

NextSeq 1000 e 2000

Manual de sequenciação do sistema

PROPRIEDADE DA ILLUMINA

Documento n.º 1000000109376 v04 POR

Abril de 2021

Apenas para efeitos de investigação. Não se destina a utilização em procedimentos de diagnóstico.

Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas ("Illumina") e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produtos descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produtos aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produtos.

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LER INTEGRALMENTE E SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NOS PRODUTOS, LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AOS PRODUTOS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Histórico de revisões

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v04	Abril de 2021	Adição de instruções para importar ficheiros de linha de base. Adição do fluxo de trabalho DRAGEN DNA Amplicon. Adição de funcionalidades para o Software de controlo NextSeq 1000/2000v1.3. Adição de informações para selecionar um servidor proxy. Atualização da temperatura de armazenamento e envio de RSB com Tween 20. Atualização do fluxo de trabalho DRAGEN RNA para incluir a expressão de gene diferencial. Atualização da estrutura da pasta de saída de sequenciação. Atualização das recomendações de formatação da folha de amostra v2.
1000000109376 v03	Novembro de 2020	Correção dos números de catálogo. Adição de informações para adicionar novos utilizadores.

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v02	Outubro de 2020	<p>Adição do Kit de reagentes NextSeq 1000/2000 P3.</p> <p>Adição do fluxo de trabalho DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Adição do fluxo de trabalho DRAGEN Enrichment.</p> <p>Adição de opções de compressão FASTQ.</p> <p>Adição de instruções para instalar o pipeline DRAGEN e atualizações de licença.</p> <p>Adição de instruções para importar genomas de referência personalizados.</p> <p>Atualização do volume de carregamento e das concentrações para tipos de bancos.</p> <p>Atualização das instruções de diluição de bancos.</p> <p>Adição de instruções para purgar automaticamente o cartucho de reagente.</p> <p>Atualização das informações sobre o número de ciclos suportado.</p> <p>Atualização das opções de personalização do instrumento.</p> <p>Atualização das instruções de configuração de ensaios do instrumento.</p> <p>Atualização da estrutura da pasta de sequenciação DRAGEN.</p> <p>Adição de informações sobre os relatórios de CQ DRAGEN.</p> <p>Adição de informações sobre a remoção dos genomas de referência personalizados da unidade de disco rígido.</p> <p>Adição de informações sobre a realização das verificações do sistema.</p> <p>Atualização das definições da folha de amostra v2.</p>

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v01	Junho de 2020	<p>Atualização das descrições de software para o Software de controlo NextSeq 1000/2000.</p> <p>Esclarecimento da distinção entre o modo Cloud, Híbrido, Local e Autónomo ao longo do guia.</p> <p>Atualização das instruções de armazenamento e descongelação do cartucho.</p> <p>Atualização das informações sobre o número de ciclos suportado.</p> <p>Atualização das instruções para configurar a análise secundária.</p> <p>Atualização dos números de catálogo do kit de reagentes.</p> <p>Atualização do diagrama do protocolo de sequenciação.</p> <p>Atualização das instruções para especificar uma unidade de rede como a pasta de saída predefinida.</p> <p>Atualização da tabela de tipos de bancos suportados.</p> <p>Adição de instruções para importar um genoma de referência personalizado.</p> <p>Adição de instruções para configurar um ensaio utilizando um kit de indexação personalizada e kit personalizado para preparação de bancos.</p> <p>Atualização dos requisitos de conta de utilizador e palavra-passe.</p> <p>Adição de detalhes sobre a estrutura da pasta de saída DRAGEN.</p> <p>Esclarecimento das instruções para drenar reagentes usados do cartucho.</p> <p>Adição de informações contextuais sobre a tabela de qualidade.</p> <p>Atualização das instruções sobre a instalação de atualizações do software de controlo.</p> <p>Adição de instruções sobre como recolocar um ensaio em fila de espera.</p> <p>Adição de instruções sobre a atualização dos pipelines DRAGEN e da licença.</p>

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v01	Junho de 2020	Adição de instruções de personalização do instrumento. Atualização das ilustrações para refletir a nova rotulagem. Alteração de porta para visor ao longo de todo o guia. Adição da descrição das duas portas Ethernet.
1000000109376 v00	Março de 2020	Edição inicial.

Índice

Descrição geral do sistema	1
Recursos adicionais	2
Hardware do instrumento	3
Software integrado	5
Gestão de processos	6
Diagrama do protocolo de sequenciação	8
Como funciona a sequenciação	8
Configuração do sistema	11
Requisitos da conta do utilizador	11
Configurar o Hub de Sequências BaseSpace e o Suporte proativo	13
Especificar a localização predefinida da pasta de saída	15
Importar genomas de referência personalizados	18
Importar ficheiros de linha de base de ruído	19
Configurar o Run Mode (Modo de ensaio)	20
Personalização do instrumento	21
Consumíveis e equipamento	24
Consumíveis de sequenciação	24
Consumíveis auxiliares	28
Equipamento auxiliar	29
Protocolo	31
Considerações sobre a sequenciação	31
Planear um ensaio de sequenciação no Hub de Sequências BaseSpace	33
Descongelar o cartucho acondicionado e a célula de fluxo	41
Diluir bancos	44
Carregar consumíveis no cartucho	46
Iniciar um ensaio de sequenciação	48
Saída de sequenciação	57
Descrição geral do Real-Time Analysis	57
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis	59
Ficheiros de saída da sequenciação	63
Ficheiros de saída da análise secundária DRAGEN	64
Estrutura da pasta de saída da análise secundária DRAGEN	74
Manutenção	78
Limpar o espaço no disco rígido	78
Atualizações de software	78
Fluxo de trabalho DRAGEN e atualizações da licença	80

Substituir o filtro de ar	82
Resolução de problemas	84
Resolução de mensagens de erro	84
Voltar a armazenar os consumíveis	85
Cancelar um ensaio	85
Recolocar um ensaio em fila de espera	86
Ciclo de inicialização do instrumento	86
Executar uma verificação do sistema	87
Restaurar para as definições de fábrica	88
Capturar a imagem instalada	88
Restaurar imagem capturada	89
Recursos e referências	90
Definições da folha de amostra v2	90
Sequenciação de Dark Cycle	106
Index	108
Assistência técnica	112

Descrição geral do sistema

O Sistema de sequenciação Illumina® NextSeq™ 1000 e o Sistema de sequenciação Illumina® NextSeq™ 2000 permitem uma abordagem específica à NGS¹. Este sistema focado em aplicações transforma a tecnologia de sequenciação da Illumina num instrumento de secretária acessível, que oferece as seguintes funcionalidades:

- **Acessibilidade e fiabilidade** — O NextSeq 1000/2000 apresenta a análise DRAGEN local e integra a desnaturação e a diluição. Está integrado um módulo de aquisição de imagens no sistema e estão integrados componentes fluídicos no consumível, simplificando a manutenção do instrumento.
- **Carregamento de consumíveis em passo único** — Um cartucho de utilização única é cheio previamente com todos os reagentes necessários para um ensaio. O banco e a célula de fluxo são diretamente introduzidos no cartucho, que é depois carregado no instrumento. A identificação integrada permite um controlo preciso.
- **Software do NextSeq 1000/2000** — Um conjunto de software integrado controla as operações do instrumento, processa imagens e gera identificações de bases.
 - **Modo Cloud** — Planeie o seu ensaio com a Configuração do ensaio no instrumento no Hub de Sequências BaseSpace. O fluxo de trabalho de análise selecionado é iniciado automaticamente na cloud. Os dados do ensaio e os resultados da análise também são disponibilizados na cloud.
 - **Modo Híbrido** — Planeie o seu ensaio com a Configuração do ensaio no instrumento no Hub de Sequências BaseSpace. O fluxo de trabalho da análise selecionada é depois iniciado através da plataforma DRAGEN presente no instrumento.
 - **Modo Local** — Planeie o seu ensaio localmente no formato de ficheiro de folha de amostra v2. O fluxo de trabalho da análise selecionada é iniciado automaticamente através da plataforma DRAGEN presente no instrumento.
 - **Modo Autónomo** — Planeie o seu ensaio sem uma folha de amostra.

Esta secção fornece uma descrição geral do sistema, incluindo informações sobre o hardware, o software e a análise de dados. Também reúne conceitos-chave e terminologia presentes na documentação. Para obter as especificações detalhadas, as folhas de dados, as aplicações e os produtos relacionados, consulte a [página de produtos dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#) no website da Illumina.

¹Next generation sequencing (sequenciação de nova geração)

Recursos adicionais

As [páginas de suporte dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#) no website da Illumina fornecem recursos adicionais do sistema. Estes recursos incluem software, formação, produtos compatíveis e a seguinte documentação. Consulte sempre as páginas de suporte para obter as versões mais recentes.

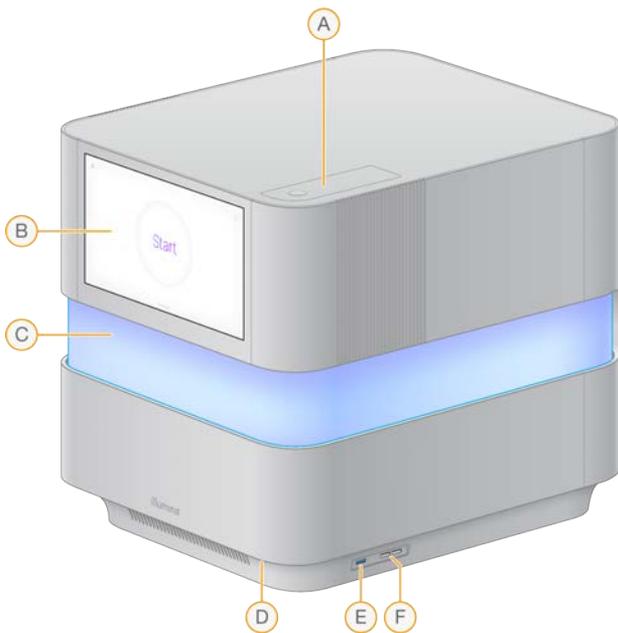
Recurso	Descrição
Seletor de protocolo personalizado	Uma ferramenta para gerar instruções completas adaptadas ao método de preparação de bancos, parâmetros de execução e método de análise, com opções para aperfeiçoar o nível de detalhes.
<i>Guia de Conformidade e Segurança do Sistema de Sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000 (documento n.º 1000000111928)</i>	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e etiquetas do instrumento.
<i>Manual de Conformidade do Módulo do Leitor RFID (documento n.º 1000000002699)</i>	Fornecer informações sobre o leitor RFID no instrumento, certificações de conformidade e considerações de segurança.
<i>Guia de desnaturação e diluição de bancos NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)</i>	Apresenta instruções para a desnaturação e a diluição manual dos bancos preparados para um ensaio de sequenciação e para a preparação do controlo PhiX opcional.
<i>Guia de primers personalizados do sistema de sequenciação NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 10000000133551)</i>	Apresenta informações sobre a substituição dos primers de sequenciação Illumina por primers de sequenciação personalizados.
<i>Guia de Preparação do Centro Clínico do Sistema de Sequenciação NextSeq 2000 (documento n.º 1000000109378)</i>	Apresenta especificações de espaço no laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais e de rede.
<i>Ajuda do BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Fornecer informações sobre a utilização do BaseSpace™ Sequence Hub e das opções de análise disponíveis.

Recurso	Descrição
<i>Guia de Pooling de Adaptadores de Índice</i> (documento n.º 1000000041074)	Fornecer as diretrizes de pooling e estratégias de indexação dupla.
<i>Sequências do Adaptador Illumina</i> (documento n.º 1000000002694)	Fornecer listas das sequências do adaptador para os kits de preparação de bancos Illumina.

Hardware do instrumento

Os Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000 são compostos por um botão de alimentação, monitor, barra de estado, compartimento de consumíveis e portas USB.

Figura 1 Componentes do sistema externo



- A. **Compartimento do filtro de ar** — Permite o acesso ao filtro de ar substituível.
- B. **Monitor tátil** — Permite a configuração no instrumento através da interface do software de controlo.
- C. **Barra de estado** — A cor da luz progride à medida que o sistema avança no seu fluxo de trabalho. Azul e roxo indicam a interatividade (por ex., verificações pré-ensaio) e várias cores indicam momentos importantes e dados (por ex., a conclusão da sequenciação). Os erros críticos são indicados por uma luz vermelha.
- D. **Botão de alimentação** — Controla a alimentação do instrumento e indica se o sistema está ligado (brilha), desligado (escuro) ou desligado com a alimentação de CA (pulsa).

- E. **Porta USB 3.0** — Para ligar uma unidade portátil externa para a transferência de dados.
- F. **Portas USB 2.0** — Para ligar um rato e teclado.

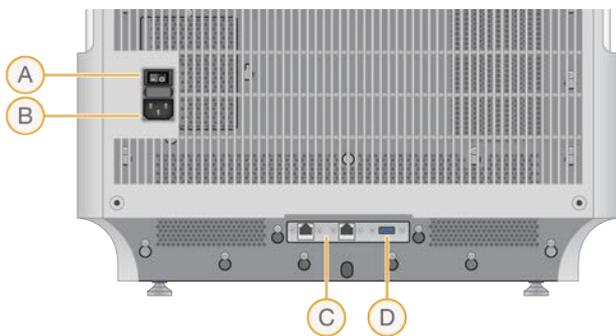
Alimentação e ligações auxiliares

Pode mover cuidadosamente o instrumento para aceder ao interruptor de alimentação, à porta USB e a outras ligações auxiliares na parte traseira do instrumento.

Na parte traseira do instrumento, encontra-se o interruptor e a entrada que controla a alimentação do instrumento, e encontram-se também duas portas Ethernet para uma ligação Ethernet opcional. Uma porta USB 3.0 permite ligar uma unidade portátil externa para a transferência de dados (exFAT não é suportado nesta plataforma com base em Linux).

Os Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000 são fornecidos com duas portas Ethernet para expandir a capacidade e a flexibilidade do sistema. Por exemplo, uma porta Ethernet pode ser dedicada à comunicação com uma unidade de rede interna e a outra porta dedicada à comunicação externa, como ao Hub de Sequências BaseSpace ou Suporte proativo.

Figura 2 Componentes do painel posterior

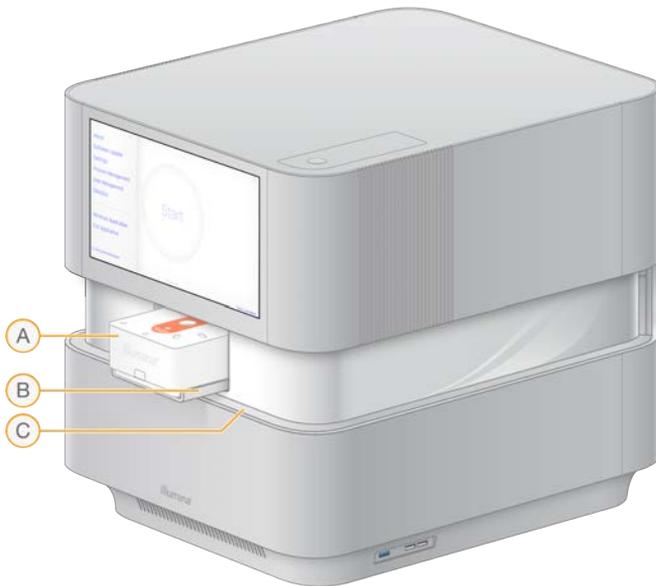


- A. **Interruptor** — Ligar e desligar o instrumento.
- B. **Entrada de alimentação** — Ligação do cabo de alimentação.
- C. **Portas Ethernet (2)** — Ligação de cabo Ethernet opcional.
- D. **Porta USB 3.0** — Para ligar uma unidade rígida externa para a transferência de dados.

Compartimento de consumíveis

O compartimento de consumíveis contém o cartucho, incluindo a célula de fluxo e o banco diluído, para um ensaio de sequenciação.

Figura 3 Compartimento de consumíveis carregado



- A. **Cartucho** — Contém a célula de fluxo, o banco e os reagentes, e recolhe os reagentes usados durante o ensaio.
- B. **Tabuleiro** — Suporta o cartucho durante a sequenciação.
- C. **Visor** — Abre para fornecer acesso ao compartimento de consumíveis.

Software integrado

O conjunto do software do sistema inclui aplicações integradas que executam ensaios de sequenciação e análise.

- **Software de controlo NextSeq 1000/2000** — Controla as operações do instrumento e fornece uma interface para configurar o sistema, configurar um ensaio de sequenciação e monitorizar estatísticas de ensaio à medida que a sequenciação avança.
- **Real-Time Analysis (RTA3)** — Executa uma análise de imagem e de identificação de bases durante o ensaio. Para obter mais informações, consulte [Saída de sequenciação na página 57](#).
- **Universal Copy Service** — Copia os ficheiros de sequenciação de saída da pasta do ensaio para o Hub de Sequências BaseSpace (se aplicável) e para a pasta de saída, onde pode aceder aos mesmos.

O software de controlo é interativo e executa processos automatizados em segundo plano.

O Real-Time Analysis e o Universal Copy Service executam apenas processos em segundo plano.

Informações do sistema

Selecione o menu do software de controlo no canto superior esquerdo para abrir a secção About (Acerca de). A secção About (Acerca de) contém as informações de contacto da Illumina e as seguintes informações do sistema:

- Número de série do instrumento
- Nome do computador
- Versão do conjunto do sistema
- Versão do sistema operativo de imagem
- Contagem total de ensaios

Notificações e alertas

O ícone de notificação está localizado no canto superior direito. Quando ocorre um aviso ou um erro, o painel direito desliza para fora para sinalizar as notificações. Selecione o ícone em qualquer altura para ver uma lista das notificações atuais ou o histórico de notificações para avisos e erros.

- Os avisos requerem atenção, mas não interrompem um ensaio nem requerem ações além da confirmação.
- Os erros requerem ações antes de iniciar ou continuar um ensaio.

Minimizar o software de controlo

Minimize o software de controlo para aceder a outras aplicações. Por exemplo, para aceder à pasta de saída do Explorador de ficheiros ou procurar uma folha de amostra.

1. No menu do software de controlo, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicação). O software de controlo é minimizado.
2. Para maximizar o software de controlo, selecione **NextSeq 1000/2000 Control Software** (Software de controlo NextSeq 1000/2000) na barra de ferramentas.

Gestão de processos

O ecrã Process Management (Gestão de processos) apresenta os ensaios temporários que são armazenados em `/usr/local/illumina/runs`. Cada ensaio é identificado pela data do ensaio, nome e ID. Determinadas informações, como o estado do ensaio, a análise secundária, a pasta de saída e a cloud, também são apresentadas para cada ensaio. Selecione o ensaio para visualizar informações adicionais, incluindo o fluxo de trabalho, % Q30 média, o total de leituras PF e a produção total. Para eliminar ensaios e libertar espaço, consulte [Limpar o espaço no disco rígido na página 78](#). Para recolocar a análise no instrumento em fila de espera, consulte [Recolocar um ensaio em fila de espera na página 86](#).

Estado do ensaio

Esta secção apresenta o estado do ensaio de sequenciação:

- **In Progress** (Em curso) — O ensaio de sequenciação está em curso.
- **Complete** (Concluído) — O ensaio de sequenciação está concluído.
- **Stopped** (Parado) — O ensaio de sequenciação foi parado.
- **Errored**(Com erro) — O ensaio de sequenciação tem um erro.

Estado da análise secundária

Esta secção apresenta o estado da análise secundária DRAGEN no instrumento. Irá apresentar N/A se a análise for realizada no Hub de Sequências BaseSpace.

- **Not Started** (Não iniciada) — A análise DRAGEN ainda não iniciou.
- **In Progress** (Em curso)—A análise DRAGEN está em curso.
- **Stopped** (Parada)—A análise DRAGEN foi parada.
- **Errored** (Com erro)—A análise DRAGEN tem um erro.
- **Complete** (Concluída)—A análise DRAGEN está concluída.

Estado da pasta de saída

Esta secção apresenta o estado dos ficheiros que estão a ser copiados para a pasta de saída:

- **In Progress** (Em curso) — Os ficheiros estão a ser copiados para a pasta de saída.
- **Complete** (Concluído) — Os ficheiros foram copiados com êxito para a pasta de saída.

Estado da Cloud (Hub de Sequências BaseSpace)

A secção apresenta o estado dos ficheiros que estão a ser carregados para o Hub de Sequências BaseSpace através da cloud:

- **In Progress** (Em curso) — O software de controlo está a carregar os ficheiros para o Hub de Sequências BaseSpace.
- **Complete** (Concluído) — Os ficheiros foram carregados com sucesso para o Hub de Sequências BaseSpace.

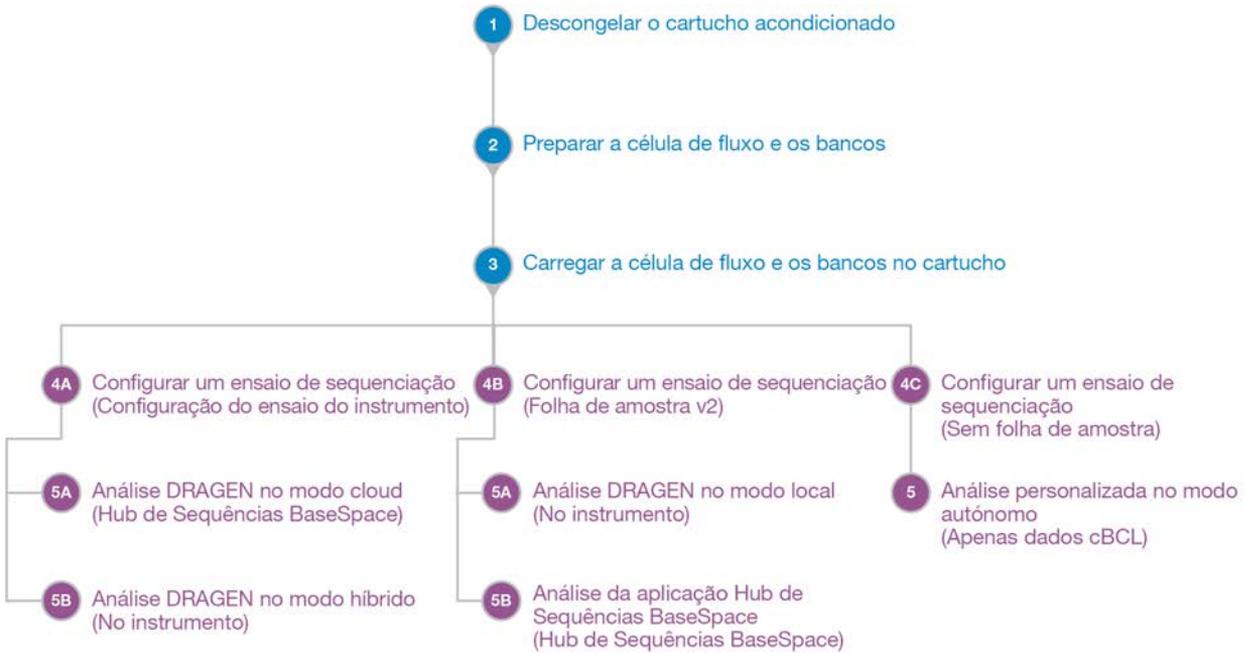
Resolução de problemas referentes ao estado

- Se o ensaio estiver em curso, feche o ecrã Process Management (Gestão de processos), aguarde cerca de cinco minutos e volte a abrir.

- Se o ensaio não estiver em curso, realize um ciclo de inicialização do instrumento e volte a abrir o ecrã Process Management (Gestão de processos). Consulte [Ciclo de inicialização do instrumento na página 86](#).

Diagrama do protocolo de sequenciação

O diagrama seguinte ilustra o protocolo de sequenciação utilizando o NextSeq 1000/2000.



Como funciona a sequenciação

A geração de clusters, a sequenciação e a análise são efetuadas durante o processo de sequenciação dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Cada passo ocorre automaticamente durante um ensaio de sequenciação. Dependendo da configuração do sistema, é executada uma análise adicional fora do instrumento após a conclusão do ensaio.

Geração de clusters

O banco¹ é automaticamente desnaturado em cadeias únicas e é novamente diluído no instrumento. Durante a geração de clusters, as moléculas individuais de ADN são ligadas à superfície da célula de fluxo e amplificadas para formar clusters². A geração de clusters demora ~4 horas.

Sequenciação

É adquirida uma imagem dos clusters utilizando a química de dois canais, um canal verde e um canal azul, para codificar os dados para os quatro nucleótidos. Após a aquisição de imagens de um bloco na célula de fluxo, é adquirida a imagem do bloco seguinte. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciação (~5 minutos por ciclo). Após a análise das imagens, o software Real-Time Analysis executa a identificação de bases³, a filtragem e o índice de qualidade.⁴

Análise primária

À medida que o ensaio avança, o software de controlo transfere automaticamente os ficheiros de identificação de bases⁵ (*.cbcl) para a pasta especificada da análise de dados. Durante o ensaio de sequenciação, o software Real-Time Analysis (RTA3) efetua a análise de imagens, a identificação de bases e a demultiplexação⁶. Quando a sequenciação estiver concluída, a análise secundária é iniciada. O método da análise secundária de dados depende da aplicação e da configuração do sistema.

Análise secundária

O Hub de Sequências BaseSpace é o ambiente de informática na cloud da Illumina para monitorização de ensaios, análise de dados, armazenamento e colaboração. Inclui as aplicações DRAGEN e Hub de Sequências BaseSpace, que suportam métodos de análise comuns para a sequenciação.

Após a conclusão da análise de sequenciação inicial, a DRAGEN executa a análise secundária ao utilizar um dos pipelines de análise disponíveis.

¹Uma amostra de ADN ou RNA que tem adaptadores anexados para sequenciação. Os métodos de preparação variam.

²Um grupo clonal de cadeias de ADN numa célula de fluxo que produz uma leitura de sequenciação. Cada cadeia de ADN numa célula de fluxo semeia um modelo que é amplificado até que o cluster seja composto por centenas ou milhares de cópias. Por exemplo, uma célula de fluxo com 10 000 clusters produz 10 000 leituras individuais ou 20 000 leituras de extremidades emparelhadas.

³Determinando uma base (A, C, G ou T) para cada cluster num bloco, num ciclo específico.

⁴Calcula um conjunto de indicadores de qualidade para cada identificação de base e, de seguida, utiliza o valor do indicador para procurar pelo índice Q.

⁵Contém a identificação de bases e índice de qualidade associado para cada cluster de cada ciclo de sequenciação.

⁶Um processo de análise que diferencia leituras para cada banco de um pool.

Se utilizar o modo Cloud ou Híbrido, a plataforma DRAGEN extrai a folha de amostra, o genoma de referência e os ficheiros de entrada do ensaio da Configuração do ensaio do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace. Para o modo Cloud, os dados cBCL são carregados automaticamente no Hub de Sequências BaseSpace, e o Hub de Sequências BaseSpace inicia a análise secundária da plataforma DRAGEN. Para o modo Híbrido, a análise secundária da plataforma DRAGEN é executada no instrumento, e os ficheiros de saída podem ser armazenados numa pasta selecionada ou na cloud.

Se utilizar o modo Local, a DRAGEN recupera a folha de amostra fornecida, o genoma de referência e os ficheiros de entrada do ensaio dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000. A análise secundária da plataforma DRAGEN é executada no instrumento, e os ficheiros de saída são armazenados numa pasta de saída selecionada. Se for selecionada a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), a análise também pode ser iniciada através das aplicações do Hub de Sequências BaseSpace após a conclusão da sequenciação.

Se utilizar o modo Autónomo, configure um ensaio sem uma folha de amostra. Este fluxo de trabalho é recomendado para os fluxos de trabalho de análise personalizada que iniciam a partir dos dados cBCL.

- Para obter mais informações sobre o Hub de Sequências BaseSpace, consulte a [BaseSpace Sequence Hub Online Help](#) (Ajuda online do Hub de Sequências BaseSpace).
- Para obter mais informações sobre a DRAGEN, consulte a [página de suporte da Plataforma DRAGEN Bio-IT](#).
- Para uma descrição geral de todas as aplicações, consulte [Aplicações do BaseSpace](#).

Configuração do sistema

Esta secção fornece instruções para configurar o seu sistema, incluindo descrições das definições do software.

Estas instruções descrevem principalmente o software de controlo, com algumas informações sobre a configuração da rede e do sistema operativo.

i | Ao utilizar o Google Chrome no instrumento, receberá a indicação de que deve desbloquear o seu porta-chaves de início de sessão. Pode ignorar em segurança e cancelar a indicação.

Requisitos da conta do utilizador

O sistema operativo Linux tem três contas:

- root (super administrador)
- ilmnadmin (administrador)
- ilmnuser (utilizador)

A conta do administrador destina-se apenas à aplicação das atualizações do sistema, como atualizar o Software de controlo NextSeq 1000/2000, ou para utilização por parte dos técnicos de TI para montar uma unidade de rede persistente.

Execute todas as outras funções, incluindo a sequenciação, com a conta de utilizador.

Requisitos de palavra-passe

O Técnico de assistência inicia uma alteração da palavra-passe para as três contas depois de concluir a instalação do instrumento. Atualize cada uma das palavras-passe a cada 180 dias, quando for solicitado.

Tabela 1 Políticas de palavras-passe predefinidas

Política	Definição
Impor histórico de palavras-passe	Cinco palavras-passe memorizadas
Limiar de bloqueio	Dez tentativas inválidas de início de sessão
Comprimento mínimo da palavra-passe	Dez caracteres
Variedade mínima de caracteres	Três cada de: número, letra maiúscula, letra minúscula e símbolo
Máximo de caracteres repetidos	Três caracteres

Política	Definição
A palavra-passe tem de cumprir requisitos de complexidade	Desativado
Guarde as palavras-passe com uma encriptação reversível	Desativado

Adicionar um novo utilizador

1. Inicie sessão em ilmnadmin.
2. Selecione o botão de alimentação e, em seguida, abra a lista pendente ilmnadmin.
3. Selecione **Account Settings** (Definições da conta).
4. Selecione **Unlock** (Desbloquear) e, em seguida, introduza a palavra-passe de ilmnadmin.
5. Selecione **Add User** (Adicionar utilizador).
6. Selecione o tipo de conta Standard (Padrão) e, em seguida, introduza um novo nome de utilizador.
7. Selecione **Set password now** (Definir palavra-passe agora) e, em seguida, introduza uma palavra-passe.
8. Selecione **Add** (Adicionar).
O novo utilizador é adicionado à lista de Users (Utilizadores).
9. Conceda o acesso do utilizador ao Software de controlo NextSeq 1000/2000 conforme se segue.
 - a. Abra o terminal.
 - b. Introduza o seguinte:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <novo nome de utilizador>
```
 - c. Se lhe for pedido, introduza a palavra-passe de ilmnadmin.
10. Para confirmar que as permissões do utilizador foram definidas com êxito, faça o que se segue.
 - a. Inicie sessão na nova conta do utilizador.
 - b. Navegue até ao Software de controlo NextSeq 1000/2000.
 - c. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
 - d. Em Default Output Folder (Pasta de saída predefinida), certifique-se de que seleciona e guarda o caminho da pasta de saída.
Se conseguir selecionar e guardar o caminho da pasta de saída sem quaisquer erros, as permissões foram definidas com êxito.

Repor a palavra-passe

Esta secção indica como repor a palavra-passe de ilmnuser, ilmnadmin ou de root. A recuperação de palavra-passe não está disponível. Repor a sua palavra-passe não contorna o bloqueio da conta após demasiadas tentativas incorretas de inserção de palavra-passe. Tem de aguardar 10 minutos até poder repor a sua palavra-passe ou tentar iniciar sessão.

Repor a palavra-passe de ilmnuser

Pode repor a palavra-passe de ilmnuser se souber a palavra-passe de ilmnadmin ou de root.

1. Inicie sessão em ilmnadmin.
2. Abra o terminal.
3. Introduza `sudo passwd ilmnuser`.
4. Quando lhe for pedido, introduza a palavra-passe de ilmnadmin.
5. Quando lhe for pedido, introduza uma nova palavra-passe de ilmnuser.
6. Quando lhe for pedido, introduza novamente a nova palavra-passe de ilmnuser para confirmar a nova palavra-passe.

Repor a palavra-passe de ilmnadmin

Pode repor a palavra-passe de ilmnadmin se souber a palavra-passe de root.

1. Inicie sessão na conta root.
2. Abra o terminal.
3. Introduza `passwd ilmnadmin` para alterar a palavra-passe ilmadmin, ou introduza `passwd ilmnuser` para alterar a palavra-passe ilmnuser.
4. Quando lhe for pedido, introduza a nova palavra-passe.
5. Quando lhe for pedido, introduza novamente a nova palavra-passe para confirmar a nova palavra-passe.

Repor a palavra-passe de root

Para repor a palavra-passe da conta root, utilize uma das seguintes opções:

- Se souber a palavra-passe da altura em que a última imagem do sistema operativo foi capturada, restaure para essa imagem guardada.
- Se não se lembrar da palavra-passe, contacte o Suporte técnico da Illumina.

Configurar o Hub de Sequências BaseSpace e o Suporte proativo

Utilize as instruções seguintes para configurar o Hub de Sequências BaseSpace e o Suporte proativo no seu sistema. Para configurar uma conta do Hub de Sequências BaseSpace, consulte a [BaseSpace Sequence Hub Online Help](#) (Ajuda online do Hub de Sequências BaseSpace).

1. No menu do software de controlo, seleccione **Settings** (Definições).

2. Para as definições do Hub de Sequências BaseSpace e Suporte proativo, selecione uma das seguintes opções:

Opção	Descrição e requisitos
Proactive Support Only* (Apenas Suporte proativo)	Enviar dados de desempenho do instrumento para a Illumina para uma resolução de problemas mais rápida. Requer uma ligação à Internet.
Proactive and Run Monitoring (Suporte proativo e monitorização de ensaios)	Enviar ficheiros InterOp e ficheiros de registo para o Hub de Sequências BaseSpace para a monitorização remota do ensaio. Esta opção é a predefinição. Requer uma conta do Hub de Sequências BaseSpace e uma ligação à Internet.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios)	Enviar ficheiros InterOp, ficheiros de registo e dados de ensaio para o Hub de Sequências BaseSpace para análise e monitorização remota. Requer uma conta do Hub de Sequências BaseSpace, uma ligação à Internet e uma folha de amostra.
None (Nenhum)	Desliga os ensaios de contas do Hub de Sequências BaseSpace e não envia dados de desempenho do instrumento para o Suporte proativo da Illumina.

*Dependendo da versão do software de controlo, o nome desta definição na interface do software pode ser diferente do nome neste manual.

Quando se seleciona qualquer opção, com a exceção de None (Nenhum), o Suporte proativo é ativado. Este é um serviço gratuito que lhe permite visualizar os seus dados de desempenho no Painel de cliente MyIllumina e permite às equipas de assistência da Illumina resolverem os problemas mais rapidamente.

i | A opção Proactive and Run Monitoring (Suporte proativo e monitorização de ensaios) está ativada por predefinição. Para desistir deste serviço, selecione **None** (Nenhum).

- Se selecionou None (Nenhum) no passo 2, selecione **Save** (Guardar) para terminar. Caso contrário, continue para o passo 6.
- Na lista Localização de alojamento, selecione a localização do servidor do Hub de Sequências BaseSpace para onde os dados são carregados. Certifique-se de que utiliza a Localização de alojamento existente na sua região ou a mais próxima.
- Se tiver uma subscrição empresarial, introduza o nome do domínio (URL) utilizado para a conta do Hub de Sequências BaseSpace.
Por exemplo: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
- Selecione **Save** (Guardar).

Especificar a localização predefinida da pasta de saída

Utilize as instruções nesta secção para seleccionar uma localização predefinida da pasta de saída. Pode alterar a pasta de saída para cada ensaio durante a configuração do ensaio. O software guarda ficheiros cBCL¹ e outros dados de ensaio na pasta de saída.

É necessária uma pasta de saída, a menos que o Hub de Sequências BaseSpace esteja configurado para Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios). Utilize apenas uma unidade externa ou da rede como a pasta de saída predefinida. Utilizar uma pasta de saída no instrumento afeta negativamente o seu ensaio de sequenciação.

Especificar uma pasta de saída de unidade externa

Utilize as instruções seguintes para seleccionar uma unidade portátil externa como a pasta de saída predefinida. É recomendável utilizar uma unidade com alimentação própria formatada em NFTS ou GPT/EXTA.

1. Ligue uma unidade portátil externa utilizando a porta USB 3.0 na parte lateral ou traseira do instrumento.
Certifique-se de que a unidade portátil externa permite permissões de escrita. Se estiver definida para Read Only (Só de leitura), o software de controlo não conseguirá guardar os dados na mesma.
2. Crie uma nova pasta na unidade portátil externa. Esta pasta será a localização da pasta de saída predefinida.
O Software de controlo NextSeq 1000/2000 requer, pelo menos, dois níveis de pastas agrupadas para reconhecer a localização como uma unidade portátil externa.
3. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
4. Em Default Output Folder (Pasta de saída predefinida), selecione o caminho da pasta existente e navegue até à nova pasta na unidade portátil externa.
5. **[Opcional]** Se tiver seleccionado **Online Run Setup** (Configuração de ensaio online) em Run Mode (Modo de ensaio), selecione uma opção no menu pendente Hosting Location (Localização de alojamento).
6. Selecione **Save** (Guardar).

Especificar uma pasta de saída predefinida da unidade de rede

Utilize as instruções seguintes para montar uma unidade de rede persistente e especificar a localização da pasta de saída predefinida. Server Message Block (SMB)/Common Internet File System (CIFS) e Network File System (NFS) são os únicos métodos suportados para a montagem persistente de uma unidade de rede no NextSeq 1000/2000.

¹Contém a identificação de bases e índice de qualidade associado para cada cluster de cada ciclo de sequenciação.

Instruções de montagem por SMB/CIFS

1. Se o Software de controlo NextSeq 1000/2000 estiver aberto, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicação).
2. Inicie sessão em ilmnadmin.
3. Selecione **Applications** (Aplicações).
4. Em Favorites (Favoritos), selecione **Terminal**.
5. Introduza `sudo touch /root/.smbcreds` e, em seguida, selecione **Enter**.
6. Quando lhe for pedido, introduza a palavra-passe de ilmnadmin.
A palavra-passe de ilmnadmin é necessária sempre que utiliza um comando `sudo`.
7. Introduza `sudo gedit /root/.smbcreds` e, em seguida, selecione **Enter** para abrir o ficheiro de texto com o nome `smbcreds`.
8. Quando o ficheiro de texto `.smbcreds` abrir, introduza as suas credenciais de início de sessão na rede no formato seguinte.

```
username=<nome de utilizador>
password=<palavra-passe>
domain=<nome_domínio>
```

As aspas não são necessárias para as credenciais de nome de utilizador, palavra-passe e domínio. A credencial de domínio é necessária apenas se a conta remota fizer parte de um domínio.
9. Selecione **Save** (Guardar) e saia do ficheiro.
10. Identifique o nome do servidor e o nome da partilha para o seu servidor SMB/CIFS.
O nome do servidor e o nome da partilha não podem ter espaços, por exemplo:
Nome do servidor: `192.168.500.100` ou `Myserver-myinstitute-03`
Nome da partilha: `/share1`
11. No terminal, introduza `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` e, em seguida, selecione **Enter** para conceder acesso de leitura ao ficheiro de texto `.smbcreds`.
12. Introduza `sudo mkdir /mnt/<nome local>`.
`<nome local>` é o nome do novo diretório na sua unidade de rede e pode conter espaços. Este é o diretório que irá aparecer no instrumento.
13. Selecione **Enter**.
14. Introduza `sudo gedit /etc/fstab` e, em seguida, selecione **Enter**.
15. Quando o ficheiro `fstab` abrir, introduza o que se segue ao final do ficheiro e, em seguida, selecione **Enter**.

```
//<Nome do servidor>/<Nome da partilha> /mnt/<nome local> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Selecione **Save** (Guardar) e saia do ficheiro.

17. No terminal, introduza `sudo mount -a -vvv` e, em seguida, selecione **Enter**.
A unidade de rede está agora montada como `/mnt/<nome local>`.
18. Para confirmar se a montagem foi bem-sucedida, introduza `<df | grep <nome local>>` e, em seguida, selecione **Enter**.
O nome do fileshare deve aparecer.
19. Introduza `sudomkdir /mnt/<nome local>/<diretório de saída>` para criar uma subpasta no diretório local. O `<diretório de saída>` representa a localização da sua pasta de saída predefinida.
O Software de controlo NextSeq 1000/2000 requer, pelo menos, dois níveis de pastas agrupadas para reconhecer a localização como unidade de rede montada.
20. Faça um ciclo de inicialização ao instrumento. Consulte [Ciclo de inicialização do instrumento na página 86](#).
21. Defina a unidade de rede montada persistente como a pasta de saída predefinida. Consulte [Especificar a unidade de rede persistente como a pasta de saída predefinida na página 18](#).

Instruções de montagem por NFS

1. Se o Software de controlo NextSeq 1000/2000 estiver aberto, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicação).
2. Inicie sessão em `ilmnadmin`.
3. Identifique o nome do servidor para o seu servidor NFS.
O nome do servidor não pode ter espaços, por exemplo:
Nome do servidor: `192.168.500.100` ou `Myserver-myinstitute-03`
4. Selecione **Applications** (Aplicações).
5. Em Favorites (Favoritos), selecione **Terminal**.
6. Introduza `sudo mkdir /mnt/<nome local>` e, em seguida, selecione **Enter**.
`<nome local>` é o nome do novo diretório na sua unidade de rede.
7. Introduza `sudo gedit /etc/fstab` e, em seguida, selecione **Enter**.
8. Quando o ficheiro `fstab` abrir, introduza o que se segue e, em seguida, selecione **Enter**.
`Nome do servidor:/share //mnt/<nome local> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
9. Selecione **Save** (Guardar) e saia do ficheiro.
10. No terminal, introduza `sudo mount -a -vvv` e, em seguida, selecione **Enter**.
A unidade de rede está agora montada no `/mnt/directory` dentro da pasta `<nome local>`.
11. Crie uma nova `<subpasta>` dentro da pasta `<nome local>`. A subpasta representa a localização da sua pasta de saída predefinida.
O Software de controlo NextSeq 1000/2000 requer, pelo menos, dois níveis de pastas agrupadas para reconhecer a localização como unidade de rede montada.

12. Faça um ciclo de inicialização ao instrumento. Consulte [Ciclo de inicialização do instrumento na página 86](#).
13. Defina a unidade de rede montada persistente como a pasta de saída predefinida. Consulte [Especificar a unidade de rede persistente como a pasta de saída predefinida na página 18](#).

Especificar a unidade de rede persistente como a pasta de saída predefinida

1. Inicie sessão como ilmnuser.
2. No menu do Software de controlo NextSeq 1000/2000, selecione **Settings** (Definições).
3. Em Default Output Folder (Pasta de saída predefinida), selecione a montagem de unidade de rede persistente localizada em /mnt/<nome local>/<diretório de saída>.
4. **[Opcional]** Se tiver selecionado **Online Run Setup** (Configuração de ensaio online) em Run Mode (Modo de ensaio), selecione uma opção no menu pendente Hosting Location (Localização de alojamento).
5. Selecione **Save** (Guardar).

Importar genomas de referência personalizados

Os novos genomas de referência personalizados só podem ser importados utilizando a conta do administrador. Para uma lista de todos os genomas de referência compatíveis, visite a página de Compatibilidade produtos do NextSeq 1000/2000.

1. Crie um genoma de referência utilizando a aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina no Hub de Sequências BaseSpace. Para obter mais informações, consulte a *Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help* (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).
2. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, selecione **Process Management** (Gestão de processos).
3. Certifique-se de que não está em curso nenhum ensaio de sequenciação ou análise secundária no instrumento.
4. No menu do software de controlo, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicação).
5. Inicie sessão em ilmnadmin.
6. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, **DRAGEN**.
7. Na secção Genome (Genoma), selecione **View Installed Genomes** (Ver genomas instalados) para ver uma lista de todos os genomas personalizados e todos os genomas da Illumina instalados atualmente.
8. Fecha a janela modal.
9. Selecione **Choose** (Escolher) em Import New Reference Genomes (Importar novos genomas de referência), navegue até ao ficheiro do genoma de referência (*.tar.gz) na unidade de rede montada ou portátil e, em seguida, selecione **Open** (Abrir).
10. Selecione **Import** (Importar).

Importar ficheiros de linha de base de ruído

Se utilizar o fluxo de trabalho DRAGEN Enrichment no modo somático, pode utilizar um ficheiro de linha de base de ruído para filtrar o ruído de sequenciação ou sistemático. Pode transferir ficheiros de ruído personalizados na [Página de suporte da Illumina](#) ou criar um ficheiro de linha de base de ruído personalizado.

Gerar um ficheiro de linha de base de ruído personalizado

Se utilizar o modo somático, pode gerar um ficheiro de linha de base de ruído personalizado. O ficheiro de linha de base de ruído é criado utilizando amostras normais que não correspondem ao sujeito de onde proveem as amostras. O número recomendado de amostras normais é 50.

Para gerar um ficheiro de linha de base de ruído personalizado, utilize um dos seguintes métodos:

- Utilize o servidor da Plataforma DRAGEN Bio-IT. Consulte a *Ajuda online* da Plataforma DRAGEN Bio-IT para obter instruções.
- Utilize a aplicação DRAGEN Baseline Builder no Hub de Sequências BaseSpace. Utilize o pipeline BCL Convert na Configuração de ensaios do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace para gerar ficheiros FASTQ. Após a conclusão do ensaio de sequenciação e de estarem disponíveis 50 amostras, introduza os ficheiros FASTQ na aplicação DRAGEN Baseline Builder.

Importar ficheiros da linha de base utilizando a interface do utilizador

Depois de importar o ficheiro da linha de base, pode configurar o seu ensaio de sequenciação utilizando o fluxo de trabalho DRAGEN Enrichment no modo somático.

1. Transfira um ficheiro de linha de base padrão na [Página de suporte da Illumina](#) ou transfira o ficheiro de linha de base personalizado no servidor DRAGEN ou aplicação DRAGEN Baseline Builder.
2. No menu do software de controlo, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicação).
3. Inicie sessão em ilmnadmin.
4. Seleccione **Applications** (Aplicações) e, em seguida, seleccione **Favorites** (Favoritos).
5. Seleccione **+Other Locations** (+Outras localizações) e, em seguida, seleccione **Computer** (Computador).
6. Clique duas vezes em **usr** e, em seguida, **local**.
7. Clique duas vezes em **illumina** e, em seguida, **aux_files**.
8. Arraste o ficheiro de linha de base de ruído para **aux_files**.

Importar ficheiros de linha de base utilizando o terminal

Depois de importar o ficheiro da linha de base, pode configurar o seu ensaio de sequenciação utilizando o fluxo de trabalho DRAGEN Enrichment no modo somático.

1. Transfira um ficheiro de linha de base padrão na [Página de suporte da Illumina](#) ou transfira o ficheiro de linha de base personalizado no servidor DRAGEN ou aplicação DRAGEN Baseline Builder.
2. No menu do software de controlo, seleccione **Minimize Application** (Minimizar aplicação).
3. Inicie sessão em ilmnadmin.
4. Seleccione **Applications** (Aplicações).
5. Em Favorites (Favoritos), seleccione **Terminal**.
6. Introduza o seguinte comando.

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

Configurar o Run Mode (Modo de ensaio)

O modo de ensaio aplica-se a todos os ensaios e determina onde introduzir os parâmetros do ensaio e como analisar dados.

Modo Cloud ou Híbrido

1. No menu do software de controlo, seleccione **Settings** (Definições).
2. Seleccione **Online Run Setup** (Configuração de ensaio online) em Serviços e Suporte proativo do Hub de Sequências BaseSpace.
3. Configure as definições adicionais corretamente ao seleccionar o seguinte:
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Suporte proativo e monitorização de ensaios) ou **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios).
 - b. Menu pendente para **Hosting Location** (Localização de alojamento).
 - c. **[Opcional]** Introduza um **Private Domain Name** (Nome de domínio privado).
4. Seleccione **Save** (Guardar).

Modo Local ou Autónomo

1. No menu do software de controlo, seleccione **Settings** (Definições).
2. Seleccione **Local Run Setup** (Configuração de ensaio local) em Serviços e Suporte proativo do Hub de Sequências BaseSpace.
3. Configure as definições adicionais corretamente ao seleccionar o seguinte:
 - a. **Proactive Support Only** (Apenas Suporte proativo), **Proactive and Run Monitoring** (Suporte proativo e monitorização de ensaios), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios) ou **None** (Nenhum).



O Hub de Sequências BaseSpace irá permitir a funcionalidade de recolocação em fila de espera apenas se for selecionada a opção **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios). Em caso de folha de amostra inválida, isto irá permitir-lhe realizar correções na folha de amostra e recolocar a análise de demultiplexação em fila de espera. Para a funcionalidade de recolocação em fila de espera no instrumento, consulte [Recolocar um ensaio em fila de espera na página 86](#).

- b. Menu pendente para **Hosting Location** (Localização de alojamento).
 - c. [Opcional] Introduza um **Private Domain Name** (Nome de domínio privado).
4. Selecione **Save** (Guardar).

Considerações sobre a folha de amostra para o modo Local ou Autónomo

Tem de utilizar o formato de ficheiro da folha de amostra v2 para analisar com a plataforma DRAGEN. O formato de ficheiro da folha de amostra v2 também é compatível com aplicações Hub de Sequências BaseSpace que não sejam compatíveis com DRAGEN. Para obter informações sobre a criação de uma folha de amostra no formato de ficheiro v2, consulte [Definições da folha de amostra v2 na página 90](#).

Personalização do instrumento

Esta secção inclui informações sobre a configuração das definições de personalização disponíveis. Para definir uma pasta de saída predefinida, consulte [Especificar a localização predefinida da pasta de saída na página 15](#).

Nome do instrumento

1. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
2. Selecione Instrument Nickname (Alcunha do instrumento) e introduza um nome preferencial para o instrumento.
O nome é apresentado na parte superior de cada ecrã.
3. Selecione **Save** (Guardar).

Definir as preferências de desnaturação e diluição

1. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
2. Escolha se pretende efetuar a desnaturação e a diluição dos bancos automaticamente no instrumento. A predefinição é a opção selecionada para o seu ensaio anterior.
 - Para desnaturar e diluir bancos automaticamente no instrumento, selecione a caixa de verificação **Denature and Dilute On Board** (Desnaturação e diluição integradas).
 - Para desnaturar e diluir bancos manualmente, anule a seleção da caixa de verificação **Denature and Dilute On Board** (Desnaturação e diluição integradas).

Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bancos do sistema NextSeq 1000 e 2000*

(documento n.º 1000000139235) para obter instruções sobre a desnaturação e a diluição de bancos manualmente.

Definir a preferência de purga de reagente automática

1. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
2. Escolha se o sistema deve purgar automaticamente os reagentes não usados para o compartimento de reagentes gastos após cada ensaio para agilizar a eliminação de reagentes residuais após a conclusão do ensaio:
 - Para purgar automaticamente, selecione a caixa de verificação **Purge Reagent Cartridge** (Purgar cartucho de reagente).
 - Para ignorar a purga automática, anule a seleção da caixa de verificação **Purge Reagent Cartridge** (Purgar cartucho de reagente) (esta é a predefinição).A purga dos reagentes não usados acrescenta até 2 horas ao fluxo de trabalho.
3. Selecione **Save** (Guardar).

Configurar atualizações do software

1. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
2. Selecione se pretende que o sistema verifique automaticamente atualizações de software:
 - Para verificar automaticamente, selecione a caixa de verificação **Autocheck for software updates** (Verificar automaticamente atualizações de software).
 - Para verificar manualmente, desmarque a caixa de verificação **Autocheck for software updates** (Verificar automaticamente atualizações de software).Para verificar as atualizações de software automaticamente, é necessária uma ligação à Internet. Para obter mais informações sobre a instalação de atualizações de software, consulte [Atualizações de software na página 78](#) (Atualizações de software).
3. Selecione **Save** (Guardar).

Alterar o brilho do LCD

1. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
2. Mova o controlo de deslize LCD Brightness (Brilho do LCD) para a percentagem desejada.
3. Selecione **Save** (Guardar).

Definir um servidor proxy

O suporte de servidor proxy está disponível apenas no Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3.

1. No menu do software de controlo, selecione **Settings** (Definições).
2. Selecione as definições de proxy atuais para abrir o ecrã Proxy Settings (Definições de proxy).

3. Selecione a caixa de verificação **Enable Proxy** (Ativar proxy) e, em seguida, introduza o endereço da porta IP do servidor.
4. **[Opcional]** Se o servidor proxy exigir autenticação, selecione a caixa de verificação **Requires Username and Password** (Requer nome de utilizador e palavra-passe) e, em seguida, introduza o nome de utilizador e palavra-passe.
5. Selecione **Save** (Guardar) para guardar e validar as informações de proxy.
6. Selecione uma das seguintes opções:
 - Selecione **Yes, I'm Finished** (Sim, terminei) para reiniciar o sistema e aplicar as novas definições de proxy.
 - Selecione **No, Take Me Back** (Não, voltar atrás) para regressar ao ecrã Settings (Definições). As novas definições de proxy são guardadas, mas não são aplicadas até reiniciar o sistema.

Consumíveis e equipamento

Esta secção lista tudo o que é fornecido no kit de reagentes juntamente com as condições de armazenamento. Também pode ver que consumíveis e equipamento auxiliares tem de adquirir para concluir o protocolo e efetuar a manutenção e os procedimentos de resolução de problemas.

Consumíveis de sequenciação

A sequenciação no NextSeq 1000/2000 requer um kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P2 de utilização única da Illumina ou um kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P3 de utilização única da Illumina. O kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P2 está disponível em três tamanhos (100 ciclos, 200 ciclos, 300 ciclos) e o kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P3 está disponível em quatro tamanhos (50 ciclos, 100 ciclos, 200 ciclos, 300 ciclos).

O Sistema de sequenciação NextSeq 1000 é compatível apenas com o kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P2 da Illumina.

O kit de reagentes inclui o cartucho e a célula de fluxo para sequenciação. Quando recebe o kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P2 ou o kit de Reagentes NextSeq 1000/2000 P3 da Illumina:

- Armazene os componentes imediatamente nas temperaturas indicadas para garantir o desempenho adequado.
- Não abra qualquer saco de alumínio prateado até receber instruções nesse sentido.
- Armazene os cartuchos na sua embalagem para evitar rasgar ou perfurar o saco de alumínio.
- Armazene os cartuchos com as setas a apontar para cima.

 Se a etiqueta do cartucho não estiver virada para cima, os dados de sequenciação serão afetados negativamente.

Tabela 2 Componentes do kit

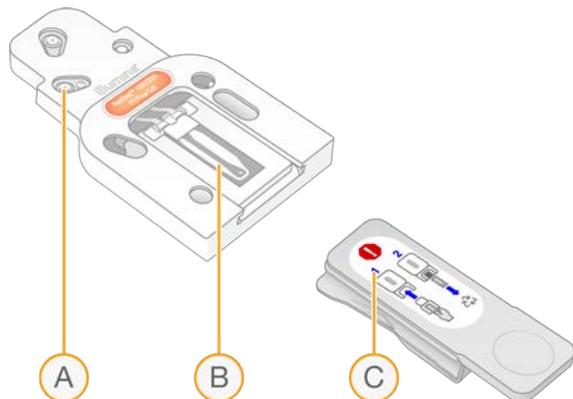
Consumível	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Dimensões
Cartucho	1	-25°C a -15°C	29,2 cm x 17,8 cm x 12,7 cm (11,5 pol. x 7 pol. x 5 pol.)
Célula de fluxo	1	2°C a 8°C*	21,6 cm x 12,7 cm x 1,9 cm (8,5 pol. x 5 pol. x 0,75 pol.)
RSB com Tween 20	1	-25°C a -15°C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm) (1,6 pol. x 2,6 pol. x 2 pol.)

*Enviado à temperatura ambiente.

Ambos os consumíveis têm identificadores para controlar e garantir a compatibilidade. O cartucho e a célula de fluxo utilizam RFID¹.

Célula de fluxo

A célula de fluxo é uma célula de fluxo de via única com padrão. Um cartucho de plástico sustenta a célula de fluxo à base de vidro. Uma patilha cinzenta cobre e sobressai da célula de fluxo para garantir um manuseamento seguro.



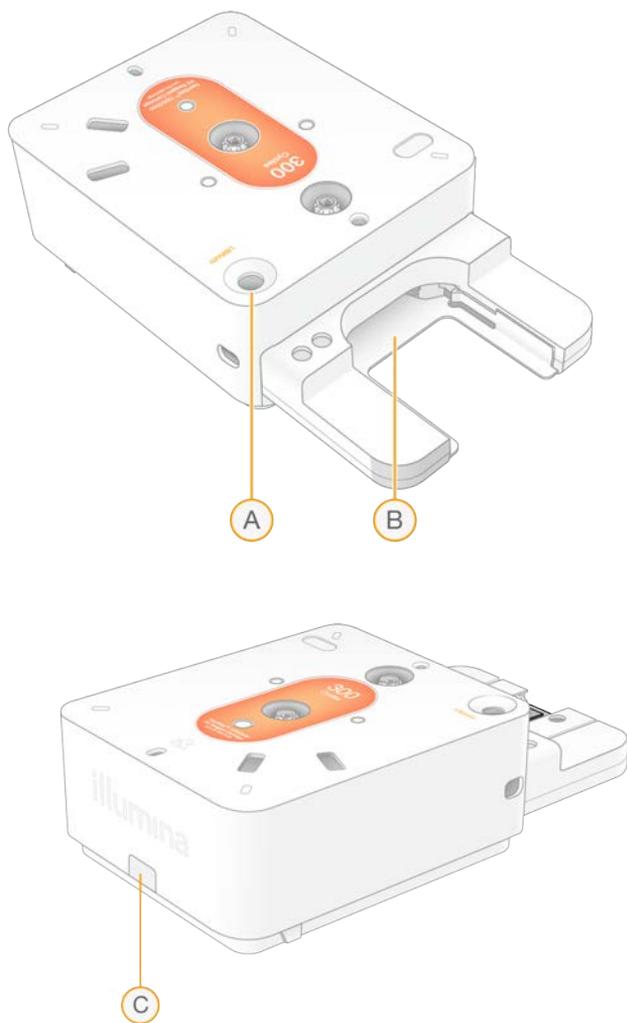
- A. Cartucho de plástico
- B. Célula de fluxo
- C. Patilha cinzenta

Milhões de poços nano cobrem a superfície interior da célula de fluxo. Os clusters são gerados nos poços nano, a partir dos quais a reação de sequenciação é realizada. A disposição em padrão dos poços nano aumenta os dados e as leituras de saída.

¹Radio-frequency identification (identificação por radiofrequência)

Cartucho

O cartucho de reagente de sequenciação é cheio previamente com reagentes de indexação, clustering, sequenciação e extremidades emparelhadas. Um reservatório selado com folha de alumínio está reservado para bancos, e uma ranhura na parte da frente está reservada para a nova célula de fluxo.



- A. Reservatório do banco
- B. Ranhura da célula de fluxo
- C. Tampa de drenagem

O cartucho contém todos os consumíveis para um ensaio: reagentes, banco e célula de fluxo. O banco e a célula de fluxo são carregados no cartucho descongelado, que depois é carregado no instrumento. Após o início do ensaio, os reagentes e os bancos são transferidos automaticamente do cartucho para a célula de fluxo.

O cartucho contém bombas, válvulas e todos os fluídicos para o sistema, incluindo um reservatório na parte inferior para recolher os reagentes usados. O cartucho é eliminado após um ensaio, pelo que não é necessário lavar o instrumento.

Número de ciclos suportados

A etiqueta no cartucho indica quantos ciclos são analisados e não quantos ciclos são realizados. A célula de fluxo é compatível com qualquer número de ciclos e qualquer tipo de leitura.

Todos os cartuchos de 100 e 200 ciclos incluem mais 38 ciclos como extra. O cartucho de 300 ciclos inclui 27 ciclos extra. Por exemplo, o cartucho de 300 ciclos fornece reagentes suficientes para até 327 ciclos de sequenciação. Para obter informações sobre a quantidade de ciclos a sequenciar, consulte a secção [Número de ciclos numa leitura na página 32](#).

Descrições de símbolos

A seguinte tabela descreve os símbolos no consumível ou na embalagem do consumível.

Símbolo	Descrição
	A data de validade do consumível. Para melhores resultados, utilize o consumível antes desta data.
	Indica o fabricante (Illumina).
	A utilização prevista é Apenas para investigação.
	Indica o número da peça para que o consumível possa ser identificado. ¹
	Indica o código do lote para identificar o lote de fabrico do consumível. ¹

Símbolo	Descrição
	Indica um perigo para a saúde.
	Intervalo da temperatura de armazenamento em graus Celsius. Armazene o consumível dentro do intervalo indicado. ²

Consumíveis auxiliares

Adquira os seguintes consumíveis para a sequenciação e manutenção.

Consumíveis para sequenciação

Tabela 3 Consumíveis para sequenciação

Consumível	Fabricante	Finalidade
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor geral do laboratório	Uso geral.
Kit de reagentes NextSeq 1000/2000 P2 (v3)	Illumina: catálogo n.º 20046811 (100 ciclos) catálogo n.º 20046812 (200 ciclos) catálogo n.º 20046813 (300 ciclos)	Fornece o cartucho de reagente, a célula de fluxo e o NextSeq 1000/2000 RSB com Tween 20 para um ensaio individual. Compatível com o NextSeq 1000 e NextSeq 2000
Kit de reagentes NextSeq 2000 P3	Illumina: catálogo n.º 20046810 (50 ciclos) catálogo n.º 20040559 (100 ciclos) catálogo n.º 20040560 (200 ciclos) catálogo n.º 20040561 (300 ciclos)	Fornece o cartucho de reagente, a célula de fluxo e o NextSeq 1000/2000 RSB com Tween 20 para um ensaio individual. Compatível apenas com o NextSeq 2000.

Consumível	Fabricante	Finalidade
Microtubos, 1,5 ml	Fisher Scientific, catálogo n.º 14-222-158 ou equivalentes de baixa ligação	Diluir bancos na concentração de carregamento.
Pontas de pipeta, 10 µl	Fornecedor geral do laboratório	Diluir bancos.
Pontas de pipeta, 20 µl	Fornecedor geral do laboratório	Diluir e carregar bancos.
Pontas de pipeta, 200 µl	Fornecedor geral do laboratório	Diluir bancos.
Pontas de pipeta, 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório	Perfurar a película do reservatório do banco.
[Opcional] PhiX Control v3	Illumina, catálogo n.º FC-110-3001	Executar um ensaio apenas PhiX ou contaminar um controlo PhiX.
[Opcional] Papel absorvente	Fornecedor geral do laboratório	Secar o cartucho após um banho com água.

Consumíveis para manutenção

Tabela 4 Consumíveis para manutenção

Consumível	Fabricante	Finalidade
Luvras descartáveis, sem pó	Fornecedor geral do laboratório	Uso geral.
Substituição do filtro de ar NextSeq 1000/2000*	Illumina, catálogo n.º 20029759	Substituir o filtro de ar de seis em seis meses.

* O instrumento é enviado com um instalado e outro sobresselente. Quando não estiver ao abrigo da garantia, as substituições são fornecidas pelo utilizador. Mantenha na embalagem até à utilização.

Equipamento auxiliar

Adquira o equipamento seguinte para fins de sequenciação.

Item	Origem	Finalidade
Congelador, -25 °C a -15 °C	Fornecedor geral do laboratório	Armazenar o cartucho.

Item	Origem	Finalidade
Balde para gelo	Fornecedor geral do laboratório	Reservar bancos até à sequenciação.
Pipeta, 10 µl	Fornecedor geral do laboratório	Diluir bancos na concentração de carregamento.
Pipeta, 20 µl	Fornecedor geral do laboratório	Diluir os bancos à concentração de carregamento e carregar os bancos no cartucho.
Pipeta, 200 µl	Fornecedor geral do laboratório	Diluir bancos na concentração de carregamento.
Frigorífico, 2 °C a 8 °C	Fornecedor geral do laboratório	Armazenar a célula de fluxo ou descongelar o cartucho.
[Opcional] Um dos seguintes banhos de água com temperatura controlada ou um banho equivalente que possa ser mantido a 25°C: <ul style="list-style-type: none"> • Banho com água em circulação Thermo Scientific Precision de 35 litros (capacidade para 5 cartuchos em simultâneo) • Banho com água em circulação digital SHEL LAB de 22 litros (capacidade para 3 cartuchos em simultâneo) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, catálogo n.º TSCIR 35 • Shel Lab, catálogo n.º SWBC22 	Descongelar o cartucho.

Protocolo

Esta secção apresenta instruções passo a passo sobre como preparar os consumíveis, diluir bancos e configurar um ensaio de sequenciação num dos quatro modos de ensaio (o modo Cloud, Híbrido e Local utilizam a plataforma DRAGEN ou o Hub de Sequências BaseSpace, enquanto o modo Autónomo consiste num ensaio autónomo destinado à geração de dados cBCL apenas para fluxos de trabalho de análise personalizada).

Quando manusear reagentes e outros químicos, use óculos de segurança, uma bata de laboratório e luvas sem pó.

Certifique-se de que tem os consumíveis e o equipamento necessários antes de iniciar um protocolo. Consulte [Consumíveis e equipamento na página 24](#).

Siga os protocolos pela ordem apresentada, utilizando as temperaturas, as durações e os volumes especificados.

Considerações sobre a sequenciação

Antes de iniciar o protocolo, reveja as seguintes informações para preparar a diluição de bancos e configurar o ensaio. Alcançar a concentração de carregamento ideal é essencial para uma sequenciação e uma análise bem-sucedidas. Introduzir o número correto de ciclos numa leitura ajuda a garantir uma ótima saída de dados.

Concentrações e volume de carregamento

O volume de carregamento é de 20 µl. A concentração de carregamento varia consoante o tipo de banco:

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

Tipo de banco	Concentração de carregamento (pM)
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

Para outros tipos de bancos, 650 pM é a concentração inicial recomendada para a concentração de carregamento. Otimize esta concentração nos ensaios subsequentes para identificar uma concentração de carregamento que produza constantemente dados que cumprem as especificações.

i Para otimizar a concentração de carregamento, utilize o indicador % de concentração de carregamento no ficheiro de saída `PrimaryAnalysisMetrics.csv` disponível após a conclusão do ensaio. Se a % de concentração de carregamento for < 95%, aumente a concentração de carregamento em incrementos de 100 pM em ensaios subsequentes.

Número de ciclos numa leitura

Para cada leitura, introduzir um mínimo de 26 ciclos e um máximo de 151 ciclos ajuda a assegurar a qualidade dos dados. O número exato de ciclos depende da sua experiência. O Software de controlo NextSeq 1000/2000 exige pelo menos 1 ciclo para a Read 1 (Leitura 1), mas apresenta um aviso quando o número de ciclos na Read 1 (Leitura 1) for inferior a 26.

O número total de ciclos para a Read 1 (Leitura 1), o Index 1 (Índice 1), o Index 2 (Índice 2) e a Read 2 (Leitura 2) não pode ser superior ao número de ciclos suportados pelo kit mais 38 ciclos para os kits de 100 ciclos e 200 ciclos e 27 ciclos para os kits de 300 ciclos P3. O Software de controlo NextSeq 1000/2000 irá apresentar um aviso quando o Index 1 (Índice 1) e o Index 2 (Índice 2) forem inferiores a 6 ciclos. O aviso não será apresentado se o Index 1 (Índice 1) ou o Index 2 (Índice 2) for de 0 ciclos.

Os números de ciclos mínimos e máximos incluem um ciclo extra. Adicione sempre um ciclo ao comprimento de leitura pretendido para corrigir os efeitos da colocação em fase e pré-fase. O comprimento de leitura é o número de ciclos de **sequenciação** em Read 1 (Leitura 1) e Read 2 (Leitura 2), o que exclui ciclos extra e ciclos de índice. Para obter mais informações, consulte Correção da colocação em fase em [Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis na página 59](#).

Exemplo de configuração do ensaio:

- Para um comprimento de leitura de 35 (leitura única), introduza **36** no campo Read 1 (Leitura 1).
- Para um comprimento de leitura de 150 por leitura (extremidades emparelhadas), introduza **151** no campo Read 1 (Leitura 1) e **151** no campo Read 2 (Leitura 2).

Planear um ensaio de sequenciação no Hub de Sequências BaseSpace

Utilize a Configuração de ensaios do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace para criar e configurar as definições do seu ensaio. Se estiver a configurar um ensaio no modo Cloud ou Híbrido, submeta a configuração do seu ensaio para a lista de ensaios planeados da sua conta do Hub de Sequências BaseSpace no separador Planned Runs (Ensaios planeados). Os ensaios disponíveis para sequenciação nos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000 são apresentados no separador Planned Runs (Ensaios planeados). Se estiver a configurar um ensaio no modo Local, utilize a Configuração de ensaios do instrumento para criar e exportar a sua folha de amostra no formato de ficheiro v2. Alternativamente, consulte [Definições da folha de amostra v2 na página 90](#) para, utilizando um modelo fornecido, criar uma folha de amostra sem o Hub de Sequências BaseSpace.

A Configuração de ensaios do instrumento do Hub de Sequências BaseSpace não suporta mais de 1536 amostras.

Configurar um ensaio

1. Navegue até ao Hub de Sequências BaseSpace.
2. Introduza o seu endereço de e-mail e a palavra-passe do Hub de Sequências BaseSpace e, em seguida, selecione **Sign in** (Iniciar sessão).
3. Selecione o separador **Runs** (Ensaios) e, em seguida, selecione o menu pendente **New Run** (Novo ensaio).
4. Selecione **NextSeq 1000/2000**.
5. No campo Run Name (Nome do ensaio), introduza um nome exclusivo à sua escolha para identificar o ensaio atual.
O nome do ensaio pode conter um máximo de 225 caracteres alfanuméricos, espaços, traços e sublinhados.
6. Selecione uma das seguintes localizações de análise.
 - **BaseSpace** — Analisar os dados de sequenciação na cloud.
 - **Local** — Analisar os dados de sequenciação no instrumento ou gerar uma folha de amostra v2 para o modo Local ou Híbrido.
7. Selecione um tipo e versão da análise.
Para obter mais informações sobre a análise secundária, consulte [Ficheiros de saída da análise secundária DRAGEN na página 64](#) ou a documentação da aplicação Hub de Sequências BaseSpace. Se tiver selecionado a análise DRAGEN Single Cell RNA, consulte a página de ficheiros de produtos NextSeq 1000/2000 para obter informações sobre a compatibilidade com kits de preparação de bancos de ARN de célula única de terceiros.

i | Para a análise no instrumento, a versão selecionada tem de corresponder com a versão da plataforma DRAGEN instalada no instrumento. Para confirmar a versão da plataforma DRAGEN instalada no instrumento, consulte [Fluxo de trabalho DRAGEN e atualizações da licença na página 80](#).

8. **[Opcional]** Configure kits de índice personalizados conforme se segue.
Se estiver a utilizar mais de um banco, os bancos têm de apresentar os mesmos comprimentos de leitura de índice.
 - a. Selecione **Add Custom Index Adapter Kit** (Adicionar kit de adaptador de índice personalizado) no menu pendente Index Adapter Kit (Kit de adaptador de índice).
 - b. Selecione um tipo de modelo e introduza o nome do kit, as sequências do adaptador, as estratégias de indexação e as sequências de indexação.
Certifique-se de que as sequências do adaptador do segundo índice (i5) estão na orientação de avanço.
 - c. Selecione **Create New Kit** (Criar kit novo).
 9. **[Opcional]** Configure um kit personalizado para preparação de bancos conforme se segue.
 - a. Selecione **Add Custom Library Prep Kit** (Kit personalizado para preparação de bancos) no menu pendente Library Prep Kit (Kit de preparação de bancos).
 - b. Introduza o nome, os tipos de leitura, os ciclos de leitura predefinidos e os kits do adaptador de índice compatíveis para o seu kit personalizado para preparação de bancos.
 - c. Selecione **Create New Kit** (Criar kit novo).
 10. Selecione as seguintes definições do instrumento. Dependendo do kit de preparação de bancos, as opções recomendadas são selecionadas automaticamente. Alguns kits de preparação de bancos têm um número imposto de leituras de índices e tipos de leituras, que não pode ser alterado.
 - Kit de preparação de bancos
 - Kit do adaptador de índice
 - Número de leituras de índice
 - Tipo de leitura
 - Número de ciclos de sequenciação por leitura
- i** | Se estiver selecionado Not Specified (Não especificado) para o kit de preparação de bancos, o número de leituras de índice não é atualizado até se introduzirem sequências de indexação na secção Sample Data (Dados da amostra).
11. Introduza as informações da amostra na folha de cálculo Sample Data (Dados da amostra) utilizando uma das seguintes opções. Para agrupar amostras para a agregação de dados durante a análise a jusante, atribua um nome ao grupo na coluna Project (Projeto).
 - Selecione **Import Data** (Importar dados) e, em seguida, selecione a sua folha de amostra. Certifique-se de que a sua folha de amostra cumpre os requisitos de formatação. Consulte [Definições da folha de amostra v2 na página 90](#). Alterar a sua folha de amostra após a transferência inicial pode resultar na falha da análise.

- Cole as ID das amostras e as posições dos poços da placa de índices ou os índices i7 e i5 diretamente a partir de um ficheiro externo. Antes de colar, introduza o número de linhas de amostras no campo Rows (Linhas) e, em seguida, selecione +. As ID de amostras podem conter até 20 caracteres alfanuméricos, hífenes e sublinhados.
 - i** | As placas de índices com disposição fixa requerem as entradas para a posição dos poços. Os índices que não têm uma disposição fixa requerem as entradas para os índices i7 e i5. Os índices i5 têm de ser introduzidos na orientação de avanço.
- Introduza manualmente as ID de amostras e as posições dos poços correspondentes ou índices. Se estiver selecionado Not Specified (Não especificado) para o kit de preparação de bancos, introduza as sequências do Índice 2 (i5) na orientação de avanço.

12. Selecione **Next** (Seguinte).

Configurar a análise secundária

Configure as definições para o tipo de análise selecionado para o seu ensaio. Para obter mais informações sobre os fluxos de trabalho da análise DRAGEN, consulte [Ficheiros de saída da análise secundária DRAGEN na página 64](#).

DRAGEN BCL Convert da Illumina

Utilize os passos seguintes para configurar a análise DRAGEN BCL Convert da Illumina.

1. Introduza as seguintes definições opcionais.

Definição	Descrição
AdapterRead1	Sequência do adaptador para a leitura 1. Se utilizar um kit de preparação de bancos da Illumina, deixe o campo AdapterRead1 em branco.
AdapterRead2	Sequência do adaptador para a leitura 2. Se utilizar um kit de preparação de bancos da Illumina, deixe o campo AdapterRead2 em branco.
BarcodeMismatchesIndex1	O número de elementos não correspondentes permitidos entre a primeira leitura de índice e a sequência de indexação. O valor predefinido é 1. Se um código de barras for de 6 bp, o valor recomendado é 0.
BarcodeMismatchesIndex2	O número de elementos não correspondentes permitidos entre a segunda leitura de índice e a sequência de indexação. O valor predefinido é 1. Se um código de barras for de 6 bp, o valor recomendado é 0.

Definição	Descrição
OverrideCycles	<p>Cadeia utilizada para especificar os ciclos UMI e mascarar os ciclos de uma leitura. São permitidos os seguintes valores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N — Especifica os ciclos a ignorar. • Y — Especifica os ciclos de sequenciação. • I — Especifica os ciclos de índice. • U — Especifica os ciclos UMI a serem recortados. <p>Cada elemento é separado por ponto e vírgula. Seguem-se exemplos de entradas OverrideCycles.</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

2. Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
3. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
 - **gzip** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato gzip.
 - **DRAGEN** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato ora.
4. Conclua a configuração do ensaio.
 - Para enviar a configuração do ensaio para a sua conta do Hub de Sequências BaseSpace, selecione **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ensaios enviados para o Hub de Sequências BaseSpace aparecem na lista de ensaios planeados e estão disponíveis para os sistemas que utilizam o modo Cloud ou Híbrido.
 - Para guardar a configuração do ensaio como folha de amostra no formato de ficheiro v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar folha de amostra) na lista pendente **Submit Run** (Enviar ensaio). A folha de amostra é necessária para iniciar os ensaios nos sistemas utilizando o modo Local. Esta opção está disponível apenas se o modo Local tiver sido selecionado para a localização da análise.

Illumina DRAGEN Enrichment

Utilize os passos que se seguem para configurar a análise DRAGEN Enrichment da Illumina.

1. Selecione um genoma de referência.
Se possível, utilize um genoma de referência com alt aware.
2. Selecione um ficheiro *.bed que contenha as regiões-alvo ou carregue um novo ficheiro personalizado.
Certifique-se de que o genoma de referência do ficheiro BED corresponde ao genoma de referência selecionado no passo 1. Para um novo ficheiro BED personalizado, utilize o seguinte formato de nome: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Modo Local** — Selecione **Select Custom File (Local)** (Selecionar ficheiro personalizado [Local]) para carregar um ensaio individual ou **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]) para a utilização repetida.
 - **Modo Cloud ou Híbrido** — Selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]). O ficheiro BED personalizado está disponível apenas no Grupo de trabalho no qual foi carregado.
3. Selecione o identificador de variante de linha germinal ou somática.
 4. **[Opcional]** Se utilizar o identificador de variante somática, selecione um ficheiro de linha de base de ruído. Consulte [Importar ficheiros de linha de base de ruído na página 19](#) para obter mais informações.
 5. Selecione um formato de saída do mapa/alinhamento.
 6. Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
 7. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
 - **gzip** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato gzip.
 - **DRAGEN** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato ora.
 8. Conclua a configuração do ensaio.
 - Para enviar a configuração do ensaio para a sua conta do Hub de Sequências BaseSpace, selecione **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ensaios enviados para o Hub de Sequências BaseSpace aparecem na lista de ensaios planeados e estão disponíveis para os sistemas que utilizam o modo Cloud ou Híbrido.
 - Para guardar a configuração do ensaio como folha de amostra no formato de ficheiro v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar folha de amostra) na lista pendente **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ficheiros de suporte da análise secundária e a folha de amostra são transferidos para uma pasta *.zip e são necessários para iniciar os ensaios nos sistemas utilizando o modo Local. Esta opção está disponível apenas se o modo Local tiver sido selecionado para a localização da análise.

Illumina DRAGEN Germline

Utilize os passos seguintes para configurar a análise DRAGEN Germline da Illumina.

1. Selecione o seu genoma de referência.
Se possível, utilize um genoma de referência com alt aware.
2. Selecione um formato de saída do mapa/alinhamento.
3. Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
4. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
 - **gzip** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato gzip.

- **DRAGEN** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato ora.
5. Conclua a configuração do ensaio.
 - Para enviar a configuração do ensaio para a sua conta do Hub de Sequências BaseSpace, selecione **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ensaios enviados para o Hub de Sequências BaseSpace aparecem na lista de ensaios planeados e estão disponíveis para os sistemas que utilizam o modo Cloud ou Híbrido.
 - Para guardar a configuração do ensaio como folha de amostra no formato de ficheiro v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar folha de amostra) na lista pendente **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ficheiros de suporte da análise secundária e a folha de amostra são transferidos para uma pasta *.zip e são necessários para iniciar os ensaios nos sistemas utilizando o modo Local. Esta opção está disponível apenas se o modo Local tiver sido selecionado para a localização da análise.

Illumina DRAGEN RNA

Utilize os passos seguintes para configurar a análise DRAGEN RNA da Illumina.

1. Selecione o seu genoma de referência.
Se possível, utilize um genoma de referência sem alt aware.
2. Selecione o seu formato de saída do mapa/alinhamento.
3. Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
4. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
 - **gzip** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato gzip.
 - **DRAGEN** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato ora.
5. **[Opcional]** Carregue um ficheiro de anotação de ARN no formato Gene Transfer Format (GTF).
 - **Modo Local** — Selecione **Select Custom File (Local)** (Selecionar ficheiro personalizado [Local]) para carregar um ensaio individual ou **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]) para a utilização repetida.
 - **Modo Cloud ou Híbrido** — Selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]). O ficheiro GTF está disponível apenas no Grupo de trabalho no qual foi carregado.
Quando um ficheiro GTF tiver sido carregado para um Grupo de trabalho do Hub de Sequências BaseSpace, selecione o ficheiro de anotação de ARN no menu pendente.
6. Selecione se pretende ativar a expressão diferencial.
7. Se tiver ativado a expressão diferencial, selecione um controlo ou um valor de comparação para cada amostra.

Em cada grupo de comparação, qualquer amostra marcada como controlo é comparada com todas as amostras marcadas como comparação. Se a amostra não incluir um valor de controlo ou comparação, selecione **na** como o valor.

8. Conclua a configuração do ensaio.
 - Para enviar a configuração do ensaio para a sua conta do Hub de Sequências BaseSpace, selecione **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ensaios enviados para o Hub de Sequências BaseSpace aparecem na lista de ensaios planeados e estão disponíveis para os sistemas que utilizam o modo Cloud ou Híbrido.
 - Para guardar a configuração do ensaio como folha de amostra no formato de ficheiro v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar folha de amostra) na lista pendente **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ficheiros de suporte da análise secundária e a folha de amostra são transferidos para uma pasta *.zip se tiver sido fornecido um ficheiro GTF opcional e são necessários para iniciar os ensaios nos sistemas utilizando o modo Local. Esta opção está disponível apenas se o modo Local tiver sido selecionado para a localização da análise.

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Utilize os passos seguintes para configurar a análise DRAGEN Single Cell RNA da Illumina.

1. Selecione o seu genoma de referência.
Se possível, utilize um genoma de referência sem alt aware.
2. **[Opcional]** Carregue um ficheiro de anotação de ARN no formato Gene Transfer Format (GTF).
 - **Modo Local** — Selecione **Select Custom File (Local)** (Selecionar ficheiro personalizado [Local]) para carregar um ensaio individual ou **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]) para a utilização repetida.
 - **Modo Cloud ou Híbrido** — Selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]). O ficheiro GTF está disponível apenas no Grupo de trabalho no qual foi carregado.

Quando um ficheiro GTF tiver sido carregado para um Grupo de trabalho do Hub de Sequências BaseSpace, selecione o ficheiro de anotação de ARN no menu pendente.

3. Selecione o seu formato de saída do mapa/alinhamento.
4. Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
5. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
 - **gzip** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato gzip.
 - **DRAGEN** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato ora.
6. Selecione a configuração idêntica ao seu tipo de kit de preparação de bancos.
Por exemplo, se tiver selecionado o Single Cell RNA Library Kit 1 como o seu kit de preparação de bancos, selecione Type 1 (Tipo 1) para o Tipo de configuração.

7. Selecione a leitura de código de barras.
8. **[Opcional]** Edite o número de bases nos códigos de barras e o UMI. Os valores são preenchidos automaticamente com base no kit de preparação de bancos e tipo de configuração selecionado.
9. Selecione a orientação da cadeia.
10. **[Opcional]** Selecione um ficheiro que inclua as suas sequências de códigos de barras ou carregue um novo ficheiro personalizado.
11. Se utilizar um tipo de configuração Avançado/Personalizado, introduza os valores para o número de ciclos de substituição, a posição do código de barras e a posição de UMI.
12. Conclua a configuração do ensaio.
 - Para enviar a configuração do ensaio para a sua conta do Hub de Sequências BaseSpace, selecione **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ensaios enviados para o Hub de Sequências BaseSpace aparecem na lista de ensaios planeados e estão disponíveis para os sistemas que utilizam o modo Cloud ou Híbrido.
 - Para guardar a configuração do ensaio como folha de amostra no formato de ficheiro v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar folha de amostra) na lista pendente **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ficheiros de suporte da análise secundária e a folha de amostra são transferidos para uma pasta *.zip se tiver sido fornecido um ficheiro GTF opcional e são necessários para iniciar os ensaios nos sistemas utilizando o modo Local. Esta opção está disponível apenas se o modo Local tiver sido selecionado para a localização da análise.

Illumina DRAGEN Amplicon

Utilize os passos seguintes para configurar a análise DRAGEN Amplicon da Illumina.

1. Selecione o seu genoma de referência.
2. Selecione um ficheiro *.bed que contenha as regiões-alvo ou carregue um novo ficheiro personalizado.

Certifique-se de que o genoma de referência do ficheiro BED corresponde ao genoma de referência selecionado no passo 1. Para um novo ficheiro BED personalizado, utilize o seguinte formato de nome: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Modo Cloud ou Híbrido** — Selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]). O ficheiro BED personalizado está disponível apenas no Grupo de trabalho no qual foi carregado.
 - **Modo Local** — Selecione **Select Custom File (Local)** (Selecionar ficheiro personalizado [Local]) para carregar um ensaio individual ou **Upload Custom File (BaseSpace)** (Carregar ficheiro personalizado [BaseSpace]) para a utilização repetida.
3. Selecione o identificador de variante de linha germinal ou somática.
 4. Selecione o seu formato de saída do mapa/alinhamento.

5. **[Local]** Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
6. Selecione se pretende guardar uma cópia dos seus ficheiros FASTQ. Os ficheiros FASTQ são gerados apenas se optar por manter ficheiros FASTQ.
7. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
 - **gzip** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato gzip.
 - **DRAGEN** — Guarde os ficheiros FASTQ no formato ora.
8. Conclua a configuração do ensaio.
 - Para enviar a configuração do ensaio para a sua conta do Hub de Sequências BaseSpace, selecione **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ensaios enviados para o Hub de Sequências BaseSpace aparecem na lista de ensaios planeados e estão disponíveis para os sistemas que utilizam o modo Cloud ou Híbrido.
 - **[Local]** Para guardar a configuração do ensaio como folha de amostra no formato de ficheiro v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar folha de amostra) na lista pendente **Submit Run** (Enviar ensaio). Os ficheiros de suporte da análise secundária e a folha de amostra são transferidos para uma pasta *.zip e são necessários para iniciar os ensaios nos sistemas utilizando o modo Local. Esta opção está disponível apenas se o modo Local tiver sido selecionado para a localização da análise.

Descongelar o cartucho acondicionado e a célula de fluxo

Este passo descongela o cartucho *no saco por abrir* e prepara a célula de fluxo. Descongele o cartucho acondicionado utilizando um de três métodos: banho de água controlado, frigorífico ou ar à temperatura ambiente. Utilize o cartucho imediatamente depois de descongelar, sem voltar a congelar. Se não conseguir utilizar o cartucho imediatamente depois de descongelar, consulte [Voltar a armazenar os consumíveis na página 85](#).

Figura 4 Cartucho acondicionado



Descongelar o cartucho num banho de água controlado

1. Calce um novo par de luvas sem pó e remova o cartucho do armazenamento.
2. Remova o cartucho da caixa, mas **não abra o saco de alumínio prateado**.

! Descongelar um saco rasgado ou perfurado num banho de água pode resultar na falha da sequenciação. Em vez disso, descongele à temperatura ambiente ou num frigorífico.

3. Descongele o cartucho acondicionado num banho de água controlado a 25°C durante 6 horas:
 - Mantenha uma profundidade da água de pelo menos 9,5–10 cm independentemente do número de cartuchos que estiver a descongelar.
 - Prepare um banho de água com controlo de temperatura a 25°C.
 - Coloque a etiqueta do saco para cima e coloque no banho de água sem mergulhar.

! Não tente forçar a imersão do cartucho. Se a etiqueta do saco não estiver virada para cima ou o cartucho virar ao contrário durante o descongelamento, os dados de sequenciação serão afetados negativamente.

- Não exceda as 8 horas no banho de água.
 - Não descongele simultaneamente mais cartuchos do que o número suportado pelo banho de água. Para os banhos de água compatíveis, consulte [Equipamento auxiliar na página 29](#).
 - Não empilhe os cartuchos.
4. Remova o cartucho do banho de água e seque com papel absorvente.

Descongelo do cartucho num frigorífico

1. Calce um novo par de luvas sem pó.
2. Um dia antes do ensaio antecipado, retire o cartucho do armazenamento de -25°C a -15°C .
3. Remova o cartucho da caixa, mas *não abra o saco de alumínio prateado*.
4. Posicione o cartucho à temperatura ambiente de forma que a etiqueta fique voltada para cima e o ar circule em ambos os lados e na parte superior.

 Se a etiqueta do saco não estiver virada para cima, os dados de sequenciação serão afetados negativamente.

5. Descongele à temperatura ambiente durante 6 horas.
6. Posicione o cartucho num frigorífico entre 2°C a 8°C de forma que a etiqueta fique voltada para cima e o ar circule em ambos os lados.

 Se a etiqueta do saco não estiver virada para cima, os dados de sequenciação serão afetados negativamente.

7. Descongele no frigorífico durante 12 horas. Não exceda as 72 horas.

Descongelo do cartucho à temperatura ambiente

1. Calce um novo par de luvas sem pó.
2. Retire o cartucho do armazenamento de -25°C a -15°C .
3. Remova o cartucho da caixa, mas *não abra o saco de alumínio prateado*.
4. Posicione o cartucho de forma que a etiqueta fique voltada para cima e o ar circule em ambos os lados e na parte superior.

 Se a etiqueta do saco não estiver virada para cima, os dados de sequenciação serão afetados negativamente.

5. Descongele à temperatura ambiente durante 9 horas. Não exceda as 16 horas.

Preparar a célula de fluxo e o cartucho

1. Prepare a célula de fluxo da seguinte forma.
 - a. Retire uma nova célula de fluxo do armazenamento de 2°C a 8°C .
 - b. Reserve a embalagem por abrir à temperatura ambiente durante 10–15 minutos para evitar a condensação quando remover a célula de fluxo da embalagem. Prepare a célula de fluxo agora garante que esta alcança a temperatura ambiente a tempo.
2. Se utilizar o método de descongelamento no frigorífico:
 - a. Retire o cartucho descongelado do armazenamento entre 2°C e 8°C .

- b. Reserve o cartucho por abrir à temperatura ambiente durante pelo menos 15 minutos antes da sequenciação. Não exceda 1 hora.

Diluir bancos

Se utilizar a desnaturação e a diluição integradas, este passo dilui os bancos para a concentração de carregamento aplicável. Um pico PhiX¹ opcional de 2% fornece indicadores adicionais, diversidade de base ou um controlo positivo. A percentagem de pico PhiX deve ser aumentada para os bancos com uma diversidade de base inferior.

Se efetuar a desnaturação e a diluição manualmente, utilize o *Guia de desnaturação e diluição de bancos do sistema NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. Este passo aplica-se apenas à desnaturação e diluição integradas.

Diluir banco de 2 nM

1. [Opcional] Remova o stock de PhiX 10 nM do armazenamento de -25 °C a -15 °C. O PhiX é necessário apenas para um ensaio de pico opcional ou apenas de PhiX.
2. [Opcional] Descongele o PhiX à temperatura ambiente durante 5 minutos e, em seguida, quantifique utilizando um método à base de fluorescência, como o Qubit, para confirmar a concentração de PhiX. Se a quantificação não for possível, continue com a concentração de 10 nM.
3. Agite brevemente em vórtice o banco ou o PhiX e, em seguida, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
4. Utilizando o RSB com o diluente Tween 20, prepare pelo menos 24 µl de banco 2 nM num microtubo de baixa ligação. Para obter as instruções do pico PhiX, consulte [Adicionar um PhiX Control \(Opcional\) na página 45](#).
5. Agite brevemente em vórtice e, em seguida, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.

Diluir banco de 2 nM para a concentração de carregamento

1. Combine os seguintes volumes num microtubo de baixa ligação para preparar um banco de 24 µl diluído para a concentração de carregamento apropriada:

Tipo de banco*	Concentração de carregamento (pM)	Volume do banco de 2 nM (µl)	Volume do RSB com Tween 20 (µl)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15

¹O PhiX é um banco Illumina, pronto a utilizar, com uma representação equilibrada de nucleótidos.

Tipo de banco*	Concentração de carregamento (pM)	Volume do banco de 2 nM (µl)	Volume do RSB com Tween 20 (µl)
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with 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

* Para os tipos de banco não incluídos na lista, comece com uma concentração de carregamento de 650 pM e optimize em ensaios subsequentes.

Esta tabela apresenta exemplos de concentrações de carregamento. O Sistema NextSeq 1000/2000 é compatível com todos os kits de preparação de bancos da Illumina, mas a concentração de carregamento ideal pode variar.

- Agite brevemente em vórtice e, em seguida, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- Reserve o banco diluído em gelo até estar pronto para sequenciação.
Os bancos de sequenciação diluídos na concentração de carregamento no mesmo dia em que são diluídos.
- Proceda da seguinte forma.
 - Se adicionar PhiX, consulte [Adicionar um PhiX Control \(Opcional\) na página 45](#).
 - Se não adicionar PhiX ou se estiver a realizar um ensaio apenas de PhiX, consulte [Carregar consumíveis no cartucho na página 46](#).

Adicionar um PhiX Control (Opcional)

- Combine os seguintes volumes num microtubo de baixa ligação para preparar 20 µl 1 nM de PhiX:
 - 10 nM PhiX (2 µl)
 - RSB com Tween 20 (18 µl)
- Agite brevemente em vórtice e, em seguida, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- Adicione 1 µl 1 nM PhiX ao banco de 24 µl diluído para a concentração de carregamento final. Estes volumes resultam num pico de PhiX de ~2%. A percentagem atual varia consoante a qualidade e a quantidade do banco.

4. Reserve o banco com pico de PhiX em gelo até estar pronto para sequenciação.
Efetue a sequenciação dos bancos com pico de PhiX no mesmo dia em que foram diluídos.

Carregar consumíveis no cartucho

Este passo prepara o cartucho para a sequenciação ao misturar os reagentes pré-cheios e ao carregar os bancos diluídos e a célula de fluxo.

Preparar o cartucho

1. Abra o saco do cartucho ao rasgar ou cortar com uma tesoura o entalhe superior em ambos os lados.
2. Remova o cartucho do saco. Elimine o saco e o dessecante.
3. Inverta o cartucho 10 vezes para misturar os reagentes.
Os componentes internos podem fazer barulho durante a inversão, o que é normal.



Carregar a célula de fluxo

1. Abra a embalagem de alumínio prateado ao rasgar ou cortar com uma tesoura a abertura superior em ambos os lados.
Se não conseguir utilizar a célula de fluxo imediatamente, consulte [Voltar a armazenar os consumíveis na página 85](#).

2. Retire a célula de fluxo da embalagem.

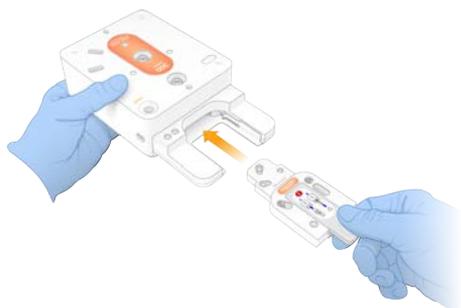
Coloque a embalagem de alumínio e o dessecante de parte caso tenha de voltar a armazenar a célula de fluxo. O dessecante está incluído numa bolsa no fundo da embalagem de alumínio. Elimine-os quando a sequenciação iniciar.



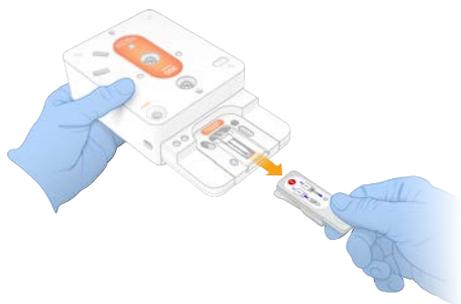
3. Segure a célula de fluxo pela patilha cinzenta com a etiqueta na patilha voltada para cima.

4. Empurre para inserir a célula de fluxo na ranhura na parte da frente do cartucho.

Um clique audível indica que a célula de fluxo está no devido lugar. Quando estiver carregado corretamente, a patilha cinzenta sai do cartucho.



5. Puxe para trás e remova a patilha cinzenta para expor a célula de fluxo. Recicle a patilha.



Carregar bancos

1. Com uma nova ponta de pipeta P1000, perfure o reservatório do banco e empurre a folha de alumínio para as extremidades para alargar o orifício.
2. Elimine a ponta da pipeta para evitar a contaminação.

3. Adicione 20 µl de banco diluído ao **fundo** do reservatório ao descer lentamente a ponta da pipeta até ao fundo do reservatório antes de distribuir. Evite tocar na folha de alumínio.



Iniciar um ensaio de sequenciação

Este passo inicia um ensaio de sequenciação em um de quatro modos:

- **Modo Cloud** — O ensaio é selecionado a partir de uma lista de ensaios planeados no Software de controlo NextSeq 1000/2000. Durante a sequenciação, os dados cBCL são carregados no Hub de Sequências BaseSpace. Após a sequenciação, o DRAGEN no Hub de Sequências BaseSpace inicia automaticamente.
- **Modo Híbrido** — O ensaio é selecionado a partir de uma lista de ensaios planeados no Software de controlo NextSeq 1000/2000. Após a sequenciação, a análise no instrumento inicia automaticamente. Os dados cBCL e os ficheiros de saída da análise secundária DRAGEN são armazenados na pasta de saída selecionada.
- **Modo Local** — Uma folha de amostra no formato de ficheiro v2 é importada manualmente para o Software de controlo NextSeq 1000/2000. Após a sequenciação, a análise no instrumento inicia automaticamente. Os dados cBCL e os ficheiros de saída da análise secundária DRAGEN são armazenados na pasta de saída selecionada. Se for selecionada a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), a análise também pode ser iniciada através das aplicações do Hub de Sequências BaseSpace após a conclusão da sequenciação.
- **Modo Autónomo** — Configure um ensaio, seguindo as instruções no Software de controlo NextSeq 1000/2000 para gerar dados cBCL.

 | Abrir o visor durante a verificação pré-ensaio ou o ensaio pode provocar a falha do ensaio.

 Mantenha as mãos afastadas do instrumento durante a abertura e o fecho do visor para evitar ferimentos.

Iniciar um ensaio no modo Cloud ou Híbrido

1. Configure o modo de ensaio, conforme descrito em [Configurar o Run Mode \(Modo de ensaio\) na página 20](#).
2. Selecione **Start** (Iniciar).
3. Introduza as suas credenciais de início de sessão do Hub de Sequências BaseSpace e, em seguida, selecione **Sign In** (Iniciar sessão).
4. Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), selecione o Grupo de trabalho que contém o seu ensaio criado na Configuração de ensaios no instrumento no Hub de Sequências BaseSpace.

 É necessário selecionar um grupo de trabalho para evitar erros. Certifique-se de que selecionou um grupo de trabalho antes de continuar.

5. Selecione **Next** (Seguinte).
6. Selecione o seu ensaio.
7. Confirme que as opções Analysis (Análise), Run Length (Comprimento do ensaio) e Secondary Analysis version (Versão da análise secundária) correspondem ao ensaio correto.
A análise apresenta Cloud_ para indicar que a análise ocorre no Hub de Sequências BaseSpace.
8. Selecione **Review** (Rever).
9. **[Opcional]** Introduza as localizações do primer de leitura personalizado e primer de indexação personalizado.
Para obter informações sobre a preparação e a adição de primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)*. Certifique-se de que visita a página sobre Produtos compatíveis para o seu kit de preparação de bancos de forma a verificar se são necessários primers personalizados da Illumina.
10. **[Opcional]** Selecione uma receita personalizada. Para obter mais informações, consulte [Sequenciação de Dark Cycle na página 106](#).
Se utilizar o Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3 e o Illumina Stranded Total RNA Prep com o Ribo-Zero Plus kit ou o Illumina Stranded mRNA Prep kit, a receita personalizada é selecionada automaticamente.
11. **[Opcional]** Para desnaturar e diluir bancos manualmente, anule a seleção da caixa de verificação **Denature and Dilute On Board** (Desnaturação e diluição integradas). Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bancos NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*.
A seleção predefinida é configurada nas definições do Software de controlo NextSeq 1000/2000.
12. **[Opcional]** Para alterar a pasta de saída, selecione o campo Output Folder (Pasta de saída) e introduza uma nova localização.

O campo Output Folder (Pasta de saída) é preenchido automaticamente com base nas suas predefinições e é necessário, a não ser que se selecione **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios).

Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), a opção Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar no Hub de Sequências BaseSpace) apresenta Enabled (Ativado).

Se tiver selecionado Proactive and Run Monitoring (Suporte proativo e monitorização de ensaios), a opção Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar no Hub de Sequências BaseSpace) apresenta Disabled (Desativado).

13. Reveja as informações do ensaio e, em seguida, selecione **Prep** (Preparar).

Iniciar um ensaio local

1. Configure o modo de ensaio, conforme descrito em [Configurar o Run Mode \(Modo de ensaio\) na página 20](#).
2. Selecione **Start** (Iniciar).
3. Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios) ou Proactive and Run Monitoring (Suporte proativo e monitorização de ensaios), introduza as suas credenciais de início de sessão do seu Hub de Sequências BaseSpace e, em seguida, selecione **Sign In** (Iniciar sessão).
4. Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), selecione o Grupo de trabalho do Hub de Sequências BaseSpace onde pretende guardar o seu ensaio e, em seguida, selecione **Next** (Seguinte).

 É necessário selecionar um grupo de trabalho para evitar erros. Certifique-se de que selecionou um grupo de trabalho antes de continuar.

5. Selecione **Choose...** (Escolher...) em Start With Sample Sheet (Iniciar com a folha de amostra) e navegue para a folha de amostra na formatação v2 no instrumento NextSeq 1000/2000, na unidade portátil ou na unidade de rede montada. Os nomes dos ficheiros das folhas de amostras não podem conter caracteres especiais.

O Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3 deteta automaticamente a versão DRAGEN da folha de amostra e indica-lhe que deve mudar de versões, se necessário. A versão DRAGEN tem de ser instalada no sistema. Para obter informações sobre a instalação, consulte [Atualizações de software na página 78](#).

- **Configuração utilizada de ensaios do instrumento** — Selecione a pasta .zip que contém a folha de amostra v2 e os ficheiros de suporte, se aplicável. Caso contrário, selecione a folha de amostra v2.
- **Configuração não utilizada de ensaios do instrumento** — Certifique-se de que o ficheiro de suporte da análise secundária está localizado no mesmo diretório que a folha de amostra v2.

i | A folha de amostra selecionada tem de estar na formatação v2. Para criar uma folha de amostra v2, transfira a folha de amostra gerada na Configuração de ensaios do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace ou edite um modelo de folha de amostra v2 fornecido na página de suporte do NextSeq 1000/2000. Consulte [Definições da folha de amostra v2 na página 90](#) para obter mais informações sobre a formatação e os requisitos das folhas de amostras v2. Certifique-se de que quaisquer ficheiros referidos na folha de amostra estão localizados na mesma pasta que a folha de amostra.

6. Selecione **Review** (Rever).
7. **[Opcional]** Introduza as localizações do primer de leitura personalizado e primer de indexação personalizado.
Para obter informações sobre a preparação e a adição de primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)*. Certifique-se de que visita a página sobre Produtos compatíveis para o seu kit de preparação de bancos de forma a verificar se são necessários primers personalizados da Illumina.
8. **[Opcional]** Selecione uma receita personalizada. Para obter mais informações, consulte [Sequenciação de Dark Cycle na página 106](#).
Se utilizar o Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3 e o Illumina Stranded Total RNA Prep com o Ribo-Zero Plus kit ou o Illumina Stranded mRNA Prep kit, a receita personalizada é selecionada automaticamente.
9. **[Opcional]** Para desnaturar e diluir bancos manualmente, anule a seleção da caixa de verificação **Denature and Dilute On Board** (Desnaturação e diluição integradas). Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bancos NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. A seleção predefinida é configurada nas definições do Software de controlo NextSeq 1000/2000.
10. **[Opcional]** Para alterar a pasta de saída, selecione o campo Output Folder (Pasta de saída) e introduza uma nova localização.
O campo Output Folder (Pasta de saída) é preenchido automaticamente com base nas suas predefinições e é necessário, a não ser que se selecione Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios).
Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), a opção Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar no Hub de Sequências BaseSpace) apresentará Enabled (Ativado).
Se tiver selecionado Proactive and Run Monitoring (Suporte proativo e monitorização de ensaios), a opção Save to BaseSpace Sequence Hub (Guardar no Hub de Sequências BaseSpace) apresenta Disabled (Desativado).
11. Reveja as informações do ensaio e, em seguida, selecione **Prep** (Preparar).

Iniciar um ensaio autónomo

1. Configure o modo de ensaio, conforme descrito em [Configurar o Run Mode \(Modo de ensaio\) na página 20](#).
2. Selecione **Start** (Iniciar).
3. Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios) ou Proactive and Run Monitoring (Suporte proativo e monitorização de ensaios), introduza as suas credenciais de início de sessão do seu Hub de Sequências BaseSpace e, em seguida, selecione **Sign In** (Iniciar sessão).
4. Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), selecione o Grupo de trabalho do Hub de Sequências BaseSpace onde pretende guardar o seu ensaio e, em seguida, selecione **Next** (Seguinte).
5. Selecione **Set Up New Run** (Configurar um novo ensaio).
6. No campo Run Name (Nome do ensaio), introduza, à sua escolha, um nome exclusivo para identificar o ensaio atual.
O nome do ensaio pode conter caracteres alfanuméricos, traços, hífenes e sublinhados.
7. Em Read Type (Tipo de leitura), selecione quantas leituras de sequenciação pretende executar:
 - **Single Read** (Leitura única) — Executar uma leitura, que é a opção mais simples e mais rápida.
 - **Paired End** (Extremidades emparelhadas) — Executar duas leituras, cujo consenso gera dados de maior qualidade e fornece um alinhamento mais preciso.
8. Introduza o número de ciclos executados em cada leitura:
Não existe um número máximo de ciclos de índice, mas a soma dos ciclos de leitura e ciclos de índice tem de ser inferior ao número de ciclos indicados na etiqueta do cartucho mais 27.

Read 1 (Leitura 1) — Introduza **1–151** ciclos.

Index 1 (Índice 1) — Introduza o número de ciclos para o primer de Index 1 (Índice 1) (i7). Para um ensaio apenas de PhiX, introduza **0** em ambos os campos do índice.

Index 2 (Índice 2) — Introduza o número de ciclos para o primer de Index 2 (Índice 2) (i5).

Read 2 (Leitura 2) — Introduza até **151** ciclos. Este valor é normalmente igual ao valor da Read 1 (Leitura 1).

9. Se tiver selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios), selecione **Choose...** (Escolher...) para importar uma folha de amostra. O Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3 deteta automaticamente a versão DRAGEN da folha de amostra e indica-lhe que deve mudar de versões, se necessário. A versão DRAGEN tem de ser instalada no sistema. Para obter informações sobre a instalação, consulte [Atualizações de software na página 78](#).

- i** | A folha de amostra selecionada tem de estar na formatação v2. Para criar uma folha de amostra v2, transfira a folha de amostra gerada na Configuração de ensaios do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace ou edite um modelo de folha de amostra v2 fornecido na página de suporte do NextSeq 1000/2000. Consulte [Definições da folha de amostra v2 na página 90](#) para obter mais informações sobre a formatação e os requisitos das folhas de amostras v2. Certifique-se de que quaisquer ficheiros referidos na folha de amostra estão localizados na mesma pasta que a folha de amostra.
10. **[Opcional]** Introduza as localizações do primer de leitura personalizado e primer de indexação personalizado.
Para obter informações sobre a preparação e a adição de primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)*. Certifique-se de que visita a página sobre Produtos compatíveis para o seu kit de preparação de bancos de forma a verificar se são necessários primers personalizados da Illumina.
 11. **[Opcional]** Selecione uma receita personalizada. Para obter mais informações, consulte [Sequenciação de Dark Cycle na página 106](#)
 12. **[Opcional]** Para desnaturar e diluir bancos manualmente, anule a seleção da caixa de verificação **Denature and Dilute On Board** (Desnaturação e diluição integradas). Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bancos NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. A seleção predefinida é configurada nas definições do Software de controlo NextSeq 1000/2000.
 13. **[Opcional]** Para alterar a pasta de saída, selecione o campo Output Folder (Pasta de saída) e introduza uma nova localização.
O campo Output Folder (Pasta de saída) é preenchido automaticamente com base nas suas predefinições e é necessário, a não ser que se selecione Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios).
 14. Selecione **Prep** (Preparar).

Carregar os consumíveis no instrumento

1. Certifique-se de que o cartucho foi descongelado anteriormente e invertido 10 vezes para misturar antes de carregar a célula de fluxo (patilha cinzenta removida) e banco diluído.
2. Selecione **Load** (Carregar).
O Software de controlo NextSeq 1000/2000 abre o visor e ejeta o tabuleiro.

3. Coloque o cartucho no tabuleiro com a etiqueta virada para cima e a célula de fluxo dentro do instrumento. Empurre o cartucho até encaixar no lugar.



4. Selecione **Close** (Fechar) para retrain o cartucho e fechar o visor.
O Software de controlo NextSeq 1000/2000 apresenta as informações dos consumíveis digitalizados após ~3 minutos.
5. [Opcional] Selecione **Eject Cartridge** (Ejetar cartucho) para remover o cartucho.
O visor abre-se após 1 minuto e ejeta o cartucho.
6. Selecione **Sequence** (Sequência).

Verificações pré-ensaio

As verificações pré-ensaio incluem uma verificação do instrumento seguida de uma verificação dos fluídicos. A verificação dos fluídicos perfura os selos do cartucho, o que provocará 3-4 sons tipo estalido provenientes do instrumento. Isto é normal. O reagente é agora passado através da célula de fluxo.

! Os consumíveis não podem ser reutilizados depois de iniciada a verificação dos fluídicos.

1. Aguarde cerca de 15 minutos para as verificações pré-ensaio terminarem.
O ensaio começa automaticamente após uma conclusão bem-sucedida.
2. Se ocorrer um erro durante a verificação do instrumento, selecione **Retry** (Tentar novamente) para reiniciar a verificação.
Quando uma verificação está em curso, o círculo dessa verificação é animado.
3. Para resolver erros recorrentes, consulte [Resolução de mensagens de erro na página 84](#).

Monitorizar o progresso do ensaio

1. Monitorize o progresso do ensaio e os indicadores à medida que são apresentados no ecrã Sequencing (Sequenciação).
 - **Estimated run completion** (Conclusão prevista do ensaio) — A data e a hora aproximadas para a conclusão do ensaio. O indicador de conclusão prevista do ensaio necessita de 10 ensaios anteriores para calcular com precisão o tempo de conclusão do ensaio.
 - **Average %Q30** (%Q30 média) — A percentagem média das identificações de bases com um índice de qualidade ≥ 30 .
 - **Projected Yield** (Produção projetada) — O número esperado de identificação de bases no ensaio.
 - **Total Reads PF** (Total de leituras PF) — O número de clusters de extremidades emparelhadas que passam pelo filtro (em milhões).
 - **Real Time Demux** (Demultiplexação em tempo real) — Estado da demultiplexação quando é iniciada no início da Read 2 (Leitura 2), após a conclusão dos ciclos Read 1 (Leitura 1), Index 1 (Índice 1) e Index 2 (Índice 2). O estado irá apresentar Complete (Concluído), mesmo que os ciclos de indexação não sejam realizados. Não está disponível para os ensaios no modo Cloud.
 - **Real Time Alignment** (Alinhamento em tempo real) — Estado do alinhamento da Read 1 (Leitura 1) quando é iniciada no início da Read 2 (Leitura 2), após a conclusão dos ciclos Read 1 (Leitura 1), Index 1 (Índice 1) e Index 2 (Índice 2). Não está disponível para os ensaios no modo Cloud.

Os indicadores Q30 e de produção são apresentados após o ciclo 26 (~6 horas após o início do ensaio).

2. Para monitorizar processos de ensaio, selecione o menu do software de controlo e, em seguida, **Process Management** (Gestão de processos).
3. Para cancelar um ensaio, selecione **End Run** (Terminar ensaio). Consulte [Cancelar um ensaio na página 85](#) (Cancelar um ensaio) para obter mais informações sobre o cancelamento de ensaios.
4. Descarregar consumíveis do instrumento. Remova o cartucho do instrumento no prazo de 3 dias.

Descarregar consumíveis

1. Quando a sequenciação estiver concluída, selecione **Eject Cartridge** (Ejetar cartucho). O software ejeta o cartucho usado do instrumento.
2. Remova o cartucho do tabuleiro.
3. Remova a célula de fluxo do cartucho.
4. Elimine a célula de fluxo, que contém componentes eletrónicos, de acordo com as normas aplicáveis na sua região.

5. [Opcional] Remova a tampa de drenagem por baixo do logótipo da Illumina que se encontra na parte lateral do cartucho sobre uma área apropriada (ou seja, um lavatório ou recipiente para resíduos líquidos perigosos) com a tampa na horizontal ou virada para baixo, afastada do seu rosto. Drene os reagentes usados de acordo com as normas aplicáveis na sua região. O tempo de drenagem depende do tamanho do cartucho caso a purga de reagente automática não esteja ativada.

! Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para obter informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte as FDS em support.illumina.com/sds.html.

6. Elimine o cartucho de reagente.
Uma lavagem pós-ensaio não é necessária porque os fluídicos são eliminados com o cartucho.
7. Selecione **Close Door** (Fechar porta) para recarregar o tabuleiro e voltar ao ecrã inicial.
O software recarrega automaticamente o tabuleiro e os sensores confirmam a remoção do cartucho.

Limpar o tabuleiro do cartucho

É necessário limpar o tabuleiro do cartucho apenas se o reagente tiver sido derramado para o tabuleiro do cartucho.

1. Remova o cartucho do instrumento.
2. Calce um novo par de luvas sem pó e coloque equipamento de proteção adicional.
3. Pulverize solução de lixívia a 10% num pano.
4. Limpe o tabuleiro do cartucho utilizando o pano e, em seguida, remova imediatamente a solução de lixívia utilizando um toalhete resistente.
A lixívia mancha o tabuleiro do cartucho se não for removida imediatamente.
5. Pulverize solução de etanol a 70% no tabuleiro do cartucho e remova imediatamente utilizando um toalhete resistente.
6. Coloque o tabuleiro do cartucho novamente na posição de carregamento.

Saída de sequenciação

Esta secção descreve o software Real-Time Analysis, que efetua a identificação de bases, atribui índices de qualidade e fornece dados. Conheça os diferentes tipos de ficheiros de saída e onde os localizar após um ensaio.

Descrição geral do Real-Time Analysis

Os Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000 executam o RTA3, uma implementação do software Real-Time Analysis, no Compute Engine (CE) do instrumento. O RTA3 extrai as intensidades das imagens recebidas da câmara, efetua identificações de bases, atribui um índice de qualidade às identificações de bases, alinha-se com o PhiX e comunica os dados em ficheiros InterOp para visualização no Software de controlo do instrumento.

Para otimizar o tempo de processamento, o RTA3 armazena as informações na memória. Se o RTA3 for terminado, o processamento não é retomado e quaisquer dados do ensaio que estiverem a ser processados na memória são perdidos.

Entradas RTA3

O RTA3 necessita das imagens de blocos contidas na memória do sistema local para o processamento. O RTA3 recebe as informações do ensaio e os comandos do software de controlo.

Saídas RTA3

As imagens para cada canal colorido são transferidas na memória para o RTA3 como blocos. A partir destas imagens, o RTA3 produz um conjunto de ficheiros de identificação de bases classificados por qualidade e ficheiros de filtro. Todos os outros ficheiros gerados são ficheiros de saída de suporte.

Tipo de ficheiro	Descrição
Ficheiros de identificação de bases	Cada bloco analisado é incluído num ficheiro de identificação de bases concatenado (*.cbcl). Os blocos da mesma via e superfície são agregados em 1 ficheiro *.cbcl para cada via e superfície.
Ficheiros de filtro	Cada bloco produz um ficheiro de filtro (*.filter) que especifica se um cluster passa pelo filtro.
Ficheiros de localização de clusters	Os ficheiros de localização de clusters (*.locs) contêm as coordenadas X,Y para todos os clusters num bloco. É gerado um ficheiro de localização de clusters para cada ensaio.

Os ficheiros de saída são utilizados para a análise a jusante no DRAGEN e Hub de Sequências BaseSpace.

Erro ao manusear

O RTA3 cria ficheiros de registo e grava-os na pasta Logs (Registos). Os erros são registados num ficheiro de texto no formato de ficheiro *.log.

Os seguintes ficheiros de registo são transferidos para o destino de saída final no fim do processamento:

`info_00000.log` resume os eventos importantes do ensaio.

`error_00000.log` apresenta os erros que ocorreram durante um ensaio.

`warning_00000.log` apresenta os avisos que ocorreram durante um ensaio.

Blocos da célula de fluxo

Os blocos são pequenas áreas de imagens na célula de fluxo. A câmara captura uma imagem por bloco.

A Célula de fluxo do NextSeq 1000/2000 P2 tem um total de 132 blocos. A Célula de fluxo do NextSeq 1000/2000 P3 tem um total de 264 blocos.

Tabela 5 Blocos da célula de fluxo

Componente da célula de fluxo	Célula de fluxo do NextSeq 1000/2000 P2	Célula de fluxo do NextSeq 1000/2000 P3	Descrição
Pistas	1	2	As vias são distintas a nível ótico, mas não são canais separados a nível de fluídicos.
Superfícies	2	2	São obtidas imagens das células de fluxo P2 e P3 em duas superfícies: a superior e a inferior. Em primeiro lugar, é obtida a imagem da superfície superior de um bloco.
Faixas por pista	6	6	Uma faixa é uma coluna numa via da célula de fluxo.
Blocos por faixa	11	11	Um bloco é uma porção de uma faixa e ilustra uma área capturada em imagem na célula de fluxo.

Componente da célula de fluxo	Célula de fluxo do NextSeq 1000/2000 P2	Célula de fluxo do NextSeq 1000/2000 P3	Descrição
Total de blocos gerados	132	264	As vias × superfícies × faixas × blocos por faixa equivalem ao número total de blocos.

Designação de blocos

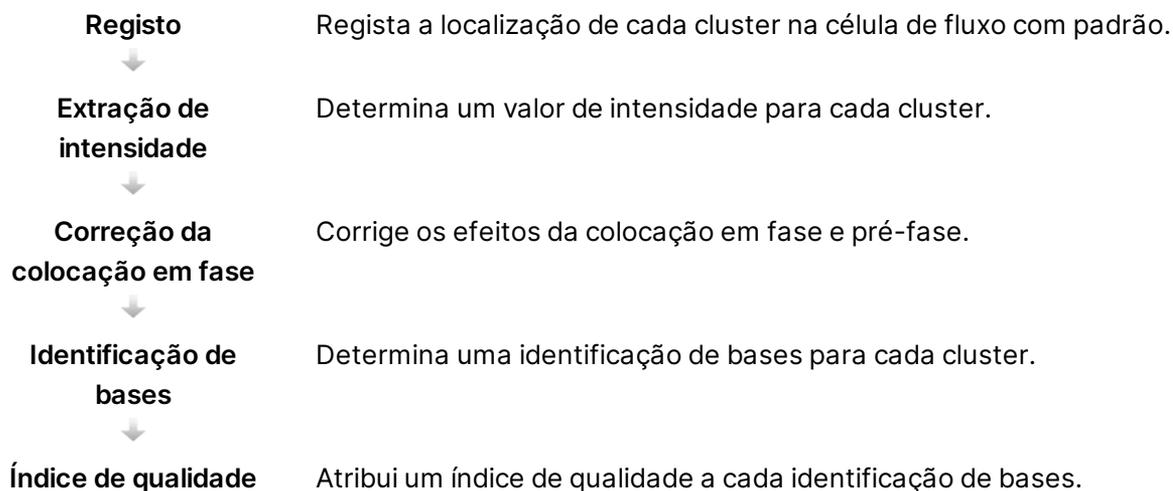
O nome do bloco é um número de quatro dígitos que representa a posição do bloco na célula de fluxo. Por exemplo, o nome do bloco 1205 indica a superfície superior, faixa 2, bloco 05.

O primeiro dígito representa a superfície: 1 para superior ou 2 para inferior.

O segundo dígito representa o número da faixa: 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Os últimos dois dígitos representam o número do bloco. Para os números de faixa 1-4, a numeração inicia com 01 na extremidade de saída da célula de fluxo até 11 na extremidade de entrada. Para os números de faixa 5-6, a numeração inicia com 01 na extremidade de entrada e 11 na extremidade de saída.

Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis



Registo

O registo alinha uma imagem com o conjunto quadrado rodado dos poços nano na célula de fluxo com padrão. Devido à disposição ordenada dos poços nano, as coordenadas X e Y de cada cluster num bloco são predeterminadas. As posições dos clusters são escritas num ficheiro de localização dos clusters (s.locs) para cada ensaio.

Se o registo falhar para quaisquer imagens num ciclo, não são geradas quaisquer identificações de bases para esse bloco nesse ciclo. Utilize o Sequencing Analysis Viewer para identificar que imagens apresentaram falhas no registo.

Extração de intensidade

Após o registo, a extração de intensidade calcula um valor de intensidade para cada poço nano numa determinada imagem. Se o registo tiver falhado, a intensidade para esse bloco não pode ser extraída.

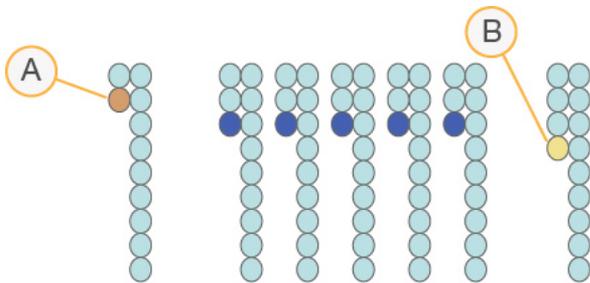
Correção da colocação em fase

Durante a reação de sequenciação, cada cadeia de ADN num cluster expande-se uma base por ciclo. A colocação em fase e pré-fase ocorre quando uma cadeia fica fora de fase com o ciclo atual de incorporação.

A colocação em fase ocorre quando uma base fica para trás.

A colocação em pré-fase ocorre quando uma base avança.

Figura 5 Colocação em fase e pré-fase



- A. Leitura com uma base colocada em fase.
- B. Leitura com uma base colocada em pré-fase.

O RTA3 corrige os efeitos da colocação em fase e pré-fase, o que maximiza a qualidade dos dados em cada ciclo do ensaio.

Identificação de bases

A identificação de bases determina a base (A, C, G ou T) de cada cluster de um determinado bloco num ciclo específico. Os Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000 utilizam a sequenciação de dois canais, que requer apenas duas imagens para codificar os dados de quatro bases de ADN, uma do canal verde e outra do canal azul.

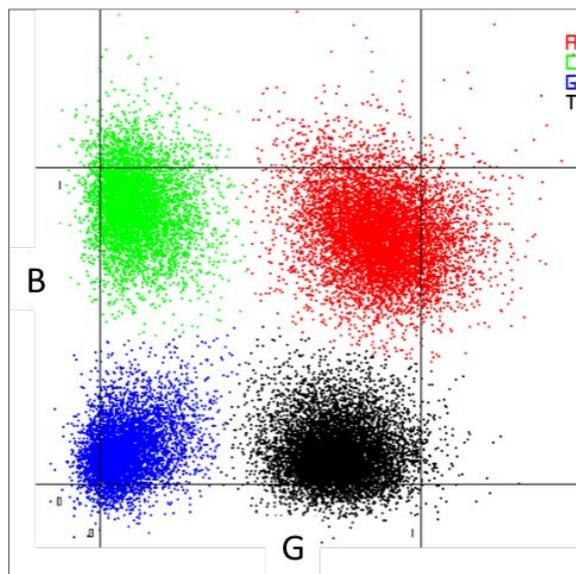
Uma ausência de identificação é indicada pela letra N. As ausências de identificação ocorrem quando um cluster não passa no filtro, o registo falha ou um cluster é desviado para fora da imagem.

As intensidades de cada cluster são extraídas das imagens verde e azul e comparadas umas com as outras, o que resulta em quatro populações distintas. Cada população corresponde a uma base. O processo de identificação de bases determina a que população pertence cada cluster.

Tabela 6 Identificações de bases na sequenciação de 2 canais

Base	Canal verde	Canal azul	Resultado
A	1 (presente)	1 (presente)	Clusters que exibem intensidade quer no canal verde quer no canal azul.
C	0 (não presente)	1 (presente)	Clusters que exibem intensidade apenas no canal azul.
G	0 (não presente)	0 (não presente)	Clusters que não exibem qualquer intensidade numa localização conhecida do cluster.
T	1 (presente)	0 (não presente)	Clusters que exibem intensidade apenas no canal verde.

Figura 6 Visualização de intensidades de cluster



i | A cor de cada cluster correlaciona-se com os traçados de %Base no Sequence Analysis Viewer (SAV) e Dados do ensaio por ciclo do Hub de Sequências BaseSpace e não pretendem correlacionar-se com o canal verde e azul.

Filtro de passagem de clusters

Durante o ensaio, o RTA3 filtra os dados em bruto para remover as leituras que não cumprem o limiar de qualidade dos dados. Os clusters sobrepostos e de baixa qualidade são removidos.

Para a análise de dois canais, o RTA3 utiliza um sistema baseado numa população para determinar a pureza (medição da intensidade de pureza) de uma identificação de bases. O filtro de passagem de clusters (PF) é ativado quando não mais de uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos tiver uma pureza inferior a um limiar fixo. Quando incluído, o alinhamento PhiX é executado no ciclo 26 num subconjunto de blocos dos clusters que passaram no filtro. Os clusters que não passem no filtro não são identificados por bases nem são alinhados.

Índices de qualidade

Um índice de qualidade (índice Q) é uma previsão da probabilidade de uma identificação de bases incorreta. Um índice de qualidade mais elevado implica que a identificação de bases tem uma qualidade mais elevada e há mais probabilidade de estar correta. Depois de determinar o índice de Q, os resultados são registados nos ficheiros de identificação de bases (*.cbcl).

O índice de Q comunica sucintamente as probabilidades de pequenos erros. Os índices de qualidade são representados como Q(X), onde X corresponde ao índice. A seguinte tabela mostra a relação entre um índice de qualidade e a probabilidade de erro.

Índice de qualidade - Q(X)	Probabilidade de erro
Q40	0,0001 (1 em 10 000)
Q30	0,001 (1 em 1000)
Q20	0,01 (1 em 100)
Q10	0,1 (1 em 10)

Avaliação da qualidade e relatórios

A avaliação da qualidade calcula um conjunto de indicadores preditivos para cada identificação de bases e, em seguida, usa os valores destes para procurar por um índice de qualidade numa tabela de qualidade. As tabelas de qualidade são criadas para fornecer indicadores preditivos de qualidade altamente precisos para ensaios gerados por uma configuração específica da plataforma de sequenciação e versão de química.

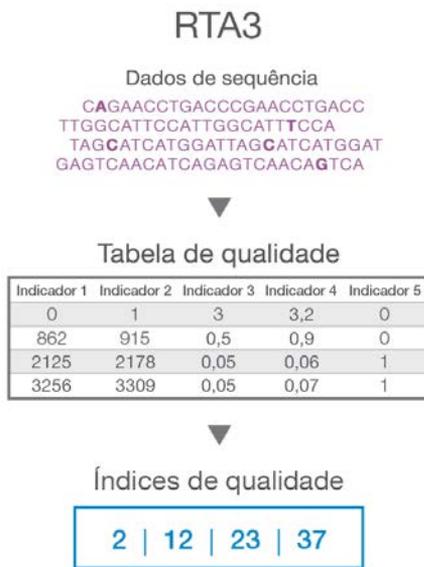


A avaliação da qualidade baseia-se numa versão modificada do algoritmo Phred.

Para gerar a tabela de qualidade para os Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000, três grupos de identificações de bases foram determinados, com base nos clusters destas funcionalidades de previsão específicas. Após o agrupamento destas identificações de bases, a taxa de erro média foi calculada empiricamente para cada um dos três grupos e os índices de qualidade

correspondentes foram registados na tabela de qualidade em conjunto com as funcionalidades preditivas correlacionadas com esse grupo. Desta forma, são possíveis apenas três índices de qualidade com o RTA3 e estes índices de qualidade representam a taxa de erro média do grupo (*Avaliação da qualidade simplificada com o RTA3 na página 63*). No geral, isto resulta numa avaliação da qualidade simplificada, mas altamente precisa. Os três grupos na tabela de qualidade correspondem às identificações de bases de qualidade marginal (< Q15), média (~Q20) e alta (> Q30) e são atribuídos aos índices específicos de 12, 23 e 37 respetivamente. Além disso, um índice nulo de 2 é atribuído a todas as ausências de identificação. Este modelo de relatório sobre os índices de qualidade reduz o espaço de armazenamento e os requisitos de largura de banda sem afetar a exatidão ou o desempenho.

Figura 7 Avaliação da qualidade simplificada com o RTA3



Ficheiros de saída da sequenciação

Tipo de ficheiro	Descrição de ficheiro, Localização e Nome
Ficheiros de identificações de bases concatenadas	<p>Cada cluster analisado está incluído num ficheiro de identificação de bases concatenadas, agregado num ficheiro por ciclo, via e superfície. O ficheiro agregado contém a identificação de bases concatenada e o índice de qualidade codificado para cada cluster. Os ficheiros de identificações de bases concatenadas são utilizados pelo Hub de Sequências BaseSpace ou bcl2fastq2.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, por exemplo L001_1.cbcl</p>

Tipo de ficheiro	Descrição de ficheiro, Localização e Nome
Ficheiros de localização de clusters	<p>Para cada célula de fluxo, um ficheiro de localização de clusters contém as coordenadas XY para os clusters num bloco. Uma disposição hexagonal que corresponde à disposição do poço nano da célula de fluxo predefine as coordenadas.</p> <p>Data/Intensities s_[pista].locs</p>
Ficheiros de filtro	<p>O ficheiro de filtro especifica se um cluster passou pelo filtro. Os ficheiros de filtro são gerados ao ciclo 26 com 25 ciclos de dados. É gerado um ficheiro de filtro para cada bloco.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter</p>
Ficheiros InterOp	<p>Os ficheiros de comunicação binária podem ser visualizados no instrumento com o Software de controlo do instrumento ou fora do instrumento no SAV ou Hub de Sequências BaseSpace. Os ficheiros InterOp são atualizados ao longo do ensaio.</p> <p>Pasta InterOp</p>
Ficheiro de informações do ensaio	<p>Indica o nome do ensaio, o número de ciclos em cada leitura, se a leitura é uma leitura de índice e o número de faixas e blocos na célula de fluxo. O ficheiro de informações do ensaio é criado no início do ensaio.</p> <p>[Pasta raiz],RunInfo.xml</p>

Ficheiros de saída da análise secundária DRAGEN

A Plataforma DRAGEN Bio-IT analisa adicionalmente os resultados de sequenciação no instrumento ao utilizar um dos seguintes pipelines de análise.

- BCL Convert
- Germline
- RNA
- Enrichment
- Single Cell RNA
- DNA Amplicon

Esta secção fornece informações sobre cada pipeline DRAGEN, incluindo informações sobre o ficheiro de saída. Para além de gerar ficheiros específicos a cada pipeline, a plataforma DRAGEN fornece os indicadores para a análise num ficheiro `<nome_amostra>.metrics.json` e os relatórios descritos em [Pipeline DRAGEN BCL Convert na página 70](#). Para obter mais informações sobre a plataforma DRAGEN, consulte a página de suporte da Plataforma [DRAGEN Bio-IT](#).

Todos os pipelines DRAGEN suportam a descompressão do BCL de entrada e a compressão dos ficheiros BAM/CRAM de saída.

Considerações sobre o ficheiro de saída:

- Para os pipelines Germline, RNA, Enrichment e DNA Amplicon executados na análise do instrumento, os ficheiros BAM não serão carregados no Hub de Sequências BaseSpace se for selecionada a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Suporte proativo, armazenamento e monitorização de ensaios).

Pipeline DRAGEN Enrichment

O pipeline DRAGEN Enrichment suporta as funcionalidades que se seguem. Se utilizar a plataforma DRAGEN 3.7 ou posterior, o modo de linha germinal e somático são suportados (apenas para tumores).

- Demultiplexação de amostras
- Mapeamento e alinhamento, incluindo a ordenação e a marcação de duplicados
- Identificação de variantes pequenas
- Identificação de variantes estruturais

Para realizar uma identificação de variantes, um ficheiro *.bed tem de ser incluído na folha de amostra ou especificado na Configuração do ensaio do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace. A identificação de variantes estruturais é gerada apenas para leituras de extremidades emparelhadas e no modo de linha germinal.

Se utilizar o pipeline DRAGEN Enrichment na versão 3.8 ou posterior, deve introduzir um ficheiro de linha de base de ruído para melhorar o desempenho no modo somático. Consulte [Importar ficheiros de linha de base de ruído na página 19](#).

O pipeline gera os ficheiros de saída que se seguem.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.bam, ou • <nome_amostra>.cram
Identificação de variantes pequenas	VCF e gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.hard-filtered.gvcf.gz • <nome_amostra>.hard-filtered.vcf.gz
Identificação de variantes estruturais	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.sv.vcf.gz

* Os ficheiros de saída gVCF estão disponíveis apenas para o modo de linha germinal.

Pipeline DRAGEN Germline

O pipeline DRAGEN Germline suporta as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostras
- Mapeamento e alinhamento, incluindo a ordenação e a marcação de duplicados

- Identificação de variantes pequenas
- Identificação de variantes estruturais para leituras de extremidades emparelhadas
- Identificação de variantes no número de cópias para genomas humanos
- Expansões de repetição para genomas humanos
- Regiões de homozigidade para genomas humanos
- **[DRAGEN v3.8 ou posterior]** Deteção do CYP2D6

A identificação de variantes estruturais é gerada apenas para leituras de extremidades emparelhadas. O pipeline gera os ficheiros de saída que se seguem.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.bam, ou • <nome_amostra>.cram
Identificação de variantes pequenas	VCF e gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.hard-filtered.gvcf.gz • <nome_amostra>.hard-filtered.vcf.gz
Identificador de variantes estruturais	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.sv.vcf.gz
Variantes no número de cópias	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.cnv.vcf.gz
Expansão de repetição	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.repeats.vcf.gz
Regiões de homozigidade	CSV e BED	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.roh_metrics.csv • <nome_amostra>.roh.bed
Deteção de CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.cyp2d6.tsv

Pipeline DRAGEN DNA Amplicon

O pipeline DRAGEN DNA Amplicon suporta as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostras
- Mapeamento e alinhamento, incluindo a ordenação e a marcação de duplicados
- Identificação de variantes pequenas no modo de linha germinal e somático.

Para realizar uma identificação de variantes, um ficheiro *.bed tem de ser incluído na folha de amostra ou especificado na Configuração do ensaio do instrumento no Hub de Sequências BaseSpace.

O pipeline gera os ficheiros de saída que se seguem.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.bam, ou • <nome_amostra>.cram
Identificação de variantes pequenas	VCF e gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.hard-filtered.gvcf.gz • <nome_amostra>.hard-filtered.vcf.gz

* Os ficheiros de saída gVCF estão disponíveis apenas no modo de linha germinal.

Pipeline DRAGEN RNA

O pipeline DRAGEN RNA suporta as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostras
- Mapeamento e alinhamento, incluindo a ordenação e a marcação de duplicados
- Deteção da fusão de genes
- Quantificação da transcrição
- **[DRAGEN v3.8 ou posterior]** Expressão de gene diferencial

Para gerar ficheiros de saída, indique um ficheiro GTF na folha de amostra ou certifique-se de que o ficheiro `genes.gtf.gz` predefinido existe com o genoma de referência.

O pipeline gera os ficheiros de saída que se seguem.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída	Descrição
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.bam, ou • <nome_amostra>.cram 	Saída de alinhamento que segue as especificações SAM.
Deteção da fusão de genes	Texto simples	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.fusion_candidates.preliminary • <nome_amostra>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> • Candidatos a fusão antes da aplicação dos filtros. • Candidatos a fusão após a aplicação dos filtros.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída	Descrição
Quantificação da transcrição	Texto simples	<ul style="list-style-type: none"> nome_amostra.quant.genes.sf nome_amostra.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> Resultados da quantificação da transcrição ao nível do gene. Todos os resultados de quantificação da transcrição.
Expressão diferencial	PNG	Consulte a seguinte tabela de ficheiros de saída de expressão diferencial.	Para gerar ficheiros de saída, é necessário configurar uma comparação na folha de amostra.

Os ficheiros seguintes são ficheiros de saída quando a expressão diferencial está ativada.

Nome de ficheiro	Descrição
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Contém os indicadores de análise da expressão diferencial.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Descreve o número de leituras mapeadas para cada gene de cada amostra nos grupos de controlo e comparação.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Um mapa de cores da expressão dos genes com expressão diferencial para as amostras nos grupos de controlo e comparação. O mapa de cores mostra apenas os genes com expressão diferencial com um valor P ajustado <-0,05. Se existirem mais de 30 genes com expressão diferencial, são utilizados apenas os 30 genes com expressão diferencial que se encontram acima dos restantes. Se o DESeq1 falhar em convergir ou se não existir nenhum gene com expressão diferencial, o ficheiro não é gerado.

Nome de ficheiro	Descrição
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Contém a variação dos rácios de expressão do gene como uma função da intensidade média do sinal. Para mostrar as diferenças entre as medições realizadas em duas amostras, o traçado transforma os dados em escalas M (rácio do registo) e A (média) e, em seguida, faz um traçado dos valores. O traçado MA mostra as log2 fold changes atribuíveis a uma determinada variável ao longo da média de contagens normalizadas para todas as amostras. Se o valor P ajustado for inferior a 0,1, os pontos são vermelhos. Os pontos que ficam fora da janela são traçados como triângulos abertos. Os triângulos que apontam para cima representam uma log fold change positiva. Os triângulos que apontam para baixo representam uma log fold change negativa.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	O traçado apresenta os dois principais componentes que explicam a maior variância.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Contém os resultados DESeq2, que descrevem a expressão média, a log2 (fold change), o erro padrão de log2, o valor P, o valor P ajustado e o estado de expressão de cada gene.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Contém as contagens transformadas do log calculadas pelo DESeq2.

Pipeline DRAGEN Single Cell RNA

O pipeline DRAGEN Single Cell RNA suporta as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostras
- Mapeamento e alinhamento, incluindo a ordenação e a marcação de duplicados
- Classificação de células e genes

Para gerar ficheiros de saída, indique um ficheiro GTF na folha de amostra ou certifique-se de que o ficheiro `genes.gtf.gz` predefinido existe com o genoma de referência.

O pipeline gera os ficheiros de saída que se seguem.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.bam, ou • <nome_amostra>.cram
Classificação de células/genes	TSV, CSV e MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <nome_amostra>.scRNA.barcodeSummary.tsv • <nome_amostra>.scRNA.genes.tsv • <nome_amostra>.scRNA.matrix.mtx
Relatórios de análise	HTML	<nome_amostra>.dragen.scrna-report.*.html

Pipeline DRAGEN BCL Convert

O pipeline DRAGEN BCL Convert utiliza os dados BCL gerados pelo seu ensaio de sequenciação e as informações da folha de amostra para gerar um ficheiro FASTQ para cada amostra. O nome do ficheiro FASTQ é <nome_amostra>.fastq.gz.

O pipeline gera os relatórios que se seguem.

Componente	Tipo	Nome do ficheiro de saída
Demultiplexação	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Indicadores do adaptador	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Troca de índices	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Principais códigos de barras desconhecidos	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

Relatório de estatísticas de demultiplexação

O relatório de estatísticas de demultiplexação contém informações sobre o número de leituras do filtro de passagem atribuído a cada amostra na folha de amostra. Quaisquer leituras que não estejam associadas claramente a uma amostra são classificadas como não determinadas. O relatório inclui também informações sobre os índices de qualidade das bases nas leituras do filtro de passagem (PF) atribuídas a cada amostra.

Estão incluídas as seguintes informações.

Indicador	Descrição
Lane	A via na célula de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
SampleID	A ID da amostra da folha de amostra. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo apresenta <code>undetermined</code> (indeterminado).

Indicador	Descrição
Index	A concatenação da Index Read 1 (Leitura de índice 1) e a Index Read 2 (Leitura de índice 2) da folha de amostra separada por um hífen. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo apresenta <code>undetermined</code> (indeterminado).
# Reads	O número de leituras de PF demultiplexadas para a amostra na via especificada.
# Perfect Index Reads	Número de leituras com uma correspondência perfeita com as sequências de indexação combinadas especificadas na folha de amostra.
# One Mismatch Index Reads	Número de leituras com um erro nas sequências de indexação combinadas especificadas na folha de amostra.
# of ≥ Q30 Bases (PF)	Número de bases, incluindo adaptadores, correspondentes às leituras que passam num limiar de qualidade Q30.
Mean Quality Score (PF)	O índice de qualidade médio para as leituras correspondentes à amostra na via especificada. O valor inclui as bases do adaptador.

Relatórios dos indicadores do adaptador

O ficheiro dos indicadores do adaptador contém o número de bases do adaptador e da amostra associadas a cada leitura.

Estão incluídas as seguintes informações.

Indicador	Descrição
Lane	A via na célula de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
Sample_ID	A ID da amostra da folha de amostra. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo apresenta <code>undetermined</code> (indeterminado).
index	A sequência do index1 (índice 1) da folha de amostra. O campo está vazio se o índice não tiver sido especificado na folha de amostra ou o valor da ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).
index2	A sequência do index2 (índice 2) da folha de amostra. O campo está vazio se o index2 (índice 2) não tiver sido especificado na folha de amostra ou o valor da ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).
R1_AdapterBases	Número de bases correspondentes ao AdapterRead1 (Adaptador de leitura 1) na folha de amostra.

Indicador	Descrição
R1_SampleBases	Número de bases recortadas ou mascaradas da Read 1 (Leitura 1) para a via e a amostra correspondentes.
R2_AdapterBases	Número de bases correspondentes ao AdapterRead2 (Adaptador de leitura2) na folha de amostra.
R2_SampleBases	Número de bases recortadas ou mascaradas da Read 2 (Leitura 2) para a via e amostra correspondentes.
# Reads	Número de leituras para a amostra na via especificada.

Relatório de contagens de troca de índices

O relatório de contagens de troca de índices contém o número de leituras para cada índice esperado e trocado para ensaios de indexação dupla. O relatório inclui apenas índices duplos únicos por via em que não é detetada qualquer colisão de códigos de barras em qualquer índice. Para gerar indicadores de troca de índices para uma via, cada par de entradas em cada índice tem de ter uma distância de Hamming de pelo menos $2N + 1$, em que N representa a tolerância de não correspondência do código de barras especificada para o índice.

Estão incluídas as seguintes informações.

Para ensaios não indexados, ensaios de indexação individual ou vias que não contêm indexações duplas únicas, o ficheiro contém apenas os cabeçalhos.

Indicador	Descrição
Lane	A via na célula de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
# Reads	Número de leituras para a amostra na via especificada.
SampleID	A ID da amostra da folha de amostra. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo apresenta <code>undetermined</code> (indeterminado).
index	A sequência do <code>index1</code> (índice 1) da folha de amostra. O campo está em branco se uma leitura apresentar uma extremidade individual ou se o valor da ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).
index2	A sequência do <code>index2</code> (índice 2) da folha de amostra. O campo está em branco se uma leitura apresentar uma extremidade individual ou se o valor da ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).

Relatório dos principais códigos de barras desconhecidos

O relatório dos principais códigos de barras desconhecidos contém os 100 primeiros índices ou pares de índices por via que não foram identificados na folha de amostra de acordo com o número de não correspondências permitidas. Se existirem vários valores de índices colocados como a 100.^a entrada de contagem de índices mais elevada, todos os valores de índices com a mesma contagem são apresentados como a 100.^a entrada.

Estão incluídas as seguintes informações:

Indicador	Descrição
Lane	A via na célula de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
index	A sequência para cada índice desconhecido na index Read 1 (Leitura de índice 1). O campo está em branco se não forem encontrados índices desconhecidos.
index2	A sequência para cada índice desconhecido na index Read 2 (Leitura de índice 2). Se o ensaio era de leitura única ou não foram encontrados índices desconhecidos, o campo está em branco.
# Reads	Número de leituras para a amostra na via especificada.

Relatórios de CQ DRAGEN da Illumina

Para todos os pipelines, o DRAGEN FastQC gera traçados de CQ por predefinição. Os resultados de CQ agregados são armazenados na pasta `AggregatedFastqcMetrics` e os resultados por amostra são armazenados na pasta `<nome_amostra>`.

Os relatórios de CQ não são gerados se o número de amostras for superior a 512.

São fornecidos os seguintes traçados de CQ.

Traçado de CQ	Descrição
<code>adapter_content</code>	A percentagem de sequências para cada par de bases.
<code>positional_mean_quality</code>	Índice de qualidade da base com escala Phred média para cada posição de leitura.
<code>gc_content</code>	A percentagem do conteúdo GC para cada leitura de sequenciação.
<code>positional_quality.read_1</code>	O valor médio de qualidade com escala Phred das bases com um nucleótido específico e numa determinada localização na Read 1 (Leitura 1).
<code>gc_quality</code>	

Traçado de CQ	Descrição
positional_quality.read_2	O valor médio de qualidade com escala Phred das bases com um nucleótido específico e numa determinada localização na Read 2 (Leitura 2).
n_content	
read_length	O comprimento da sequência para cada leitura.
positional_base_content.read_1	Número de bases de cada nucleótido específico em determinadas localizações na Read 1 (Leitura 1).
read_quality	Índice médio de qualidade com escala Phred para cada leitura de sequenciação.
positional_base_content.read_2	Número de bases de cada nucleótido específico em determinadas localizações na Read 2 (Leitura 2).

Estrutura da pasta de saída da análise secundária DRAGEN

Por predefinição, a plataforma DRAGEN gera ficheiros de saída na pasta de saída selecionada no separador Settings (Definições). Para cada fluxo de trabalho, a plataforma DRAGEN cria um relatório de resumo no ficheiro `report.html`.

📁 Data

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr_.txt`

📄 `*stdout_.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Ficheiros de entrada do ensaio (por exemplo, ficheiros BED, ficheiros GTF)

📁 nome_amostra

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

📁 nome_amostra

📄 `*.png`

- 📄 dragen_*.log
- 📄 nome_amostra.*.metrics.csv
- 📄 [DNA] nome_amostra.*.vcf.gz
- 📄 [DNA] nome_amostra.*.gvcf.gz—Indisponível para o pipeline DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon (somático).
- 📄 nome_amostra.*.bam ou sample_name.*.cram
- 📄 Logs
- 📄 [RNA] nome_amostra.fusion_candidates.filter_info
- 📄 [RNA] nome_amostra.fusion_candidates.final
- 📄 [RNA] nome_amostra.quant.genes.sf
- 📄 [RNA] nome_amostra.quant.sf
- 📄 nome_amostra.metrics.json
- 📄 [scRNA] sample_dragen-scRNA-report.*.html
- 📄 [scRNA] nome_amostra.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Germline] nome_amostra.roh_metrics.csv
- 📄 [Germline] nome_amostra.roh.bed
- 📄 [Germline] nome_amostra.cyp2d6.tsv
- 📄 nome_amostra.fastqc_metrics.csv
- 📄 nome_amostra.trimmer_metrics.csv

📁 [RNA] DifferentialExpression

📁 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** — Disponível apenas se KeepFastq for definido para true (verdadeiro).

📄 *.fastq.gz

📁 **ora_fastq** — Disponível apenas se FastqCompressionFormat for definido para 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

📁 **Reports**

📄 Demultiplex_Stats.csv

📄 RunInfo.xml

📄 Trim_Metrics.csv

📄 fastq_list.csv

📄 SampleSheet.csv

📄 Index_Hopping_Counts.csv

📄 Top_Unknown_Barcodes.csv

📁 **Read1InstrumentAnalyticsMetrics** — Apenas para leituras de extremidades emparelhadas.

📁 **0001**

📄 dataset.json

📁 **0002**

📄 dataset.json

📄 Adapter_Metrics.csv

📄 Demultiplex_Stats.csv

 Index_Hopping_Counts.csv

 **Read1Metrics**—Apenas para leituras de extremidades emparelhadas.

 Adapter_Metrics.csv

 Index_Hopping_Counts.csv

Manutenção

Esta secção descreve os procedimentos necessários para manter um sistema em boas condições. Saiba como instalar as atualizações de software, alterar o filtro de ar e efetuar outros procedimentos de manutenção periódica. Manter o software de controlo atualizado garante que o seu sistema possui as correções de bugs e as funcionalidades mais recentes instaladas para um excelente desempenho.

Limpar o espaço no disco rígido

Um ensaio de sequenciação requer cerca de 200 GB de espaço no disco rígido local. É apresentada uma notificação de aviso quando o espaço é reduzido. Utilize os passos seguintes para libertar espaço ao eliminar os ensaios concluídos e os genomas de referência instalados de uma pasta de ensaio temporária.

 Elimine os ensaios utilizando apenas o Software de controlo NextSeq 1000/2000 e não manualmente através do sistema operativo. Eliminar os ensaios manualmente pode afetar negativamente o software de controlo.

1. No menu do software de controlo, selecione **Disk Management** (Gestão de discos).
O ecrã Disk Management (Gestão de discos) é apresentado com uma lista de ensaios e genomas de referência guardados no disco rígido local.
2. Para o ensaio que pretende eliminar, selecione **Delete Run** (Eliminar ensaio).
Se eliminar um ensaio, elimina a pasta de ensaios local. A pasta de saída, que é uma cópia da pasta do ensaio, é retida.
3. Na caixa de diálogo, selecione **Yes, Delete Run** (Sim, eliminar ensaio) para confirmar a eliminação do ensaio.
4. Repita os passos 2 e 3 para cada ensaio que pretende eliminar.
5. Para o genoma que pretende eliminar, selecione **Delete Genome** (Eliminar genoma).
6. Na caixa de diálogo, selecione **Yes, Delete Genome** (Sim, eliminar genoma).
7. Repita os passos 5 e 6 para cada genoma que pretende eliminar.
8. Quando terminar, feche o ecrã Disk Management (Gestão de discos) para voltar ao ecrã inicial.

Atualizações de software

Se atualizar o software irá garantir que o seu sistema tem as funcionalidades e as correções de erros mais recentes. As atualizações de software são fornecidas num conjunto designado por conjunto do sistema, que inclui o seguinte software:

- Software de controlo NextSeq 1000/2000

- Receitas do NextSeq 1000/2000
- Universal Copy Service
- Real-Time Analysis

i | Os módulos DRAGEN não estão incluídos no conjunto do sistema. Instale-os separadamente, conforme necessário. Acesse ao software do módulo DRAGEN a partir das páginas de suporte.

O sistema está configurado para transferir atualizações de software automática ou manualmente:

- **Automatic updates** (Atualizações automáticas) — As atualizações são transferidas automaticamente do Hub de Sequências BaseSpace para que as possa instalar. Esta opção requer uma ligação à Internet, mas não é necessária uma conta no Hub de Sequências BaseSpace.
- **Manual updates** (Atualizações manuais) — As atualizações são transferidas manualmente a partir da Web, guardadas localmente ou numa unidade portátil e instaladas a partir da localização guardada. Esta opção não requer uma ligação à Internet para o instrumento.

Instalar uma atualização de software automática

1. Certifique-se de que não está em curso nenhum ensaio de sequenciação ou análise secundária no instrumento.
2. Inicie sessão em ilmnadmin.
3. Selecione **Software Update** (Atualização de software) no menu do software de controlo. Os sistemas configurados para atualizações automáticas apresentam um alerta quando uma atualização de software estiver disponível.
4. Para verificar se existe uma atualização, selecione **Check Online for Software Update** (Verificar atualização de software online).
5. Selecione **Update Now** (Atualizar agora) para transferir a nova versão do software. Quando a transferência estiver concluída, o software de controlo é fechado e o assistente de instalação é apresentado. O software de controlo é reiniciado automaticamente. Qualquer atualização de firmware ocorre automaticamente após reiniciar.

i | Não é possível cancelar uma atualização depois de iniciada a instalação. Só pode cancelar uma atualização durante a transferência.

Instalar uma atualização de software manual

1. Inicie sessão em ilmnadmin.
2. Certifique-se de que não está em curso nenhum ensaio de sequenciação ou análise secundária no instrumento.

3. Quando uma atualização de software estiver disponível, transfira o programa de instalação (*.tar.gz) na [página de suporte dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#). Guarde o programa de instalação numa unidade local ou portátil.
4. Se tiver guardado o programa de instalação numa unidade portátil, ligue a unidade a uma porta USB 3.0, localizada na parte lateral e traseira do instrumento.
5. No software de controlo, selecione **Software Update** (Atualização de software) no menu do software de controlo.
6. Selecione **Choose...** (Escolher...) para aceder ao programa de instalação.
7. Selecione **Update Now** (Atualizar agora) para iniciar a instalação.
O software de controlo apresenta um indicador de ocupado durante a instalação.
O software de controlo é reiniciado automaticamente. Qualquer atualização de firmware ocorre automaticamente após reiniciar.



Não é possível cancelar uma atualização depois de iniciada a instalação. Só pode cancelar uma atualização durante a transferência.

Fluxo de trabalho DRAGEN e atualizações da licença

Apenas os administradores do sistema podem instalar os fluxos de trabalho DRAGEN e renovar a licença DRAGEN.

Renovar a licença DRAGEN online

Se o NextSeq 1000/2000 estiver ligado à Internet, atualize a sua licença da Plataforma DRAGEN Bio-IT conforme se segue.

1. Contacte o Suporte Técnico da Illumina para obter uma nova chave de licença.
2. Aguarde 24 horas para a licença atualizar automaticamente ou atualize a licença imediatamente conforme se segue.
 - a. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, **DRAGEN**.
 - b. Selecione **Check Online** (Verificar online) para verificar se está disponível uma nova chave de licença DRAGEN.
 - c. Se estiver disponível, selecione **Update** (Atualizar).

Renovar a licença DRAGEN offline

Se o NextSeq 1000/2000 não estiver ligado à Internet, atualize a sua licença da Plataforma DRAGEN Bio-IT conforme se segue.

1. Contacte o Suporte Técnico da Illumina para obter uma nova chave de licença. Guarde o ficheiro `license.zip` numa unidade local ou portátil.

2. Se tiver guardado o ficheiro *.zip numa unidade portátil, ligue a unidade a uma porta USB 3.0, localizada na parte lateral e traseira do instrumento. Mova cuidadosamente o instrumento conforme necessário para aceder à parte de trás.
3. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, **DRAGEN**.
4. Selecione **Choose** (Escolher) para navegar até ao ficheiro *.zip e, em seguida, selecione **Open** (Abrir).

Instalar fluxos de trabalho DRAGEN online

Se o NextSeq 1000/2000 estiver ligado à Internet, pode instalar os fluxos de trabalho DRAGEN diretamente no Software de controlo NextSeq 1000/2000. A instalação online dos fluxos de trabalho DRAGEN está disponível apenas no Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3.

1. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, selecione **Process Management** (Gestão de processos).
2. Certifique-se de que não está em curso nenhum ensaio de sequenciação ou análise secundária no instrumento.
3. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, **DRAGEN**.
Por baixo da versão, a secção Available Workflows (Fluxos de trabalho disponíveis) lista os fluxos de trabalho instalados atualmente no sistema.
4. Para instalar os fluxos de trabalho DRAGEN no Software de controlo NextSeq 1000/2000, selecione **Check Online** (Verificar online).
Nem todas as versões e fluxos de trabalho DRAGEN são compatíveis com a instalação online. Utilize a instalação offline para os fluxos de trabalho adicionais.
5. Selecione a caixa de verificação para os fluxos de trabalho que gostaria de instalar. Se não estiver instalado, certifique-se de que instala a versão mais recente do BCL Convert em primeiro lugar. Pode ver as informações sobre a versão mais recente de um fluxo de trabalho nas notas da versão.
6. Selecione **Install** (Instalar) para iniciar a instalação.
7. Introduza ilmnadmin para a palavra-passe do sistema e, em seguida, selecione **Authenticate** (Autenticar).

Instalar fluxos de trabalho DRAGEN offline

1. Quando está disponível uma atualização de fluxo de trabalho DRAGEN, transfira o programa de instalação (*.tar.gz) na [página de suporte DRAGEN](#). Guarde o programa de instalação numa unidade local ou portátil.
2. Se tiver guardado o programa de instalação numa unidade portátil, ligue a unidade a uma porta USB 3.0, localizada na parte lateral e traseira do instrumento. Mova cuidadosamente o instrumento conforme necessário para aceder à parte de trás.
3. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, selecione **Process Management** (Gestão de processos).

4. Certifique-se de que não está em curso nenhum ensaio de sequenciação ou análise secundária no instrumento.
5. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, **DRAGEN**.
6. Por baixo da versão, selecione **Browse for New Version** (Procurar uma nova versão) para navegar até ao programa de instalação.
7. Selecione **Install** (Instalar) para iniciar a instalação.
8. Introduza ilmnadmin para a palavra-passe do sistema e, em seguida, selecione **Authenticate** (Autenticar).

Substituir o filtro de ar

Utilize as instruções seguintes para substituir um filtro de ar expirado a cada 6 meses.

O filtro de ar é um cartucho retangular de uma única utilização que cobre o ventilador no lado direito do instrumento. Assegura o arrefecimento adequado e impede a entrada de detritos no sistema. O instrumento é enviado com um filtro de ar instalado e um sobresselente. São incluídas peças sobresselentes com um contrato de assistência do instrumento válido, ou podem ser compradas separadamente à Illumina.

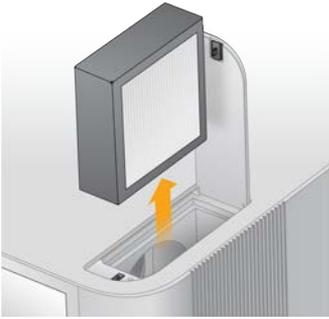
1. Na parte superior do instrumento, prima o lado direito do painel superior para desengatar, conforme mostrado na ilustração seguinte.



2. Abra o painel.



3. Pressione para libertar o cartucho do filtro de ar, remova-o do centro do painel e elimine-o.



4. Introduza um novo filtro de ar no recetáculo e pressione para prender.
5. Feche o painel superior e pressione-o para encaixar no devido lugar.



6. Coloque o instrumento no local original.

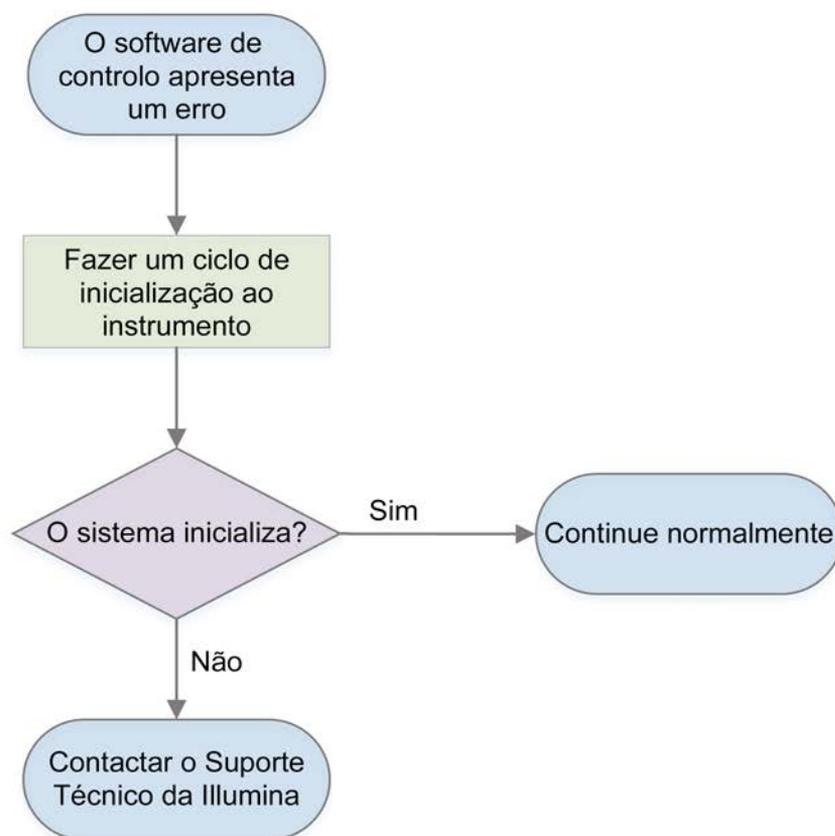
Resolução de problemas

Esta secção apresenta instruções passo a passo para cancelar um ensaio, efetuar um ciclo de inicialização do instrumento e outros procedimentos de resolução de problemas.

Resolução de mensagens de erro

Este anexo apresenta instruções detalhadas sobre diversos passos de resolução de problemas. O seguinte organograma fornece uma descrição geral da resolução de mensagens de erro apresentadas durante a inicialização, a configuração do ensaio ou a sequenciação, e que não são resolvidas com uma nova tentativa.

Muitos erros podem ser resolvidos com um ciclo de inicialização: desligar o instrumento e voltar a ligá-lo. Consulte [Ciclo de inicialização do instrumento na página 86](#) para obter mais informações sobre o ciclo de inicialização.



Voltar a armazenar os consumíveis

Utilize as instruções seguintes para armazenar um cartucho descongelado e uma célula de fluxo em caso de erro do instrumento durante a verificação pré-ensaio do instrumento antes da verificação dos fluídicos.

1. Separe a célula de fluxo do cartucho.
 2. Remova e elimine o banco diluído do reservatório (até ~18 µl).
- !** Prepare uma diluição nova do mesmo banco para o ensaio seguinte, de forma a evitar a contaminação cruzada da amostra com o banco residual no reservatório.
3. Posicione o cartucho num armazenamento entre 2°C a 8°C de forma que a etiqueta fique voltada para cima e que o ar circule em todos os lados.
Não exceda as 72 horas. Se o cartucho tiver sido descongelado no frigorífico durante 12 horas durante a noite, não exceda as 60 horas.
 4. Volte a colocar a célula de fluxo na embalagem de alumínio prateado original com o dessecante.
 5. Feche a embalagem de alumínio com fita-cola e coloque no armazenamento entre 2°C a 8°C.
Não exceda as 72 horas.

Cancelar um ensaio

1. Selecione **End Run** (Terminar ensaio).
2. Para purgar automaticamente o cartucho de reagente, selecione a caixa de verificação **Purge Reagent Cartridge** (Purgar cartucho de reagente).
A seleção predefinida é configurada nas definições do Software de controlo NextSeq 1000/2000.
3. Selecione **Yes, end the sequencing run** (Sim, terminar o ensaio de sequenciação).
O cancelamento de um ensaio é final. O software não pode retomar o ensaio e os consumíveis não podem ser reutilizados após a parte de verificações pré-ensaio da verificação do instrumento.
4. Selecione **Eject Cartridge** (Ejetar cartucho) para abrir o visor e ejetar o tabuleiro.
5. Remova o cartucho do tabuleiro.
6. Armazene ou elimine o cartucho, dependendo de quando ocorreu o cancelamento:

Circunstância	Instância
Cancelou antes ou durante a verificação pré-ensaio do instrumento e pretende reutilizar os consumíveis.	Consulte Voltar a armazenar os consumíveis na página 85 .
Todas as outras circunstâncias.	Consulte Descarregar consumíveis na página 55 .

7. Selecione **Close Door** (Fechar porta) para recarregar o tabuleiro e voltar ao ecrã inicial.
Os sensores confirmam a remoção do cartucho.

Recolocar um ensaio em fila de espera

Se for apresentado um erro para o Status of Secondary Analysis (Estado da análise secundária) em Process Management (Gestão de processos), pode recolocar um ensaio em fila de espera para efetuar novamente a análise DRAGEN no instrumento nos ficheiros cBCL gerados. A pasta original do ensaio tem de continuar presente no instrumento para poder utilizar a funcionalidade de recolocação em fila de espera. Utilizar esta funcionalidade de recolocação em fila de espera não recoloca os ensaios em fila de espera no Hub de Sequências BaseSpace. Para recolocar em fila de espera no Hub de Sequências BaseSpace, consulte Corrigir folha de amostra no Centro de ajuda do Hub de Sequências BaseSpace.

1. Atualize a sua folha de amostra v2 e, em seguida, guarde a folha de amostra para uma unidade de rede montada ou portátil.
2. Se tiver guardado a folha de amostra numa unidade portátil, ligue a unidade a uma porta USB 3.0, localizada na parte lateral e traseira do instrumento. Mova cuidadosamente o instrumento conforme necessário para aceder à parte de trás.
3. Selecione o menu do software de controlo e, em seguida, selecione **Process Management** (Gestão de processos).
4. Certifique-se de que não está em curso nenhum ensaio de sequenciação ou análise secundária no instrumento.
5. Selecione **Requeue** (Recolocar em fila de espera) junto ao ensaio concluído para o recolocar em fila de espera.
6. Selecione **Choose** (Escolher) para navegar até à folha de amostra atualizada e, em seguida, selecione **Open** (Abrir).
7. Selecione **Start Requeue** (Iniciar recolocação em fila de espera).

Ciclo de inicialização do instrumento

Fazer um ciclo de inicialização do instrumento permite encerrar e reiniciar o sistema em segurança para restaurar uma ligação perdida, alinhar uma especificação ou resolver uma falha de inicialização. As mensagens de software indicam quando deve efetuar um ciclo de inicialização para resolver erros ou avisos.

1. No menu do software de controlo, selecione **Shut Down Instrument** (Encerrar instrumento).
2. Se o sistema não encerrar, prima o botão de alimentação no lado direito do instrumento até as luzes apagarem.
3. Quando o botão de alimentação pulsar, prima o lado (**O**) para desligar do interruptor no painel traseiro.
O botão de alimentação pode continuar a pulsar depois de desligar a alimentação.

Figura 8 Localização do interruptor



4. Aguarde 30 segundos.
5. Prima o lado (I) do interruptor.
6. Quando o botão de alimentação pulsar, aguarde 30 segundos e, em seguida, prima-o.

Figura 9 Localização do botão de alimentação



7. Aguarde cerca de 5 minutos para o carregamento do sistema operativo. Quando o sistema operativo for carregado, inicie sessão no sistema.
O software de controlo é iniciado e inicializa o sistema. Aguarde cerca de 5 minutos para a inicialização do sistema. O ecrã inicial é apresentado quando a inicialização estiver concluída.

Executar uma verificação do sistema

Não é necessária uma verificação do sistema para o funcionamento normal ou a manutenção do instrumento. No entanto, um representante da Assistência técnica da Illumina pode solicitar-lhe que efetue uma verificação do sistema para fins de resolução de problemas.

Quatro verificações do subsistema demoram cerca de 58 minutos a efetuar a resolução de problemas de erros de verificação pré-ensaio e outros problemas. Os testes confirmam se os componentes estão devidamente alinhados e funcionais.

Os resultados dos testes são colocados na pasta `system-check` localizada em `/usr/local/illumina/system-check`.

Certifique-se de que descarrega o cartucho antes de executar as verificações do sistema.

Executar uma verificação do sistema

1. No menu do software de controlo, selecione **System Checks** (Verificações do sistema).
2. Selecione a caixa de verificação para qualquer uma das seguintes verificações do sistema que pretende realizar.
 - **Network Connectivity** (Conectividade da rede) — Verifica o estado de ligação da sua rede e o seu desempenho.
 - **Enclosure** (Compartimento) — Verifica o desempenho do sistema térmico e mecanismo de elevação do visor.
 - **Motion** (Movimento) — Verifica os limites de deslocação e o desempenho da platina Z e platina XY.
 - **Optics** (Ótica) — Verifica o desempenho do módulo de aquisição de imagens.
3. Selecione **Start** (Iniciar).

Restaurar para as definições de fábrica

Restaure o sistema para as definições de fábrica para desatualizar o software ou recuperar de uma configuração indesejável. Esta funcionalidade deve ser utilizada apenas por um representante da Illumina.

Capturar a imagem instalada

Capture uma imagem do sistema para efetuar a cópia de segurança de uma instalação de software que funciona corretamente. Esta imagem do sistema pode ser restaurada posteriormente. É recomendável capturar a imagem do sistema imediatamente depois de concluir a instalação inicial e de alterar a sua palavra-passe com um representante da Illumina.

1. Reinicie o Linux.
2. Quando lhe for solicitado escolher um sistema operativo, selecione **Capture Installed Image** (Capturar a imagem instalada).

As opções do sistema operativo são apresentadas brevemente antes de avançar automaticamente com o Software de controlo NextSeq 1000/2000.



Uma vez que apenas uma imagem é retida na memória, esta irá substituir a imagem capturada anteriormente.

3. Aguarde cerca de 30 minutos para o sistema capturar a imagem instalada atualmente. A captura pode incluir vários reinícios. Quando estiver concluída, o sistema reinicia com a imagem instalada armazenada atualmente na memória.

Restaurar imagem capturada

Restaure o sistema para a imagem capturada anteriormente para recuperar em caso de configuração indesejável.

1. Reinicie o Linux.
2. Quando lhe for solicitado para escolher um sistema operativo, seleccione **Restore Installed Image** (Restaurar a imagem instalada).

As opções do sistema operativo são apresentadas brevemente antes de avançar automaticamente com o Software de controlo NextSeq 1000/2000.

i | As palavras-passe estão associadas à imagem do sistema. Após o restauro, utilize a palavra-passe da imagem restaurada para iniciar sessão no sistema.

3. Aguarde cerca de 30 minutos até à conclusão do restauro.
O restauro pode incluir vários reinícios. Quando estiver concluído, o sistema reinicia com a imagem restaurada.

Recursos e referências

Definições da folha de amostra v2

No caso do modo Local, pode utilizar o formato de ficheiro de folha de amostra v2 para configurar as definições do seu ensaio. Crie a folha de amostra na Configuração de ensaios do instrumento ou ao editar o *Modelo da folha de amostra v2 dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000*. Quando editar a folha de amostra, certifique-se de que as secções e os campos que se seguem são incluídos na ordem listada e cumprem os requisitos. Após a edição, utilize uma unidade de rede montada ou portátil para transferir a folha de amostra para os Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Quando navega para a folha de amostra no software de controlo, esta é copiada para uma pasta pré-ensaio no instrumento para que a unidade portátil possa ser removida. Certifique-se de que as suas definições da folha de amostra v2 cumprem os seguintes requisitos:

- As sequências de indexação especificadas na secção da folha de amostra BCLConvert_Data devem corresponder ao kit de indexação selecionado no NextSeq 1000/2000.
- Se utilizar o Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.2, a versão DRAGEN especificada na folha de amostra tem de estar instalada e ativa no sistema. Para obter informações sobre a instalação, consulte [Atualizações de software na página 78](#).
- Se utilizar o Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3, a versão DRAGEN especificada na folha de amostra tem de estar instalada no sistema. O software de controlo deteta automaticamente a versão DRAGEN da folha de amostra e indica-lhe que deve mudar as versões ativas, se necessário. Para obter informações sobre a instalação, consulte [Atualizações de software na página 78](#).

Se estiver a utilizar a plataforma DRAGEN, terá de configurar as definições adicionais. Para obter mais informações, consulte [Definições da folha de amostra DRAGEN na página 94](#).

Transfira o modelo da folha de amostra v2 em Product Files (Ficheiros de produtos) na página de suporte dos Sistemas de sequenciação NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Se tiver criado uma folha de amostra utilizando a Configuração de ensaios do instrumento, alterar a folha de amostra após a transferência inicial pode resultar na falha da análise.

Os nomes dos ficheiros não podem conter caracteres especiais.

Requisitos do [Cabeçalho]

A secção do [Cabeçalho] inclui informações gerais sobre o seu ensaio. Em seguida são apresentados os campos e as descrições no [Cabeçalho].

Campo	Obrigatório	Descrição
FileFormatVersion	Sim	A versão da folha de amostra. Introduza 2 para o valor.
RunName	Não	Nome, da sua preferência, exclusivo do ensaio. O campo RunName pode conter caracteres alfanuméricos, sublinhados, traços e pontos finais. Se o campo RunName incluir espaços ou caracteres especiais, a análise falha.
RunDescription	Não	Descrição do ensaio.
InstrumentPlatform	Não	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Não	NextSeq 1000/2000

Requisitos das [Leituras]

A secção [Leituras] descreve o número dos ciclos de sequenciação utilizados para a leitura genómica e dos índices 1 e 2. Seguem-se os campos e descrições disponíveis na secção [Leituras].

Campo	Obrigatório	Descrição
Read1Cycles	Sim	Número de ciclos na primeira leitura. O valor tem de ser um número inteiro superior a zero.
Read2Cycles	Não	Número de ciclos na segunda leitura.
Index1Cycles	Não	Número de ciclos na primeira leitura de índice. Obrigatório quando se efetua a sequenciação de mais de uma amostra. O máximo são 10 ciclos.
Index2Cycles	Não	Número de ciclos na segunda leitura de índice. O máximo são 10 ciclos.

Requisitos de [Sequencing_Settings]

Utilize a secção [Sequencing_Settings] para especificar o kit de preparação de bancos que está a utilizar.

Campo	Obrigatório	Descrição
LibraryPrepKits	Não	<p>O seu kit de preparação de bancos. É permitido apenas um kit de preparação de bancos.</p> <p>No Software de controlo NextSeq 1000/2000 v1.3, a receita personalizada necessária é selecionada automaticamente se o Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kit ou o Illumina Stranded mRNA Prep kit for especificado como o kit de preparação de bancos.</p> <p>Introduza um dos valores que se segue.</p> <ul style="list-style-type: none"> Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kit— ILMNStrandedTotalRNA Illumina Stranded mRNA Prep kit—ILMNStrandedmRNA

Requisitos do BCL Convert

A secção BCL Convert fornece informações sobre a conversão dos seus dados de BCL para FASTQ. As opções do BCL Convert incluem duas secções separadas: [BCLConvert_Settings] e [BCLConvert_Data]. As secções do BCL Convert necessitam de informações sobre as sequências do adaptador de índice. Para identificar a sequência do adaptador compatível para cada leitura e índice, consulte *Sequências do adaptador Illumina (documento n.º 1000000002694)*.

Seguem-se os campos e as descrições disponíveis em [BCLConvert_Settings].

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Não	O número de elementos não correspondentes permitidos entre a primeira leitura de índice e a sequência de indexação. Os valores podem ser 0, 1 ou 2. O valor predefinido é 1.

Campo	Obrigatório	Descrição
BarcodeMismatchesIndex2	Não	O número de elementos não correspondentes permitidos entre a segunda leitura de índice e a sequência de indexação. Os valores podem ser 0, 1 ou 2. O valor predefinido é 1.
FastqCompressionFormat	Não	Para gerar ficheiros FASTQ como um ficheiro *.gz, introduza <code>gzip</code> . Para guardar ficheiros FASTQ como ficheiro *.ora e utilizar com a Descompressão DRAGEN, introduza <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Não	A sequência para recortar ou mascarar a partir do final da read 1 (leitura 1). Sequência do adaptador da Read 1 (Leitura 1) que contém A, C, G ou T. AdapterRead1 (Adaptador da leitura 1) recorta os ciclos por predefinição.
AdapterRead2	Não	A sequência para recortar ou mascarar a partir do final da read 2 (leitura 2). Sequência do adaptador da Read 2 (Leitura 2) que contém A, C, G ou T. AdapterRead2 (Adaptador de leitura 2) recorta os ciclos por predefinição.
OverrideCycles	Não	Cadeia utilizada para especificar os ciclos UMI e mascarar os ciclos de uma leitura. São permitidos os seguintes valores: <ul style="list-style-type: none"> • N — Especifica os ciclos a ignorar. • Y — Especifica os ciclos de sequenciação. • I — Especifica os ciclos de índice. • U — Especifica os ciclos UMI a serem recortados. Cada elemento é separado por ponto e vírgula. Seguem-se exemplos de entradas OverrideCycles. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [BCLConvert_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos, hífenes e sublinhados. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço ou um sublinhado. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515.
Index	Não	A sequência de indexação associada à amostra. São permitidos apenas A, C, T, G. Obrigatório quando se efetua a sequenciação de mais de uma amostra.
Index2	Não	A segunda sequência de indexação associada à amostra. São permitidos apenas A, C, T, G. Certifique-se de que as sequências do adaptador do segundo índice (i5) estão na orientação de avanço. A plataforma DRAGEN aplica automaticamente os complementos inversos dos índices i5 durante a análise secundária.
Lane	Não	A via da célula de fluxo. As vias são representadas por um valor inteiro.

Definições da folha de amostra DRAGEN

Esta secção descreve os requisitos das folhas de amostras para cada pipeline DRAGEN. Adicione as suas definições de pipeline DRAGEN como a última secção na sua folha de amostra. Só pode utilizar uma pipeline DRAGEN.

Cada pipeline DRAGEN inclui secções separadas para as definições e os dados.

Requisitos do pipeline DRAGEN Germline

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenGermline_Settings].

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão de software tem de corresponder à versão especificada na secção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg19_alt_aware. Utilize o nome do genoma de referência localizado em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do ficheiro de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se não for especificado nenhum valor, a predefinição é nenhum.
KeepFastq	Não	Para guardar ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Para remover ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>false</code> (falso).

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenGermline_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. As ID de amostras têm de corresponder às ID especificadas na secção BCLConvert_Data.

Requisitos do pipeline DRAGEN RNA

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenRNA_Settings].

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão de software tem de corresponder à versão especificada na secção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_noalt_with_decoy. Utilize o nome do genoma de referência localizado em /usr/local/illumina/genomes. Para utilizar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).
RnaGeneAnnotationFile	Não	O ficheiro que contém as anotações do gene de ARN. São permitidos apenas caracteres alfanuméricos. Se não for fornecido, é utilizado o ficheiro de anotação predefinido incluído no genoma de referência especificado.
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do ficheiro de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se não for especificado nenhum valor, a predefinição é nenhum.
KeepFastq	Não	Para guardar ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Para remover ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>false</code> (falso).
DifferentialExpressionEnable	Não	Para ativar a expressão de gene diferencial, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Introduza <code>false</code> (falso) para excluir a expressão de gene diferencial da análise.

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DrogenRna_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. As ID de amostras têm de corresponder às ID especificadas na secção BCLConvert_Data.
Comparison<N>	Não	O valor de controlo ou comparação para cada amostra. Se não existir nenhum valor de controlo ou comparação para a amostra, atribui-se <i>na</i> à amostra. Todas as amostras marcadas com controlo são comparadas com todas as amostras marcadas com comparação. O valor <i>N</i> reflete o grupo de comparação das amostras.

Requisitos do pipeline DRAGEN Enrichment

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DrogenEnrichment_Settings].

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão de software tem de corresponder à versão especificada na secção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_alt_aware. Os genomas de referência estão localizados em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).

Campo	Obrigatório	Descrição
BedFile	Sim	O ficheiro bed que contém as regiões-alvo.
GermlineOrSomatic	Sim	Para efetuar a análise de linha germinal de enriquecimento, introduza <code>germline</code> (linha germinal). Para efetuar a análise somática de enriquecimento, introduza <code>somatic</code> (somática).
KeepFastq	Não	Para guardar ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Para remover ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do ficheiro de saída. Os valores permitidos são <code>bam</code> ou <code>cram</code> . Se não for especificado nenhum valor, a predefinição é nenhum.
AuxNoiseBaselineFile	Não	O nome do ficheiro de linha de base de ruído. Pode utilizar o formato de ficheiro <code>*.txt</code> ou <code>*.gz</code> . Os ficheiros de linha de base de ruído estão disponíveis apenas quando utilizar o modo somático. Consulte Importar ficheiros de linha de base de ruído na página 19 para obter mais informações.

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenEnrichment_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. As ID de amostras têm de corresponder às ID especificadas na secção BCLConvert_Data.

Requisitos do pipeline DRAGEN DNA Amplicon

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenAmplicon_Settings].

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão de software tem de corresponder à versão especificada na secção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_alt_aware. Os genomas de referência estão localizados em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).
DnaBedFile	Sim	O ficheiro bed que contém as regiões-alvo. O ficheiro bed pode ser introduzido no formato de ficheiro *.txt ou *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Sim	Para efetuar a análise de linha germinal DNA Amplicon, introduza <code>germline</code> (linha germinal). Para efetuar a análise somática DNA Amplicon, introduza <code>somatic</code> (somática).
KeepFastq	Não	Para guardar ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Para remover ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do ficheiro de saída. Os valores permitidos são <code>bam</code> ou <code>cram</code> . Se não for especificado nenhum valor, a predefinição é <code>nenhum</code> .

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenAmplicon_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. As ID de amostras têm de corresponder às ID especificadas na secção BCLConvert_Data.
DnaOrRna	Sim	O tipo de análise Amplicon que pretende realizar. Apenas a análise de ADN é suportada para a plataforma DRAGEN v3.8. Introduza <code>dna</code> (ADN).

Requisitos do pipeline DRAGEN Single Cell RNA

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenSingleCellRNA_Settings]. Para obter informações sobre a compatibilidade de kits de terceiros, consulte a página de suporte de Compatibilidade de produtos da plataforma DRAGEN Bio-IT.

Kit do banco de célula única 1—5

As seguintes definições de folhas de amostras aplicam-se aos kits de preparação de bancos com a mesma estrutura genética que os Kits de bancos de célula única 1—5 DRAGEN. Utilize a página de suporte de Compatibilidade de produtos da plataforma DRAGEN Bio-IT para confirmar a estrutura genética para o seu kit.

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão de software tem de corresponder à versão especificada na secção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_alt_aware. Os genomas de referência estão localizados em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).
RnaLibraryType	Não	Introduza um dos seguintes valores: <ul style="list-style-type: none"> • SF — Com cadeia de avanço. SF é o valor predefinido. • SR — Com cadeia de inversão. • U — Sem cadeia.
RnaGeneAnnotationFile	Não	O ficheiro que contém as anotações do gene de ARN. São permitidos apenas caracteres alfanuméricos. Se não for fornecido, é utilizado o ficheiro de anotação predefinido incluído no genoma de referência especificado.
BarcodeRead	Não	A localização no ensaio de sequenciação da leitura de código de barras, que contém o código de barras e o UMI. Os valores podem conter <code>Read1</code> (Leitura 1) ou <code>Read2</code> (Leitura 2). O valor predefinido é <code>Read1</code> (Leitura 1).

Campo	Obrigatório	Descrição
BarcodePosition	Sim	A localização das bases correspondentes ao código de barras no âmbito do valor introduzido para BarcodeRead. As posições das bases são indexadas iniciando na posição zero. Introduza o valor BarcodePosition no formato seguinte: 0_<posição final do código de barras> Por exemplo, se um código de barras tiver 16 bases, o valor é 0_15.
UmiPosition	Sim	A localização das bases correspondentes ao UMI no âmbito do valor introduzido para BarcodeRead. Introduza o valor UmiPosition no formato seguinte: <posição inicial do UMI>_<posição final do UMI> Por exemplo, se o UMI tiver 10 bases e o código de barras tiver 16, o valor é 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Não	O nome do ficheiro que contém as sequências de códigos de barras que pretende incluir. O nome do ficheiro pode conter apenas caracteres alfanuméricos, traços, sublinhados e pontos finais.
KeepFastq	Não	Para guardar ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Para remover ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do ficheiro de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se não for especificado nenhum valor, a predefinição é nenhum.

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DrogenSingleCellRNA_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. As ID de amostras têm de corresponder às ID especificadas na secção BCLConvert_Data.

Kit do banco de célula única 6

As definições da folha de amostra seguintes aplicam-se aos kits de preparação de bancos com a mesma estrutura genética que os DRAGEN Single Cell Library Kits 6. Utilize a página de suporte de Compatibilidade de produtos da plataforma DRAGEN Bio-IT para confirmar a estrutura genética para o seu kit.

Campo	Obrigatório	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Utilize os três números inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão de software tem de corresponder à versão especificada na secção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_alt_aware. Os genomas de referência estão localizados em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para utilizar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Ajuda online da aplicação Reference Builder para instrumentos Illumina v1.0.0).
RnaLibraryType	Não	Introduza um dos seguintes valores: <ul style="list-style-type: none"> • SF — Com cadeia de avanço. • SR — Com cadeia de inversão. • U — Sem cadeia.
RnaGeneAnnotationFile	Não	O ficheiro que contém as anotações do gene de ARN. São permitidos apenas caracteres alfanuméricos. Se não for fornecido, é utilizado o ficheiro de anotação predefinido incluído no genoma de referência especificado.
BarcodeRead	Não	A localização no ensaio de sequenciação da leitura de código de barras, que contém o código de barras e o UMI. Os valores podem conter <code>Read1</code> (Leitura 1) ou <code>Read2</code> (Leitura 2). O valor predefinido é <code>Read1</code> (Leitura 1).

Campo	Obrigatório	Descrição
BarcodePosition	Sim	<p>A localização das bases correspondentes aos códigos de barras no âmbito do valor introduzido para BarcodeRead. As posições das bases são indexadas iniciando na posição zero. Introduza o valor BarcodePosition no formato seguinte:</p> <pre>0_<posição final do primeiro código de barras>+<posição inicial do segundo código de barras>_<posição final do segundo código de barras>+<posição inicial do terceiro código de barras>_<posição final do terceiro código de barras></pre> <p>Por exemplo, a estrutura seguinte resultaria no valor <code>0_8+21_29+43_51</code>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 bases no primeiro código de barras (<code>0_8</code>). • 12 bases entre o primeiro e o segundo códigos de barras. • 9 bases no segundo código de barras (<code>21_29</code>). • 13 bases entre o segundo e o terceiro códigos de barras. • 9 bases no terceiro código de barras (<code>43_51</code>).
UmiPosition	Sim	<p>A localização das bases correspondentes ao UMI no âmbito do BarcodeRead especificado. Introduza a cadeia no formato seguinte:</p> <pre><posição inicial do UMI>_<posição final do UMI></pre> <p>Por exemplo, se o UMI tiver 8 bases e o número de bases antes do UMI totalizar 51, o valor é <code>52_59</code>.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Não	<p>O nome do ficheiro que contém a sequência de código de barras a designar como permitidos. O nome do ficheiro pode conter apenas caracteres alfanuméricos, traços, sublinhados e pontos finais.</p>
KeepFastq	Não	<p>Para guardar ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>true</code> (verdadeiro). Para remover ficheiros de saída FASTQ, introduza <code>false</code> (falso).</p>

Campo	Obrigatório	Descrição
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do ficheiro de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se não for especificado nenhum valor, a predefinição é nenhum.

Em seguida, são apresentados os campos e as descrições em [DragenSingleCellRNA_Data].

Campo	Obrigatório	Descrição
Sample_ID	Sim	A ID da amostra. A ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. A ID é sensível a maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. As ID de amostras têm de corresponder às ID especificadas na secção BCLConvert_Data.

Sequenciação de Dark Cycle

Esta secção descreve como utilizar a sequenciação de dark cycle na receita.

A sequenciação de Dark cycle é utilizada para concluir apenas os passos de química de um ciclo de sequenciação. Verifique a página de produtos compatíveis para o seu kit de preparação de bancos no [Website de suporte da Illumina](#) para saber se é necessária a sequenciação de dark cycle.

Utilize os passos seguintes para a sequenciação de dark cycle.

Editar o ficheiro da receita

1. Transfira o ficheiro XML da receita a partir do [Website de suporte da Illumina](#).
2. Edite o ficheiro XML da receita.
 - a. Identifique a secção do protocolo apropriado com base na sua configuração de sequenciação de leitura e índice. Existem seis protocolos diferentes possíveis por receita personalizada que podem ser editados.
Por exemplo, o protocolo para uma Read 1 (Leitura 1) individual sem configuração de sequenciação de índice seria `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
 - b. Antes de `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` e `<ReadRef ReadName="Read 2"/>`, introduza o seguinte passo dark cycle numa nova linha.
`<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
 - c. Introduza o passo dark cycle numa nova linha para cada dark cycle necessário.
3. Guarde o ficheiro XML da receita.

O seguinte é um exemplo de uma receita com dark cycle:

```
<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" />
  ...
```

Anexar a receita ao ensaio

- 1 Na configuração do ensaio no software de controlo, seleccione **Choose** (Escolher) em Custom Recipe (Personalizar receita).
- 2 Navegue até ao ficheiro XML da receita atualizado.
- 3 Seleccione **Open** (Abrir).
4. Regresse a [Iniciar um ensaio de sequenciação na página 48](#) (Iniciar um ensaio de sequenciação).

Index

%

%PF 62

A

ajuda técnica 112
algunha 21
alertas 78
algoritmo Phred 62
alimentação de CA
 entrada 4
alinhamento de especificação 86
amplificação 9
análise
 métodos 5, 9
análise baseada na cloud 1
análise de imagem 5
análise local 1
apoio ao cliente 112
aquisição de imagens 57-58
artigos técnicos 62
assistência técnica 112
atribuir nome
 nome do instrumento 21
atualizações automáticas 78
atualizações manuais de software 78
ausência de identificações 59-60
avisos 6, 86

B

bancos
 desnaturação 9
barra de estado 3
barra de luzes 3
bcl2fastq2 57
blocos 57
botão de alimentação 3, 86

C

cabo de alimentação 4
cabo Ethernet 4
câmaras 58
caminhos UNC 52
canal verde 60
canal vermelho 60
cartucho
 orientação de carregamento 53
CE 57
ciclo de inicialização 84
ciclos de leitura 32
ciclos extra 32
colocação em fase e pré-fase 60
compartimento de consumíveis 3
comprimentos de leitura 32
Compute Engine 57
configuração do ensaio
 exemplos 32
configuração pela primeira vez 82, 88-89
conjunto do software 1, 5
consumíveis
 controlo 1
 verificação 53
consumíveis de controlo 1
contagem de ensaios 6
conversão de FASTQ 57

D

dados de desempenho 14
dados de desempenho do instrumento 14
datas de validade 82
definições de áudio 21
definições de som 21
desatualizar software 88-89
desnaturação 9
diluir bancos 9
disco rígido 6, 78
documentação 112
domínio privado 14

domínios 14

E

editar parâmetros do ensaio 52
eliminar ensaios 6, 78
encerrar 86
endereço de IP 6
ensaio
 indicadores 57
erros 6, 86
 mensagens 84
 probabilidade 62
espaço em disco 6, 78
especificações do congelador 29
especificações do frigorífico 29
estado do ensaio 6
extremidade emparelhada 52

F

faixas 58-59
falhas de registo 59
ficheiros BCL 6
ficheiros CBCL 62
ficheiros de filtro 57, 63
ficheiros de identificação de bases 9, 57, 63
ficheiros de registo 58
ficheiros InterOp 57, 63
filtragem de clusters 62
filtro de passagem (PF) 62
filtro de pureza 62
filtros de ar
 localização 82
 peças sobresselentes 29
fragmentos de receita 6

G

garantia 29
geração de modelo 59
Gestão de processos 78

H

Hub de Sequências BaseSpace 1
 definições 14
 documentação 14

I

ícones 6
identificação de bases 5
imagens 57
índice
 ciclos 32
índices de qualidade 62
inicialização 87
 falha 86
instalação do software 78
intensidades de clusters 60
interruptor 4, 86

K

kit de testes 29
kits 28
 números de catálogo 29

L

leitura única 52
ligação à Internet 14
ligações perdidas 86
Local Run Manager 5
localização de alojamento 14
localização do servidor 14
localizações de cluster 57
localizações de clusters 63

M

miniaturas 63
monitor 3
mover 4

N

nome

nome do computador 6

nome do computador 6

nucleótidos 60

numeração de blocos 59

numeração de superfícies 59

número de série 6

números de catálogo 28

números de ciclos 32

P

páginas de suporte 78

parâmetros do ensaio

editar 52

pasta de saída 52, 78

pasta de saída predefinida 52

pasta do ensaio 78

PhiX 29

alinhamento 57

PhiX Control v3 28

poços nano 60

porta Ethernet 4

portas

fechar 53

portas USB 4

predefinições de fábrica 88-89

programa de instalação do conjunto do sistema 78

Q

qualidade dos dados 62

R

rato 4

reagentes iNextSeq 1000/2000 28

receitas 78

registos de erros 58

reiniciar 88-89

RunInfo.xml 63

S

sequenciação de dois canais 60

Sequencing Analysis Viewer 57, 59

sistema operativo 87

sobresselentes 82

software

alertas de atualização 22

desatualizar 88-89

instalação 78

subscrição empresarial 14

substituto RSB 28

Suporte proativo da Illumina 14

T

tabelas de qualidade 62

tabuleiro de recolha

tapetes 29

tamanho do ensaio 78

Tampão de ressuspensão 28

tapetes 29

teclados 4

toalhetes com lixívia 29

toalhetes de álcool 29

U

unidade D 78

unidades mapeadas 52

Universal Copy Service 5, 78

V

valores de intensidade 60

ventiladores 82

verificações do sistema 84

vias 58

W

Windows

início de sessão 87

Assistência técnica

Para obter assistência técnica, contacte o Suporte Técnico da Illumina.

Sítio Web: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Números de telefone do Suporte Técnico da Illumina

Região	Número gratuito	Internacional
Alemanha	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Austrália	+61 1800 775 688	
Áustria	+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
Coreia do Sul	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Espanha	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Estados Unidos	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Filipinas	+63 180016510798	
Finlândia	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
França	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Hong Kong, China	+852 800 960 230	
Índia	+91 8006500375	
Indonésia		0078036510048
Irlanda	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Itália	+39 800 985513	+39 236003759
Japão	+81 0800 111 5011	
Malásia	+60 1800 80 6789	
Noruega	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nova Zelândia	+64 800 451 650	

Região	Número gratuito	Internacional
Países Baixos	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Reino Unido	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Singapura	1 800 5792 745	
Suécia	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Suíça	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Tailândia	+66 1800 011 304	
Taiwan, China	+886 8 06651752	
Vietname	+84 1206 5263	

Fichas de dados de segurança (FDS) — Disponíveis no sítio Web da Illumina em support.illumina.com/sds.html.

Documentação do produto — Disponível para transferência em support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122 EUA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Apenas para efeitos de investigação. Não se destina a utilização em procedimentos de diagnóstico.

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]