectivo de la secuenciación de nueva generación o NGS¹. Este sistema basado en aplicaciones incorpora la tecnología de secuenciación de Illumina en un instrumento de escritorio rentable que ofrece las siguientes funciones:

- **Accesibilidad y fiabilidad:** NextSeq 1000/2000 cuenta con análisis de DRAGEN local, así como desnaturalización y dilución integradas. El sistema tiene integrado un módulo de adquisición de imágenes y el consumible tiene integrados componentes de fluidica, lo que simplifica el mantenimiento del instrumento.
- **Carga de consumibles en un solo paso:** dispone de un cartucho de un solo uso precargado con todos los reactivos necesarios para llevar a cabo un experimento. La celda de flujo y la biblioteca se cargan directamente en el cartucho, el cual posteriormente se carga en el instrumento. La identificación integrada permite un seguimiento preciso.
- **Software de NextSeq 1000/2000:** un paquete de software integrado controla el funcionamiento del instrumento, procesa las imágenes y genera las llamadas de bases.
 - **Modo Cloud (Nube):** planifique su experimento con Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub. El flujo de trabajo de análisis seleccionado se inicia automáticamente en la nube. Los datos del experimento y los resultados del análisis también se ofrecen en la nube.
 - **Modo Hybrid (Híbrido):** planifique su experimento con Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub. El flujo de trabajo de análisis seleccionado se inicia mediante la plataforma DRAGEN integrada en el instrumento.
 - **Modo Local:** planifique su experimento con un formato de archivo v2 de hoja de muestras localmente. El flujo de trabajo de análisis seleccionado se inicia automáticamente mediante la plataforma DRAGEN integrada en el instrumento.
 - **Modo Standalone (Independiente):** planifique su experimento sin una hoja de muestras.

Esta sección ofrece una descripción general del sistema, lo que incluye información del hardware, el software y el análisis de datos. Asimismo, reúne conceptos clave y terminología que se mencionan a lo largo de la documentación. Para obtener especificaciones detalladas, hojas de datos, aplicaciones y productos relacionados, consulte la [página de producto de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000](#) en el sitio web de Illumina.

¹secuenciación de nueva generación

Otros recursos

Las [páginas de asistencia de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000](#) del sitio web de Illumina proporcionan recursos adicionales del sistema. Estos recursos incluyen el software, la formación, los productos compatibles y la siguiente documentación. Revise siempre las páginas de asistencia para obtener las versiones más recientes.

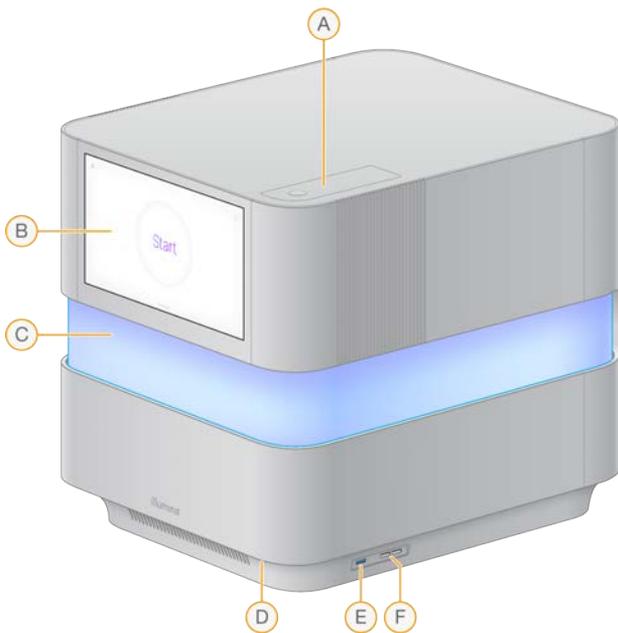
Recurso	Descripción
Herramienta de selección de protocolos personalizados	Una herramienta para generar instrucciones integrales adaptadas al método de preparación de bibliotecas, a los parámetros del experimento y al método de análisis, con opciones para refinar el nivel de detalle.
<i>Guía de cumplimiento y seguridad de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000 (n.º de documento 1000000111928)</i>	Proporciona información sobre las consideraciones de seguridad operativa, las declaraciones de cumplimiento normativo y el etiquetado del instrumento.
<i>Guía de cumplimiento del módulo de lector RFID con antena externa (n.º de documento 1000000002699)</i>	Proporciona información sobre el lector de RFID del instrumento, las certificaciones de cumplimiento y las consideraciones de seguridad.
<i>Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139235)</i>	Proporciona instrucciones para la desnaturalización manual y dilución de bibliotecas preparadas para un experimento de secuenciación y la preparación de un control PhiX opcional.
<i>Guía de cebadores personalizados de NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139569)</i>	Proporciona información sobre la sustitución de los cebadores de secuenciación de Illumina con cebadores de secuenciación personalizados.
<i>Guía de preparación del centro del sistema de secuenciación NextSeq 2000 (n.º de documento 1000000109378)</i>	Proporciona especificaciones para el espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales y de red.
<i>Ayuda de BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Proporciona información sobre el uso de BaseSpace™ Sequence Hub y las opciones de análisis disponibles.

Recurso	Descripción
<i>Guía de agrupación de adaptadores indexados (n.º de documento 1000000041074)</i>	Ofrece directrices de agrupación y estrategias de indexado doble.
<i>Secuencias de adaptadores de Illumina (n.º de documento 1000000002694)</i>	Ofrece listas de las secuencias de adaptadores para los kits de preparación de bibliotecas de Illumina.

Hardware del instrumento

Los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000 se componen de un botón de encendido, un monitor, una barra de estado, un compartimento de consumibles y puertos USB.

Figura 1 Componentes externos del sistema



- A. **Compartimento del filtro de aire:** ofrece acceso al filtro de aire que se puede sustituir.
- B. **Monitor con pantalla táctil:** permite la configuración integrada en el instrumento y el ajuste mediante el uso de la interfaz del software de control.
- C. **Barra de estado:** el color de la luz progresa a medida que el sistema avanza por el flujo de trabajo. El azul y el violeta indican interactividad (por ejemplo, comprobaciones previas al experimento) y el multicolor indica momentos y datos destacados (por ejemplo, finalización de la secuenciación). Los errores graves se indican con una luz roja.
- D. **Botón de encendido:** controla el encendido del instrumento e indica si el sistema está activado (se ilumina), desactivado (apagado) o desactivado con alimentación de CA (parpadea).

- E. **Puerto USB 3.0:** para conectar una unidad portátil para la transferencia de datos.
- F. **Puertos USB 2.0:** para conectar un ratón y un teclado.

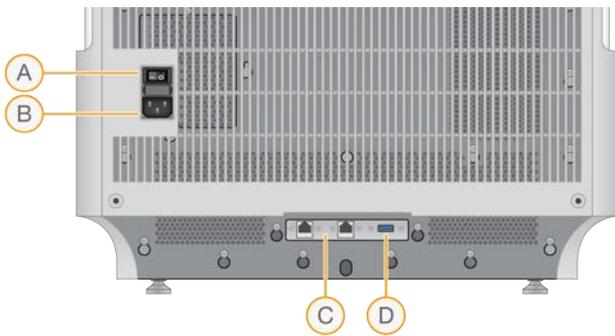
Conexiones de alimentación y auxiliares

El instrumento se puede mover con cuidado para acceder al interruptor de alimentación, al puerto USB y a otras conexiones auxiliares de la parte posterior del instrumento.

La parte posterior del instrumento cuenta con el interruptor y la entrada que controlan la alimentación al instrumento, así como con dos puertos Ethernet para una conexión Ethernet opcional. Un puerto USB 3.0 permite conectar un disco duro externo para realizar la transferencia de datos (el formato exFAT no es compatible en esta plataforma de Linux).

Los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000 incluyen dos puertos Ethernet para ampliar la capacidad y flexibilidad del sistema. Por ejemplo, se puede dedicar un puerto Ethernet a la comunicación con una unidad de red interna y el otro a la comunicación externa, como con BaseSpace Sequence Hub o la asistencia de Proactive.

Figura 2 Componentes del panel trasero

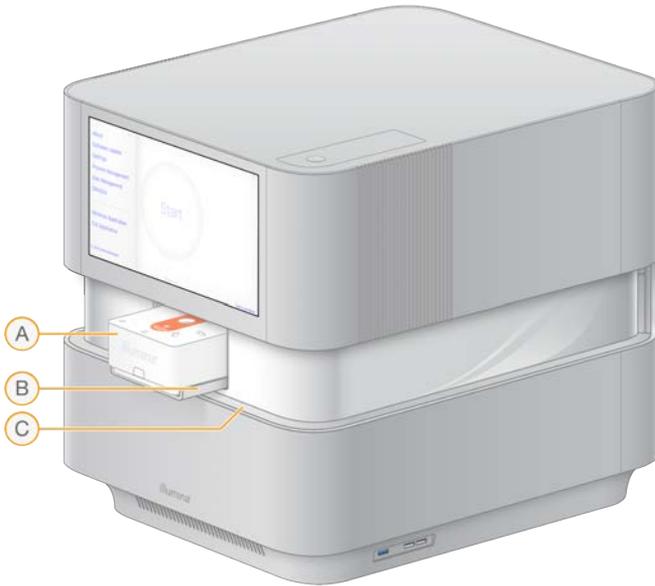


- A. **Interruptor de alimentación:** enciende y apaga el instrumento.
- B. **Entrada de alimentación:** conexión del cable de alimentación.
- C. **Puertos Ethernet (2):** conexión opcional del cable Ethernet.
- D. **Puerto USB 3.0:** para conectar un disco duro externo para la transferencia de datos.

Compartimento de consumibles

El compartimento de consumibles contiene el cartucho, que incluye la celda de flujo y la biblioteca diluida, para un experimento de secuenciación.

Figura 3 Compartimento de consumibles cargados



- A. **Cartucho:** contiene la celda de flujo, la biblioteca y los reactivos, y recoge los reactivos utilizados durante el experimento.
- B. **Bandeja:** alberga el cartucho durante la secuenciación.
- C. **Visor:** se abre para acceder al compartimento de consumibles.

Software integrado

El paquete de software del sistema incluye aplicaciones integradas que realizan experimentos de secuenciación y análisis.

- **NextSeq 1000/2000 Control Software:** controla el funcionamiento del instrumento y ofrece una interfaz para configurar el sistema, configurar un experimento de secuenciación y supervisar las estadísticas del experimento conforme avanza la secuenciación.
- **Análisis en tiempo real (RTA3):** realiza análisis de imágenes y llamadas de bases durante el experimento. Para obtener más información, consulte [Resultados de secuenciación en la página 58](#).
- **Servicio de copia universal:** copia los archivos de resultados de secuenciación de la carpeta de experimentos a BaseSpace Sequence Hub (si corresponde) y a la carpeta de resultados, donde puede acceder a ellos.

El software de control es interactivo y ejecuta procesos en segundo plano automatizados. Análisis en tiempo real y Servicio de copia universal solo ejecutan procesos en segundo plano.

Información del sistema

Seleccione el menú del software de control situado en la esquina superior izquierda para abrir la sección About (Acerca de). La sección About (Acerca de) contiene información de contacto de Illumina y la siguiente información del sistema:

- Número de serie del instrumento
- Nombre del ordenador
- Versión del paquete de software
- Versión de la imagen del sistema operativo
- Recuento total de experimentos

Notificaciones y alertas

El icono de notificaciones se encuentra en la esquina superior derecha. Cuando se produce una advertencia o un error, el panel derecho aparece para indicar que hay notificaciones. Seleccione el icono en cualquier momento para ver una lista de las notificaciones actuales o históricas de advertencias y errores.

- Es necesario prestar atención a las advertencias, aunque no hacen que se detenga un experimento ni es necesario hacer otra acción más que confirmar.
- Con los errores sí es necesario actuar antes de iniciar o continuar con el experimento.

Minimizar el software de control

Minimice el software de control para acceder a otras aplicaciones. Por ejemplo, para buscar la carpeta de salida en el explorador de archivos o buscar una hoja de muestras.

1. En el menú del software de control, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicación). El software de control se minimiza.
2. Para maximizar el software de control, seleccione **NextSeq 1000/2000 Control Software** en la barra de herramientas.

Process Management (Gestión del proceso)

La pantalla Process Management (Gestión del proceso) muestra experimentos temporales que están almacenados en `/usr/local/illumina/runs`. Cada experimento se identifica con una fecha, nombre e ID del experimento. La información como Status of Run (Estado del experimento), Secondary Analysis (Análisis secundario), Output Folder (Carpeta de resultados) y Cloud (Nube) también se muestra para cada experimento. Seleccione el experimento para ver información adicional, lo que incluye Workflow (Flujo de trabajo), Average % Q30 (Q30 del porcentaje medio), Total Reads PF (Total

de lecturas PF) y Total Yield (Rendimiento total). Para eliminar experimentos y liberar espacio, consulte [Liberación de espacio en el disco duro en la página 80](#). Para volver a poner en cola un análisis integrado en el instrumento, consulte [Volver a poner en cola un experimento en la página 88](#).

Estado del experimento

Esta sección muestra el estado de un experimento de secuenciación:

- **In Progress** (En curso): experimento de secuenciación en curso.
- **Complete** (Finalizado): el experimento de secuenciación ha finalizado.
- **Stopped** (Detenido): se ha detenido el experimento de secuenciación.
- **Errored** (Con errores): el experimento de secuenciación tiene un error.

Estado del análisis secundario

Esta sección muestra el estado del análisis secundario de DRAGEN integrado en el instrumento. Si el análisis se está realizando en BaseSpace Sequence Hub aparecerá N/A (No disponible).

- **Not Started** (No iniciado): el análisis DRAGEN no se ha iniciado todavía.
- **In Progress** (En curso): el análisis DRAGEN está en curso.
- **Stopped** (Detenido): el análisis DRAGEN se ha detenido.
- **Errored** (Con errores): el análisis DRAGEN tiene un error.
- **Complete** (Finalizado): el análisis DRAGEN ha finalizado.

Estado de la carpeta de resultados

Esta sección muestra el estado de los archivos que se están copiando en la carpeta de resultados:

- **In Progress** (En curso): los archivos se están copiando en la carpeta de resultados.
- **Complete** (Finalizado): los archivos se han copiado correctamente en la carpeta de resultados.

Estado de la nube (BaseSpace Sequence Hub)

La sección muestra el estado de los archivos que se están cargando en BaseSpace Sequence Hub a través de la nube:

- **In Progress** (En curso): el software de control está cargando archivos en BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Finalizado): los archivos se han cargado correctamente en BaseSpace Sequence Hub.

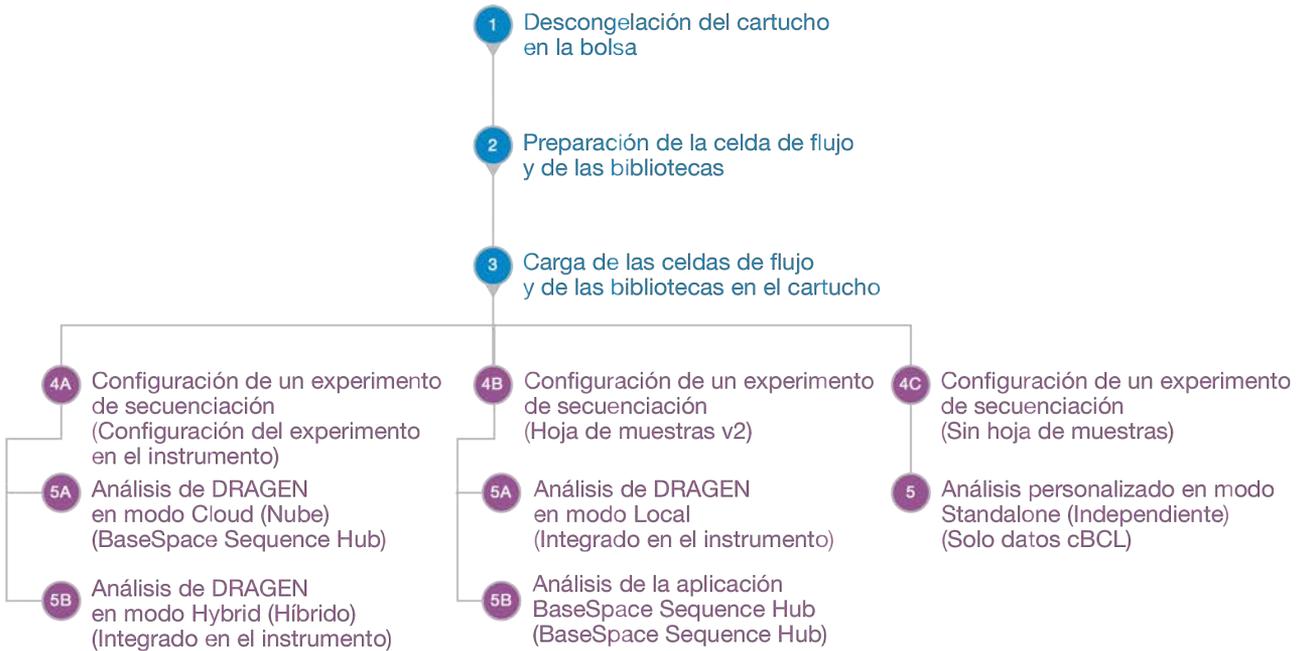
Solución de problemas de estado

- Si el experimento está en curso, cierre la pantalla Process Management (Gestión del proceso), espere cinco minutos aproximadamente y, a continuación, vuelva a abrirla.

- Si el experimento no está en curso, apague y encienda el instrumento y, a continuación, vuelva a abrir la pantalla Process Management (Gestión del proceso). Consulte [Ciclo de apagado y encendido del instrumento en la página 88](#).

Diagrama del protocolo de secuenciación

El siguiente diagrama ilustra el protocolo de secuenciación mediante NextSeq 1000/2000.



Cómo funciona la secuenciación

La generación de grupos, su secuenciación y análisis conforman la secuenciación en los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Cada paso se lleva a cabo de manera automática durante un experimento de secuenciación. En función de la configuración del sistema, se llevan a cabo más análisis fuera del instrumento después de haber finalizado el experimento.

Generación de grupos

La biblioteca¹ se desnaturaliza de manera automática en cadenas individuales y se diluye posteriormente en el instrumento. Durante la generación de grupos, las moléculas únicas de ADN se

¹Una muestra de ADN o ARN que tiene adaptadores unidos para la secuenciación. Los métodos de preparación pueden variar.

unen a la superficie de la celda de flujo y se amplifican para formar grupos¹. La generación de clústeres dura aproximadamente 4 horas.

Secuenciación

Se adquieren imágenes de los grupos con composiciones químicas de dos canales, un canal verde y un canal azul, para codificar los datos para los cuatro nucleótidos. Tras la adquisición de imágenes de una placa en la celda de flujo, se procede a la adquisición de imágenes de la placa siguiente. El proceso se repite para cada ciclo de secuenciación (5 minutos aproximadamente por ciclo). Después del análisis de imágenes, el software de análisis en tiempo real ejecuta las llamadas de bases², el filtrado y la puntuación de calidad.³

Análisis principal

A medida que el experimento avanza, el software de control transfiere de forma automática archivos de llamada de bases⁴ (*.cbcl) a la carpeta de resultados especificada para el análisis de los datos. Durante el experimento de secuenciación, el análisis en tiempo real (RTA3) ejecuta análisis de imágenes, llamadas de bases y demultiplexado⁵. Una vez finalizada la secuenciación, comienza el análisis secundario. El método de análisis de datos secundario depende de la configuración del sistema y de la aplicación.

Análisis secundario

BaseSpace Sequence Hub es el entorno informático basado en la nube de Illumina para la supervisión de experimentos, el análisis de los datos, el almacenamiento y la colaboración. Alberga DRAGEN y las aplicaciones de BaseSpace Sequence Hub, que admiten los métodos de análisis comunes para la secuenciación.

Una vez que se ha realizado el análisis de secuenciación inicial, DRAGEN realiza un análisis secundario utilizando uno de los procesos de análisis disponibles.

Si utiliza el modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido), DRAGEN recupera la hoja de muestras, el genoma de referencia y los archivos de entrada de experimentos de Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub. Para el modo Cloud (Nube), los datos

¹Un grupo clónico de hebras de ADN en una cubeta de lectura que producen una lectura de secuenciación. Cada hebra de ADN en una cubeta de lectura crea una cadena que se amplifica hasta que el conjunto alcanza los cientos o miles de copias. Por ejemplo, una cubeta de lectura con 10 000 conjuntos produce 10 000 lecturas individuales o 20 000 lecturas de ambos extremos.

²Determinar una base (A, C, G, o T) para cada conjunto en una placa en un ciclo específico.

³Calcula una serie de factores pronósticos de la calidad para cada llamada de base y, a continuación, utiliza el valor del factor pronóstico para consultar la puntuación de calidad.

⁴Contiene la llamada de base y la puntuación de calidad asociada para cada conjunto de cada ciclo de secuenciación.

⁵Un proceso analítico que diferencia lecturas para cada librería en un agrupamiento.

cBCL se cargan automáticamente en BaseSpace Sequence Hub y este inicia el análisis secundario de DRAGEN. Para el modo Hybrid (Híbrido), el análisis secundario de DRAGEN se realiza integrado en el instrumento y los archivos de resultados se pueden almacenar en una carpeta seleccionada o en la nube.

Si utiliza el modo Local, DRAGEN recupera la hoja de muestras, el genoma de referencia y los archivos de entrada de experimentos de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000. El análisis secundario de DRAGEN se realiza integrado en el instrumento y los archivos de resultados se almacenan en una carpeta de resultados seleccionada. Si se selecciona Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), el análisis también se puede iniciar mediante las aplicaciones de BaseSpace Sequence Hub una vez finalizada la secuenciación.

Si se utiliza el modo Standalone (Independiente), configure el experimento sin una hoja de muestras. Este flujo de trabajo es el recomendado para flujos de trabajo de análisis personalizados que se inician desde datos de cBCL.

- Para obtener más información sobre BaseSpace Sequence Hub, consulte la [ayuda en línea de BaseSpace Sequence Hub](#).
- Para obtener más información sobre DRAGEN, consulte la [página de asistencia de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN](#).
- Para ver una descripción general de todas las aplicaciones, consulte [Aplicaciones de BaseSpace](#).

Configuración del sistema

Esta sección ofrece instrucciones para configurar el sistema, incluidas descripciones de la configuración del software.

Estas instrucciones describen principalmente el software de control, con algo de información sobre la configuración de la red y el sistema operativo.

i | Si utiliza Google Chrome en el instrumento, se le pedirá que desbloquee su llavero de claves de inicio de sesión. Puede ignorar esto y salir del mensaje.

Requisitos de la cuenta de usuario

El sistema operativo Linux tiene tres cuentas:

- root (superadministrador)
- ilmnadmin (administrador)
- ilmnuser (usuario)

La cuenta de administrador solo se utiliza para aplicar actualizaciones del sistema, como la actualización de NextSeq 1000/2000 Control Software, o para que el equipo de TI la utilice para montar una unidad de red persistente.

Lleve a cabo el resto de funciones, incluida la secuenciación, con la cuenta de usuario.

Requisitos de las contraseñas

El ingeniero de servicio de campo inicia un cambio de contraseña para las tres cuentas tras finalizar la instalación del instrumento. Actualice cada contraseña cada 180 días, cuando se le solicite.

Tabla 1 Políticas de contraseña predeterminadas

Política	Ajuste
Aplicar historial de contraseñas	Cinco contraseñas almacenadas en memoria
Umbral de bloqueo	Diez intentos de inicio de sesión fallidos
Longitud mínima de la contraseña	Diez caracteres
Variedad mínima de caracteres	Tres de cada: número, letra mayúscula, letra minúscula y símbolo
Máximo de caracteres que se pueden repetir	Tres caracteres

Política	Ajuste
La contraseña debe cumplir los requisitos de complejidad	Desactivado
Guardar las contraseñas con cifrado reversible	Desactivado

Añadir nuevo usuario

- Inicie sesión como administrador.
- Pulse el botón de inicio y abra el menú desplegable del administrador.
- Seleccione **Account Settings** (Configuración de la cuenta).
- Seleccione **Unlock** (Desbloquear) e introduzca la contraseña de administrador.
- Seleccione **Add User** (Añadir usuario).
- Seleccione el tipo de cuenta Standard (Estándar) e introduzca un nuevo nombre de usuario.
- Seleccione **Set password now** (Establecer contraseña ahora) e introduzca una contraseña.
- Seleccione **Add** (Añadir).
El nuevo usuario se ha añadido a la lista de usuarios.
- Para conceder acceso al usuario al software de control NextSeq 1000/2000, siga estos pasos.
 - Abra el terminal.
 - Introduzca lo siguiente:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <nombre de usuario nuevo>
```
 - Si se solicita, introduzca la contraseña de administrador.
- Para confirmar que los permisos del usuario se han configurado correctamente, haga lo siguiente.
 - Inicie sesión en la cuenta del nuevo usuario.
 - Navegue al software de control de NextSeq 1000/2000.
 - En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
 - Compruebe que en Default Output Folder (Carpeta de resultados predeterminada) puede seleccionar y guardar la ruta de la carpeta de resultados.
Si puede seleccionar y guardar la ruta de la carpeta de resultados sin errores, significa que los permisos se han configurado correctamente.

Restablecer la contraseña

En esta sección se detalla cómo restablecer la contraseña de usuario, administrador o superadministrador. La opción de recuperación de contraseña no está disponible. Restablecer la contraseña no evita que la cuenta se bloquee después de introducir una contraseña incorrecta varias veces. Debe esperar 10 minutos antes de restablecer la contraseña o de volver a intentar iniciar sesión.

Restablecer la contraseña de usuario

Puede restablecer la contraseña de usuario si conoce la contraseña de administrador o superadministrador.

1. Inicie sesión como administrador.
2. Abra el terminal.
3. Introduzca `sudo passwd ilmnuser`.
4. Cuando se solicite, introduzca la contraseña de administrador.
5. Cuando se solicite, introduzca una nueva contraseña de administrador.
6. Vuelva a escribir la nueva contraseña de usuario cuando se le pida, para confirmar la nueva contraseña.

Restablecer la contraseña de administrador

Puede restablecer la contraseña de administrador si conoce la contraseña de superadministrador.

1. Inicie sesión como superadministrador.
2. Abra el terminal.
3. Introduzca `passwd ilmnadmin` para cambiar la contraseña de administrador, o introduzca `passwd ilmnuser` para cambiar la contraseña de usuario.
4. Cuando se solicite, introduzca la contraseña.
5. Vuelva a escribir la nueva contraseña cuando se le pida, para confirmarla.

Restablecer la contraseña de superadministrador

Para restablecer la contraseña de superadministrador, use una de las opciones siguientes:

- Si conoce la contraseña desde el momento en que se capturó la última imagen del sistema operativo, restaure esa imagen guardada.
- Si no recuerda la contraseña, contacte con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Configuración de BaseSpace Sequence Hub y la asistencia de Proactive

Siga estas instrucciones para configurar BaseSpace Sequence Hub y la asistencia de Proactive en el sistema. Para configurar una cuenta de BaseSpace Sequence Hub, consulte la [ayuda en línea de BaseSpace Sequence Hub](#).

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).

- Para la configuración de BaseSpace Sequence Hub y la asistencia de Proactive, seleccione una de las siguientes opciones:

Opción	Descripción y requisitos
Proactive Support Only* (Solo asistencia de Proactive)	Envía datos de rendimiento del instrumento a Illumina para una solución más rápida de los errores. Necesita conexión a Internet.
Proactive and Run Monitoring (Proactive y Supervisión del experimento)	Envía archivos InterOp y de registro a BaseSpace Sequence Hub para la supervisión remota del experimento. Esta opción es la predeterminada. Requiere una cuenta de BaseSpace Sequence Hub y conexión a Internet.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, Supervisión del experimento y Almacenamiento)	Envía archivos InterOp, archivos de registro y datos del experimento a BaseSpace Sequence Hub para su análisis y supervisión remotos. Hace falta una cuenta de BaseSpace Sequence Hub, una conexión a Internet y una hoja de muestras.
None (Ninguno)	Desconecta los experimentos de las cuentas de BaseSpace Sequence Hub y no envía datos de rendimiento del instrumento para la asistencia de Illumina Proactive.

* En función de la versión del software de control, el nombre de este ajuste en la interfaz del software puede diferir del nombre que se indica en esta guía.

Cuando se selecciona cualquier opción excepto None (Ninguno), la asistencia de Proactive está activada. Este es un servicio gratuito que le permite consultar los datos de rendimiento en el panel de cliente MyIllumina y facilita la solución de los problemas más rápidamente a los equipos de asistencia de Illumina.

i | Proactive y Run Monitoring están activados de forma predeterminada. Para desactivar este servicio, seleccione **None** (Ninguno).

- Si ha seleccionado None (Ninguno) en el paso 2, seleccione **Save** (Guardar) para finalizar. En caso contrario, continúe con el paso 6.
- En la lista Hosting Location (Ubicación de alojamiento), seleccione la ubicación del servidor de BaseSpace Sequence Hub en el que se cargan los datos. Asegúrese de utilizar la ubicación de alojamiento de su región o más la más cercana a esta.
- Si cuenta con una suscripción Enterprise, introduzca el nombre de dominio (URL) utilizado para la cuenta BaseSpace Sequence Hub. Por ejemplo: <https://sulaboratorio.basespace.illumina.com>.
- Seleccione **Save** (Guardar).

Especificación de la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada

Utilice las instrucciones de esta sección para seleccionar una ubicación predeterminada para la carpeta de resultados. Puede cambiar la carpeta de resultados para cada experimento durante la configuración del experimento. El software guarda los archivos cBCL¹ y otros datos del experimento en la carpeta de resultados.

Se requiere una carpeta de resultados a menos que BaseSpace Sequence Hub esté configurado para Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento). Utilice únicamente una unidad de red o externa como la carpeta de resultados predeterminada. El uso de una carpeta de resultados integrada en el instrumento repercute de manera negativa en el experimento de secuenciación.

Especificación de una unidad externa como la carpeta de resultados

Utilice las siguientes instrucciones para seleccionar un disco duro externo como la carpeta de resultados predeterminada. Se recomienda un disco duro de alimentación automática que esté formateado en NTFS or GPT/EXTA.

1. Conecte un disco duro externo utilizando el puerto USB 3.0 de la parte lateral o posterior del instrumento.
Asegúrese de que el disco duro externo admita permisos de escritura. Si es de solo lectura, el software de control no podrá guardar los datos en él.
2. Cree una nueva carpeta en un disco duro externo. Esta carpeta será la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada.
NextSeq 1000/2000 Control Software requiere al menos dos niveles de carpetas anidadas para reconocer la ubicación como un disco duro externo.
3. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
4. En Default Output Folder (Carpeta de resultados predeterminada), seleccione Choose... (Elegir...) y navegue hasta la ubicación del disco duro externo.
5. **[Opcional]** Si ha seleccionado **Online Run Setup** (Configuración del experimento en línea) en Run Mode (Modo de experimento), seleccione una opción del menú desplegable Hosting Location (Ubicación de alojamiento).
6. Seleccione **Save** (Guardar).

¹Contiene la llamada de base y la puntuación de calidad asociada para cada conjunto de cada ciclo de secuenciación.

Especificación de una carpeta de resultados predeterminada en una unidad de red

Utilice las siguientes instrucciones para montar una unidad de red permanente y especificar la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada. Bloque de mensajes del servidor (SMB, Server Message Block)/Sistema de archivos de Internet común (CIFS, Common Internet File Systems) y Network File System (NFS) son los únicos métodos compatibles para el montaje permanente de una unidad de red en NextSeq 1000/2000.

Instrucciones de montaje de SMB/CIFS

1. Si NextSeq 1000/2000 Control Software está abierto, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicación).
2. Inicie sesión en ilmnadmin.
3. Seleccione **Applications** (Aplicaciones).
4. En Favorites (Favoritos), seleccione **Terminal**.
5. Introduzca `sudo touch /root/.smbcreds` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).
6. Cuando se le solicite, introduzca la contraseña de administrador.
Debe introducir la contraseña de ilmnadmin cada vez que utilice un comando `sudo`.
7. Introduzca `sudo gedit /root/.smbcreds` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro) para abrir el archivo de texto denominado `smbcreds`.
8. Cuando se abra el archivo de texto `.smbcreds.txt`, introduzca sus credenciales de inicio de sesión en red en el siguiente formato.

```
username=<nombre de usuario>
password=<contraseña>
domain=<nombre_de_dominio>
```

No se requieren corchetes para las credenciales de nombre de usuario, contraseña y dominio. La credencial de dominio solo es necesaria si la cuenta remota forma parte de un dominio.
9. Seleccione **Save** (Guardar) y salga del archivo.
10. Identifique el nombre de servidor y de recurso compartido de su servidor SMB/CIFS.
Los nombres del servidor del recurso compartido no pueden incluir espacios, por ejemplo:
Nombre del servidor: 192.168.500.100 o Miservidor-miinstituto-03
Nombre del recurso compartido: /share1
11. En el terminal, escriba `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro) para otorgar acceso de lectura al archivo de texto `.smbcreds`.
12. Escriba `sudo mkdir /mnt/<nombre local>`.
<nombre local> es el nombre del nuevo directorio en su unidad de red y puede incluir espacios.
Este es el directorio que aparecerá en el instrumento.
13. Seleccione **Enter** (Intro).

14. Escriba `sudo gedit /etc/fstab` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).
15. Cuando se abra el archivo `fstab`, escriba el texto de abajo al final del archivo y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).

```
//<nombre servidor>/<nombre recurso compartido> /mnt/<nombre local> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Seleccione **Save** (Guardar) y salga del archivo.
17. En el terminal, escriba `sudo mount -a -vvv` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).
La unidad de red ahora está montada en `/mnt/<nombre local>`.
18. Para confirmar que el montaje ha sido correcto, escriba `<df | grep <nombre local >>` y seleccione **Enter** (Intro).
Debería mostrarse el nombre del recurso compartido.
19. Introduzca `sudo mkdir /mnt/<nombre local>/<directorio de resultados>` para crear una subcarpeta dentro del directorio local. El `<directorio de resultados>` representa la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada.
NextSeq 1000/2000 Control Software requiere al menos dos niveles de carpetas anidadas para reconocer la ubicación como una unidad de red montada.
20. Apague y encienda el instrumento. Consulte [Ciclo de apagado y encendido del instrumento en la página 88](#).
21. Especifique la unidad de red permanente montada como carpeta de resultados predeterminada. Consulte [Especificación de la unidad de red permanente como la carpeta de resultados predeterminada en la página 18](#).

Instrucciones de montaje de NFS

1. Si NextSeq 1000/2000 Control Software está abierto, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicación).
2. Inicie sesión en `ilmnadmin`.
3. Identifique el nombre de servidor de su servidor NFS.
El nombre del servidor no puede incluir espacios, por ejemplo:
Nombre del servidor: `192.168.500.100` o `Miservidor-miinstituto-03`
4. Seleccione **Applications** (Aplicaciones).
5. En Favorites (Favoritos), seleccione **Terminal**.
6. Escriba `sudo mkdir /mnt/<nombre local>` y seleccione **Enter** (Intro).
`<nombre local>` es el nombre del nuevo directorio en su unidad de red.
7. Escriba `sudo gedit /etc/fstab` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).
8. Cuando se abra el archivo `fstab`, escriba el texto de abajo y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).

```
Nombre del servidor:/share //mnt/<nombre local> nfs x-  
systemd.automount,defaults 0 0
```

9. Seleccione **Save** (Guardar) y salga del archivo.
10. En el terminal, escriba `sudo mount -a -vvv` y, a continuación, seleccione **Enter** (Intro).
La unidad de red ahora está montada en `/mnt/directory` en la carpeta `<nombre local>`.
11. En la carpeta `<nombre local>`, cree una nueva `<subcarpeta>`. Esta subcarpeta es la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada.
NextSeq 1000/2000 Control Software requiere al menos dos niveles de carpetas anidadas para reconocer la ubicación como una unidad de red montada.
12. Apague y encienda el instrumento. Consulte [Ciclo de apagado y encendido del instrumento en la página 88](#).
13. Especifique la unidad de red permanente montada como carpeta de resultados predeterminada. Consulte [Especificación de la unidad de red permanente como la carpeta de resultados predeterminada en la página 18](#).

Especificación de la unidad de red permanente como la carpeta de resultados predeterminada

1. Inicie sesión como `ilmnuser`.
2. Seleccione **Settings** (Configuración) en el menú de NextSeq 1000/2000 Control Software.
3. En Default Output Folder (Carpeta de resultados predeterminada), seleccione el montaje de la unidad de red permanente en `/mnt/<local name>/<output directory>`.
4. **[Opcional]** Si ha seleccionado **Online Run Setup** (Configuración del experimento en línea) en Run Mode (Modo de experimento), seleccione una opción del menú desplegable Hosting Location (Ubicación de alojamiento).
5. Seleccione **Save** (Guardar).

Importación de genomas de referencia personalizados

Los nuevos genomas de referencia personalizados solo se pueden importar con una cuenta de administrador. Para obtener la lista de todos los genomas de referencia compatibles, visite la página de compatibilidad de productos de NextSeq 1000/2000.

1. Cree un genoma de referencia con la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments BaseSpace Sequence Hub. Para obtener más información, consulte la [ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0](#).
2. En el menú del software de control, seleccione **Process Management** (Gestión del proceso).
3. Asegúrese de que no haya experimentos de secuenciación ni análisis secundarios en curso en el instrumento.
4. En el menú del software de control, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicación).
5. Inicie sesión en `ilmnadmin`.

6. Seleccione el menú del software de control y, a continuación, seleccione **DRAGEN**.
7. En la sección Genome (Genoma), seleccione **View Installed Genomes** (Ver genomas instalados) para ver una lista de todos los genomas personalizados de Illumina que están instalados actualmente.
8. Cierre el modal.
9. Seleccione **Choose** (Elegir) en Import New Reference Genomes (Importar nuevos genomas de referencia), acceda al archivo del genoma de referencia (*.tar.gz) en la unidad portátil o unidad de red montada y, a continuación, seleccione **Open** (Abrir).
10. Seleccione **Import** (Importar).

Import Noise Baseline Files (Importar archivos de referencia de ruido)

En caso de usar el flujo de trabajo de DRAGEN Enrichment en modo somático, puede usar un archivo de referencia de ruido para filtrar ruido de secuenciación o del sistema. Puede descargar archivos de ruido personalizados estándar del [Sitio de asistencia de Illumina](#) o crear un archivo de referencia de ruido personalizado.

Generar un archivo de referencia de ruido personalizado

En caso de usar el modo somático, puede generar un archivo de referencia de ruido personalizado. El archivo de referencia de ruido se hace con muestras normales que no coinciden con el sujeto del que proceden las muestras. El número de muestras normales recomendado es 50.

Para generar un archivo de referencia de ruido personalizado, utilice uno de los siguientes métodos:

- Utilice el servidor de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT. Consulte *la Online Help* (Asistencia en línea) de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT para consultar las instrucciones.
- Utilice la aplicación DRAGEN Baseline Builder (Creador de referencias DRAGEN) en BaseSpace Sequence Hub. Utilice el proceso Conversión de BCL en la configuración del experimento del instrumento BaseSpace Sequence Hub para generar archivos FASTQ. Una vez finalizado el experimento de secuenciación y estén disponibles 50 muestras, introduzca los archivos FASTQ en la aplicación DRAGEN Baseline Builder (Creador de referencias DRAGEN).

Importación de archivos de referencia mediante la interfaz de usuario

Después de importar el archivo de referencia, puede configurar su experimento de secuenciación usando el flujo de trabajo de DRAGEN Enrichment en modo somático.

1. Descargue un archivo de referencia estándar del [Sitio de asistencia de Illumina](#), o descargue el archivo de referencia personalizado del servidor de DRAGEN o de la aplicación DRAGEN Baseline Builder (Creador de referencias DRAGEN).

2. En el menú del software de control, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicación).
3. Inicie sesión como administrador.
4. Seleccione **Applications** (Aplicaciones) y, a continuación, seleccione **Favorites** (Favoritos).
5. Seleccione **+Other Locations** (+Otras ubicaciones) y, a continuación, seleccione **Computer** (Ordenador).
6. Haga doble clic en **usr** (usuario) y, a continuación, en **local** (local).
7. Haga doble clic en **illumina** y, a continuación, en **aux_files** (archivos auxiliares).
8. Arrastre el archivo de referencia de ruido hasta **aux_files** (archivos auxiliares).

Importación de archivos de referencia a través del terminal

Después de importar el archivo de referencia, puede configurar su experimento de secuenciación usando el flujo de trabajo de DRAGEN Enrichment en modo somático.

1. Descargue un archivo de referencia estándar del [Sitio de asistencia de Illumina](#), o descargue el archivo de referencia personalizado del servidor de DRAGEN o de la aplicación DRAGEN Baseline Builder (Creador de referencias DRAGEN).
2. En el menú del software de control, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicación).
3. Inicie sesión como administrador.
4. Seleccione **Applications** (Aplicaciones).
5. En Favorites (Favoritos), seleccione **Terminal**.
6. Introduzca el siguiente comando.

```
cp [/path/to/baselinefile] /usr/local/illumina/aux_files
```

Configuración del modo de experimento

El modo de experimento se aplica a todos los experimentos y determina dónde introducir los parámetros del experimento y cómo analizar los datos.

Modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido)

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Seleccione **Online Run Setup** (Configuración del experimento en línea) en BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Servicios de BaseSpace Sequence Hub y asistencia de Proactive).
3. Configure otros ajustes como proceda seleccionando lo siguiente:
 - a. **Proactive, and Run Monitoring** (Proactive y supervisión del experimento) o **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Supervisión del experimento y Almacenamiento).
 - b. Menú desplegable de **Hosting Location** (Ubicación de alojamiento).
 - c. **[Opcional]** Escriba un **Private Domain Name** (Nombre de dominio privado).

4. Seleccione **Save** (Guardar).

Modo Local o Standalone (Independiente)

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Seleccione **Local Run Setup** (Configuración del experimento local) en BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Servicios de BaseSpace Sequence Hub y asistencia de Proactive).
3. Configure otros ajustes como proceda seleccionando lo siguiente:
 - a. **Proactive Support Only** (Solo asistencia de Proactive), **Proactive and Run Monitoring** (Proactive y supervisión del experimento), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Supervisión del experimento y Almacenamiento) o **None** (Ninguno).



BaseSpace Sequence Hub solo permitirá la funcionalidad de volver a poner en cola si se selecciona **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Supervisión del experimento y Almacenamiento). Si la hoja de muestras no es válida, esto le permite corregirla y volver a poner en cola el análisis de demultiplexado. Para obtener información sobre la funcionalidad de volver a poner en cola en el instrumento, consulte [Volver a poner en cola un experimento en la página 88](#).

- b. Menú desplegable de **Hosting Location** (Ubicación de alojamiento).
 - c. **[Opcional]** Escriba un **Private Domain Name** (Nombre de dominio privado).
4. Seleccione **Save** (Guardar).

Consideraciones de la hoja de muestras para el modo Local o Standalone (Independiente)

Debe utilizar el formato de archivo v2 de hoja de muestras para analizar con DRAGEN. El formato de archivo v2 de hoja de muestras también es compatible con las aplicaciones de BaseSpace Sequence Hub que no están habilitadas para DRAGEN. Para obtener información sobre la creación de una hoja de muestras con el formato de archivo v2, consulte [Configuración de la hoja de muestras v2 en la página 92](#).

Personalización del instrumento

Esta sección incluye información sobre la configuración de los ajustes de personalización disponibles. Para establecer una carpeta de resultados predeterminada, consulte [Especificación de la ubicación de la carpeta de resultados predeterminada en la página 15](#).

Asignar nombre al instrumento

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Seleccione Instrument Nickname (Sobrenombre del instrumento) e introduzca el nombre de instrumento deseado.

El nombre aparecerá en la parte superior de cada pantalla.

3. Seleccione **Save** (Guardar).

Configurar las preferencias de desnaturalización y dilución

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Seleccione si quiere realizar automáticamente la desnaturalización y dilución de bibliotecas en el instrumento. La configuración predeterminada es la opción que había seleccionado en el experimento anterior.
 - Para desnaturalizar y diluir automáticamente las bibliotecas en el instrumento, seleccione la casilla de verificación **Denature and Dilute On Board** (Desnaturalización y dilución en el instrumento).
 - Para desnaturalizar y diluir manualmente las bibliotecas, anule la selección de la casilla de verificación **Denature and Dilute On Board** (Desnaturalización y dilución en el instrumento). Consulte la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139235)* para obtener instrucciones sobre la desnaturalización y la dilución manual de bibliotecas.

Establecer la preferencia de purgado automático de reactivos

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Elija si el sistema debe purgar automáticamente los reactivos no utilizados del compartimento de reactivos agotados después de cada experimento para agilizar la eliminación de residuos de reactivos una vez finalizado el experimento:
 - Para purgar automáticamente, seleccione la casilla de verificación **Purge Reagent Cartridge** (Purgar cartucho de reactivo).
 - Para omitir la purga automática, anule la selección de la casilla de verificación **Purge Reagent Cartridge** (Purgar cartucho de reactivo), que es la configuración predeterminada.

La purga de reactivos no utilizados añade hasta 2 horas al flujo de trabajo.

3. Seleccione **Save** (Guardar).

Configurar actualizaciones de software

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Seleccione si desea que el sistema compruebe automáticamente la existencia de actualizaciones de software:
 - Para que el sistema lo compruebe automáticamente, seleccione la casilla de verificación **Autocheck for software updates** (Comprobar automáticamente las actualizaciones de software).
 - Para comprobar las actualizaciones manualmente, anule la selección de la casilla de verificación **Autocheck for software updates** (Comprobar automáticamente las actualizaciones de software).

La búsqueda automática de actualizaciones de software requiere conexión a Internet. Para obtener más información sobre la instalación de actualizaciones del software, consulte [Actualizaciones de software en la página 80](#) (Actualizaciones del software).
3. Seleccione **Save** (Guardar).

Cambio el brillo de la pantalla LCD

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Mueva el deslizador de control del brillo de la pantalla LCD hasta el porcentaje que desee.
3. Seleccione **Save** (Guardar).

Configuración de un servidor Proxy

El servidor Proxy solo está disponible en el software de control NextSeq 1000/2000 v1.3.

1. En el menú del software de control, seleccione **Settings** (Configuración).
2. Seleccione la configuración actual del Proxy para abrir la pantalla Proxy Settings (Configuración del Proxy).
3. Seleccione la casilla de verificación **Enable Proxy** (Habilitar Proxy) y, a continuación, escriba la dirección del puerto IP del servidor.
4. **[Opcional]** Si el servidor Proxy solicita autenticación, seleccione la casilla de verificación **Requires Username and Password** (Solicita nombre de usuario y contraseña) y, a continuación, escriba el nombre de usuario y la contraseña.
5. Seleccione **Save** (Guardar) para guardar y validar la información del Proxy.
6. Seleccione una de las siguientes opciones:
 - Seleccione **Yes, I'm Finished** (Sí, he acabado) para restablecer el sistema y aplique la nueva configuración del Proxy.

- Seleccione **No, Take Me Back** (No, deseo regresar) para volver a la pantalla Settings (Configuración). Se ha guardado la nueva configuración del Proxy, pero esta no se aplicará hasta que haya reiniciado el sistema.

Consumibles y equipos

Esta sección enumera todo lo que incluye el kit de reactivos con condiciones de almacenamiento. Asimismo, puede ver qué consumibles y equipos auxiliares debe comprar para llevar a cabo el protocolo, así como realizar procedimientos de mantenimiento y solución de problemas.

Consumibles de secuenciación

La secuenciación en NextSeq 1000/2000 requiere un kit de reactivos P2 de NextSeq 1000/2000 de Illumina de un solo uso o un kit de reactivos P3 de NextSeq 1000/2000 de Illumina. El kit de reactivos P2 de NextSeq 1000/2000 de Illumina está disponible en tres tamaños (100 ciclos, 200 ciclos y 300 ciclos) y el kit de reactivos P3 de NextSeq 1000/2000 de Illumina está disponible en cuatro tamaños (50 ciclos, 100 ciclos, 200 ciclos y 300 ciclos).

El sistema de secuenciación NextSeq 1000 solo es compatible con los kit de reactivos P2 de NextSeq 1000/2000 de Illumina.

El kit de reactivo proporciona el cartucho y la celda de flujo para la secuenciación. Cuando reciba el kit de reactivos P2 de NextSeq 1000/2000 o el kit de reactivos P3 de NextSeq 1000/2000 de Illumina:

- Almacene rápidamente los componentes a las temperaturas indicadas para garantizar un rendimiento adecuado.
- No abra las bolsas de aluminio plateadas hasta que se le indique.
- Almacene los cartuchos en su caja para evitar que se rasgue o se perforo el envase.
- Almacene los cartuchos con las etiquetas orientadas hacia arriba.

 Si la etiqueta del cartucho no está orientada hacia arriba, los datos de secuenciación se verán afectados de manera negativa.

Tabla 2 Componentes del kit

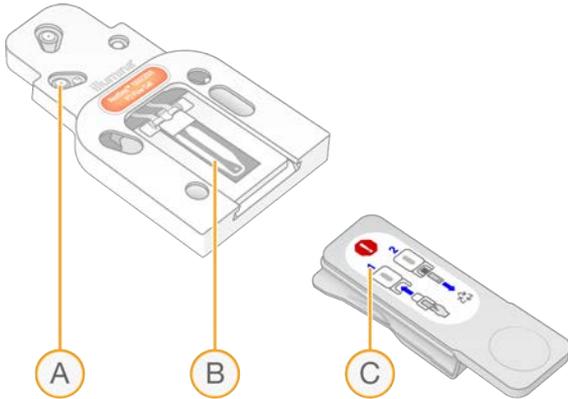
Consumible	Cantidad	Temperatura de almacenamiento	Dimensiones
Cartucho	1	Entre -25 °C y -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 in × 7 in × 5 in)
Celda de flujo	1	Entre 2 °C y 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 in × 5 in × 0,75 in)
RSB con Tween 20	1	Entre -25 °C y -15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm (1,6 in x 2,6 in x 2 in)

* Se envía a temperatura ambiente.

Ambos consumibles tienen identificadores para su seguimiento y para garantizar la compatibilidad. El cartucho y la celda de flujo utilizan RFID¹.

Celda de flujo

La celda de flujo es una celda de flujo con un único carril en tramas. Un cartucho de plástico alberga la celda de flujo basada en vidrio. Una pestaña gris sobresale de la celda de flujo para garantizar que se manipula de forma segura.



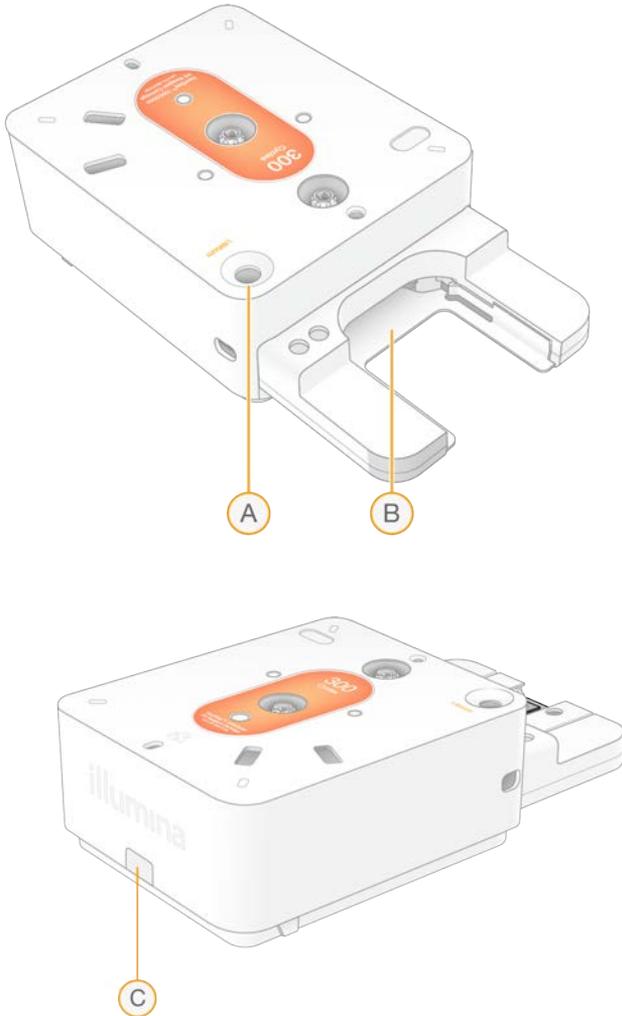
- A. Cartucho de plástico
- B. Celda de flujo
- C. Pestaña gris

Millones de nanopocillos cubren la superficie interior de la celda de flujo. Los grupos se generan en los nanopocillos desde los cuales se lleva a cabo posteriormente la reacción de secuenciación. La disposición en trama de los nanopocillos aumenta los datos y las lecturas de resultados.

¹Identificación por radiofrecuencia

Cartucho

El cartucho de reactivo de secuenciación viene precargado con reactivos de agrupación, secuenciación, paired-end y de indexado. El depósito con cierre metálico está reservado para las bibliotecas y dispone de una ranura en la parte frontal para la celda de flujo.



- A. Depósito de bibliotecas
- B. Ranura de la celda de flujo
- C. Tapón de drenaje

El cartucho contiene todos los consumibles necesarios para un experimento: reactivos, biblioteca y celda de flujo. La biblioteca y la celda de flujo se cargan en el cartucho descongelado, que posteriormente se carga en el instrumento. Una vez iniciado el experimento, los reactivos y la biblioteca se transfieren de forma automática del cartucho a la celda de flujo.

El cartucho contiene bombas, válvulas y toda la fluídica del sistema, incluso un depósito en la parte inferior para recoger los reactivos usados. El cartucho se desecha después de realizar un experimento, por lo que no es necesario lavar el instrumento.

Número de ciclos admitido

La etiqueta del cartucho indica el número de ciclos que se analizan, no el número de ciclos que se llevan a cabo. La celda de flujo es compatible con cualquier número de ciclos y cualquier tipo de lectura.

Los cartuchos de 100 ciclos y 200 ciclos incluyen 38 ciclos adicionales. El cartucho de 300 ciclos incluye 27 ciclos adicionales. Por ejemplo, el cartucho de 300 ciclos proporciona reactivos suficientes para hasta 327 ciclos de secuenciación. Para obtener más información sobre el número de ciclos a secuenciar, consulte [Número de ciclos de una lectura en la página 33](#).

Descripción de símbolos

La siguiente tabla describe los símbolos que aparecen en los consumibles o el embalaje de los consumibles.

Símbolo	Descripción
	La fecha en que caduca el consumible. Para unos resultados óptimos, utilice el consumible antes de esta fecha.
	Indica el fabricante (Illumina).
	El uso previsto es Solo para uso en investigaciones.
	Indica el número de referencia para poder identificar el consumible. ¹

Símbolo	Descripción
	Indica el código de lote para identificar el lote en que se fabricó el consumible. ¹
	Indica un peligro para la salud.
	Rango de temperatura de almacenamiento en grados Celsius. Almacene el consumible dentro del rango indicado. ²

Consumibles auxiliares

Compre los siguientes consumibles para la secuenciación y el mantenimiento.

Consumibles para secuenciación

Tabla 3 Consumibles para secuenciación

Consumible	Proveedor	Finalidad
Guantes desechables sin talco	Proveedor de laboratorio general	Uso general.
Kit de reactivos P2 (v3) de NextSeq 1000/2000	Illumina: n.º de catálogo 20046811 (100 ciclos) n.º de catálogo 20046812 (200 ciclos) n.º de catálogo 20046813 (300 ciclos)	Proporciona el cartucho de reactivo, la celda de flujo y NextSeq 1000/2000 RSB con Tween 20 para un único experimento. Compatible con NextSeq 1000 y NextSeq 2000.

Consumible	Proveedor	Finalidad
Kit de reactivos P3 de NextSeq 2000	Illumina: n.º de catálogo 20046810 (50 ciclos) n.º de catálogo 20040559 (100 ciclos) n.º de catálogo 20040560 (200 ciclos) n.º de catálogo 20040561 (300 ciclos)	Proporciona el cartucho de reactivo, la celda de flujo y NextSeq 1000/2000 RSB con Tween 20 para un único experimento. Solo compatible con NextSeq 2000.
Microtubos, 1,5 ml	Tubos de baja adherencia de Fisher Scientific, n.º de catálogo 14-222-158 (o equivalente)	Dilución de bibliotecas para la concentración de carga.
Puntas de pipeta (10 µl)	Proveedor de laboratorio general	Dilución de bibliotecas.
Puntas de pipeta (20 µl)	Proveedor de laboratorio general	Dilución y carga de bibliotecas.
Puntas de pipeta (200 µl)	Proveedor de laboratorio general	Dilución de bibliotecas.
Puntas de pipeta (1000 µl)	Proveedor de laboratorio general	Perforación del envase metálico del depósito de la biblioteca.
[Opcional] Control PhiX v3	Illumina, n.º de catálogo FC-110-3001	Realización de un experimento solo de PhiX o una adición en un control PhiX.
[Opcional] Papel absorbente	Proveedor de laboratorio general	Secado del cartucho tras un baño de agua.

Consumibles para el mantenimiento

Tabla 4 Consumibles para el mantenimiento

Consumible	Proveedor	Finalidad
Guantes desechables sin talco	Proveedor de laboratorio general	Uso general.
Sustitución del filtro de aire de NextSeq 1000/2000*	Illumina, n.º de catálogo 20029759	Sustitución del filtro de aire cada seis meses.

* El instrumento incluye un componente montado de serie y otro de repuesto. Si no está en periodo de garantía, los repuestos los debe suministrar el usuario. Conserve los componentes en el envase hasta que los utilice.

Equipo auxiliar

Compre el siguiente equipo con fines de secuenciación.

Elemento	Proveedor	Finalidad
Congelador, entre -25 °C y -15 °C	Proveedor de laboratorio general	Almacenamiento del cartucho.
Hielera	Proveedor de laboratorio general	Reserva de las bibliotecas hasta la secuenciación.
Pipeta (10 µl)	Proveedor de laboratorio general	Dilución de bibliotecas para la concentración de carga.
Pipeta (20 µl)	Proveedor de laboratorio general	Dilución de bibliotecas para la concentración de carga y carga de las bibliotecas en el cartucho.
Pipeta (200 µl)	Proveedor de laboratorio general	Dilución de bibliotecas para la concentración de carga.
Refrigerador, entre 2 °C y 8 °C	Proveedor de laboratorio general	Almacenamiento de la celda de flujo o descongelación del cartucho.
[Opcional] Uno de los siguientes baños de agua con control de temperatura o el equivalente que puede aguantar a 25 °C:		Descongelación del cartucho.
<ul style="list-style-type: none"> Baño de agua circulante de 35 l Thermo Scientific Precision (alberga 5 cartuchos simultáneamente) Baño de agua circulante digital de 22 l SHEL LAB (alberga 3 cartuchos simultáneamente) 	<ul style="list-style-type: none"> Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo TSCIR 35 Shel Lab, n.º de catálogo SWBC22 	

Protocolo

Esta sección ofrece instrucciones paso a paso sobre cómo preparar consumibles, diluir bibliotecas y configurar un experimento de secuenciación en uno de los cuatro modos de experimento (los modos Cloud [Nube], Hybrid [Híbrido] y Local utilizan DRAGEN o BaseSpace Sequence Hub, mientras que el modo Standalone [Independiente] es un experimento independiente para generar datos cBCL solo para flujos de trabajo de análisis personalizado).

Cuando manipule reactivos y otras sustancias químicas, utilice gafas de seguridad, una bata de laboratorio y guantes sin talco.

Asegúrese de que cuenta con el equipo y los consumibles necesarios antes de iniciar un protocolo. Consulte [Consumibles y equipos en la página 25](#).

Siga los protocolos en el orden mostrado, con los volúmenes, las temperaturas y las duraciones que se especifiquen.

Consideraciones de secuenciación

Antes de iniciar el protocolo, revise la siguiente información para preparar la dilución de las bibliotecas y la configuración del experimento. Alcanzar la concentración de carga óptima es fundamental para una secuenciación y un análisis correctos. Introducir el número correcto de ciclos en una lectura ayuda a garantizar un rendimiento de datos óptimo.

Concentraciones y volumen de carga

El volumen de carga es de 20 µl. La concentración de carga varía en función del tipo de biblioteca:

Tipo de biblioteca	Concentración de carga (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000
Illumina Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1000
100 % PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200

Tipo de biblioteca	Concentración de carga (pM)
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

En el caso de otros tipos de biblioteca, se recomienda una concentración de carga inicial de 650 pM. Optimice esta concentración en los experimentos subsiguientes para identificar una concentración de carga que produzca, de manera uniforme, datos que cumplan con las especificaciones.

i Para optimizar la concentración de carga, utilice el criterio de medición % Loading Concentration (% de concentración de carga) en el archivo de resultados `PrimaryAnalysisMetrics.csv` que está disponible una vez terminado el experimento. Si el porcentaje de concentración de carga es inferior al 95 %, aumente la concentración en incrementos de 100 pM en los experimentos posteriores.

Número de ciclos de una lectura

Para cada lectura, introducir un mínimo de 26 ciclos y un máximo de 151 ciclos ayudará a garantizar unos datos de calidad. El número exacto de ciclos dependerá del experimento. NextSeq 1000/2000 Control Software requiere al menos 1 ciclo para la Lectura 1, pero muestra una advertencia si el número de ciclos de la Lectura 1 es inferior a 26.

El número total de ciclos de la Lectura 1, el Índice 1, el Índice 2 y la Lectura 2 no puede ser superior al número de ciclos admitido por el kit más 38 ciclos para los kits de 100 ciclos y 200 ciclos, y más 27 ciclos para los kits de 300 ciclos de P3. NextSeq 1000/2000 Control Software mostrará una advertencia cuando el Índice 1 y el Índice 2 tengan menos de 6 ciclos. La advertencia no se mostrará si el Índice 1 o el Índice 2 tienen 0 ciclos.

En los números de ciclo mínimo y máximo se incluye un ciclo adicional. Añada siempre un ciclo a la longitud de lectura deseada para corregir los efectos de hebra retrasada y hebra adelantada. La longitud de lectura es el número de ciclos de *secuenciación* en la Lectura 1 y la Lectura 2, la cual excluye los ciclos adicionales y los ciclos de índices. Para obtener más información, consulte Corrección de hebra retrasada en [Flujo de trabajo de análisis en tiempo real en la página 61](#).

Ejemplo de configuración de experimento:

- Para una longitud de lectura de 35 ciclos (lectura individual), introduzca **36** en el campo Read 1 (Lectura 1).
- Para una longitud de lectura de 150 ciclos por lectura ("paired-end"), introduzca **151** en el campo Read 1 (Lectura 1) y **151** en el campo Read 2 (Lectura 2).

Planificación de un experimento de secuenciación en BaseSpace Sequence Hub

Utilice Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub para crear y configurar los ajustes de su experimento. Si está configurando un experimento en modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido), envíe la configuración del experimento a la lista de experimentos planificados de su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, en la pestaña Planned Runs (Experimentos planificados) en la que se incluyen los experimentos disponibles para ser secuenciados en los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Si está configurando un experimento en modo Local, utilice Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) para crear y exportar su hoja de muestras en formato de archivo v2. O bien, consulte [Configuración de la hoja de muestras v2 en la página 92](#) para crear una hoja de muestras sin BaseSpace Sequence Hub utilizando una plantilla proporcionada.

La configuración del experimento en el instrumento en BaseSpace Sequence Hub no permite más de 1536 muestras.

Configuración de experimentos

1. Navegue hasta BaseSpace Sequence Hub.
2. Introduzca su dirección de correo electrónico y la contraseña de BaseSpace Sequence Hub y, a continuación, seleccione **Sign In** (Iniciar sesión).
3. Seleccione la ficha **Runs** (Experimentos), y luego seleccione el desplegable **New Run** (Nuevo experimento).
4. Seleccione **NextSeq 1000/2000**.
5. En el campo Run Name (Nombre del experimento), introduzca un nombre único de su preferencia para identificar el experimento actual.
El nombre del experimento puede contener un máximo de 225 caracteres alfanuméricos, espacios, guiones y guiones bajos.
6. Seleccione una de las siguientes ubicaciones de análisis.
 - **BaseSpace**: analice los datos de secuenciación en la nube.
 - **Local**: analice los datos de secuenciación integrados en el instrumento o genere una hoja de muestras v2 para el modo Local o Hybrid (híbrido).
7. Seleccione un tipo de análisis y la versión.
Para obtener más información sobre los análisis secundarios, consulte [Archivos de resultados del análisis secundario de DRAGEN en la página 66](#) o la documentación de la aplicación de BaseSpace Sequence Hub. Si selecciona el análisis DRAGEN Single Cell RNA, consulte la página de archivos productos compatibles de NexSeq 1000/2000 para obtener información sobre la compatibilidad del kit de preparación de bibliotecas de ARN de células únicas de terceros.



Para el análisis integrado en el instrumento, la versión seleccionada debe coincidir con la versión de DRAGEN instalada en el instrumento. Para confirmar la versión de DRAGEN instalada en el instrumento, consulte [Actualizaciones de flujos de trabajo y licencias de DRAGEN en la página 82](#).

8. **[Opcional]** Configure los kits de índices personalizados de la siguiente manera.
Si está utilizando más de una biblioteca, todas ellas deben tener la misma longitud de lectura del índice.
 - a. Seleccione **Añadir kit de adaptador de índice personalizado** en el menú desplegable Index Adapter Kit (Kit de adaptador de índice).
 - b. Seleccione un tipo de plantilla e introduzca el nombre del kit, las secuencias del adaptador, las estrategias de indexado y las secuencias de índice.
Asegúrese de que las secuencias del adaptador del segundo índice (i5) estén en dirección de avance.
 - c. Seleccione **Create New Kit** (Crear nuevo kit).
 9. **[Opcional]** Configure el kit preparación de bibliotecas personalizado de la siguiente manera.
 - a. Seleccione **Add Custom Library Prep Kit** (Añadir kit de preparación de bibliotecas personalizado) en el menú desplegable Library Prep Kit (Kit de preparación de bibliotecas).
 - b. Introduzca el nombre, los tipos de lectura, los ciclos de lectura predeterminados y los kits de adaptadores de índices compatibles para su kit de preparación de bibliotecas personalizado.
 - c. Seleccione **Create New Kit** (Crear nuevo kit).
 10. Seleccione la siguiente configuración del instrumento. En función del kit de preparación de bibliotecas, las opciones recomendadas se seleccionan automáticamente. Algunos kits de preparación de bibliotecas tienen un número de lecturas de índices y de tipos de lectura codificado de forma rígida, que no se puede cambiar.
 - Kit de preparación de bibliotecas
 - Kit de adaptador de índice
 - Número de lecturas de índice
 - Tipo de lectura
 - Número de ciclos de secuenciación por lectura
-
- Si se selecciona Not Specified (No especificado), el número de lecturas de índice no se actualiza hasta que se introduzcan las secuencias del índice en la sección Sample Data (Datos de la muestra).
11. Introduzca la información de la muestra en la hoja de cálculo Sample Data (Datos de la muestra) utilizando una de las siguientes opciones. Para agrupar las muestras para la agregación de datos durante análisis sucesivos, asigne un nombre para el grupo en la columna Project (Proyecto).

- Seleccione **Import Data** (Importar datos) y, a continuación, seleccione su hoja de muestras. Asegúrese de que la hoja de muestras cumple con los requisitos de formato. Consulte [Configuración de la hoja de muestras v2 en la página 92](#). La alteración de la hoja de muestras tras la descarga inicial puede dar como resultado un error de análisis.
- Pegue los ID de muestra y las posiciones de pocillos de la placa de índices o los índices i7 e i5 directamente desde un archivo externo. Antes de pegarlos, introduzca el número de filas de muestra en el campo Rows (Filas) y, a continuación, seleccione **+**. Los ID de muestra pueden contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos, guiones y guiones bajos.
 - i** | Las placas de índices con una disposición fija requieren entradas para la posición de los pocillos. Las placas que no tienen una disposición fija requieren entradas para los índices i7 e i5. Los índices i5 deben introducirse en dirección de avance.
- Introduzca manualmente los ID de muestra y las posiciones o los índices de pocillos correspondientes. Si se selecciona Not Specified (No especificado) para el kit de preparación de bibliotecas, introduzca las secuencias del Índice 2 (i5) en dirección de avance.

12. Seleccione **Next** (Siguiente).

Configuración de un análisis secundario

Configure los ajustes para el tipo de análisis seleccionado para su experimento. Para obtener más información sobre los flujos de trabajo de análisis de DRAGEN, consulte [Archivos de resultados del análisis secundario de DRAGEN en la página 66](#)

Illumina DRAGEN BCL Convert

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis Illumina DRAGEN BCL Convert.

1. Introduzca los siguientes ajustes opcionales.

Ajuste	Descripción
AdapterRead1	Secuencia del adaptador para la Lectura 1. Si utiliza un kit de preparación de bibliotecas de Illumina, deje el campo AdapterRead1 vacío.
AdapterRead2	Secuencia del adaptador para la Lectura 2. Si utiliza un kit de preparación de bibliotecas de Illumina, deje el campo AdapterRead2 vacío.
BarcodeMismatchesIndex1	El número de incoherencias permitidas entre la primera lectura del índice y la secuencia de índice. El valor predeterminado es 1. Si un código de barras es de 6 pb, el valor recomendado es 0.

Ajuste	Descripción
BarcodeMismatchesIndex2	El número de incoherencias permitidas entre la segunda lectura del índice y la secuencia de índice. El valor predeterminado es 1. Si un código de barras es de 6 pb, el valor recomendado es 0.
OverrideCycles	<p>Cadena utilizada para especificar ciclos UMI y desenmascarar ciclos de una lectura. Se permiten los siguientes valores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N: especifica los ciclos a ignorar. • Y: especifica los ciclos de secuenciación. • I: especifica los ciclos de indexado. • U: especifica los ciclos UMI a recortar. <p>Cada elemento se separa con punto y coma. A continuación, tiene ejemplos de entradas de OverrideCycles.</p> <p>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</p>

2. Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.
3. Seleccione una de las opciones de formato de salida FASTQ siguientes:
 - **gzip**: guarda los archivos FASTQ en formato gzip.
 - **DRAGEN**: guarda los archivos FASTQ en formato ora.
4. Finalice la configuración del experimento.
 - Para enviar la configuración del experimento a su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Submit Run** (Enviar experimento). Los experimentos enviados a BaseSpace Sequence Hub aparecen en la lista de experimentos planificados y están disponibles para los sistemas utilizando el modo Cloud (Nube) o el modo Hybrid (Híbrido).
 - Para guardar la configuración del experimento como una hoja de muestras con formato de archivo v2, seleccione **Export Sample Sheet** (Exportar hoja de muestras) en la lista desplegable **Submit Run** (Enviar experimento). La hoja de muestras es necesaria para iniciar experimentos en los sistemas utilizando el modo Local. Esta opción solo está disponible si la ubicación del análisis seleccionada es Local.

Illumina DRAGEN Enrichment

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis Illumina DRAGEN Enrichment.

1. Seleccione un genoma de referencia.
Si es posible, utilice un genoma de referencia con ALT-Aware.

2. Seleccione un archivo *.bed que contenga las regiones a las que le gustaría dirigirse o cargue un nuevo archivo personalizado.
Asegúrese de que el genoma de referencia del archivo BED coincide con el seleccionado en el paso 1. Si se trata de un nuevo archivo BED personalizado, utilice la siguiente nomenclatura: `nombre_del_panel_númerodeversión.genomadereferencia.bed`.
 - **Modo Local:** seleccione **Select Custom File (Local)** (Seleccionar archivo personalizado [Local]) para cargar un único experimento o **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]) para un uso repetido.
 - **Modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido):** seleccione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]). El archivo BED personalizado solo está disponible en el grupo de trabajo en el que se ha cargado.
3. Seleccione el llamador de variantes germinales o somáticas.
4. **[Opcional]** Si utiliza el llamador de variantes somáticas, seleccione un archivo de referencia de ruido. Consulte [Import Noise Baseline Files \(Importar archivos de referencia de ruido\) en la página 19](#) para obtener más información.
5. Seleccione un formato de resultados de asignación o alineación.
6. Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.
7. Seleccione una de las opciones de formato de salida FASTQ siguientes:
 - **gzip:** guarda los archivos FASTQ en formato gzip.
 - **DRAGEN:** guarda los archivos FASTQ en formato ora.
8. Finalice la configuración del experimento.
 - Para enviar la configuración del experimento a su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Submit Run** (Enviar experimento). Los experimentos enviados a BaseSpace Sequence Hub aparecen en la lista de experimentos planificados y están disponibles para los sistemas utilizando el modo Cloud (Nube) o el modo Hybrid (Híbrido).
 - Para guardar la configuración del experimento como una hoja de muestras con formato de archivo v2, seleccione **Export Sample Sheet** (Exportar hoja de muestras) en la lista desplegable **Submit Run** (Enviar experimento). La hoja de muestras y los archivos de soporte del análisis secundario se descargan en una carpeta *.zip y son necesarios para iniciar experimentos en sistemas que utilizan el modo Local. Esta opción solo está disponible si la ubicación del análisis seleccionada es Local.

Illumina DRAGEN Germline

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis Illumina DRAGEN Germline.

1. Seleccione su genoma de referencia.
Si es posible, utilice un genoma de referencia con ALT-Aware.

2. Seleccione un formato de resultados de asignación o alineación.
3. Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.
4. Seleccione una de las opciones de formato de salida FASTQ siguientes:
 - **gzip**: guarda los archivos FASTQ en formato gzip.
 - **DRAGEN**: guarda los archivos FASTQ en formato ora.
5. Finalice la configuración del experimento.
 - Para enviar la configuración del experimento a su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Submit Run** (Enviar experimento). Los experimentos enviados a BaseSpace Sequence Hub aparecen en la lista de experimentos planificados y están disponibles para los sistemas utilizando el modo Cloud (Nube) o el modo Hybrid (Híbrido).
 - Para guardar la configuración del experimento como una hoja de muestras con formato de archivo v2, seleccione **Export Sample Sheet** (Exportar hoja de muestras) en la lista desplegable **Submit Run** (Enviar experimento). La hoja de muestras y los archivos de soporte del análisis secundario se descargan en una carpeta *.zip y son necesarios para iniciar experimentos en sistemas que utilizan el modo Local. Esta opción solo está disponible si la ubicación del análisis seleccionada es Local.

Illumina DRAGEN RNA

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis Illumina DRAGEN RNA.

1. Seleccione su genoma de referencia.
Si es posible, utilice un genoma de referencia sin ALT-Aware.
2. Seleccione su formato de resultados de asignación o alineación.
3. Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.
4. Seleccione una de las opciones de formato de salida FASTQ siguientes:
 - **gzip**: guarda los archivos FASTQ en formato gzip.
 - **DRAGEN**: guarda los archivos FASTQ en formato ora.
5. **[Opcional]** Cargue un archivo de anotación de ARN en Gene Transfer Format (Formato de transferencia de genes, GTF).
 - **Modo Local**: seleccione **Select Custom File (Local)** (Seleccionar archivo personalizado [Local]) para cargar un único experimento o **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]) para un uso repetido.
 - **Modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido)**: seleccione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]). El archivo GTF solo está disponible en el grupo de trabajo en el que se ha cargado.

Una vez que se haya cargado un archivo GTF en un grupo de trabajo de BaseSpace Sequence Hub, seleccione el archivo de anotación de ARN en el menú desplegable.

6. Seleccionar si desea habilitar la expresión diferencial.
7. En caso de habilitar la expresión diferencial, seleccione un valor de control o comparación para cada muestra.

En cada grupo de comparación, toda muestra marcada como control se compara con todas las muestras marcadas como comparación. En caso de que la muestra no contenga ningún valor de control o comparación, seleccione **na** como valor.

8. Finalice la configuración del experimento.
 - Para enviar la configuración del experimento a su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Submit Run** (Enviar experimento). Los experimentos enviados a BaseSpace Sequence Hub aparecen en la lista de experimentos planificados y están disponibles para los sistemas utilizando el modo Cloud (Nube) o el modo Hybrid (Híbrido).
 - Para guardar la configuración del experimento como una hoja de muestras con formato de archivo v2, seleccione **Export Sample Sheet** (Exportar hoja de muestras) en la lista desplegable **Submit Run** (Enviar experimento). La hoja de muestras y los archivos de soporte del análisis secundario se descargan en una carpeta *.zip si se ha proporcionado un archivo GTF opcional y son necesarios para iniciar experimentos en sistemas que utilizan el modo Local. Esta opción solo está disponible si la ubicación del análisis seleccionada es Local.

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis Illumina DRAGEN Single Cell RNA.

1. Seleccione su genoma de referencia.

Si es posible, utilice un genoma de referencia sin ALT-Aware.
2. **[Opcional]** Cargue un archivo de anotación de ARN en Gene Transfer Format (Formato de transferencia de genes, GTF).
 - **Modo Local:** seleccione **Select Custom File (Local)** (Seleccionar archivo personalizado [Local]) para cargar un único experimento o **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]) para un uso repetido.
 - **Modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido):** seleccione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]). El archivo GTF solo está disponible en el grupo de trabajo en el que se ha cargado.

Una vez que se haya cargado un archivo GTF en un grupo de trabajo de BaseSpace Sequence Hub, seleccione el archivo de anotación de ARN en el menú desplegable.

3. Seleccione su formato de resultados de asignación o alineación.
4. Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.

5. Seleccione una de las opciones de formato de salida FASTQ siguientes:
 - **gzip**: guarda los archivos FASTQ en formato gzip.
 - **DRAGEN**: guarda los archivos FASTQ en formato ora.
6. Seleccione la configuración idéntica a su tipo de kit de preparación de bibliotecas.
Por ejemplo, si ha seleccionado Single Cell RNA Library Kit 1 como kit de preparación de bibliotecas de ARN de células únicas, seleccione el tipo 1 en Configuration Type (Tipo de configuración).
7. Seleccione la lectura de código de barras.
8. **[Opcional]** Edite el número de bases en los códigos de barras y los identificadores moleculares exclusivos (UMI, unique molecular identifiers). Los valores se cumplimentan automáticamente en función del kit de preparación de bibliotecas y el tipo de configuración que haya seleccionado.
9. Seleccione la orientación de la cadena.
10. **[Opcional]** Seleccione un archivo que contenga sus secuencias de código de barras o cargue un nuevo archivo personalizado.
11. Si utiliza un tipo de configuración Advanced/Custom (Avanzada/personalizada), introduzca valores para el número de ciclos de anulación, la posición del código de barras y la posición de UMI.
12. Finalice la configuración del experimento.
 - Para enviar la configuración del experimento a su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Submit Run** (Enviar experimento). Los experimentos enviados a BaseSpace Sequence Hub aparecen en la lista de experimentos planificados y están disponibles para los sistemas utilizando el modo Cloud (Nube) o el modo Hybrid (Híbrido).
 - Para guardar la configuración del experimento como una hoja de muestras con formato de archivo v2, seleccione **Export Sample Sheet** (Exportar hoja de muestras) en la lista desplegable **Submit Run** (Enviar experimento). La hoja de muestras y los archivos de soporte del análisis secundario se descargan en una carpeta *.zip si se ha proporcionado un archivo GTF opcional y son necesarios para iniciar experimentos en sistemas que utilizan el modo Local. Esta opción solo está disponible si la ubicación del análisis seleccionada es Local.

Illumina DRAGEN Amplicon

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis Illumina DRAGEN Amplicon.

1. Seleccione su genoma de referencia.
2. Seleccione un archivo *.bed que contenga las regiones a las que le gustaría dirigirse o cargue un nuevo archivo personalizado.

Asegúrese de que el genoma de referencia del archivo BED coincide con el seleccionado en el paso

1. Si se trata de un nuevo archivo BED personalizado, utilice la siguiente nomenclatura: `nombre_del_panel_númerodeversión.genomadereferencia.bed`.

- **Modo Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido):** seleccione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]). El archivo BED personalizado solo está disponible en el grupo de trabajo en el que se ha cargado.
 - **Modo Local:** seleccione **Select Custom File (Local)** (Seleccionar archivo personalizado [Local]) para cargar un único experimento o **Upload Custom File (BaseSpace)** (Cargar archivo personalizado [BaseSpace]) para un uso repetido.
3. Seleccione el llamador de variantes germinales o somáticas.
 4. Seleccione su formato de resultados de asignación o alineación.
 5. **[Local]** Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.
 6. Seleccione si quiere guardar una copia de sus archivos FASTQ. Los archivos FASTQ solo se generan si selecciona la opción de conservarlos.
 7. Seleccione una de las opciones de formato de salida FASTQ siguientes:
 - **gzip:** guarda los archivos FASTQ en formato gzip.
 - **DRAGEN:** guarda los archivos FASTQ en formato ora.
 8. Finalice la configuración del experimento.
 - Para enviar la configuración del experimento a su cuenta de BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Submit Run** (Enviar experimento). Los experimentos enviados a BaseSpace Sequence Hub aparecen en la lista de experimentos planificados y están disponibles para los sistemas utilizando el modo Cloud (Nube) o el modo Hybrid (Híbrido).
 - **[Local]** Para guardar la configuración del experimento como una hoja de muestras con formato de archivo v2, seleccione **Export Sample Sheet** (Exportar hoja de muestras) en la lista desplegable **Submit Run** (Enviar experimento). La hoja de muestras y los archivos de soporte del análisis secundario se descargan en una carpeta *.zip y son necesarios para iniciar experimentos en sistemas que utilizan el modo Local. Esta opción solo está disponible si la ubicación del análisis seleccionada es Local.

Descongelación del cartucho en la bolsa y la celda de flujo

Este paso descongela el cartucho *en la bolsa sin abrir* y se prepara la celda de flujo. Descongele el cartucho dentro de la bolsa utilizando uno de estos tres métodos: en baños de agua controlados, en refrigerador o a temperatura ambiente. Utilice el cartucho inmediatamente tras descongelarlo, sin volver a congelarlo. Si no puede usar el cartucho de inmediato después de descongelarlo, consulte [Devolución de los consumibles a almacenamiento en la página 87](#).

Figura 4 Cartucho en la bolsa



Descongelación del cartucho en un baño de agua controlado

1. Póngase un par de guantes sin talco nuevos y saque el cartucho de donde esté almacenado.
2. Saque el cartucho de la caja, pero **no abra la bolsa de aluminio plateada**.

! Si se descongela una bolsa rota o perforada en un baño de agua, se puede producir un error de secuenciación. Descongele a temperatura ambiente o en un refrigerador.

3. Descongele el cartucho en la bolsa en un baño de agua con una temperatura controlada de 25 °C durante seis horas:

- Mantenga una profundidad de agua de al menos 9,5–10 cm, independientemente del número de cartuchos que esté descongelando.
- Ponga el baño de agua con control de temperatura a 25 °C.
- Coloque la bolsa con la etiqueta hacia arriba y métala en el baño de agua sin sumergirla.

! No intente empujar el cartucho para que se sumerja. Si la etiqueta de la bolsa no mira hacia arriba o el cartucho se invierte durante la descongelación, los datos de secuenciación se verán afectados de manera negativa.

- No supere las ocho horas en el baño de agua.
- No descongele más cartuchos al mismo tiempo de los que se puedan introducir en el baño de agua. Para conocer los baños de agua compatibles, consulte [Equipo auxiliar en la página 31](#).
- No apile los cartuchos.

4. Retire el cartucho del baño de agua y séquelo con papel absorbente.

Descongelación del cartucho en un refrigerador

1. Utilice un nuevo par de guantes sin talco.
2. Un día antes del experimento previsto, extraiga el cartucho almacenado a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Saque el cartucho de la caja, pero *no abra la bolsa de aluminio plateada*.
4. Coloque el cartucho a temperatura ambiente de forma que la etiqueta quede hacia arriba y el aire pueda circular por los lados y la parte superior.
 - ! Si la etiqueta de la bolsa no está orientada hacia arriba, los datos de secuenciación se verán afectados de manera negativa.
5. Descongele a temperatura ambiente durante seis horas.
6. Coloque el cartucho en un refrigerador entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ de forma que la etiqueta quede hacia arriba y el aire pueda circular por los lados.
 - ! Si la etiqueta de la bolsa no está orientada hacia arriba, los datos de secuenciación se verán afectados de manera negativa.
7. Descongele en el refrigerador durante 12 horas. No supere las 72 horas.

Descongelación del cartucho a temperatura ambiente

1. Utilice un nuevo par de guantes sin talco.
2. Extraiga el cartucho almacenado a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Saque el cartucho de la caja, pero *no abra la bolsa de aluminio plateada*.
4. Coloque el cartucho de forma que la etiqueta quede hacia arriba y el aire pueda circular por los lados y la parte superior.
 - ! Si la etiqueta de la bolsa no está orientada hacia arriba, los datos de secuenciación se verán afectados de manera negativa.
5. Descongele a temperatura ambiente durante nueve horas. No supere las 16 horas.

Preparación de la celda de flujo y del cartucho

1. Prepare la celda de flujo tal como se explica a continuación.
 - a. Extraiga una nueva celda de flujo de su almacenamiento a una temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - b. Aparte el paquete sin abrir a temperatura ambiente durante 10–15 minutos para evitar la condensación cuando saque la celda de flujo del paquete. Si se prepara ahora la celda de flujo, se asegurará de alcanzar la temperatura ambiente a tiempo.
2. Si se utiliza el método de descongelación del refrigerador:
 - a. Extraiga el cartucho descongelado almacenado a una temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- b. Aparte el cartucho sin abrir a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de la secuenciación. No supere una hora.

Dilución de bibliotecas

Si se utilizan la desnaturalización y la dilución en el instrumento, este paso diluye las bibliotecas hasta la concentración de carga aplicable. Un volumen adicional opcional del 2 % de PhiX¹ proporciona una diversidad de la base, un control positivo o criterios de medición adicionales. El porcentaje de volumen adicional de PhiX debe aumentarse para las bibliotecas con una diversidad de base menor.

Si la desnaturalización y la dilución de las bibliotecas se hacen manualmente, utilice la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139235)*. Este paso únicamente es de aplicación a la desnaturalización y la dilución en el instrumento.

Dilución de la biblioteca a 2 nM

1. [Opcional] Retire el control PhiX a 10 nM preparado del almacenamiento con unas temperaturas comprendidas entre -25 °C y -15 °C.
Solo se requiere PhiX para una adición opcional o si se va a realizar un experimento solo de PhiX.
2. [Opcional] Descongele el PhiX a temperatura ambiente durante cinco minutos y, a continuación, cuantifique utilizando un método basado en la fluorescencia, como Qubit, para confirmar la concentración de PhiX.
Si la cuantificación no es posible, siga con la concentración de 10 nM.
3. Agite en vórtice la biblioteca o el PhiX brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante un minuto.
4. Si usa el RSB con Tween 20 como diluyente, prepare al menos 24 µl de bibliotecas a 2 nM en un microtubo de baja unión.
Para ver las instrucciones de volumen adicional de PhiX, consulte [Adición de un control PhiX \(opcional\) en la página 47](#).
5. Agite en vórtice brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante un minuto.

¹PhiX es una pequeña librería de Illumina lista para su uso con una representación de nucleótidos equilibrada.

Dilución de la biblioteca a 2 nM para la concentración de carga

1. Combine los volúmenes siguientes en un microtubo de baja unión para preparar 24 µl de biblioteca diluida con la concentración de carga correspondiente:

Tipo de biblioteca*	Concentración de carga (pM)	Volumen de biblioteca a 2 nM (µl)	Volumen de RSB con Tween 20 (µl)
Ampliseq para Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100 % PhiX	650	7,8	16,2

* En el caso de los tipos de biblioteca que no se encuentren en la lista, comience con una concentración de carga de 650 pM y optimícela en experimentos posteriores.

En esta tabla, se proporcionan ejemplos de concentraciones de carga. El sistema NextSeq 1000/2000 es compatible con todos los kits de preparación de bibliotecas de Illumina, pero la concentración de carga óptima puede variar.

2. Agite en vórtice brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante un minuto.
3. Reserve la biblioteca diluida en hielo hasta que esté listo para la secuenciación. Secuencie las librerías diluidas a la concentración de carga el mismo día en que se diluyen.
4. Continúe del modo indicado a continuación.
 - Si va a añadir PhiX, consulte [Adición de un control PhiX \(opcional\) en la página 47](#).
 - Si no va a añadir PhiX o va a realizar un experimento solo de PhiX, consulte [Carga de consumibles en el cartucho en la página 47](#).

Adición de un control PhiX (opcional)

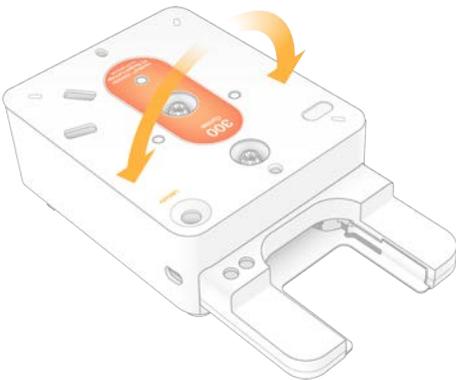
1. Combine los siguientes volúmenes en un microtubo de baja unión para preparar 20 μ l de PhiX a 1 nM:
 - PhiX a 10 nM (2 μ l)
 - RSB con Tween 20 (18 μ l)
2. Agite en vórtice brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 \times g durante un minuto.
3. Añada 1 μ l de PhiX a 1 nM a 24 μ l de biblioteca diluida con la concentración de carga final. Estos volúmenes producen un volumen adicional de PhiX de aproximadamente el 2 %. El porcentaje real varía en función de la calidad y la cantidad de la biblioteca.
4. Reserve la biblioteca con volumen adicional de PhiX en hielo hasta que esté listo para la secuenciación.
Secuencie las bibliotecas con volumen adicional de PhiX el mismo día en el que se diluyen.

Carga de consumibles en el cartucho

Este paso prepara el cartucho para la secuenciación mezclando los reactivos precargados y cargando las bibliotecas diluidas y la celda de flujo.

Preparación del cartucho

1. Abra la bolsa del cartucho rasgando o cortando con tijeras desde la muesca superior de uno de los lados.
2. Extraiga el cartucho de la bolsa. Deseche la bolsa y el desecante.
3. Invierta el cartucho 10 veces para mezclar los reactivos.
Los componentes internos pueden hacer ruido durante la inversión, pero es normal.



Carga de la celda de flujo

1. Abra el envase metálico plateado rasgando o cortando con tijeras desde la hendidura superior de uno de los lados.

Si no puede usar la celda de flujo de inmediato, consulte [Devolución de los consumibles a almacenamiento en la página 87](#).

2. Tire de la celda de flujo para extraerla del envase.

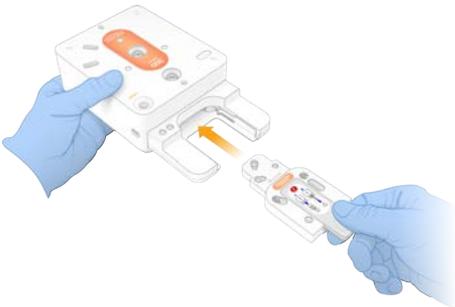
Aparte el envase metálico y el desecante por si tiene que volver a almacenar la celda de flujo. El desecante se encuentra en una bolsa en la parte inferior del envase metálico. Deséchelos cuando comience la secuenciación.



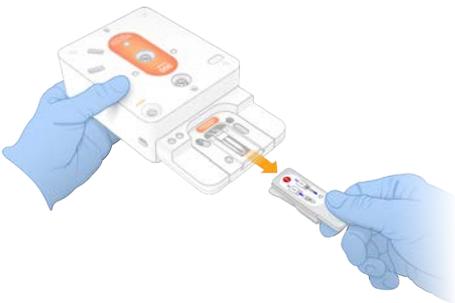
3. Sujete la celda de flujo por la pestaña gris con la etiqueta de la pestaña orientada hacia arriba.

4. Empuje para insertar la celda de flujo en la ranura de la parte delantera del cartucho.

Oirá un clic que indica que la celda de flujo está en su sitio. Una vez que esté debidamente cargada, la pestaña gris sobresale del cartucho.



5. Tire hacia afuera y retire la pestaña gris para exponer la celda de flujo. Recicle la pestaña.



Carga de bibliotecas

1. Con una nueva punta de pipeta P1000, perfore el depósito de bibliotecas y presione el cierre metálico hacia los extremos para agrandar el agujero.
2. Deseche la punta de pipeta para evitar la contaminación.

3. Añada 20 µl de biblioteca diluida a la parte *inferior* del depósito bajando poco a poco la punta de la pipeta hacia la parte inferior del depósito antes de dispensarlo. Evite tocar el cierre metálico.



Inicio de un experimento de secuenciación

Este paso inicia un experimento de secuenciación en uno de los cuatro modos:

- **Modo Cloud (Nube):** el experimento se selecciona de una lista de experimentos programados en NextSeq 1000/2000 Control Software. Durante la secuenciación, los datos de cBCL se cargan en BaseSpace Sequence Hub. Una vez finalizada la secuenciación, DRAGEN se inicia automáticamente en BaseSpace Sequence Hub.
 - **Modo Hybrid (Híbrido):** el experimento se selecciona de una lista de experimentos programados en NextSeq 1000/2000 Control Software. Tras finalizar la secuenciación, el análisis integrado en el instrumento se inicia automáticamente. Los datos cBCL y los archivos de resultados del análisis secundario de DRAGEN se almacenan en la carpeta de resultados seleccionada.
 - **Modo Local:** una hoja de muestras con el formato de archivo v2 se importa manualmente en NextSeq 1000/2000 Control Software. Tras finalizar la secuenciación, el análisis integrado en el instrumento se inicia automáticamente. Los datos cBCL y los archivos de resultados del análisis secundario de DRAGEN se almacenan en la carpeta de resultados seleccionada. Si se selecciona Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), el análisis también se puede iniciar mediante las aplicaciones de BaseSpace Sequence Hub una vez finalizada la secuenciación.
 - **Modo Standalone (Independiente):** configure un experimento, siguiendo las instrucciones de NextSeq 1000/2000 Control Software para generar los datos cBCL.
- ⚠ Si se abre el visor durante la comprobación previa al experimento o durante el experimento, se puede producir un error en el experimento.

-  Mantenga las manos alejadas del instrumento durante la apertura y cierre del visor para evitar lesiones.

Inicio de un experimento Cloud (Nube) o Hybrid (Híbrido)

1. Configure el modo de experimento, tal y como se describe en [Configuración del modo de experimento en la página 20](#).
2. Seleccione **Start** (Iniciar).
3. Introduzca sus credenciales de inicio de sesión de BaseSpace Sequence Hub y, a continuación, seleccione **Sign In** (Iniciar sesión).
4. Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), seleccione el grupo de trabajo que contiene el experimento creado en Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub.

-  Para evitar errores es necesario seleccionar un grupo de trabajo. Asegúrese de haber seleccionado un grupo de trabajo antes de continuar.

5. Seleccione **Next** (Siguiente).
6. Seleccione su experimento.
7. Confirme que la versión de Analysis (Análisis), Run Length (Longitud del experimento) y Secondary Analysis (Análisis secundario) coincida con el experimento correcto.
El análisis muestra Cloud_ para indicar que este se realiza en BaseSpace Sequence Hub.
8. Seleccione **Review** (Revisar).
9. **[Opcional]** Introduzca las ubicaciones de cebador de lectura personalizado y cebadores de índice personalizados.
Para obtener información sobre la preparación y la adición de cebadores personalizados, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139569)*. Asegúrese de visitar la página de Productos compatibles para su kit de preparación de bibliotecas para comprobar si es necesario utilizar los cebadores personalizados de Illumina.
10. **[Opcional]** Seleccione una fórmula personalizada. Para obtener más información, consulte [Secuenciación mediante ciclo sin etiquetar en la página 108](#) (Secuenciación de ciclo de oscuridad)
En caso de usar el software de control NextSeq 1000/2000 v1.3 y el kit Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus o el kit Illumina Stranded mRNA Prep, la fórmula personalizada se selecciona automáticamente.
11. **[Opcional]** Para desnaturalizar y diluir manualmente las bibliotecas, deshaga la selección de la casilla de verificación **Denature and Dilute On Board** (Desnaturalización y dilución en el instrumento). Consulte la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139235)*.
La selección predeterminada se configura en los ajustes del software de control NextSeq 1000/2000.

12. **[Opcional]** Para cambiar la carpeta de resultados, seleccione el campo Output Folder (Carpeta de resultados) e introduzca una nueva ubicación.
El campo Output Folder (Carpeta de resultados) se rellena automáticamente a partir de la configuración predeterminada y es obligatorio a menos que esté seleccionado **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento).
Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar en BaseSpace Sequence Hub) aparece como Enabled (Activado).
Si ha seleccionado Proactive and Run Monitoring (Proactivo y Supervisión del experimento), Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar en BaseSpace Sequence Hub) aparece como Disabled (Desactivado).
13. Revise la información del experimento y, a continuación, seleccione **Prep** (Preparar).

Inicio de un experimento Local

1. Configure el modo de experimento, tal y como se describe en [Configuración del modo de experimento en la página 20](#).
2. Seleccione **Start** (Iniciar).
3. Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), introduzca sus credenciales de inicio de sesión en BaseSpace Sequence Hub y, a continuación, seleccione **Sign In** (Iniciar sesión).
4. Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), seleccione el grupo de trabajo de BaseSpace Sequence Hub donde guardar su experimento y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

 Para evitar errores es necesario seleccionar un grupo de trabajo. Asegúrese de haber seleccionado un grupo de trabajo antes de continuar.

5. Seleccione **Choose...** (Elegir...) en Start With Sample Sheet (Iniciar con hoja de muestras) y acceda a la hoja de muestras con formato v2 del instrumento NextSeq 1000/2000, de la unidad portátil o de la unidad de red montada. Los nombres de archivo de las hojas de muestras no pueden incluir caracteres especiales.

El software de control del NextSeq 1000/2000 v1.3 detecta automáticamente la versión del DRAGEN de la hoja de muestras y le solicita cambiar de versión, si es preciso. La versión de DRAGEN debe instalarse en el sistema. Para obtener información sobre la instalación, consulte [Actualizaciones de software en la página 80](#) (Actualizaciones del software).

- **Instrument Run Setup Used** (Configuración del experimento usada en el instrumento): seleccione la carpeta *.zip que contiene la hoja de muestras v2 y los archivos correspondientes si procede. De lo contrario, seleccione la hoja de muestras v2.

- **Instrument Run Setup Not Used** (Configuración del experimento no usada en el instrumento): asegúrese de que el archivo correspondiente al análisis se encuentra en el mismo directorio que la hoja de muestras v2.

i | La hoja de muestras seleccionada debe tener el formato v2. Para crear una hoja de muestras v2, descargue la hoja de muestras generada desde Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub o edite la plantilla de hoja de muestras v2 que se ofrece en la página de asistencia de NextSeq 1000/2000. Consulte [Configuración de la hoja de muestras v2 en la página 92](#) para obtener más información sobre el formato y los requisitos de las hojas de muestras v2. Compruebe que todos los archivos a los que se hace referencia en la hoja de muestras se encuentran en la misma carpeta que la hoja de muestras.

6. Seleccione **Review** (Revisar).
7. **[Opcional]** Introduzca las ubicaciones de cebador de lectura personalizado y cebadores de índice personalizados.
Para obtener información sobre la preparación y la adición de cebadores personalizados, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139569)*. Asegúrese de visitar la página de Productos compatibles para su kit de preparación de bibliotecas para comprobar si es necesario utilizar los cebadores personalizados de Illumina.
8. **[Opcional]** Seleccione una fórmula personalizada. Para obtener más información, consulte [Secuenciación mediante ciclo sin etiquetar en la página 108](#) (Secuenciación de ciclo de oscuridad)
En caso de usar el software de control NextSeq 1000/2000 v1.3 y el kit Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus o el kit Illumina Stranded mRNA Prep, la fórmula personalizada se selecciona automáticamente.
9. **[Opcional]** Para desnaturalizar y diluir manualmente las bibliotecas, deshaga la selección de la casilla de verificación **Denature and Dilute On Board** (Desnaturalización y dilución en el instrumento). Consulte la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139235)*.
La selección predeterminada se configura en los ajustes del software de control NextSeq 1000/2000.
10. **[Opcional]** Para cambiar la carpeta de resultados, seleccione el campo Output Folder (Carpeta de resultados) e introduzca una nueva ubicación.
El campo Output Folder (Carpeta de resultados) se rellena automáticamente a partir de la configuración predeterminada y es obligatorio a menos que esté seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento).
Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar en BaseSpace Sequence Hub) aparecerá como Enabled (Activado).

Si ha seleccionado Proactive and Run Monitoring (Proactivo y Supervisión del experimento), Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar en BaseSpace Sequence Hub) aparece como Disabled (Desactivado).

11. Revise la información del experimento y, a continuación, seleccione **Prep** (Preparar).

Inicio de un experimento Standalone (Independiente)

1. Configure el modo de experimento, tal y como se describe en [Configuración del modo de experimento en la página 20](#).
2. Seleccione **Start** (Iniciar).
3. Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), introduzca sus credenciales de inicio de sesión en BaseSpace Sequence Hub y, a continuación, seleccione **Sign In** (Iniciar sesión).
4. Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), seleccione el grupo de trabajo de BaseSpace Sequence Hub donde guardar su experimento y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
5. Seleccione **Set Up New Run** (Configurar nuevo experimento).
6. En el campo Run Name (Nombre del experimento), introduzca un nombre único de su preferencia para identificar el experimento actual.
El nombre de experimento puede contener caracteres alfanuméricos, guiones medios, guiones y guiones bajos.
7. En Read Type (Tipo de lectura), seleccione el número de lecturas de secuenciación que se van a realizar:
 - **Single Read** (Lectura única): realice una lectura, que es la opción más sencilla y rápida.
 - **Paired-End**: realice dos lecturas, cuyo consenso genera datos de alta calidad y le ofrece una alineación más precisa.
8. Introduzca el número de ciclos realizados en cada lectura:
No hay un número máximo de ciclos de índice, pero la suma de los ciclos de lectura y de los de índice debe ser menor que el número de ciclos indicado en la etiqueta del cartucho más 27.

Read 1 (Lectura 1): introduzca un valor entre **1** y **151** ciclos.

Index 1 (Índice 1): introduzca el número de ciclos para el cebador del Índice 1 (i7). En el caso de un experimento solo de PhiX, introduzca **0** en ambos campos de índice.

Index 2 (Índice 2): introduzca el número de ciclos para el cebador del Índice 2 (i5).

Read 2 (Lectura 2): introduzca como máximo **151** ciclos. Este valor suele ser el mismo que el valor de Lectura 1.

9. Si ha seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento), seleccione **Choose...** (Elegir...) para importar una hoja de muestras.

El software de control del NextSeq 1000/2000 v1.3 detecta automáticamente la versión del DRAGEN de la hoja de muestras y le solicita cambiar de versión, si es preciso. La versión de DRAGEN debe instalarse en el sistema. Para obtener información sobre la instalación, consulte [Actualizaciones de software en la página 80](#) (Actualizaciones del software).

i | La hoja de muestras seleccionada debe tener el formato v2. Para crear una hoja de muestras v2, descargue la hoja de muestras generada desde Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub o edite la plantilla de hoja de muestras v2 que se ofrece en la página de asistencia de NextSeq 1000/2000. Consulte [Configuración de la hoja de muestras v2 en la página 92](#) para obtener más información sobre el formato y los requisitos de las hojas de muestras v2. Compruebe que todos los archivos a los que se hace referencia en la hoja de muestras se encuentran en la misma carpeta que la hoja de muestras.

10. **[Opcional]** Introduzca las ubicaciones de cebador de lectura personalizado y cebadores de índice personalizados.
Para obtener información sobre la preparación y la adición de cebadores personalizados, consulte la *Guía de cebadores personalizados de NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139569)*. Asegúrese de visitar la página de Productos compatibles para su kit de preparación de bibliotecas para comprobar si es necesario utilizar los cebadores personalizados de Illumina.
11. **[Opcional]** Seleccione una fórmula personalizada. Para obtener más información, consulte [Secuenciación mediante ciclo sin etiquetar en la página 108](#)
12. **[Opcional]** Para desnaturalizar y diluir manualmente las bibliotecas, deshaga la selección de la casilla de verificación **Denature and Dilute On Board** (Desnaturalización y dilución en el instrumento). Consulte la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NextSeq 1000 y 2000 (n.º de documento 1000000139235)*.
La selección predeterminada se configura en los ajustes del software de control NextSeq 1000/2000.
13. **[Opcional]** Para cambiar la carpeta de resultados, seleccione el campo Output Folder (Carpeta de resultados) e introduzca una nueva ubicación.
El campo Output Folder (Carpeta de resultados) se rellena automáticamente a partir de la configuración predeterminada y es obligatorio a menos que esté seleccionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento).
14. Seleccione **Prep** (Preparar).

Carga de los consumibles en el instrumento

1. Asegúrese de que el cartucho esté descongelado, y se haya invertido 10 veces para mezclarlo antes de la carga de la celda de flujo (con la pestaña gris quitada) y de la biblioteca diluida.
2. Seleccione **Load** (Cargar).
NextSeq 1000/2000 Control Software abre el visor y expulsa la bandeja.
3. Coloque el cartucho en la bandeja con la etiqueta orientada hacia arriba y la celda de flujo dentro del instrumento. Empuje el cartucho hasta que encaje en su sitio.



4. Seleccione **Close** (Cerrar) para retraer el cartucho y cerrar el visor.
NextSeq 1000/2000 Control Software muestra información de los consumibles escaneados tras tres minutos aprox.
5. [Opcional] Seleccione **Eject Cartridge** (Expulsar cartucho) para extraer el cartucho.
El visor se abre tras un minuto y expulsa el cartucho.
6. Seleccione **Sequence** (Secuenciar).

Comprobaciones previas al experimento

Las comprobaciones previas al experimento incluyen una comprobación del instrumento y una comprobación de la fluídica. La comprobación de la fluídica perfora los cierres del cartucho, lo que provocará que el instrumento emita 3-4 sonidos como de "pop". Es normal. Ahora el reactivo ha atravesado la celda de flujo.

! Los consumibles no se pueden reutilizar una vez que empieza la comprobación de la fluídica.

1. Espere unos 15 minutos a que finalicen las comprobaciones previas al experimento.
El experimento comienza de manera automática después de finalizar correctamente las comprobaciones.
2. Si se produce un error durante la comprobación del instrumento, seleccione **Retry** (Reintentar) para repetir la comprobación.

Cuando hay una comprobación en curso, aparece una animación de progreso en el círculo de dicha comprobación.

3. Para solucionar errores recurrentes, consulte [Resolución de mensajes de error en la página 86](#).

Supervisión del progreso del experimento

1. Supervise el progreso del experimento y las mediciones conforme aparecen en la pantalla Sequencing (Secuenciación).
 - **Estimated run completion** (Finalización de experimento estimada): la fecha y la hora aproximadas de finalización del experimento. La medición de finalización de experimento estimada requiere 10 experimentos anteriores para calcular de forma precisa el tiempo de finalización del experimento.
 - **Average %Q30** (Q30 del porcentaje medio): el porcentaje medio de llamadas de bases con una puntuación Q \geq 30.
 - **Projected Yield** (Rendimiento proyectado): el número esperado de bases llamadas para el experimento.
 - **Total Reads PF** (Total de lecturas PF): el número de grupos "paired-end" (en millones) que superan el filtro.
 - **Real Time Demux** (Demultiplexado en tiempo real): estado del demultiplexado cuando se inicia al comienzo de la Lectura 2 después de la finalización de los ciclos de Lectura 1, Índice 1 e Índice 2. El estado mostrado será Complete (Finalizado) aunque los ciclos de índice no se hayan realizado. No está disponible para los experimentos en el modo Cloud (Nube).
 - **Real Time Alignment** (Alineación en tiempo real): estado de la alineación de la Lectura 1 cuando se inicia al comienzo de la Lectura 2 después de la finalización de los ciclos de Lectura 1, Índice 1 e Índice 2. No está disponible para los experimentos en el modo Cloud (Nube).

Las mediciones Q30 y del rendimiento aparecen tras el ciclo 26 (seis horas aproximadamente tras iniciar el experimento).
2. Para supervisar procesos de experimentos, seleccione el menú del software de control y, a continuación, seleccione **Process Management** (Gestión del proceso).
3. Para cancelar un experimento, seleccione **End Run** (Finalizar experimento). Consulte [Cancelación de un experimento en la página 87](#) para obtener más información sobre la cancelación de experimentos.
4. Descargue los consumibles del instrumento. Retire el cartucho del instrumento en el plazo de 3 días.

Descarga de consumibles

1. Cuando finalice la secuenciación, seleccione **Eject Cartridge** (Expulsar cartucho). El software expulsa el cartucho utilizado del instrumento.
2. Retire el cartucho de la bandeja.

3. Extraiga la celda de flujo del cartucho.
4. Deseche la celda de flujo, que contiene componentes electrónicos, de acuerdo con la normativa vigente de su zona geográfica.
5. [Opcional] Retire el tapón de purga situado debajo del logotipo de Illumina en el lateral del cartucho; realice esta operación en un lugar adecuado (por ejemplo, un fregadero o un recipiente para residuos líquidos peligrosos) manteniendo el tapón de purga horizontal y mirando hacia abajo, alejado de su rostro. Drene los reactivos usados de acuerdo con la normativa vigente de su zona geográfica. El tiempo de drenaje depende del tamaño del cartucho si no se ha habilitado la purga automática de reactivos.

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

6. Deseche el cartucho de reactivo.
No es necesario realizar un lavado posterior al experimento porque los líquidos se desechan junto con el cartucho.
7. Seleccione **Close Door** (Cerrar puerta) para volver a cargar la bandeja y volver a la pantalla Home (Inicio).
El software vuelve a cargar de manera automática la bandeja y los sensores confirman la retirada del cartucho.

Limpie la bandeja del cartucho

Solo es necesario limpiar la bandeja del cartucho si el reactivo se ha derramado sobre dicha bandeja del cartucho.

1. Retire el cartucho del instrumento.
2. Póngase un nuevo par de guantes sin talco y cualquier otro equipo de protección individual que considere necesario.
3. Pulverice una solución del 10 % de lejía en un trapo.
4. Pase el trapo por la bandeja del cartucho y, a continuación, retire de inmediato la solución de lejía con un trapo de alta resistencia.
La lejía tiñe la bandeja del cartucho si no se limpia de inmediato.
5. Rocíe una solución de etanol al 70 % sobre la bandeja del cartucho y límpiela de inmediato con un paño resistente.
6. Vuelva a colocar la bandeja del cartucho en la posición de carga.

Resultados de secuenciación

En esta sección, se describe el software Real-Time Analysis, que realiza llamadas de bases, asigna puntuaciones de calidad y genera datos. Obtenga información sobre los diferentes tipos de archivo de resultados y dónde localizarlos tras un experimento.

Descripción general de Análisis en tiempo real

Los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000 utilizan RTA3, una implementación del software de análisis en tiempo real, en el motor informático del instrumento. RTA3 extrae las intensidades de las imágenes recibidas de la cámara, lleva a cabo una llamada de bases, asigna una puntuación de calidad a las llamadas de bases, se alinea con PhiX y genera informes de datos en archivos InterOp para su visualización en el software de control del instrumento.

Para optimizar el tiempo de procesamiento, RTA3 almacena información en memoria. Si se interrumpe RTA3, el procesamiento no se reanuda y se pierden los datos del experimento que se estén procesando en la memoria.

Entradas de RTA3

Para procesarlas, RTA3 necesita las imágenes de placas que se encuentran en la memoria local del sistema. RTA3 recibe información del experimento y comandos del software de control.

Resultados de RTA3

Las imágenes de cada canal de color se transfieren en memoria a RTA3 como placas. A partir de estas imágenes, RTA3 produce un conjunto de archivos de filtro y archivos de llamada de bases con puntuación de calidad. Todos los demás conjuntos admiten archivos de resultados.

Tipo de archivo	Descripción
Archivos de llamadas de bases	Cada placa que se analiza se incluye en un archivo de llamada de bases concatenado (*.cbcl). Las placas del mismo carril y superficie se agregan a un archivo *.cbcl para cada carril y superficie.
Archivos de filtro	Cada placa produce un archivo de filtro (*.filter) que especifica si un grupo pasa filtros.
Archivos de ubicación de grupos	Los archivos de ubicación de grupos (*.locs) contienen las coordenadas X e Y para cada grupo en una placa. Se genera un archivo de ubicación de grupos para cada experimento.

Los archivos de resultados se utilizan para los análisis sucesivos en DRAGEN y BaseSpace Sequence Hub.

Gestión de errores

RTA3 crea archivos de registro y los guarda en la carpeta de registros. Los errores se registran en un archivo de texto con formato *.log.

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

`info_00000.log` contiene un resumen de los eventos importantes del experimento.

`error_00000.log` enumera los errores que se han producido durante un experimento.

`warning_00000.log` enumera las advertencias que se hayan producido durante un experimento.

Placas de la celda de flujo

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo. La cámara toma una imagen de cada placa.

La celda de flujo P2 de NextSeq 1000/2000 tiene un total de 132 placas. La celda de flujo P3 de NextSeq 1000/2000 tiene un total de 264 placas.

Tabla 5 Placas de la celda de flujo

Componente de la celda de flujo	Celda de flujo P2 de NextSeq 1000/2000	Celda de flujo P3 de NextSeq 1000/2000	Descripción
Carriles	1	2	Los carriles son ópticamente distintos, pero no son canales separados flúidicamente.
Superficies	2	2	Las imágenes de las celdas de flujo P2 y P3 se adquieren en dos superficies: la superior y la inferior. En primer lugar, se adquieren imágenes de la superficie superior de una placa.
Sectores por carril	6	6	Un sector es una columna del carril de una celda de flujo.

Componente de la celda de flujo	Celda de flujo P2 de NextSeq 1000/2000	Celda de flujo P3 de NextSeq 1000/2000	Descripción
Placas por sector	11	11	Una placa es una porción de un sector y describe un área de la celda de flujo cuya imagen se ha adquirido.
Total de placas generadas	132	264	Carriles × superficies × sectores × placas por cada sector equivale al número total de placas.

Nomenclatura de placas

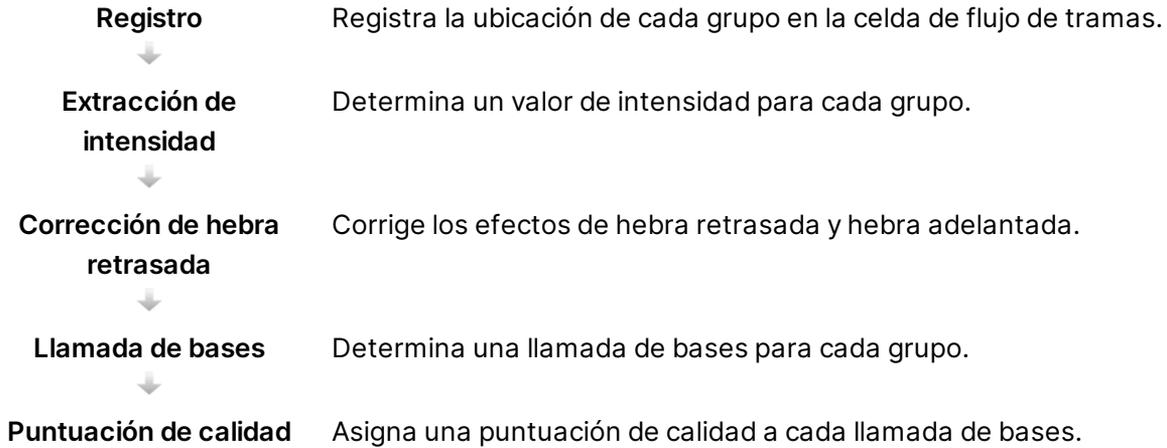
El nombre de la placa contiene un número de cuatro dígitos que representa la posición de la placa en la celda de flujo. Por ejemplo, el nombre de placa 1205 indica la superficie superior, el sector 2 y la placa 05.

El primer dígito representa la superficie: 1 para la parte superior o 2 para la inferior.

El segundo dígito representa el número de sector: 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Los dos últimos dígitos representan el número de placa. Para los números de sector del 1 al 4, la numeración comienza por 01 en el extremo de salida de la celda de flujo hasta 11 en el extremo de entrada. Para los números de sector del 5 al 6, la numeración comienza por 01 en el extremo de entrada y 11 en el extremo de salida.

Flujo de trabajo de análisis en tiempo real



Registro

El registro alinea una imagen con la matriz cuadrada girada de nanopocillos en la celda de flujo de tramas. Debido a la disposición ordenada de los nanopocillos, las coordenadas X e Y para cada grupo de una placa son predeterminadas. Las posiciones de los grupos se recopilan en un archivo de ubicación de grupos (s.locs) para cada experimento.

Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Utilice el Visor del análisis de secuenciación para identificar qué imágenes no se han podido registrar.

Extracción de intensidad

Tras el registro, la extracción de intensidad calcula un valor de intensidad para cada nanopocillo en una imagen determinada. Si el registro falla, no es posible extraer la intensidad para dicha placa.

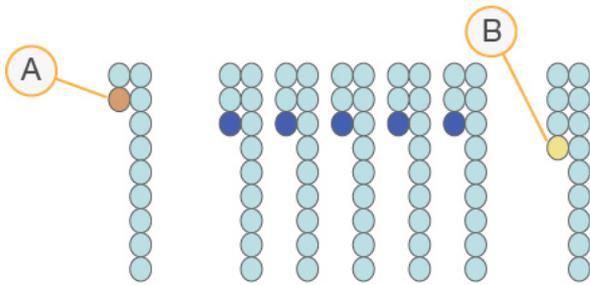
Corrección de hebra retrasada

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. Las hebras retrasadas y hebras adelantadas se producen cuando una cadena queda fuera de su lugar con respecto al ciclo de incorporación actual.

La hebra retrasada se produce cuando una base se atrasa.

La hebra adelantada se produce cuando una base se adelanta.

Figura 5 Hebra retrasada y hebra adelantada



- A. Lectura con una base con hebra retrasada
- B. Lectura con una base con hebra adelantada

RTA3 corrige los efectos de la hebra retrasada y adelantada, lo que aumenta al máximo la calidad de los datos en cada uno de los ciclos del experimento.

Llamada de bases

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. Los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000 utilizan secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos de cuatro bases de ADN, una del canal verde y una del canal azul.

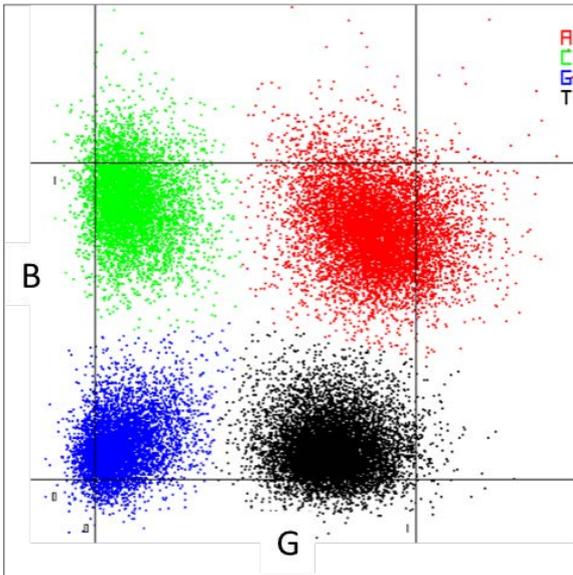
Una ausencia de llamada se identifica como N. La ausencia de llamadas se produce cuando un grupo no supera el filtro, el registro falla o se desplaza un grupo fuera de la imagen.

Las intensidades de cada grupo se extraen de la imagen verde y de la azul y se comparan una con otra, lo que produce cuatro poblaciones diferenciadas. Cada población se corresponde con una base. El proceso de llamada de bases determina a qué población pertenece cada grupo.

Tabla 6 Llamada de bases en secuenciación de dos canales

Base	Canal verde	Canal azul	Resultado
A	1 (presente)	1 (presente)	Los grupos que presentan intensidad en los canales verde y azul.
C	0 (ausente)	1 (presente)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal azul.
G	0 (ausente)	0 (ausente)	Grupos que no presentan intensidad en una ubicación de grupos conocida.
T	1 (presente)	0 (ausente)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal verde.

Figura 6 Visualización de intensidades de grupos



i El color de cada grupo se correlaciona con los diagramas porcentaje de bases en Sequence Analysis Viewer (SAV) y los datos del experimento de BaseSpace Sequence Hub por ciclo, no se correlacionan con los canales verde y azul.

Grupos que superan el filtro

Durante el experimento, RTA3 filtra incidencias para eliminar las lecturas que no satisfagan el umbral de calidad de los datos. Los grupos que se solapan o de baja calidad se eliminan.

En el caso del análisis de dos canales, RTA3 utiliza un sistema basado en la población para determinar la castidad (medición de pureza de la intensidad) de una llamada de bases. Los grupos que superan el filtro (PF) cuando solo una llamada de bases de los primeros 25 ciclos tiene un valor de castidad inferior al umbral fijado. Si se incluye, la alineación de PhiX se lleva a cabo en el ciclo 26 en un subconjunto de placas de grupos que superan el filtro. Los grupos que no superan el filtro no se alinean ni se realiza en ellos la llamada de bases.

Puntuaciones de calidad

Una puntuación de calidad (puntuación Q) es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que la llamada de bases tiene una calidad mayor y es más probable que sea correcta. Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en archivos de llamada de bases (*.cbcl).

La puntuación Q comunica brevemente pequeñas probabilidades de error. Las puntuaciones de calidad se representan como Q(X), donde X es la puntuación. En la siguiente tabla, figura la relación entre una puntuación de calidad y la probabilidad de error.

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

Puntuación de calidad y elaboración de informes

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



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

Para generar la tabla Q de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000, se determinaron tres grupos de llamadas de bases en función del agrupamiento de estas características predictivas específicas. Después de la agrupación de las llamadas de bases, se calculó empíricamente la tasa de error media de cada uno de los tres grupos y las puntuaciones Q correspondientes se registraron en la tabla Q junto con las características predictivas que se correlacionan con ese grupo. Como tal, solo son posibles tres puntuaciones Q con RTA3 y estas puntuaciones Q representan la tasa de error promedio del grupo (*Puntuación Q simplificada con RTA3 en la página 65*). En general, esto da como resultado una puntuación de calidad simplificada pero muy precisa. Los tres grupos de la tabla de calidad se corresponden a llamadas base de calidad marginal (< Q15), media (aprox. Q20) y alta (> Q30) y se les asignan puntuaciones específicas de 12, 23 y 37, respectivamente. Además, se asigna una puntuación nula de 2 en caso de ausencia de llamadas. El modelo de elaboración de informes de puntuaciones de calidad (puntuaciones Q) reduce los requisitos de espacio de almacenamiento y ancho de banda sin detrimento de la precisión o el rendimiento.

Tipo de archivo	Descripción, ubicación y nombre del archivo
Archivos InterOp	Los archivos de informe binarios se pueden visualizar integrados en el instrumento con el software de control del instrumento o fuera de él en SAV o BaseSpace Sequence Hub. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento. Carpeta <code>InterOp</code>
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si la lectura es una Lectura del índice, y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. [Carpeta raíz], <code>RunInfo.xml</code>

Archivos de resultados del análisis secundario de DRAGEN

La plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN analiza sus resultados de secuenciación integrados en el instrumento más en detalle utilizando uno de los siguientes procesos de análisis.

- BCL Convert (Conversión de BCL)
- Germline (Línea germinal)
- RNA (ARN)
- Enrichment (Enriquecimiento)
- Single Cell RNA (ARN de células únicas)
- Amplicones de ADN

En esta sección, se ofrece información sobre cada proceso de DRAGEN, incluida la información del archivo de resultados. Además de generar archivos específicos de cada proceso, DRAGEN ofrece mediciones del análisis en un archivo `<nombre_muestra>.metrics.json` y los informes descritos en [Proceso DRAGEN BCL Convert en la página 72](#). Para obtener más información sobre DRAGEN, consulte la [página del sitio de asistencia de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN](#).

Todos los procesos de DRAGEN permiten la descompresión de archivos de entrada BCL y la compresión de archivos de salida BAM/CRAM.

Consideraciones sobre el archivo de resultados:

- En el caso de los procesos Germline, RNA, Enrichment y de amplicones de ADN que se ejecuten en el análisis integrado en el instrumento, los archivos BAM no se cargarán en BaseSpace Sequence Hub si se selecciona Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento).

Proceso DRAGEN Enrichment

El proceso DRAGEN Enrichment admite las siguientes funciones. En caso de usar DRAGEN 3.7 o una versión más reciente, se admiten ambos modos germinal y somático (solo tumores).

- Demultiplexado de muestras
- Mapeo y alineación, incluida la clasificación y el marcado de duplicados
- Llamadas de variantes pequeñas
- Llamadas de variantes estructurales

Para realizar una llamada de variantes, se debe incluir un archivo *.bed en la hoja de muestras o especificarse en Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub. Las llamadas de variantes estructurales solo se generan para lecturas paired-end y en modo germinal.

En caso de usar la versión 3.8 de DRAGEN Enrichment o una más reciente, puede introducir un archivo de referencia de ruido para mejorar el rendimiento en el modo somático. Consulte [Import Noise Baseline Files \(Importar archivos de referencia de ruido\)](#) en la página 19.

El proceso genera los siguientes archivos de resultados.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados
Asignación o alineación	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.bam o • <nombre_muestra>.cram
Llamadas de variantes pequeñas	VCF y gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.hard-filtered.gvcf.gz • <nombre_muestra>.hard-filtered.vcf.gz
Llamadas de variantes estructurales	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.sv.vcf.gz

* Los archivos de salida .gVCF solo están disponibles en el modo germinal.

Proceso DRAGEN Germline

El proceso DRAGEN Germline admite las siguientes funciones:

- Demultiplexado de muestras
- Mapeo y alineación, incluida la clasificación y el marcado de duplicados
- Llamadas de variantes pequeñas
- Llamadas de variantes estructurales para lecturas paired-end
- Llamadas de variantes de números de copias para genomas humanos
- Expansiones repetidas para genomas humanos

- Regiones de homocigosis para genomas humanos
- [DRAGEN v3.8 o una versión más reciente] Detección de CYP2D6

Las llamadas de variantes estructurales solo se generan para lecturas paired-end.

El proceso genera los siguientes archivos de resultados.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados
Asignación o alineación	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.bam o • <nombre_muestra>.cram
Llamadas de variantes pequeñas	VCF y gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.hard-filtered.gvcf.gz • <nombre_muestra>.hard-filtered.vcf.gz
Llamador de variantes estructurales	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.sv.vcf.gz
Variantes de números de copias	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.cnv.vcf.gz
Expansión repetida	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.repeats.vcf.gz
Regiones de homocigosis	CSV y BED	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.roh_metrics.csv • <nombre_muestra>.roh.bed
Detección de CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.cyp2d6.tsv

Proceso de amplicones de ADN de DRAGEN

El proceso DRAGEN admite las siguientes funciones:

- Demultiplexado de muestras
- Mapeo y alineación, incluida la clasificación y el marcado de duplicados
- Llamada de variantes pequeñas en el modo germinal o somático.

Para realizar una llamada de variantes, se debe incluir un archivo *.bed en la hoja de muestras o especificarse en Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) en BaseSpace Sequence Hub.

El proceso genera los siguientes archivos de resultados.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados
Asignación o alineación	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.bam o • <nombre_muestra>.cram
Llamadas de variantes pequeñas	VCF y gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.hard-filtered.gvcf.gz • <nombre_muestra>.hard-filtered.vcf.gz

* Los archivos de salida *.gVCF solo están disponibles para el modo germinal.

Proceso DRAGEN RNA

El proceso DRAGEN RNA admite las siguientes funciones

- Demultiplexado de muestras
- Mapeo y alineación, incluida la clasificación y el marcado de duplicados
- Detección de fusión de genes
- Cuantificación de transcripción
- **[DRAGEN v3.8, o una versión más reciente]** Expresión genómica diferencial

Para generar archivos de resultados, especifique un archivo GTF en la hoja de muestra o asegúrese de que exista `genes.gtf.gz` con el genoma de referencia.

El proceso genera los siguientes archivos de resultados.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados	Descripción
Asignación o alineación	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.bam o • <nombre_muestra>.cram 	Resultado de alineación que cumple las especificaciones SAM.
Detección de fusión de genes	Texto sin formato	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.fusion_candidates.preliminary • <nombre_muestra>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> • Candidatos de fusión antes de que se apliquen los filtros. • Candidatos de fusión después de que se apliquen los filtros.
Cuantificación de transcripción	Texto sin formato	<ul style="list-style-type: none"> • nombre_muestra.quant.genes.sf • nombre_muestra.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> • Resultados de cuantificación de transcripción a nivel de los genes. • Todos los resultados de cuantificación de transcripción.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados	Descripción
Expresión diferencial	PNG	Consulte la siguiente tabla de archivos de salida de expresión diferencial.	Para generar archivos de salida, debe establecerse una comparación en la hoja de muestras.

Los siguientes archivos se emiten cuando se habilita la expresión diferencial.

Nombre de archivo	Descripción
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Contiene mediciones de análisis de expresión diferencial.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Describe el número de lecturas mapeadas por cada gen para cada muestra en los grupos de control y comparación.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Un mapa de calor de la expresión de los genes expresados diferencialmente para las muestras en los grupos de control y comparación. El mapa de valor muestra únicamente genes expresados diferencialmente con un valor de P ajustado $< 0,05$. En caso de haber más de 30 genes expresados diferencialmente, solo se usan los 30 mejores genes expresados diferencialmente. Si DESeq1 no converge o si no hay genes expresados diferencialmente, el archivo no se genera.

Nombre de archivo	Descripción
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	<p>Contiene la variación de las relaciones de expresión genética como una función de la intensidad de señal promedio. Para mostrar las diferencias entre las mediciones tomadas en dos muestras, el gráfico transforma los datos en M (relación logarítmica) y A (promedio) La gráfica MA muestra las modulaciones log₂ atribuibles a una variable dada sobre la media de los recuentos normalizados de todas las muestras. Si el valor de P ajustado es menor que 0,1, los puntos se muestran en rojo. Los puntos que se encuentran fuera de la ventana se representan como triángulos abiertos. Los triángulos que apuntan hacia arriba representan una modulación log positiva. Los triángulos que apuntan hacia abajo representan una modulación log negativa.</p>
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	<p>La gráfica representa los primeros dos componentes principales que explican la mayor varianza.</p>
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	<p>Contiene los resultados DESeq2, que describen la expresión media, log₂ (modulación), error estándar de log₂, valor de P, valor de P ajustado y el estado de expresión de cada gen.</p>
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	<p>Contiene recuentos regularizados de transformación logarítmica calculados mediante DESeq2.</p>

Proceso DRAGEN Single Cell RNA

El DRAGEN admite las siguientes funciones:

- Demultiplexado de muestras
- Mapeo y alineación, incluida la clasificación y el marcado de duplicados
- Clasificación de células y genes

Para generar archivos de resultados, especifique un archivo GTF en la hoja de muestra o asegúrese de que exista `genes.gtf.gz` con el genoma de referencia.

El proceso genera los siguientes archivos de resultados.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados
Asignación o alineación	BAM o CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_muestra>.bam o • <nombre_muestra>.cram
Clasificación de células o genes	TSV, CSV y MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <nombre_de_muestra>.scRNA.barcodeSummary.tsv • <nombre_de_muestra>.scRNA.genes.tsv • <nombre_de_muestra>.scRNA.matrix.mtx
Informes del análisis	HTML	<nombre_de_muestra>.dragen.scrna-report.*.html

Proceso DRAGEN BCL Convert

El proceso DRAGEN BCL Convert utiliza los datos de BCL generados por su experimento de secuenciación y la información de la hoja de muestras para generar un archivo FASTQ. El nombre de archivo FASTQ es <nombre_muestra>.fastq.gz.

El proceso genera los siguientes informes.

Componente	Tipo	Nombre del archivo de resultados
Demultiplexado	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Criterio de medición del adaptador	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Salto de índices	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Principales códigos de barras desconocidos	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

Informe de estadísticas de demultiplexado

El informe de estadísticas de demultiplexado contiene información sobre el número de lecturas que superan el filtro asignadas a cada muestra en la hoja de muestras. Todas las lecturas que no estén claramente asociadas a una muestra se clasifican como indeterminadas. El informe también incluye información sobre las puntuaciones de calidad de las bases en las lecturas que superan el filtro asignadas a cada muestra.

Se incluye la siguiente información.

Criterio de medición	Descripción
Lane	El carril de la celda de flujo donde se ha secuenciado la muestra.
SampleID	El ID de la muestra de la hoja de muestras. Si una lectura no se corresponde con una muestra, el campo muestra <code>undetermined</code> (sin determinar).
Index	La concatenación de la lectura del índice 1 y de la lectura del índice 2 de la hoja de muestras se separan mediante un guion. Si una lectura no se corresponde con una muestra, el campo muestra <code>undetermined</code> (sin determinar).
# Reads	El número de lecturas demultiplexadas que pasan el filtro para la muestra del carril especificado.
# Perfect Index Reads	Número de lecturas que coinciden perfectamente con las secuencias de índices combinadas especificadas en la hoja de muestras.
# One Mismatch Index Reads	Número de lecturas con un error en las secuencias de índices combinadas especificadas en la hoja de muestras.
# of ≥ Q30 Bases (PF)	Número de bases, incluidos adaptadores, correspondientes a lecturas que superan un umbral de calidad Q30.
Mean Quality Score (PF)	La puntuación de calidad media de las lecturas correspondientes a la muestra del carril especificado. El valor incluye bases de adaptador.

Informes de criterios de medición del adaptador

El archivo de criterios de medición del adaptador incluye el número de bases de adaptador y de muestra asociadas a cada lectura.

Se incluye la siguiente información.

Criterio de medición	Descripción
Lane	El carril de la celda de flujo donde se ha secuenciado la muestra.
Sample_ID	El ID de la muestra de la hoja de muestras. Si una lectura no se corresponde con una muestra, el campo muestra <code>undetermined</code> (sin determinar).
index	La secuencia del Índice 1 de la hoja de muestras. El campo está vacío si el índice no se ha especificado en la hoja de muestras o si el valor del ID de la muestra es <code>undetermined</code> (sin determinar).

Criterio de medición	Descripción
index2	La secuencia de index2 de la hoja de muestras. El campo está vacío si index2 no se ha especificado en la hoja de muestras o si el valor del ID de la muestra es <code>undetermined</code> (sin determinar).
R1_AdapterBases	El número de bases correspondiente a AdapterRead1 en la hoja de muestras.
R1_SampleBases	Número de bases recortadas o enmascaradas de la Lectura 1 para el carril y la muestra correspondientes.
R2_AdapterBases	El número de bases correspondiente a AdapterRead2 en la hoja de muestras.
R2_SampleBases	Número de bases recortadas o enmascaradas de la Lectura 2 para el carril y la muestra correspondientes.
# Reads	El número de lecturas de la muestra del carril especificado.

Informe de recuentos de saltos de índices

El informe de recuentos de saltos de índices contiene el número de lecturas para cada índice esperado y saltado para experimentos de indexado doble. El informe solo incluye índices dobles únicos por carril en los que no se detecta ningún conflicto de código de barras en ninguno de los índices. Para generar mediciones de salto de índices para un carril, cada par de entradas de cada índice debe tener una distancia de Hamming de al menos $2N + 1$, donde N representa la tolerancia de incoherencia del código de barras especificada para el índice.

Se incluye la siguiente información.

Para experimentos no indexados, experimentos de índice individual o carriles que no contienen índices dobles únicos, el archivo solo contiene el encabezado.

Criterio de medición	Descripción
Lane	El carril de la celda de flujo donde se ha secuenciado la muestra.
# Reads	El número de lecturas de la muestra del carril especificado.
SampleID	El ID de la muestra de la hoja de muestras. Si una lectura no se corresponde con una muestra, el campo muestra <code>undetermined</code> (sin determinar).
index	La secuencia del Índice 1 de la hoja de muestras. El campo está vacío si una lectura es individual o el valor del ID de la muestra es <code>undetermined</code> (sin determinar).
index2	La secuencia de index2 de la hoja de muestras. El campo está vacío si una lectura es individual o el valor del ID de la muestra es <code>undetermined</code> (sin determinar).

Informe de principales códigos de barras desconocidos

El informe de principales códigos de barras desconocidos contiene los 100 principales índices o pares de índices por carril que no se identificaron en la hoja de muestras según el número de incoherencias permitidas. Si hay varios valores de índice situados como la entrada más alta de recuento de índices en el número 100, todos los valores de índice con el mismo recuento se generan como la entrada número 100.

Se incluye la siguiente información:

Criterio de medición	Descripción
Lane	El carril de la celda de flujo donde se ha secuenciado la muestra.
index	La secuencia de cada índice desconocido en la Lectura 1 del índice. El campo está vacío si no se encuentran índices desconocidos.
index2	La secuencia de cada índice desconocido en la Lectura 2 del índice. El campo está vacío si el experimento es de lectura individual o no se encuentran índices desconocidos.
# Reads	El número de lecturas de la muestra del carril especificado.

Informes de control de calidad de DRAGEN de Illumina

DRAGEN FastQC genera gráficos de control de calidad (CC) de forma predeterminada para todos los procesos. El conjunto de resultados de CC se guardan en la carpeta `AggregatedFastqcMetrics` y los resultados por muestra se guardan en la carpeta `<nombre_de_muestra>`.

Los informes de CC no se generan si el número de muestras es mayor que 512.

Se proporcionan los gráficos de CC siguientes.

Gráfico de CC	Descripción
adapter_content	El porcentaje de secuencias para cada par de bases.
positional_mean_quality	Promedio de la puntuación de calidad de la base en la escala Phred para cada posición leída.
gc_content	El contenido porcentual en GC para cada lectura de secuenciación.
positional_quality.read_1	Valor promedio de calidad en la escala Phred de bases con un nucleótido específico y en una ubicación determinada en la Lectura 1.
gc_quality	

Gráfico de CC	Descripción
positional_quality.read_2	Valor promedio de calidad en la escala Phred de bases con un nucleótido específico y en una ubicación determinada en la Lectura 2.
n_content	
read_length	Longitud de la secuencia para cada lectura.
positional_base_content.read_1	Número de bases de cada nucleótido específico en ubicaciones determinadas en la Lectura 1.
read_quality	Promedio de la puntuación de calidad en la escala Phred para cada lectura de secuenciación.
positional_base_content.read_2	Número de bases de cada nucleótido específico en ubicaciones determinadas en la Lectura 2.

Estructura de carpetas de resultados de análisis secundario de DRAGEN

DRAGEN genera de forma predeterminada los archivos de resultados en la carpeta de resultados seleccionada en la pestaña Settings (Configuración). Para cada flujo de trabajo, DRAGEN elabora un informe a modo de resumen en el archivo `report.html`.

📁 Data (Datos)

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr_.txt`

📄 `*stdout_.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Archivos de entrada de experimentos (p. ej. archivos BED, GTF)

📁 nombre_muestra

📁 `enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq, o scrna_seq`

📁 nombre_muestra

📄 `*.png`

- 📄 dragen_*.log
- 📄 nombre_muestra.*.metrics.csv
- 📄 [DNA] nombre_muestra.*.vcf.gz
- 📄 [DNA] nombre_muestra*.gvcf.gz: no disponible para el proceso (somático) de amplicones de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT.
- 📄 nombre_muestra.*.bam o nombre_muestra.*.cram
- 📄 Logs
- 📄 [RNA] nombre_muestra.fusion_candidates.filter_info
- 📄 [RNA] nombre_muestra.fusion_candidates.final
- 📄 [RNA] nombre_muestra.quant.genes.sf
- 📄 [RNA] nombre_muestra.quant.sf
- 📄 nombre_muestra.metrics.json
- 📄 [scRNA] muestra_dragen-scRNA-report.*.html
- 📄 [ARNcs] nombre_muestra.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Germline] nombre_muestra.roh_metrics.csv
- 📄 [Germline] nombre_muestra.roh.bed
- 📄 [Germline] nombre_muestra.cyp2d6.tsv
- 📄 nombre_muestra.fastqc_metrics.csv
- 📄 nombre_muestra.trimmer_metrics.csv

📁 [RNA] Expresión diferencial

📁 Comparison1

- 📄 Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.counts.csv
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.disp.pdf
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.heatmap.pdf
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.ma.pdf
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.pca.pdf
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.res.csv
- 📄 Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv

📁 ComparisonN

📁 logs

📄 *.txt

📄 *.csv

📁 fastq: solo disponible si KeepFastq se ha establecido como true (verdadero).

📄 *.fastq.gz

📁 ora_fastq: solo disponible si FastqCompressionFormat se ha establecido como dragen.

📄 *.fastq.ora

📁 RunInstrumentAnalyticsMetrics

📁 0001

📄 dataset.json

📄 fastqc_metrics.csv

📁 0002

📄 dataset.json

📄 fastqc_metrics.csv

📄 Adapter_Metrics.csv

📄 Demultiplex_Stats.csv

📄 Index_Hopping_Counts.csv

📁 Informes

📄 Demultiplex_Stats.csv

📄 RunInfo.xml

📄 Trim_Metrics.csv

📄 fastq_list.csv

📄 SampleSheet.csv

📄 Index_Hopping_Counts.csv

📄 Top_Unknown_Barcodes.csv

📁 MedicionesAnalíticasDelInstrumentoLectura1: solo para lecturas "paired-end".

📁 0001

📄 dataset.json

📁 0002

📄 dataset.json

📄 Adapter_Metrics.csv

📄 Demultiplex_Stats.csv

 Index_Hopping_Counts.csv

 **MedicionesLectura1:** solo para lecturas "paired-end".

 Adapter_Metrics.csv

 Index_Hopping_Counts.csv

Mantenimiento

En esta sección, se describen los procedimientos necesarios para mantener un sistema en buen estado. Aprenda cómo instalar actualizaciones del software, cambiar el filtro de aire y realizar otros procedimientos de mantenimiento periódicos. Mantener el software de control actualizado asegura que su sistema tiene las últimas correcciones de errores y funciones instaladas para un rendimiento óptimo.

Liberación de espacio en el disco duro

Para un experimento de secuenciación hacen falta alrededor de 200 GB de espacio en el disco duro local. Cuando queda poco espacio, se muestra una notificación de aviso. Lleve a cabo los siguientes pasos para liberar espacio mediante la eliminación de los experimentos finalizados y los genomas de referencia instalados de un archivo de experimento temporal.

-  Elimine únicamente los experimentos con NextSeq 1000/2000 Control Software en lugar de hacerlo manualmente a través del sistema operativo. Si elimina experimentos manualmente, esto puede afectar negativamente al software de control.
- 1. El menú del software de control, seleccione **Disk Management** (Administración de disco). La pantalla Disk Management (Administración de disco) aparece con una lista de experimentos y genomas de referencia guardados en el disco duro local.
- 2. Seleccione **Delete Run** (Eliminar experimento) en el experimento que desee eliminar. Al eliminar un experimento, se elimina la carpeta local del experimento. La carpeta de resultados, que es una copia de la carpeta de experimentos, se mantiene.
- 3. En el cuadro de diálogo, seleccione **Yes, Delete Run** (Sí, eliminar experimento) para confirmar la eliminación del experimento.
- 4. Repita los pasos 2 y 3 para cada experimento que desee eliminar.
- 5. Seleccione **Delete Genome** (Eliminar genoma) en el genoma que desee eliminar.
- 6. En el cuadro de diálogo, seleccione **Yes, Delete Genome** (Sí, eliminar genoma).
- 7. Repita los pasos 5 y 6 para cada genoma que desee eliminar.
- 8. Cuando haya finalizado, cierre Disk Management (Administración de disco) para volver a la pantalla Home (Inicio).

Actualizaciones de software

La actualización del software garantiza que su sistema disponga de las funciones y correcciones más recientes. Las actualizaciones de software se integran en un paquete de sistemas, que incluye el siguiente software:

- Software de control de NextSeq 1000/2000
- Fórmulas de NextSeq 1000/2000
- Servicio de copia universal
- Análisis en tiempo real

i | Los módulos de DRAGEN no se incluyen en el paquete del sistema. Instálelos por separado según sea necesario. Acceda al software del módulo de DRAGEN desde las páginas de asistencia.

El sistema está configurado para descargar de manera automática o manual las actualizaciones de software:

- **Automatic updates** (Actualizaciones automáticas): las actualizaciones se descargan de manera automática de BaseSpace Sequence Hub para que las instale. Para esta opción hace falta una conexión a Internet, pero no una cuenta de BaseSpace Sequence Hub.
- **Manual updates** (Actualizaciones manuales): las actualizaciones se descargan manualmente de la Web, se guardan localmente o en una unidad portátil y se instalan desde la ubicación guardada. Para esta opción el instrumento no requiere una conexión a Internet.

Instalación de una actualización manual del software

1. Asegúrese de que no haya experimentos de secuenciación ni análisis secundarios en curso en el instrumento.
2. Inicie sesión en ilmnadmin.
3. Seleccione **Software Update** (Actualización de software) en el menú del software de control. Los sistemas configurados para actualizaciones automáticas muestran una alerta cuando hay una actualización de software disponible.
4. Para buscar una actualización, seleccione **Buscar actualizaciones de software en línea**.
5. Seleccione **Update Now** (Actualizar ahora) para descargar la nueva versión del software. Una vez finalizada la descarga, el software de control se cierra y aparece el asistente de instalación.
El software de control se reiniciará de manera automática. Después de reiniciar, todas las actualizaciones del firmware se llevarán a cabo automáticamente.

i | Una vez que empiece la instalación, no es posible cancelar una actualización. Solo es posible cancelar una actualización durante la descarga.

Instalar una actualización manual del software

1. Inicie sesión en ilmnadmin.
2. Asegúrese de que no haya experimentos de secuenciación ni análisis secundarios en curso en el instrumento.

3. Cuando haya una actualización de software disponible, descargue el instalador del paquete (*.tar.gz) de la [página de asistencia de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000](#). Guarde el instalador en una unidad local o portátil.
4. Si guardó el instalador en una unidad portátil, conéctela a un puerto USB 3.0 de la parte lateral y posterior del instrumento.
5. En el software de control, seleccione **Software Update** (Actualización de software) en el menú del software de control.
6. Seleccione **Choose...** (Elegir...) para acceder al instalador.
7. Seleccione **Update Now** (Actualizar ahora) para iniciar la instalación.
En el software de control, aparece un indicador de estado ocupado durante la instalación. El software de control se reiniciará de manera automática. Después de reiniciar, todas las actualizaciones del firmware se llevarán a cabo automáticamente.

 Una vez que empiece la instalación, no es posible cancelar una actualización. Solo es posible cancelar una actualización durante la descarga.

Actualizaciones de flujos de trabajo y licencias de DRAGEN

Solo los administradores del sistema pueden instalar los flujos de trabajo de DRAGEN y renovar la licencia de DRAGEN.

Renovación en línea de la licencia de DRAGEN

Si el NextSeq 1000/2000 está conectado a Internet, actualice la licencia de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT de la siguiente manera.

1. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para obtener una nueva clave de licencia.
2. Espere 24 horas para que la licencia se actualice automáticamente o actualícela inmediatamente de la siguiente manera.
 - a. Seleccione el menú del software de control y, a continuación, seleccione **DRAGEN**.
 - b. Seleccione **Check Online** (Comprobar en línea) para ver si hay una nueva clave de licencia DRAGEN disponible.
 - c. Si está disponible, seleccione **Update** (Actualizar).

Renovación sin conexión de la licencia de DRAGEN

Si el NextSeq 1000/2000 no está conectado a Internet, actualice la licencia de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT de la siguiente manera.

1. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para obtener una nueva clave de licencia. Guarde el archivo `license.zip` en una unidad local o portátil.
2. Si guardó el archivo `*.zip` en una unidad portátil, conéctela a un puerto USB 3.0 de la parte lateral y posterior del instrumento. Mueva el instrumento con cuidado según sea necesario para acceder a la parte posterior.
3. Seleccione el menú del software de control y, a continuación, seleccione **DRAGEN**.
4. Seleccione **Choose** (Elegir) para acceder al archivo `*.zip` y, a continuación, seleccione **Open** (Abrir).

Instalación en línea de flujos de trabajo de DRAGEN

Si el NextSeq 1000/2000 está conectado a Internet, puede instalar los flujos de trabajo de DRAGEN directamente en el software de control de NextSeq 1000/2000. La instalación en línea de los flujos de trabajo de DRAGEN solo está disponible para el software de control de NextSeq 1000/2000 v1.3.

1. En el menú del software de control, seleccione **Process Management** (Gestión del proceso).
2. Asegúrese de que no haya experimentos de secuenciación ni análisis secundarios en curso en el instrumento.
3. Seleccione el menú del software de control y, a continuación, seleccione **DRAGEN**.
En esta versión, la sección Available Workflows (Flujos de trabajo disponible) enumera los flujos de trabajo instalados actualmente en el sistema.
4. Para instalar los flujos de trabajo de DRAGEN en el software de control de NextSeq 1000/2000, seleccione **Check Online** (Comprobación en línea).
No todas las versiones y los flujos de trabajo de DRAGEN son compatibles con la instalación en línea. Utilice la instalación fuera de línea para instalar más flujos de trabajo.
5. Seleccione la casilla de verificación de los flujos de trabajo que desee instalar. En caso de no tenerla instalada, asegúrese de instalar primero la versión más reciente de BCL Convert.
Puede visualizar información sobre la versión más reciente de un flujo de trabajo en las notas de liberación.
6. Seleccione **Install** (Instalar) para iniciar la instalación.
7. Introduzca `ilmnadmin` como contraseña del sistema y, a continuación, seleccione **Authenticate** (Autenticar).

Instalación fuera de línea de flujos de trabajo de DRAGEN

1. Cuando haya una actualización disponible para un flujo de trabajo de DRAGEN, descargue el instalador (*.tar.gz) de la [página de asistencia de DRAGEN](#). Guarde el instalador en una unidad local o portátil.
2. Si guardó el instalador en una unidad portátil, conéctela a un puerto USB 3.0 de la parte lateral y posterior del instrumento. Mueva el instrumento con cuidado según sea necesario para acceder a la parte posterior.
3. En el menú del software de control, seleccione **Process Management** (Gestión del proceso).
4. Asegúrese de que no haya experimentos de secuenciación ni análisis secundarios en curso en el instrumento.
5. Seleccione el menú del software de control y, a continuación, seleccione **DRAGEN**.
6. En Version (Versión), seleccione **Browse for New Version** (Buscar nueva versión) para acceder hasta el instalador.
7. Seleccione **Install** (Instalar) para iniciar la instalación.
8. Introduzca ilmnadmin como contraseña del sistema y, a continuación, seleccione **Authenticate** (Autenticar).

Sustitución del filtro de aire

Siga las instrucciones que se indican a continuación para sustituir el filtro de aire caducado cada seis meses.

El filtro de aire es un cartucho rectangular de un solo uso que cubre el ventilador de la parte derecha del instrumento. Garantiza una correcta refrigeración y evita que entre suciedad en el sistema. El instrumento se entrega con un filtro de aire instalado y otro de repuesto. Los repuestos adicionales se incluyen con un contrato de servicio del instrumento válido o se pueden adquirir por separado en Illumina.

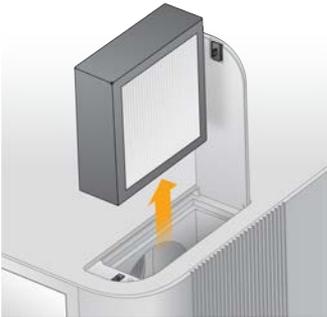
1. En la parte superior del instrumento, presione sobre el lado derecho del panel superior para desacoplarlo como se muestra en la siguiente ilustración.



2. Abra el panel.



3. Presione para liberar el cartucho del filtro de aire, retírelo del centro del panel y deséchelo.



4. Inserte un nuevo filtro de aire en el receptáculo y presione para fijarlo.
5. Cierre el panel superior y presione para fijarlo en su sitio.



6. Vuelva a colocar el instrumento en la posición original.

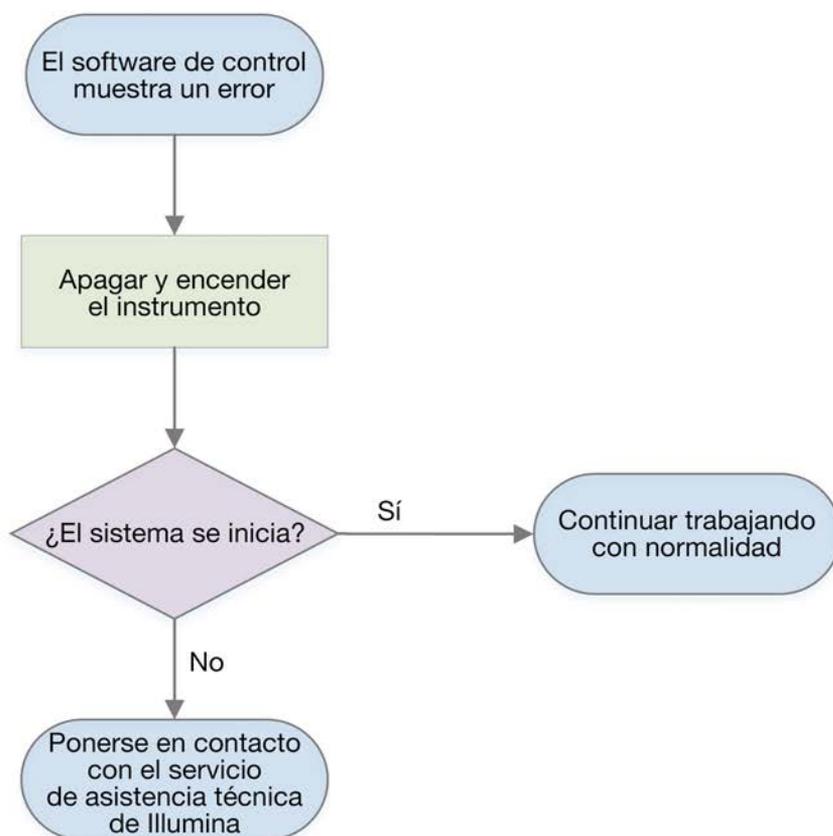
Solución de problemas

En esta sección, se ofrecen instrucciones paso a paso para cancelar un experimento, apagar y encender el instrumento, además de otros procedimientos de solución de problemas.

Resolución de mensajes de error

En este apéndice, se proporcionan instrucciones detalladas para varios pasos de solución de problemas. En el siguiente diagrama, se muestra una descripción general de los mensajes de error sobre la solución de problemas que aparecen durante el inicio, la configuración del experimento o la secuenciación y que no se resuelven reintentando la acción correspondiente.

Muchos errores pueden resolverse con un ciclo de apagado y encendido: apagar y volver a iniciar el instrumento. Consulte [Ciclo de apagado y encendido del instrumento en la página 88](#) para obtener más información sobre cómo llevar a cabo el ciclo de apagado y encendido.



Devolución de los consumibles a almacenamiento

Siga estas instrucciones para almacenar un cartucho y una celda de flujo descongelados en el caso de que se produzca un error en el instrumento durante la comprobación previa al experimento, antes de la comprobación de la fluídica.

1. Separe la celda de flujo del cartucho.
2. Extraiga y deseche la biblioteca diluida del depósito (hasta 18 µl aproximadamente).
-  Prepare una dilución nueva de la misma biblioteca para el siguiente experimento para evitar la contaminación cruzada de la muestra con la biblioteca residual del depósito.
3. Coloque el cartucho en un almacenamiento entre 2 °C y 8 °C de forma que la etiqueta quede hacia arriba y el aire pueda circular por todos los lados.
No supere las 72 horas. Si el cartucho se descongeló en el refrigerador durante 12 horas por la noche, no supere las 60 horas.
4. Vuelva a poner la celda de flujo en el envase metálico plateado original con el desecante.
5. Cierre con cinta el envase metálico y almacénelo a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.
No supere las 72 horas.

Cancelación de un experimento

1. Seleccione **End Run** (Finalizar experimento).
2. Para purgar automáticamente el cartucho de reactivo, seleccione la casilla de verificación **Purge Reagent Cartridge** (Purgar cartucho de reactivo).
La selección predeterminada se configura en los ajustes del software de control NextSeq 1000/2000.
3. Seleccione **Yes, end the sequencing run** (Sí, finalizar el experimento de secuenciación).
La cancelación de un experimento es definitiva. El software no puede reanudar el experimento y tampoco se pueden reutilizar los consumibles una vez que se haya llevado a cabo la parte de comprobación del instrumento de las comprobaciones previas al experimento.
4. Seleccione **Eject Cartridge** (Expulsar cartucho) para abrir el visor y expulsar la bandeja.
5. Retire el cartucho de la bandeja.
6. Almacene o deseche el cartucho, en función del momento en que se produjo la cancelación:

Circunstancia	Instancia
Ha cancelado antes o durante la comprobación del instrumento y desea volver a utilizar los consumibles.	Consulte Devolución de los consumibles a almacenamiento en la página 87 .
Cualquier otra circunstancia.	Consulte Descarga de consumibles en la página 56 .

7. Seleccione **Close Door** (Cerrar puerta) para volver a cargar la bandeja y volver a la pantalla Home (Inicio).

Los sensores confirmarán la retirada del cartucho.

Volver a poner en cola un experimento

Si se muestra un error del estado del análisis secundario en Process Management (Gestión del proceso), puede volver a poner en cola el experimento para volver a realizar un análisis integrado en el instrumento de DRAGEN en los archivos cBCL generados. Para que se pueda volver a poner en cola, la carpeta del experimento original debe seguir estando en el instrumento. Utilizar esta característica de volver a poner en cola no hace que se vuelvan a poner en cola los experimentos en BaseSpace Sequence Hub. Para volver a poner en cola los experimentos en BaseSpace Sequence Hub, consulte Solucionar hoja de muestras en el Centro de ayuda de BaseSpace Sequence Hub.

1. Actualice su hoja de muestras v2 y, luego, guárdela en una unidad portátil o en una unidad de red montada.
2. Si guardó la hoja de muestras en una unidad portátil, conéctela a un puerto USB 3.0 de la parte lateral y posterior del instrumento. Mueva el instrumento con cuidado según sea necesario para acceder a la parte posterior.
3. En el menú del software de control, seleccione **Process Management** (Gestión del proceso).
4. Asegúrese de que no haya experimentos de secuenciación ni análisis secundarios en curso en el instrumento.
5. Seleccione **Requeue** (Volver a poner en cola) junto al experimento finalizado que desee volver a poner en cola.
6. Seleccione **Choose** (Elegir) para acceder a la hoja de muestras actualizada y, luego, seleccione **Open** (Abrir).
7. Seleccione **Start Requeue** (Iniciar Volver a poner en cola).

Ciclo de apagado y encendido del instrumento

Con un ciclo de apagado y encendido del instrumento se apaga e inicia de manera segura el sistema con objeto de restaurar una pérdida de conexión, alinear una especificación o solucionar un fallo de inicialización. Los mensajes de software indican cuándo realizar un ciclo de apagado y encendido para resolver un error o una advertencia.

1. En el menú del software de control, seleccione **Shut Down Instrument** (Apagar instrumento).
2. Si el sistema no se apaga, mantenga pulsado el botón de encendido del lado derecho del instrumento hasta que la luz se apague.
3. Cuando el botón de encendido parpadee, pulse el lado de apagado (O) del interruptor en el panel trasero.

Puede que el botón de encendido siga parpadeando después de que se haya apagado la corriente.

Figura 8 Ubicación del interruptor



4. Espere 30 segundos.
5. Pulse el lado de encendido (I) del interruptor.
6. Cuando el botón de encendido parpadee, espere 30 segundos y, a continuación, púselo.

Figura 9 Ubicación del botón de encendido



7. Espere unos cinco minutos a que se cargue el sistema operativo. Cuando se cargue el sistema operativo, inicie sesión en el sistema.
El software de control se abre e inicia el sistema. Espere unos cinco minutos a que se inicialice el sistema. Cuando finaliza la inicialización, aparece la pantalla Home (Inicio).

Realizar una comprobación del sistema

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

Las cuatro comprobaciones del subsistema duran unos 58 minutos para solucionar errores de la comprobación previa al experimento y otros problemas. Las pruebas confirman si los componentes se encuentran bien alineados y son funcionales.

Los resultados se generan en la carpeta `system-check` ubicada en `/usr/local/illumina/system-check`.

Asegúrese de descargar el cartucho antes de llevar a cabo las verificaciones del sistema.

Ejecución de una comprobación del sistema

1. En el menú del software de control, seleccione **System Checks** (Comprobaciones del sistema).
2. Seleccione la casilla de verificación de cualquiera de las siguientes comprobaciones del sistema que desee ejecutar.
 - **Network Connectivity**: comprueba el estado y el rendimiento de su conexión a la red.
 - **Enclosure**: comprueba el rendimiento del sistema térmico y el mecanismo de elevación del visor.
 - **Motion**: comprueba los límites de recorrido y rendimiento de la platina Z y la platina XY.
 - **Optics**: comprueba el rendimiento del módulo de obtención de imágenes.
3. Seleccione **Start** (Iniciar).

Restablecimiento a la configuración de fábrica

Restablezca los valores predeterminados de fábrica del sistema para degradar la versión del software o recuperar el sistema tras una configuración no deseada. Esta función solo debe utilizarla un representante de Illumina.

Captura de una imagen de instalación

Capture una imagen del sistema para realizar una copia de seguridad de una instalación del software que funciona correctamente. Esta imagen del sistema se puede restaurar más adelante. Se recomienda que capture la imagen del sistema inmediatamente después de finalizar la instalación inicial y cambiar la contraseña con un representante de Illumina.

1. Reinicie Linux.
2. Cuando se le solicite elegir un sistema operativo, seleccione **Capture Installed Image** (Captura de una imagen de instalación).

Las opciones del sistema operativo aparecen brevemente antes de continuar automáticamente con NextSeq 1000/2000 Control Software.



Como solo se conserva una imagen en la memoria, esto sobrescribirá la imagen capturada previamente.

3. Espere 30 minutos aproximadamente hasta que el sistema capture la imagen de instalación actual. La captura puede incluir varios reinicios. Cuando finalice, el sistema se reinicia con la imagen de instalación actual almacenada en la memoria.

Restauración de la imagen capturada

Restablezca el sistema a la imagen capturada anteriormente para recuperar el sistema de una configuración no deseada.

1. Reinicie Linux.
2. Cuando se le solicite elegir un sistema operativo, seleccione **Restore Installed Image** (Restaurar imagen de instalación).

Las opciones del sistema operativo aparecen brevemente antes de continuar automáticamente con NextSeq 1000/2000 Control Software.

 Las contraseñas están ligadas a la imagen del sistema. Tras la restauración, utilice la contraseña de la imagen restaurada para iniciar sesión en el sistema.

3. Espere unos 30 minutos a que finalice la restauración.
La restauración puede incluir varios reinicios. Cuando finalice, el sistema se reinicia con la imagen restaurada.

Recursos y referencias

Configuración de la hoja de muestras v2

Si utiliza el modo Local, puede utilizar el formato de archivo de las hojas de muestras v2 para configurar los ajustes de su experimento. Cree la hoja de muestras en Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento) o editando la *plantilla de la hoja de muestras v2 de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000*. Cuando edite la hoja de muestras, asegúrese de que las siguientes secciones y campos estén incluidos en el orden siguiente y cumplan los requisitos. Una vez editada, utilice una unidad portátil o una unidad red montada para transferir la hoja de muestras a los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Cuando accede a la hoja de muestras en el software de control, se copia en una carpeta previa al experimento en el instrumento, de forma que pueda quitar la unidad portátil.

Asegúrese de que la configuración de la hoja de muestras v2 cumple con los siguientes requisitos.

- Las secuencias de índice especificadas en la sección de la hoja de muestras BCLConvert_Data deben coincidir con el kit de índices seleccionado en NextSeq 1000/2000.
- En caso de usar el software de control NextSeq 1000/2000 v1.2, la versión de DRAGEN especificada en la hoja de muestras debe instalarse y activarse en el sistema. Para obtener información sobre la instalación, consulte [Actualizaciones de software en la página 80](#) (Actualizaciones del software).
- En caso de usar el software de control NextSeq 1000/2000 v1.3, la versión de DRAGEN especificada en la hoja de muestras debe instalarse en el sistema. El software de control detecta automáticamente la versión del DRAGEN de la hoja de muestras y le solicita cambiar de versión activa, si es preciso. Para obtener información sobre la instalación, consulte [Actualizaciones de software en la página 80](#) (Actualizaciones del software).

Si está utilizando DRAGEN, tendrá que configurar ajustes adicionales. Para obtener más información, consulte [Configuración de las hojas de muestras de DRAGEN en la página 96](#)

Descargue la plantilla de hoja de muestras v2 de Product Files (Archivos del producto) en la página de asistencia de los sistemas de secuenciación NextSeq 1000 y NextSeq 2000. Si crea una hoja de muestras utilizando Instrument Run Setup (Configuración del experimento en el instrumento), tenga en cuenta que la modificación de la hoja de muestras después de la descarga inicial puede dar como resultado un error analítico.

Los nombres de archivo no pueden contener caracteres especiales.

Requisitos de [Header] (Encabezado)

La sección [Header] (Encabezado) incluye información general del experimento. Estos son los campos y descripciones de [Header] (Encabezado) disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
FileFormatVersion	Sí	La versión de la hoja de muestras. Introduzca 2 como valor.
RunName	No	El nombre de experimento único que desee. RunName puede contener caracteres alfanuméricos, guiones bajos, guiones y puntos. Si RunName contiene espacios o caracteres especiales, el análisis fallará.
RunDescription	No	Descripción del experimento.
InstrumentPlatform	No	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	No	NextSeq 1000/2000

Requisitos de [Reads] (Lecturas)

La sección [Reads] (Lecturas) describe el número de ciclos de secuenciación utilizados para la genómica y la lectura del Índice 1 y 2. Estos son los campos y descripciones de [Reads] (Lecturas) disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Read1Cycles	Sí	Número de ciclos de la primera lectura. El valor debe ser un número entero mayor que cero.
Read2Cycles	No	Número de ciclos de la segunda lectura.
Index1Cycles	No	Número de ciclos de la primera lectura del índice. Obligatorio cuando se secuencia más de una muestra. El máximo es de 10 ciclos.
Index2Cycles	No	Número de ciclos de la segunda lectura del índice. El máximo es de 10 ciclos.

Requisitos de [Sequencing_Settings] (Configuración de secuenciación)

Utilice la sección [Sequencing_Settings] (Configuración de secuenciación) para especificar el kit de preparación de bibliotecas que está usando.

Campo	Necesario	Descripción
LibraryPrepKits	No	<p>Su kit de preparación de bibliotecas. Solo se permite un kit de preparación de bibliotecas.</p> <p>En el caso de usar el software de control NextSeq 1000/2000 v1.3, la fórmula personalizada necesaria se selecciona automáticamente si el kit Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus o el kit Illumina Stranded mRNA Prep se especifica como kit de preparación de bibliotecas.</p> <p>Introduzca uno de los valores siguientes.</p> <ul style="list-style-type: none"> Kit Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus: ILMNStrandedTotalRNA Kit Illumina Stranded mRNA Prep: ILMNStrandedmRNA

Requisitos de BCL Convert (Conversión de BCL)

Las secciones BCL Convert (Conversión de BCL) ofrecen información para convertir los datos de BCL a FASTQ. Las opciones de BCL Convert (Conversión de BCL) incluyen dos secciones independientes: [BCLConvert_Settings] y [BCLConvert_Data]. Las secciones BCL Convert (Conversión de BCL) requieren información sobre las secuencias del adaptador de índices. Para identificar la secuencia del adaptador compatible para cada lectura e índice, consulte *Secuencias de adaptadores de Illumina (n.º de documento 1000000002694)*.

Estos son los campos y descripciones de [BCLConvert_Settings] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	No	El número de incoherencias permitidas entre la primera lectura del índice y la secuencia de índice. Los valores pueden ser 0, 1 o 2. El valor predeterminado es 1.

Campo	Necesario	Descripción
BarcodeMismatchesIndex2	No	El número de incoherencias permitidas entre la segunda lectura del índice y la secuencia de índice. Los valores pueden ser 0, 1 o 2. El valor predeterminado es 1.
FastqCompressionFormat	No	Para generar archivos FASTQ en formato *.gz, introduzca <code>gzip</code> . Para guardar archivos FASTQ en formato *.ora y utilizar la descompresión en DRAGEN, introduzca <code>dragen</code> .
AdapterRead1	No	La secuencia que se recortará o enmascarará desde el final de Lectura 1. Secuencia del adaptador de Lectura 1 que contiene A, C, G o T. AdapterRead1 recorta los ciclos de manera predeterminada.
AdapterRead2	No	La secuencia que se recortará o enmascarará desde el final de Lectura 2. Secuencia del adaptador de Lectura 2 que contiene A, C, G o T. AdapterRead2 recorta los ciclos de manera predeterminada.
OverrideCycles	No	Cadena utilizada para especificar ciclos UMI y desenmascarar ciclos de una lectura. Se permiten los siguientes valores: <ul style="list-style-type: none"> • N: especifica los ciclos a ignorar. • Y: especifica los ciclos de secuenciación. • I: especifica los ciclos de indexado. • U: especifica los ciclos UMI a recortar. Cada elemento se separa con punto y coma. A continuación, tiene ejemplos de entradas de OverrideCycles. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Estos son los campos y descripciones de [BCLConvert_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos, guiones y guiones bajos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion o un guion bajo. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515.
Index	No	La secuencia de índice asociada con la muestra. Solo se permiten A, C, T y G. Obligatorio cuando se secuencia más de una muestra.
Index2	No	La segunda secuencia de índice asociada con la muestra. Solo se permiten A, C, T y G. Asegúrese de que las secuencias del adaptador del segundo índice (i5) estén en dirección de avance. DRAGEN complementa inversamente los índices i5 de manera automática durante el análisis secundario.
Lane	No	El carril de la celda de flujo. Los carriles se representan mediante un valor entero.

Configuración de las hojas de muestras de DRAGEN

En esta sección se describen los requisitos de la hoja de muestras para cada proceso de DRAGEN. Añada su configuración del proceso de DRAGEN como la última sección de su hoja de muestras. Solo puede usar un proceso de DRAGEN.

Cada proceso de DRAGEN incluye secciones independientes para la configuración y los datos.

Requisitos del proceso DRAGEN Germline

Estos son los campos y descripciones de [DragenGermline_Settings] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7. La versión del software debe coincidir con la versión especificada en la sección BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sí	El nombre del genoma de referencia. Por ejemplo, hg19_alt_aware. Utilice el nombre del genoma de referencia de <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar un genoma de referencia personalizado, consulte la <i>Ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0</i> .
MapAlignOutFormat	No	El formato del archivo de resultados. Los valores permitidos son bam o cram. Si no se especifica ningún valor, no hay ningún valor predeterminado.
KeepFastq	No	Para guardar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>true</code> (verdadero). Para eliminar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>false</code> (falso).

Estos son los campos y descripciones de [DragenGermline_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515. Los ID de muestra deben coincidir con los ID especificados en la sección BCLConvert_Data.

Requisitos del proceso DRAGEN RNA

Estos son los campos y descripciones de [DragenRNA_Settings] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7. La versión del software debe coincidir con la versión especificada en la sección BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sí	El nombre del genoma de referencia. Por ejemplo, hg38_noalt_with_decoy. Utilice el nombre del genoma de referencia de <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar un genoma de referencia personalizado, consulte la <i>Ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile	No	El archivo que contiene anotaciones genéticas de ARN. Solo se permiten caracteres alfanuméricos. Si no se suministra, se utiliza el archivo de anotaciones predeterminado incluido en el genoma de referencia especificado.
MapAlignOutFormat	No	El formato del archivo de resultados. Los valores permitidos son bam o cram. Si no se especifica ningún valor, no hay ningún valor predeterminado.
KeepFastq	No	Para guardar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>true</code> (verdadero). Para eliminar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>false</code> (falso).
DifferentialExpressionEnable	No	Para habilitar la expresión genética diferencial, escriba <code>true</code> (verdadero). Escriba <code>false</code> (falso) para excluir expresiones genéticas diferenciales del análisis.

Estos son los campos y descripciones de [DragenRna_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515. Los ID de muestra deben coincidir con los ID especificados en la sección BCLConvert_Data.
Comparison<N>	No	El valor de control o comparación para cada muestra. En caso de que no haya ningún valor de control o comparación para la muestra, a la muestra se le asigna <i>na</i> . Todas las muestras marcadas con control se comparan con todas las muestras marcadas con comparación. El valor de <i>N</i> refleja el grupo de comparación de las muestras.

Requisitos del proceso DRAGEN Enrichment

Estos son los campos y descripciones de [DragenEnrichment_Settings] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7. La versión del software debe coincidir con la versión especificada en la sección BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sí	El nombre del genoma de referencia. Por ejemplo, hg38_alt_aware. Los genomas de referencia se encuentran en <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar un genoma de referencia personalizado, consulte la <i>Ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0</i> .

Campo	Necesario	Descripción
BedFile	Sí	El archivo *.bed que contiene las regiones a las que se dirigirá.
GermlineOrSomatic	Sí	Para realizar un análisis de enriquecimiento germinal, escriba <code>germline</code> . Para realizar un análisis de enriquecimiento somático, escriba <code>somatic</code> .
KeepFastq	No	Para guardar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>true</code> (verdadero). Para eliminar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	No	El formato del archivo de resultados. Los valores permitidos son <code>bam</code> o <code>cram</code> . Si no se especifica ningún valor, no hay ningún valor predeterminado.
AuxNoiseBaselineFile	No	El nombre del archivo de referencia de ruido. Puede emplear el formato de archivo *.txt o *.gz. Los archivos de referencia de ruido solo están disponibles durante el modo somático. Consulte Import Noise Baseline Files (Importar archivos de referencia de ruido) en la página 19 para obtener más información.

Estos son los campos y descripciones de [DrogenEnrichment_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515. Los ID de muestra deben coincidir con los ID especificados en la sección BCLConvert_Data.

Requisitos del proceso de amplicones de ADN de DRAGEN

Estos son los campos y descripciones de [DragenAmplicon_Settings] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7. La versión del software debe coincidir con la versión especificada en la sección BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sí	El nombre del genoma de referencia. Por ejemplo, hg38_alt_aware. Los genomas de referencia se encuentran en <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar un genoma de referencia personalizado, consulte la <i>Ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0</i> .
DnaBedFile	Sí	El archivo *.bed que contiene las regiones a las que se dirigirá. El archivo *.bed puede introducirse en formato de archivo *.txt o *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Sí	Para realizar un análisis germinal de amplicones de ADN, escriba <code>germline</code> (germinal). Para realizar un análisis somático de amplicones de ADN, escriba <code>somatic</code> (somático).
KeepFastq	No	Para guardar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>true</code> (verdadero). Para eliminar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	No	El formato del archivo de resultados. Los valores permitidos son <code>bam</code> o <code>cram</code> . Si no se especifica ningún valor, no hay ningún valor predeterminado.

Estos son los campos y descripciones de [DragenAmplicon_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515. Los ID de muestra deben coincidir con los ID especificados en la sección BCLConvert_Data.
DnaOrRna	Sí	El tipo de análisis de amplicones que se va a realizar. Solo DRAGEN v3.8. permite realizar análisis de ADN. Escriba <code>dna</code> .

Requisitos del proceso DRAGEN Single Cell RNA

Estos son los campos y descripciones de [DragenSingleCellRNA_Settings] disponibles. Para obtener información sobre la compatibilidad de terceros, consulte la página de asistencia acerca de la compatibilidad de los productos de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT.

Kit 1-5 de bibliotecas de células únicas

Los siguientes ajustes de la hoja de muestras se aplican a los kits de preparación de bibliotecas con la misma estructura genética que los kits 1-5 de bibliotecas de células únicas de DRAGEN. Utilice la página de asistencia acerca de la compatibilidad de los productos de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT para confirmar la estructura genética de su kit.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7. La versión del software debe coincidir con la versión especificada en la sección BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sí	El nombre del genoma de referencia. Por ejemplo, hg38_alt_aware. Los genomas de referencia se encuentran en <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar un genoma de referencia personalizado, consulte la <i>Ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	No	Introduzca uno de los valores siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • SF: Stranded forward (cadena directa). SF es el valor predeterminado. • SR: Stranded reverse (cadena inversa). • U: Unstranded (sin cadena).
RnaGeneAnnotationFile	No	El archivo que contiene anotaciones genéticas de ARN. Solo se permiten caracteres alfanuméricos. Si no se suministra, se utiliza el archivo de anotaciones predeterminado incluido en el genoma de referencia especificado.
BarcodeRead	No	La ubicación dentro del experimento de secuenciación del código de barras leído, que contiene tanto el código de barras como los UMI. Los valores pueden contener <code>Read1</code> (Lectura 1) o <code>Read2</code> (Lectura 2). El valor predeterminado es <code>Read1</code> (Lectura 1).

Campo	Necesario	Descripción
BarcodePosition	Sí	<p>La ubicación de las bases que corresponden al código de barras en el valor introducido para BarcodeRead. Las posiciones de las bases se indexan empezando por la posición cero. Introduzca el valor BarcodePosition en el siguiente formato:</p> <p>0_<posición final del código de barras></p> <p>Por ejemplo, si un código de barras contiene 16 bases, el valor es 0_15.</p>
UmiPosition	Sí	<p>La ubicación de las bases que corresponden al UMI en el valor introducido para BarcodeRead. Introduzca el valor UmiPosition en el siguiente formato:</p> <p><Posición de inicio de UMI>_<posición final de UMI></p> <p>Por ejemplo, si el UMI contiene 10 bases y el código de barras contiene 16, el valor es 16_25.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	No	<p>El nombre del archivo que contiene las secuencias del código de barras para incluir. El nombre del archivo solo puede contener caracteres alfanuméricos, guiones, guiones bajos y puntos.</p>
KeepFastq	No	<p>Para guardar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>true</code> (verdadero). Para eliminar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>false</code> (falso).</p>
MapAlignOutFormat	No	<p>El formato del archivo de resultados. Los valores permitidos son <code>bam</code> o <code>cram</code>. Si no se especifica ningún valor, no hay ningún valor predeterminado.</p>

Estos son los campos y descripciones de [DraGenSingleCellRNA_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515. Los ID de muestra deben coincidir con los ID especificados en la sección BCLConvert_Data.

Kit 6 de bibliotecas de células únicas

Los ajustes de la hoja de muestras que se indican a continuación se aplican a los kits de preparación de bibliotecas con la misma estructura genética que los kits 6 de bibliotecas de células únicas de DRAGEN. Utilice la página de asistencia acerca de la compatibilidad de los productos de la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT para confirmar la estructura genética de su kit.

Campo	Necesario	Descripción
SoftwareVersion	Sí	La versión del software DRAGEN instalada actualmente en el sistema. Utilice los tres números enteros incluidos en el nombre de la versión. Por ejemplo, 3.5.7. La versión del software debe coincidir con la versión especificada en la sección BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sí	El nombre del genoma de referencia. Por ejemplo, hg38_alt_aware. Los genomas de referencia se encuentran en <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar un genoma de referencia personalizado, consulte la <i>Ayuda en línea de la aplicación Reference Builder para Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	No	Introduzca uno de los valores siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • SF: Stranded forward (cadena directa). • SR: Stranded reverse (cadena inversa). • U: Unstranded (sin cadena).
RnaGeneAnnotationFile	No	El archivo que contiene anotaciones genéticas de ARN. Solo se permiten caracteres alfanuméricos. Si no se suministra, se utiliza el archivo de anotaciones predeterminado incluido en el genoma de referencia especificado.
BarcodeRead	No	La ubicación dentro del experimento de secuenciación del código de barras leído, que contiene tanto el código de barras como los UMI. Los valores pueden contener <code>Read1</code> (Lectura 1) o <code>Read2</code> (Lectura 2). El valor predeterminado es <code>Read1</code> (Lectura 1).

Campo	Necesario	Descripción
BarcodePosition	Sí	<p>La ubicación de las bases que corresponden a los códigos de barras en el valor introducido para BarcodeRead. Las posiciones de las bases se indexan empezando por la posición cero. Introduzca el valor BarcodePosition en el siguiente formato:</p> <p>0_<primera posición final del código de barras>+<segunda posición de inicio del código de barras>_<segunda posición final del código de barras>+<tercera posición de inicio del código de barras>_<tercera posición final del código de barras></p> <p>Por ejemplo, la estructura siguiente daría lugar a un valor 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 bases en el primer código de barras (0_8). • 12 bases entre el primer y el segundo código de barras. • 9 bases en el segundo código de barras (21_29). • 13 bases entre el segundo y el tercer código de barras. • 9 bases en el tercer código de barras (43_51).
UmiPosition	Sí	<p>La ubicación de las bases que corresponden al UMI en el BarCodeRead especificado. Introduzca la secuencia de caracteres en el siguiente formato:</p> <p><Posición de inicio de UMI>_<posición final de UMI></p> <p>Por ejemplo, si el UMI contiene 8 bases y el número de bases previas al UMI suma un total de 51, el valor es 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	No	<p>El nombre del archivo que contiene la secuencia del código de barras para la lista blanca. El nombre del archivo solo puede contener caracteres alfanuméricos, guiones, guiones bajos y puntos.</p>

Campo	Necesario	Descripción
KeepFastq	No	Para guardar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>true</code> (verdadero). Para eliminar archivos de resultados FASTQ, escriba <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	No	El formato del archivo de resultados. Los valores permitidos son <code>bam</code> o <code>cram</code> . Si no se especifica ningún valor, no hay ningún valor predeterminado.

Estos son los campos y descripciones de [DragenSingleCellRNA_Data] disponibles.

Campo	Necesario	Descripción
Sample_ID	Sí	ID de la muestra. El ID de muestra puede contener un máximo de 20 caracteres alfanuméricos. El ID distingue entre mayúsculas y minúsculas. Separe cada identificador con un guion. Por ejemplo, Muestra1-DQB1-022515. Los ID de muestra deben coincidir con los ID especificados en la sección BCLConvert_Data.

Secuenciación mediante ciclo sin etiquetar

En esta sección se describe el uso de la secuenciación mediante ciclo sin etiquetar en la fórmula.

La secuenciación mediante ciclo sin etiquetar se utiliza tan solo para completar los pasos del proceso químico de un ciclo de secuenciación. Consulte la página [Compatible Products \(Productos compatibles\)](#) para su kit de preparación de bibliotecas en el [sitio de asistencia de Illumina](#) para saber si se requiere la secuenciación mediante ciclo sin etiquetar.

Siga los pasos siguientes para la secuenciación mediante ciclo sin etiquetar.

Edición del archivo de la fórmula

1. Descargue el archivo XML de la fórmula del [sitio de asistencia de Illumina](#).
2. Edite el archivo XML de la fórmula.
 - a. Identifique la sección correspondiente del protocolo en función de su configuración de lectura del índice y de secuenciación de índice. Hay seis posibles protocolos diferentes por fórmula personalizada que se pueden editar.
Por ejemplo, el protocolo para una Lectura 1 única sin configuración de secuenciación de índice sería `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
 - b. Antes de `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` y `<ReadRef ReadName="Read 2"/>`, introduzca el siguiente paso de ciclo sin etiquetar en una nueva línea.

```
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />.
```

- c. Introduzca el paso de ciclo sin etiquetar en una nueva línea para cada ciclo sin etiquetar requerido.

3. Guarde el archivo XML de la fórmula.

A continuación, se muestra una fórmula de muestra con ciclo sin etiquetar:

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Transfer" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obdd ChemistryName="Library Denaturation and Dilution" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obcg ChemistryName="Cluster Generation" />
  <ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Read Prep" />
  <DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
  <ReadRef ReadName="Read 1" />
  <SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
</Protocol>
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="2min 60C Vacuum Hold" />
  ...
```

Adición de la fórmula al experimento

- 1 En Run Setup (Configuración del experimento) en el software de control, seleccione **Choose** (Elegir) en Custom Recipe (Fórmula personalizada).
- 2 Navegue al archivo XML actualizado de la fórmula.
- 3 Seleccione **Open** (Abrir).
4. Vuelva a [Inicio de un experimento de secuenciación en la página 49](#) (Inicio de un experimento de secuenciación).

Índice alfabético

%

% de PF 63

A

actualizaciones automáticas 80
actualizaciones manuales de software 80
adquisición de imágenes 58-59
advertencias 6, 88
alertas 80
algoritmo Phred 64
alimentación de CA
 entrada 4
alineación de especificaciones 88
almohadillas 30
amplificación 8
análisis
 basado en nube 1
 de imágenes 5
 local 1
 métodos 5, 9
apagar 88
archivos BCL 6
archivos CBCL 63
archivos de filtro 58, 65
archivos de llamada de bases 9, 58, 65
archivos de registro 59
archivos InterOp 58, 65
asignación de nombres
 nombre del instrumento 21
asignar nombre
 nombre del instrumento 21
asistencia al cliente 114
Asistencia de Illumina Proactive 14
ausencia de llamadas 61-62
ayuda
 técnica 114

B

bandeja para gotas
 almohadillas 30
barra de estado 3
barra de luz 3
BaseSpace Sequence Hub 1
 configuración 14
 documentación 14
bcl2fastq2 58
bibliotecas
 desnaturalizar 8
botón de encendido 3, 88

C

cable de alimentación 4
cable Ethernet 4
calidad de datos 63
cámaras 59
canal rojo 62
canal verde 62
carpeta de resultados 53, 80
carpeta de resultados predeterminada 53
carpeta del experimento 80
carriles 59
cartucho
 orientación de carga 55
CE 58
ciclo de apagado y encendido 86
ciclos adicionales 33
ciclos de lectura 33
compartimento de consumibles 3
comprobaciones del sistema 86
conexión a internet 14
configuración de audio 21
configuración de sonido 21
configuración del experimento
 ejemplos 33
configuración predeterminada de fábrica 90-91

consumibles
lectura 55
seguimiento 1
Control PhiX v3 29
conversión a FASTQ 58

D

datos de rendimiento 14
datos de rendimiento del instrumento 14
degradar versión de software 90-91
denominación
nombre de ordenador 6
desnaturalizar 8
diluir bibliotecas 8
dirección IP 6
disco duro 6, 80
documentación 114
documentación técnica 64
dominio privado 14
dominios 14

E

eliminar experimentos 6, 80
errores 6, 88
mensajes 86
probabilidad 63-64
espacio del disco 80
espacio en disco 6
especificaciones del congelador 31
especificaciones del refrigerador 31
estado de experimento 6
experimentos
métricas 58

F

fallos de registro 61
fechas de caducidad 84
filtrado de grupos 63
filtro de castidad 63

filtros de aire
repuestos 30
ubicación 84
fórmulas 80
fragmentos de fórmula 6

G

garantía 30
generación de plantillas 61

H

hebra retrasada y hebra adelantada 61

I

iconos 6
imágenes 58
índice
ciclos 33
inicialización 89
fallo 88
instalador del paquete del sistema 80
instalar software 80
intensidades de grupos 61
interruptor de alimentación 4, 88

K

kit de pruebas 30
kits 29
números de catálogo 30

L

lectura única 53
llamadas de bases 5
Local Run Manager 5
longitudes de lectura 33

M

miniaturas 65

modificar parámetros del experimento 53
monitor 3
motor informático 58
movimiento 4

N

nanopocillos 61
nombre de ordenador 6
nucleótidos 62
numeración de placas 60
numeración de superficies 60
número de serie 6
números de catálogo 29
números de ciclo 33

P

páginas de asistencia 80
paired-end 53
paquete de software 1, 5
parámetros del experimento
 modificar 53
pérdida de conexión 88
PhiX 30
 alineación 58
placas 58
primera configuración 84, 90-91
problemas técnicos, asistencia 114
Process Management 80
puertas
 cerrar 55
puerto Ethernet 4
puertos USB 4
puntuaciones Q 63-64

R

ratón 4
Reactivos NextSeq 1000/2000 29
recuento de experimentos 6
registros de errores 59
reiniciar 90-91

repuestos 84
RunInfo.xml 65
rutas UNC 53

S

sectores 59-60
secuenciación de dos canales 62
seguimiento de consumibles 1
Servicio de copia universal 5, 80
sistema operativo 89
sobrenombre 21
software
 alertas de actualizaciones 23
 degradar versión 90-91
 instalar 80
superan el filtro (PF) 63
suscripción Enterprise 14
Sustitución del RSB 29

T

tablas de calidad 64
tamaño del experimento 80
tampón de resuspensión 29
teclados 4
toallitas con lejía 30
toallitas humedecidas en alcohol 30

U

ubicación de alojamiento 14
ubicación de servidor 14
ubicaciones de grupos 58, 65
unidad D 80
unidades asignadas 53

V

valores de intensidad 61
ventiladores 84
Visor del análisis de secuenciación 58, 61

W

Windows

inicio de sesión 89

Asistencia técnica

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

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

Números del servicio de asistencia técnica de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Internacional
Alemania	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Australia	+61 1800 775 688	
Austria	+43 800 006249	+43 1 9286540
Bélgica	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Canadá	+1 800 809 4566	
China		+86 400 066 5835
Corea del Sur	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
España	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Estados Unidos	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Filipinas	+63 180016510798	
Finlandia	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Francia	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Hong Kong (China)	+852 800 960 230	
India	+91 8006500375	
Indonesia		0078036510048
Irlanda	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italia	+39 800 985513	+39 236003759
Japón	+81 0800 111 5011	
Malasia	+60 1800 80 6789	
Noruega	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nueva Zelanda	+64 800 451 650	

Región	Teléfono gratuito	Internacional
Países Bajos	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Reino Unido	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Singapur	1 800 5792 745	
Suecia	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Suiza	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Tailandia	+66 1800 011 304	
Taiwán (China)	+886 8 06651752	
Vietnam	+84 1206 5263	

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 (EE. UU.)

+ 1 800 809 ILMN (4566)

+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

illumina®