

# NextSeq 1000 e 2000

## Guia do Sistema de Sequenciamento

PROPRIEDADE DA ILLUMINA

Documento n.º 1000000109376 v04 PTB

Abril de 2021

**Somente para uso em pesquisa. Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico.**

Este documento e seu conteúdo são de propriedade da Illumina, Inc. e de suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se exclusivamente ao uso contratual de seu cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e para nenhuma outra finalidade. Este documento e seu conteúdo não devem ser usados ou distribuídos para nenhuma outra finalidade nem comunicados, divulgados ou reproduzidos de nenhuma forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não concede nenhuma licença sob seus direitos de patente, marca comercial, direitos autorais ou lei comum, nem direitos semelhantes de terceiros por meio deste documento.

As instruções neste documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo deste documento deve ser lido e compreendido por completo antes da utilização de tais produtos.

**NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AO(S) PRODUTO(S), FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUSIVE USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS, ANULANDO TODA GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).**

**A ILLUMINA NÃO SE RESPONSABILIZA POR QUALQUER PROBLEMA CAUSADO PELO USO INDEVIDO DO(S) PRODUTO (S) MENCIONADO(S) ACIMA (INCLUINDO PARTES SEPARADAS OU O SOFTWARE).**

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Histórico de revisões

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v04	Abril de 2021	Inclusão de instruções para importar arquivos de linha de base. Inclusão do fluxo de trabalho do DRAGEN DNA Amplicon. Inclusão de funções do NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3. Inclusão de informações para selecionar um servidor proxy. Atualização da temperatura para transporte e armazenamento do RSB com Tween 20. Atualização do fluxo de trabalho do DRAGEN RNA para incluir expressão gênica diferencial. Atualização da estrutura da pasta de saída de sequenciamento. Atualização das recomendações de formatação da planilha de amostras v2.
1000000109376 v03	Novembro de 2020	Correção de números de catálogo. Inclusão de informações sobre como adicionar novos usuários.

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v02	Outubro de 2020	<p>Inclusão do kit de reagentes NextSeq 1000/2000 P3.</p> <p>Inclusão do fluxo de trabalho do DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Inclusão do fluxo de trabalho do DRAGEN Enrichment.</p> <p>Inclusão de opções de compressão FASTQ.</p> <p>Inclusão de instruções para instalação do pipeline e atualizações de licença do DRAGEN.</p> <p>Inclusão de instruções para importar genomas de referência personalizados.</p> <p>Atualização de volume e concentrações de carga por tipos de biblioteca.</p> <p>Atualização de instruções para biblioteca de diluição.</p> <p>Inclusão de instruções para descartar automaticamente o cartucho de reagente.</p> <p>Atualização de informações sobre a quantidade de ciclos compatíveis.</p> <p>Atualização das opções de personalização do instrumento.</p> <p>Atualização das instruções do Instrument Run Setup.</p> <p>Atualização da estrutura de saída de sequenciamento do DRAGEN.</p> <p>Inclusão de informações sobre os relatórios de controle de qualidade do DRAGEN.</p> <p>Inclusão de informações sobre remoção de genomas de referência personalizados do disco rígido.</p> <p>Inclusão de informações sobre realização de verificações do sistema.</p> <p>Atualização das configurações da planilha de amostras v2.</p>

Documento n.º	Data	Descrição da alteração
1000000109376 v01	Junho de 2020	<p>Atualização das descrições de software do NextSeq 1000/2000 Control Software.</p> <p>Esclarecimento sobre a distinção entre os modos Cloud, Hybrid, Local e Standalone ao longo do guia.</p> <p>Atualização de instruções de armazenamento e descongelamento de cartuchos.</p> <p>Atualização de informações sobre a quantidade de ciclos compatíveis.</p> <p>Atualização de instruções para configurar uma análise secundária.</p> <p>Atualização dos números do catálogo de kits de reagentes.</p> <p>Atualização do diagrama de protocolo de sequenciamento.</p> <p>Atualização de instruções para especificar uma unidade de rede como pasta de saída padrão.</p> <p>Atualização da tabela de tipos de biblioteca compatíveis.</p> <p>Inclusão de instruções para importar um genoma de referência personalizado.</p> <p>Inclusão de instruções para configurar uma execução utilizando um kit de índice personalizado e um kit personalizado de preparação de bibliotecas.</p> <p>Atualização de requisitos de conta e senha do usuário.</p> <p>Inclusão de detalhes sobre a estrutura da pasta de saída do DRAGEN.</p> <p>Esclarecimento de instruções para drenar reagentes usados do cartucho.</p> <p>Inclusão de informações de contexto sobre o Q-table.</p> <p>Atualização de instruções sobre como instalar atualizações do software de controle.</p> <p>Inclusão de instruções sobre como recolocar uma execução na fila.</p>

<b>Documento n.º</b>	<b>Data</b>	<b>Descrição da alteração</b>
1000000109376 v01	Junho de 2020	Inclusão de instruções para atualizar os pipelines e a licença do DRAGEN. Inclusão de instruções de personalização do instrumento. Atualização das ilustrações para refletir os novos rótulos. Alteração de porta para visor ao longo do guia. Inclusão da descrição das duas portas Ethernet.
1000000109376 v00	Março de 2020	Versão inicial.

# Índice

Visão geral do sistema .....	1
Recursos adicionais .....	2
Hardware do instrumento .....	3
Software integrado .....	5
Gerenciamento de processos .....	6
Diagrama de protocolo de sequenciamento .....	8
Como funciona o sequenciamento .....	8
Configuração do sistema .....	11
Requisitos da conta de usuário .....	11
Configurar o BaseSpace Sequence Hub e o Proactive Support .....	13
Especificar o local da pasta de saída padrão .....	15
Importar genomas de referência personalizados .....	18
Importar arquivos de linha de base com ruído .....	18
Configurar o modo de execução .....	20
Personalização do instrumento .....	21
Materiais de consumo e equipamento .....	24
Materiais de consumo de sequenciamento .....	24
Materiais de consumo auxiliares .....	28
Equipamento auxiliar .....	29
Protocolo .....	31
Considerações sobre o sequenciamento .....	31
Planejar uma execução do sequenciamento no BaseSpace Sequence Hub .....	33
Descongelar o cartucho embalado e a lâmina de fluxo .....	41
Diluir bibliotecas .....	44
Carregar materiais de consumo no cartucho .....	46
Iniciar execução de sequenciamento .....	48
Saída do sequenciamento .....	57
Visão geral do Real-Time Analysis (RTA) .....	57
Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis .....	59
Arquivos de saída de sequenciamento .....	63
Arquivos de saída da análise secundária do DRAGEN .....	64
Estrutura da pasta de saída da análise secundária do DRAGEN .....	74
Manutenção .....	77
Liberar espaço no disco rígido .....	77
Atualizações de software .....	77
Fluxo de trabalho e atualizações de licença DRAGEN .....	79

Trocar o filtro de ar .....	81
Solução de problemas .....	83
Resolução de mensagens de erro .....	83
Voltar a armazenar materiais de consumo .....	84
Cancelar uma execução .....	84
Recolocar uma execução na fila .....	85
Ligar e desligar o instrumento .....	85
Executar uma verificação do sistema .....	86
Restaurar para as configurações de fábrica .....	87
Capturar imagem instalada .....	87
Restaurar imagem capturada .....	88
Recursos e referências .....	89
Configurações da planilha de amostras v2 .....	89
Sequenciamento de ciclo escuro .....	104
Índice .....	106
<b>Assistência técnica .....</b>	<b>109</b>



# Visão geral do sistema

O Sistema de Sequenciamento Illumina® NextSeq™ 1000 e o Sistema de Sequenciamento Illumina® NextSeq™ 2000 oferecem uma abordagem direcionada ao NGS<sup>1</sup>. Esse sistema centrado em aplicativos resume a tecnologia de sequenciamento da Illumina em um instrumento econômico para desktop, oferecendo as seguintes funcionalidades:

- **Acessibilidade e confiabilidade:** o NextSeq 1000/2000 conta com análise DRAGEN local e desnaturação e diluição integradas. Um módulo de aquisição de imagens é integrado ao sistema, e os componentes fluidos são integrados ao material de consumo, simplificando a manutenção do instrumento.
- **Carregamento de material de consumo de etapa única:** um cartucho de uso único é pré-carregado com todos os reagentes necessários para uma execução. A biblioteca e a lâmina de fluxo são carregadas diretamente no cartucho, que é então carregado no instrumento. A identificação integrada possibilita o controle preciso.
- **Software NextSeq 1000/2000:** um pacote de software integrado controla as operações do instrumento, processa imagens e gera identificação de bases.
  - **Modo Cloud (Nuvem):** planeje sua execução com Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub. O fluxo de trabalho de análise selecionado é iniciado automaticamente na nuvem. Os resultados dos dados e da análise da execução também são fornecidos na nuvem.
  - **Modo Hybrid (Híbrido):** planeje sua execução com Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub. Então se inicia o fluxo de trabalho de análise selecionado pelo DRAGEN do instrumento.
  - **Modo Local:** planeje sua execução com um formato de arquivo de planilha de amostras v2. Inicia-se o fluxo de trabalho de análise selecionado automaticamente pelo DRAGEN do instrumento.
  - **Modo Standalone (Autônomo):** planeje a execução sem uma planilha de amostras.

Esta seção fornece um panorama do sistema, inclusive informações sobre hardware, software e análise de dados. Ela também reúne os conceitos e a terminologia essenciais que são incorporados por toda a documentação. Para especificações detalhadas, planilha de dados, aplicativos e produtos relacionados, consulte a [página de produtos dos sistemas de sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#) no site da Illumina.

---

<sup>1</sup>sequenciador de última geração

## Recursos adicionais

As [páginas de suporte dos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#) no site da Illumina oferecem outros recursos do sistema. Esses recursos abrangem software, treinamento, produtos compatíveis e a documentação abaixo. Verifique sempre as páginas de suporte quanto às versões mais recentes.

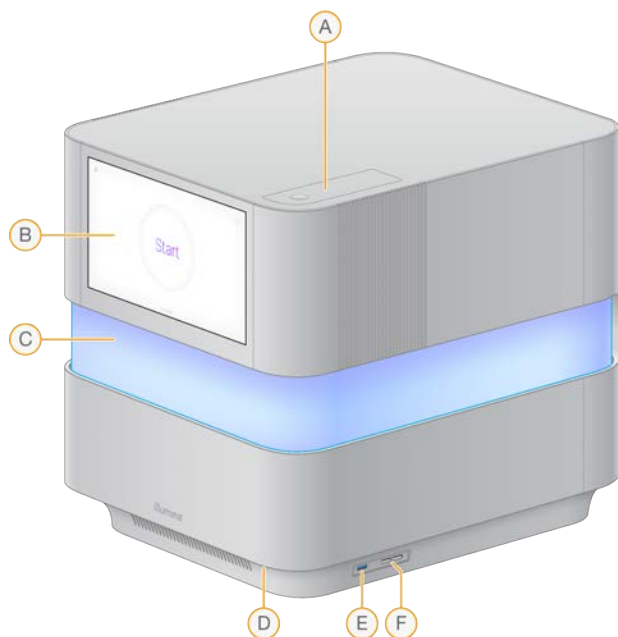
Recurso	Descrição
<a href="#">Seletor de protocolo personalizado</a>	Ferramenta para gerar instruções de todo o processo, personalizada para seu método de preparação de bibliotecas, parâmetros de execução e método de análise, com opções de refinamento do nível de detalhes.
<i>Guia de segurança e conformidade dos sistemas de sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 (documento n.º 1000000111928)</i>	Fornecer informações sobre considerações de segurança operacional, declarações de conformidade e rotulagem de instrumentos.
<i>Guia 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 bibliotecas de desnaturação e diluição NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)</i>	Fornecer instruções de desnaturação e diluição manual de bibliotecas preparadas para uma execução do sequenciamento e para a preparação de um controle de PhiX opcional.
<i>Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)</i>	Fornecer informações sobre a substituição de primers de sequenciamento da Illumina por primers de sequenciamento personalizados.
<i>Guia de preparação do local do Sistema de Sequenciamento NextSeq 2000 (documento n.º 1000000109378)</i>	Fornecer especificações para a área do laboratório, requisitos elétricos e considerações ambientais e de rede.
<i>Ajuda do BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Fornecer informações sobre o uso do BaseSpace™ Sequence Hub e de opções de análise disponíveis.

Recurso	Descrição
<i>Guia de combinações de adaptadores de índice (documento n.º 1000000041074)</i>	Fornecer diretrizes de combinações e estratégias de indexação dupla.
<i>Sequências do adaptador Illumina (documento n.º 1000000002694).</i>	Fornecer as listas das sequências do adaptador para kits de preparação de biblioteca Illumina.

## Hardware do instrumento

Os Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 contam com botão de alimentação, monitor, barra de status, compartimento de materiais de consumo e portas USB.

Figura 1 Componentes externos do sistema



- A. **Compartimento de filtro de ar:** dá acesso ao filtro de ar substituível.
- B. **Monitor com tela de toque:** possibilita a configuração e instalação do instrumento usando a interface do software de controle.
- C. **Barra de status :** a cor clara aumenta, à medida que o sistema percorre seu fluxo de trabalho. Azul e roxa indicam interatividade (por exemplo, verificações pré-execução); multicolorida indica momentos e dados notáveis (por exemplo, conclusão de sequenciamento). 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, porém com alimentação CA (pulsas).

- E. **Porta USB 3.0:** para conectar-se a uma unidade externa portátil para transferência de dados.
- F. **Porta USB 2.0:** para conectar-se a um mouse ou teclado.

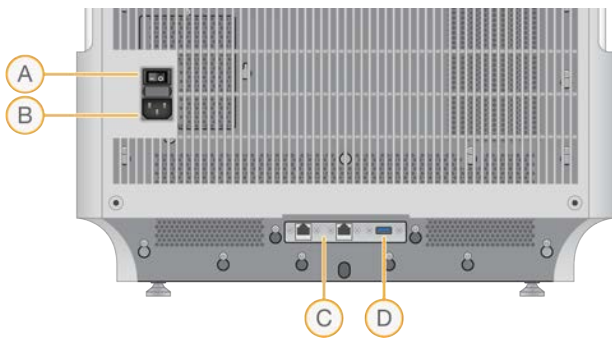
## Energia e conexões auxiliares

É possível mover o instrumento delicadamente para acessar o interruptor, a porta USB e outras conexões auxiliares na parte posterior do instrumento.

A parte posterior do instrumento contém o interruptor e a entrada que controla a alimentação para o instrumento e duas portas Ethernet para proporcionar uma conexão Ethernet opcional. Uma porta USB 3.0 fornece a opção de conectar-se a uma unidade externa portátil para transferência de dados (o exFAT não é compatível com essa plataforma baseada em Linux).

Os Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 contam com duas portas Ethernet para expandir a capacidade e a flexibilidade do sistema. Por exemplo, uma porta Ethernet pode ser dedicada à comunicação com unidade interna de rede e outra porta dedicada à comunicação externa, como BaseSpace Sequence Hub ou Proactive Support.

Figura 2 Componentes do painel posterior

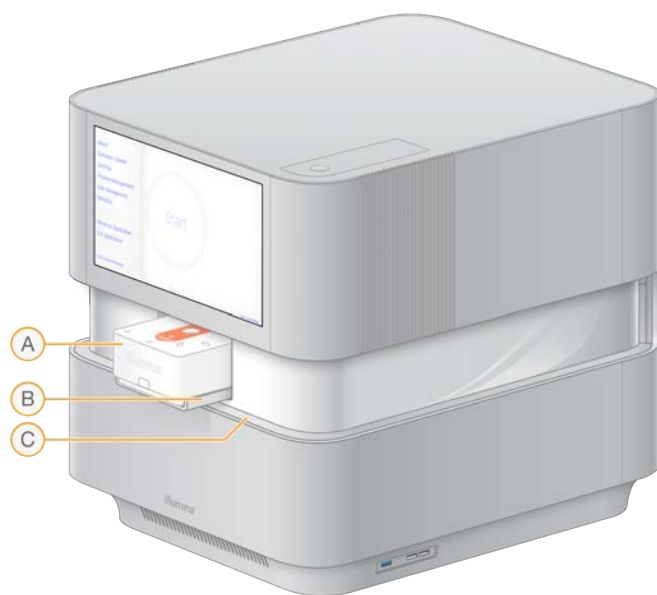


- A. **Interruptor articulado:** liga e desliga o instrumento.
- B. **Tomada elétrica:** conexão do cabo de alimentação.
- C. **Portas Ethernet (2):** conexão de cabo Ethernet opcional.
- D. **Porta USB 3.0:** para conectar-se a um disco rígido externo para transferência de dados.

## Compartimento dos materiais de consumo

O compartimento dos materiais de consumo contém o cartucho, inclusive lâmina de fluxo e biblioteca diluída para uma execução do sequenciamento.

Figura 3 Compartimento dos materiais de consumo carregado



- A. **Cartucho:** contém a lâmina de fluxo, a biblioteca e os reagentes e recolhe os reagentes usados durante a execução.
- B. **Bandeja:** mantém o cartucho durante o sequenciamento.
- C. **Visor:** abre para fornecer acesso ao compartimento de materiais de consumo.

## Software integrado

O pacote de software do sistema contém aplicativos integrados que efetuam as execuções de sequenciamento e análise.

- **NextSeq 1000/2000 Control Software:** controla as operações do instrumento e fornece uma interface para configurar o sistema, configurar uma execução do sequenciamento e monitorar estatísticas de execução durante o sequenciamento.
- **Real-Time Analysis (RTA3):** realiza análise de imagens e identificação de bases durante a execução. Para mais informações, consulte [Saída do sequenciamento na página 57](#).
- **Universal Copy Service:** copia os arquivos de saída do sequenciamento da pasta de execuções para o BaseSpace Sequence Hub (se houver) e para a pasta de saída, onde é possível acessá-los.

O software de controle é interativo e executa processos em segundo plano automatizados. O Real-Time Analysis e o Universal Copy Service executam apenas processos em segundo plano.

## Informações do sistema

Selecione o menu do software de controle no canto superior esquerdo para abrir a seção About (Sobre). A seção About (Sobre) contém informações de contato da Illumina e as seguintes informações do sistema:

- Número de série do instrumento
- Nome do computador
- Versão do pacote do sistema
- Versão da imagem do SO
- Contagem total de execuções

## Notificações e alertas

O ícone de notificação fica localizado no canto superior direito. Em caso de advertência ou erro, o painel direito desliza para indicar notificações. Selecione o ícone a qualquer momento para visualizar uma lista de notificações de advertência ou erro Current (Atuais) ou Historic (Antigas).

- Os alertas requerem atenção, mas não interrompem uma execução nem exigem outra ação além da confirmação.
- Os erros requerem ação antes de iniciar ou continuar uma execução.

## Minimizar o software de controle

Minimize o software de controle para acessar outros aplicativos. Por exemplo, para procurar a pasta de saída no Explorador de Arquivos ou encontrar uma planilha de amostras.

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

# Gerenciamento de processos

A tela Process Management (Gerenciamento de processos) exibe temporariamente execuções que são armazenadas em `/usr/local/illumina/runs`. Cada execução é identificada por data, nome e ID da execução. Informações sobre os status Run (Execução), Secondary Analysis (Análise secundária), Output Folder (Pasta de saída) e Cloud (Nuvem) também são exibidas para cada execução. Selecione a execução para visualizar outras informações, como Workflow (Fluxo de trabalho), Average % Q30 (Média % Q30), Total Reads PF (Total de PFs de leituras) e Total Yield (Rendimento total). Para excluir execuções e liberar espaço, consulte [Liberar espaço no disco rígido na página 77](#). Para recolocar a análise do instrumento na fila, consulte [Recolocar uma execução na fila na página 85](#).

## Status da execução

Esta seção exibe o status da execução do sequenciamento:

- **In Progress:** execução do sequenciamento em andamento.
- **Complete:** a execução do sequenciamento foi concluída.
- **Stopped:** a execução do sequenciamento foi interrompida.
- **Errored:** a execução do sequenciamento contém um erro.

## Status da análise secundária

Esta seção exibe o status da análise secundária DRAGEN do instrumento. Caso a análise esteja sendo efetuada no BaseSpace Sequence Hub, será exibido N/A.

- **Not Started:** a análise DRAGEN ainda não foi iniciada.
- **In Progress:** a análise DRAGEN está em andamento.
- **Stopped:** a análise DRAGEN foi interrompida.
- **Errored:** a análise DRAGEN contém um erro.
- **Complete:** a análise DRAGEN foi concluída.

## Status da pasta de saída

Esta seção exibe o status dos arquivos que estão sendo copiados para a pasta de saída:

- **In Progress** (Em andamento): os arquivos estão sendo copiados para a pasta de saída.
- **Complete** (Concluído): os arquivos foram copiados para a pasta de saída.

## Status da nuvem (BaseSpace Sequence Hub)

A seção exibe o status dos arquivos que estão sendo carregados no BaseSpace Sequence Hub pela nuvem:

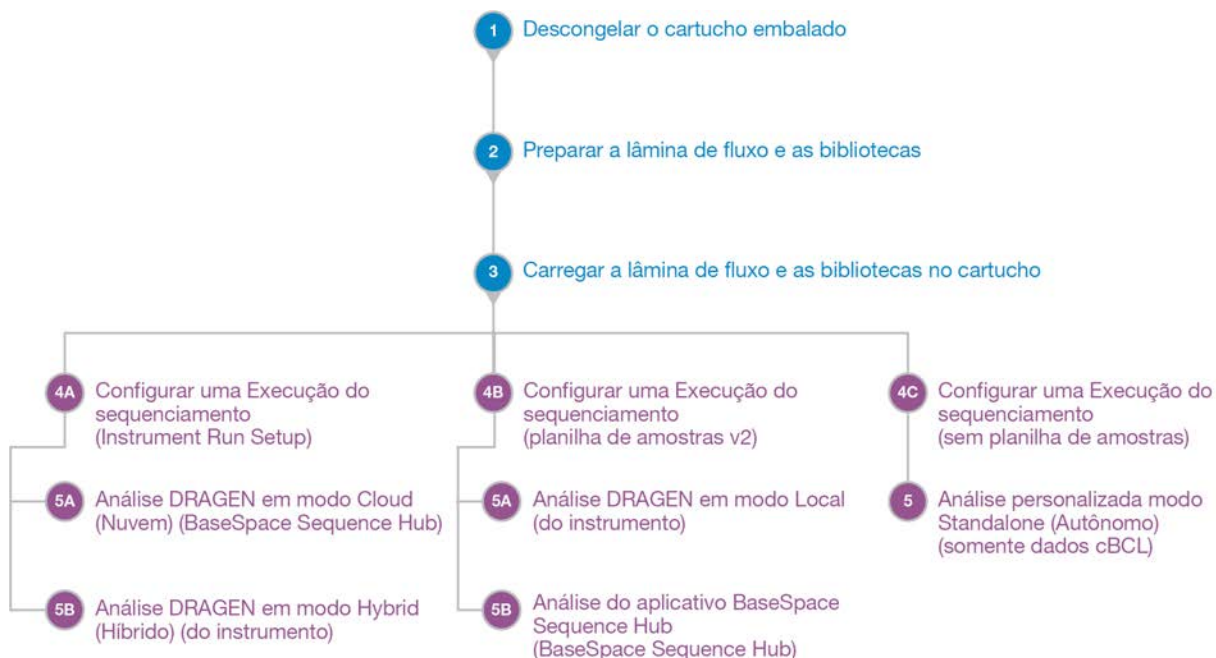
- **In Progress** (Em andamento): o software de controle está carregando arquivos no BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Concluído): os arquivos foram carregados no BaseSpace Sequence Hub.

## Como solucionar um problema no status

- Se a execução estiver em andamento, feche a tela Process Management (Gerenciamento de processos), aguarde cerca de cinco minutos e reabra.
- Se a execução não estiver em andamento, ligue e desligue o instrumento e reabra a tela Process Management (Gerenciamento de processos). Consulte [Ligar e desligar o instrumento na página 85](#).

## Diagrama de protocolo de sequenciamento

O diagrama a seguir ilustra o protocolo de sequenciamento utilizando o NextSeq 1000/2000.



## Como funciona o sequenciamento

O sequenciamento nos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 inclui clusterização, sequenciamento e análise. Cada etapa ocorre automaticamente durante uma execução de sequenciamento. Dependendo da configuração do sistema, outras análises serão realizadas à exceção do instrumento depois que a execução estiver concluída.

### Clusterização

A biblioteca<sup>1</sup> é desnaturada automaticamente em fitas simples e depois diluída dentro do instrumento. Durante a clusterização, moléculas de DNA em fita simples são ligadas à superfície da lâmina de fluxo e amplificadas para formar clusters<sup>2</sup>. A clusterização dura ~4 horas.

<sup>1</sup>Uma amostra de DNA ou RNA que tem adaptadores ligados para sequenciamento. A preparação dos métodos varia.

<sup>2</sup>Um grupo clonal de fitas de DNA em uma lâmina de fluxo que produz uma leitura de sequenciamento. Cada fita de DNA em uma lâmina de fluxo semeia um modelo que é amplificado até que o cluster consista em centenas de milhares de cópias. Por exemplo, uma lâmina de fluxo com 10.000 clusters produz 10.000 leituras simples ou 20.000 leituras tipo paired-end.



## Sequenciamento

A imagem dos clusters é feita utilizando química de dois canais, um canal verde e um canal azul, a fim de codificar dados para os quatro nucleotídeos. Depois que a imagem de um bloco na lâmina de fluxo é concluída, obtém-se a imagem do próximo bloco. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento (~5 minutos por ciclo). Após a análise das imagens, o software Real-Time Analysis realiza uma identificação de bases<sup>1</sup>, uma filtragem e uma pontuação de qualidade<sup>2</sup>.

## Análise primária

À medida que a execução ocorre, o software de controle transfere automaticamente os arquivos de identificação de bases<sup>3</sup> (\*.cbcl) para a pasta de saída especificada para análise de dados. Durante a execução do sequenciamento, o software de análise em tempo real (RTA3) realiza análise de imagens, identificação de bases e demultiplexação<sup>4</sup>. Quando o sequenciamento é concluído, inicia-se a análise secundária. O método de análise de dados secundária depende do aplicativo e da configuração do sistema.

## Análise secundária

O BaseSpace Sequence Hub é o ambiente de computação na nuvem da Illumina para monitoramento da execução, análise de dados, armazenamento e colaboração. Ele hospeda os aplicativos DRAGEN e BaseSpace Sequence Hub, que são compatíveis com métodos de análise comuns para sequenciamento.

Quando a análise de sequenciamento inicial é concluída, o DRAGEN realiza uma análise secundária com um dos pipelines de análise disponíveis.

Se estiver usando o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido), o DRAGEN recupera planilha de amostras, genoma de referência e arquivos de entrada de execução do Instrument Run Setup (Configuração da execução de instrumento) no BaseSpace Sequence Hub. No modo Cloud (Nuvem), os dados cBCL são carregados automaticamente no BaseSpace Sequence Hub, e o BaseSpace Sequence Hub inicia a análise secundária do DRAGEN. No modo Hybrid (Híbrido), a análise secundária do DRAGEN é realizada no instrumento, e os arquivos de saída podem ser armazenados em uma pasta selecionada ou na nuvem.

Utilizando o modo Local, o DRAGEN recupera planilha de amostras, genoma de referência e arquivos de entrada de execução fornecidos pelos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. A análise secundária do DRAGEN é realizada no instrumento, e os arquivos de saída são

---

<sup>1</sup>Determinando uma base (A, C, G ou T) para cada cluster de um bloco em um ciclo específico.

<sup>2</sup>Calcula um conjunto de preditores de qualidade para cada identificação de bases e usa o valor do preditor para consultar o Q-score.

<sup>3</sup>Contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade associada para cada cluster de cada ciclo de sequenciamento.

<sup>4</sup>Um processo de análise que diferencia as leituras para cada biblioteca em um pool.

armazenados em uma pasta de saída selecionada. Se a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) estiver selecionada, a análise poderá ser iniciada pelos aplicativos do BaseSpace Sequence Hub após a conclusão do sequenciamento.

Se estiver usando o modo Standalone (Autônomo), configure uma execução sem uma planilha de amostras. Recomenda-se este fluxo de trabalho para fluxos de trabalho de análise personalizados iniciados em dados cBCL.

- Para mais informações sobre o BaseSpace Sequence Hub, consulte [a ajuda on-line do BaseSpace Sequence Hub](#).
- Para mais informações sobre o DRAGEN, consulte a página de suporte da [DRAGEN Bio-IT Platform](#).
- Para uma visão geral de todos os aplicativos, consulte [BaseSpace Apps](#).

# Configuração do sistema

Esta seção fornece instruções para configurar seu sistema, inclusive as descrições de configurações de software.

Estas instruções descrevem principalmente o software de controle, com algumas informações sobre configuração de rede e operação do sistema.

**i** | Ao usar o Google Chrome no instrumento, será solicitado que você desbloqueie seu chaveiro de login. Você pode ignorar e cancelar o prompt com segurança.

## Requisitos da conta de usuário

O sistema operacional Linux tem três contas:

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

A conta de administrador destina-se apenas à aplicação de atualizações do sistema, como atualizar o NextSeq 1000/2000 Control Software, ou para ser usada pelos funcionários de TI para montar uma unidade de rede persistente.

Execute todas as outras funções, inclusive o sequenciamento, com a conta de usuário.

### Requisitos da senha

O Field Service Engineer inicia uma alteração de senha para todas as três contas após concluir a instalação do instrumento. Atualize as duas senhas a cada 180 dias, quando for solicitado.

Tabela 1 Políticas de senha padrão

Política	Configuração
Aplicar o histórico de senhas	Cinco senhas lembradas
Limite de bloqueio	Dez tentativas de login inválidas
Tamanho mínimo da senha	Dez caracteres
Variedade mínima de caracteres	Três de cada: número, letra maiúscula, letra minúscula e símbolo
Máximo de caracteres repetidos	Três caracteres

Política	Configuração
A senha deve atender aos requisitos de complexidade	Desativado
Armazenar senhas usando criptografia reversível	Desativado

## Adicionar novo usuário

1. Faça login no ilmnadmin.
2. Selecione o botão de alimentação e abra a lista suspensa ilmnadmin.
3. Selecione **Account Settings** (Configurações da conta).
4. Selecione **Unlock** (Desbloquear) e informe a senha do ilmnadmin.
5. Selecione **Add User** (Adicionar usuário).
6. Selecione o tipo de conta Standard (Padrão) e informe um novo nome de usuário.
7. Selecione **Set password now** (Definir senha agora) e informe uma nova senha.
8. Selecione **Add** (Adicionar).  
O novo usuário é adicionado à lista Users (Usuários).
9. Conceda acesso do usuário ao NextSeq 1000/2000 Control Software da seguinte maneira.
  - a. Abra o terminal.
  - b. Digite o seguinte:  

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <novo nome de usuário>
```
  - c. Caso seja solicitado, informe a senha do ilmnadmin.
10. Para confirmar que as permissões do usuário foram configuradas corretamente, faça o seguinte.
  - a. Faça login na conta do novo usuário.
  - b. Navegue até o NextSeq 1000/2000 Control Software.
  - c. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
  - d. Em Default Output Folder (Pasta de saída padrão), verifique se é possível selecionar e salvar o caminho da pasta de saída.  
Se você conseguir selecionar e salvar a pasta de saída sem erros, é porque as permissões foram configuradas corretamente.

## Redefinir senha

Esta seção explica como redefinir a senha do ilmnuser, ilmnadmin ou root. A recuperação de senha não está disponível. Redefinir a senha não ignora o bloqueio da conta após muitas tentativas de senha incorreta. Você precisa esperar 10 minutos para poder redefinir a senha ou tentar fazer login.

## Redefinir senha do ilmuser

É possível redefinir a senha do ilmuser se você souber a senha do ilnadmin ou root.

1. Faça login no ilnadmin.
2. Abra o terminal.
3. Digite `sudo passwd ilmuser`.
4. Digite a senha do ilnadmin quando solicitado.
5. Digite uma nova senha do ilmuser quando solicitado.
6. Quando solicitado, digite outra vez a nova senha do ilmuser para confirmar a nova senha.

## Redefinir senha do ilnadmin

É possível redefinir a senha do ilnadmin se você souber a senha root.

1. Faça login no root.
2. Abra o terminal.
3. Digite `passwd ilnadmin` para alterar a senha do ilnadmin ou digite `passwd ilmuser` para alterar a senha do ilmuser.
4. Digite a nova senha quando solicitado.
5. Quando solicitado, digite outra vez a nova senha para confirmá-la.

## Redefinir senha root

Para redefinir a senha root, use uma das opções a seguir:

- Se você souber a senha da vez em que a última imagem do SO foi capturada, restaure para aquela imagem salva.
- Caso não se lembre da senha, fale com o Illumina Tech Support.

# Configurar o BaseSpace Sequence Hub e o Proactive Support

Use as instruções a seguir para configurar o BaseSpace Sequence Hub e o Proactive Support no sistema. Para configurar uma conta do BaseSpace Sequence Hub, consulte a [ajuda on-line do BaseSpace Sequence Hub](#).

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).

2. Para configurações do BaseSpace Sequence Hub e do Proactive Support, selecione uma das opções a seguir:

Opção	Descrição e requisitos
<b>Proactive Support Only* (Somente Proactive Support)</b>	Envia os dados de desempenho do instrumento à Illumina para agilizar a solução de problemas. Necessita de uma conexão à Internet.
<b>Proactive and Run Monitoring (Proativo e monitoramento de execução)</b>	Envia arquivos InterOp e de registro ao BaseSpace Sequence Hub para monitoramento remoto de execuções. Esta opção é padrão. Necessita de uma conta do BaseSpace Sequence Hub e uma conexão à Internet.
<b>Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento)</b>	Envia arquivos InterOp, arquivos de registro e dados de execução ao BaseSpace Sequence Hub para monitoramento e análise remotos. Exige uma conta do BaseSpace Sequence Hub, uma conexão de internet e uma planilha de amostras.
<b>None (Nenhum)</b>	Desconecta execuções de contas do BaseSpace Sequence Hub e não envia dados de desempenho do instrumento ao Illumina Proactive Support.

\* Dependendo da versão do software de controle, o nome dessa configuração na interface do software talvez seja diferente do nome que consta neste guia.

Selecionar qualquer opção, exceto None (Nenhum), habilita o Proactive Support. É um serviço gratuito que permite que você visualize seus dados de desempenho no MyIllumina Customer Dashboard e possibilita que as equipes de serviço da Illumina solucionem problemas mais rápido.

- i** | Proactive and Run Monitoring (Proativo e monitoramento de execução) é ativado por padrão. Para optar pelo cancelamento desse serviço, selecione **None** (Nenhum).

- Se você selecionou None (Nenhum) na etapa 2, selecione **Save** (Salvar) para concluir. Senão, prossiga para a etapa 6.
- Na lista Hosting Location (Local de hospedagem), selecione o local do servidor do BaseSpace Sequence Hub para onde os dados serão carregados. Utilize o local de hospedagem de sua região ou o que estiver mais próximo.
- Caso tenha uma assinatura empresarial, insira o nome do domínio (URL) usado na conta do BaseSpace Sequence Hub. Por exemplo: <https://seulaboratorio.basespace.illumina.com>.
- Selecione **Save** (Salvar).

## Especificar o local da pasta de saída padrão

Use as instruções desta seção para selecionar um local para a pasta de saída padrão. É possível alterar a pasta de saída para cada execução durante a configuração da execução. O software salva os arquivos cBCL<sup>1</sup> e outros dados da execução na pasta de saída.

Será necessária uma pasta de saída, a menos que o BaseSpace Sequence Hub seja configurado para Proactive, Run Monitoring and Storage (proativo, monitoramento de execução e armazenamento). Utilize somente uma unidade externa ou de rede como pasta de saída padrão. Usar uma pasta de saída do instrumento impactará de maneira negativa a execução do sequenciamento.

### Especifique uma pasta de saída da unidade externa

Use as instruções a seguir para selecionar uma unidade portátil externa como pasta de saída padrão. Recomenda-se uma unidade autoalimentada que esteja formatada para NTFS ou GPT/EXTA.

1. Conecte uma unidade portátil externa usando a porta USB 3.0 na parte lateral ou posterior do instrumento.  
Verifique se a unidade portátil externa permite a gravação de permissões. Se estiver definida como Read Only (Somente leitura), o software de controle não conseguirá salvar dados nela.
2. Crie uma nova pasta na unidade portátil externa. Essa pasta será o local de pasta de saída padrão. O NextSeq 1000/2000 Control Software necessita de pelo menos dois níveis de pastas agrupadas para reconhecer o local como unidade portátil externa.
3. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
4. Em Default Output Folder (Pasta de saída padrão), selecione o caminho da pasta existente e navegue até a nova pasta na unidade externa portátil.
5. **[Opcional]** Se você tiver selecionado **Online Run Setup** (Configuração de execução on-line) no Run Mode (Modo execução), selecione uma opção do menu suspenso Hosting Location (Local de hospedagem).
6. Selecione **Save** (Salvar).

### Especificar uma pasta de saída padrão na unidade de rede

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

---

<sup>1</sup>Contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade associada para cada cluster de cada ciclo de sequenciamento.

## Instruções de montagem SMB/CIFS

1. Se o NextSeq 1000/2000 Control Software estiver aberto, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicativo).
2. Faça login no ilmnadmin.
3. Selecione **Applications** (Aplicativos).
4. Em Favorites (Favoritos), selecione **Terminal**.
5. Digite `sudo touch /root/.smbcreds` e selecione **Enter**.
6. Digite a senha do ilmnadmin quando solicitado.  
A senha do ilmnadmin é necessária toda vez que você usar um comando `sudo`.
7. Digite `sudo gedit /root/.smbcreds` e selecione **Enter** para abrir o arquivo de texto chamado `smbcreds`.
8. Ao abrir o arquivo de texto `.smbcreds`, digite suas credenciais de acesso à rede no seguinte formato.  

```
username=<user name>
password=<password>
domain=<domain_name>
```

Os colchetes não são necessários para credenciais de nome de usuário, senha e domínio. A credencial de domínio só é necessário se a conta remota fizer parte de um domínio.
9. Selecione **Save** (Salvar) e saia do arquivo.
10. Identifique o nome do servidor e nome do compartilhamento de seu servidor SMB/CIFs.  
O nome do servidor e o nome do compartilhamento não podem conter espaços, por exemplo:  
Nome do servidor: `192.168.500.100` ou `Myserver-myinstitute-03`  
Nome do compartilhamento: `/share1`
11. No terminal, digite `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` e selecione **Enter** para conceder acesso de leitura ao arquivo de texto `.smbcreds`.
12. Digite `sudo mkdir /mnt/<local name>`.  
`<local name>` é o nome do novo diretório em sua unidade de rede e pode conter espaços. Este é o diretório que aparecerá no instrumento.
13. Selecione **Enter**.
14. Digite `sudo gedit /etc/fstab` e selecione **Enter**.
15. Quando o arquivo `fstab` abrir, digite o seguinte para encerrar o arquivo e selecione **Enter**.  

```
//<Server name>/<Share name> /mnt/<local name> 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** (Salvar) e saia do arquivo.
17. No terminal, digite `sudo mount -a -vvv` e selecione **Enter**.



A unidade de rede agora esta montada como `/mnt/<local name>`.

18. Para confirmar que a montagem teve sucesso, digite `<df | grep <local name>>` e selecione **Enter**.  
O nome do fileshare deverá aparecer.
19. Digite `sudo mkdir /mnt/<local name>/<output directory>` para criar uma subpasta dentro do diretório local. O `<output directory>` representa o local de sua pasta de saída padrão.  
O NextSeq 1000/2000 Control Software necessita de pelo menos dois níveis de pastas agrupadas para reconhecer o local como unidade de rede montada.
20. Ligue e desligue o instrumento. Consulte [Ligar e desligar o instrumento na página 85](#).
21. Defina a unidade de rede montada persistente como a pasta de saída padrão. Consulte [Especificar a unidade de rede persistente como a pasta de saída padrão na página 18](#).

## Instruções de montagem do NFS

1. Se o NextSeq 1000/2000 Control Software estiver aberto, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicativo).
2. Faça login no `ilmnadmin`.
3. Identifique o nome do servidor de seu servidor NFS.  
O nome do servidor não nome conter espaços, por exemplo:  
Nome do servidor: `192.168.500.100` ou `Myserver-myinstitute-03`
4. Selecione **Applications** (Aplicativos).
5. Em Favorites (Favoritos), selecione **Terminal**.
6. Digite `sudo mkdir /mnt/<local name>` e selecione **Enter**.  
`<local name>` é o nome do novo diretório em sua unidade de rede.
7. Digite `sudo gedit /etc/fstab` e selecione **Enter**.
8. Quando o arquivo `fstab` abrir, digite o seguinte e selecione **Enter**.  
Nome do servidor: `/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
9. Selecione **Save** (Salvar) e saia do arquivo.
10. No terminal, digite `sudo mount -a -vvv` e selecione **Enter**.  
A unidade de rede agora está montada no `/mnt/directory` dentro da pasta `<local name>`.
11. Crie uma nova `<sub folder>` dentro da pasta `<local name>`. A subpasta representa o local de sua pasta de saída padrão.  
O NextSeq 1000/2000 Control Software necessita de pelo menos dois níveis de pastas agrupadas para reconhecer o local como unidade de rede montada.
12. Ligue e desligue o instrumento. Consulte [Ligar e desligar o instrumento na página 85](#).
13. Defina a unidade de rede montada persistente como a pasta de saída padrão. Consulte [Especificar a unidade de rede persistente como a pasta de saída padrão na página 18](#).

## Especificar a unidade de rede persistente como a pasta de saída padrão

1. Faça login no ilmnuser.
2. No menu do NextSeq 1000/2000 Control Software, selecione **Settings** (Configurações).
3. Em Default Output Folder (Pasta de saída padrão), selecione a montagem da unidade de rede persistente localizada em `/mnt/<local name>/<output directory>`.
4. **[Opcional]** Se você tiver selecionado **Online Run Setup** (Configuração de execução on-line) no Run Mode (Modo execução), selecione uma opção do menu suspenso Hosting Location (Local de hospedagem).
5. Selecione **Save** (Salvar).

## Importar genomas de referência personalizados

Novos genomas de referência personalizados só podem ser importados utilizando a conta do administrador. Para consultar uma lista com todos os genomas de referência compatíveis, acesse a página NextSeq 1000/2000 Product Compatibility.

1. Crie um genoma de referência utilizando o aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments do BaseSpace Sequence Hub. Para mais informações, consulte *o suporte on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0*.
2. Selecione o menu do software de controle e depois **Process Management** (Gerenciamento de processos).
3. Verifique se não há execuções de sequenciamento ou análises secundárias do instrumento em andamento.
4. No menu do software de controle, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicativo).
5. Faça login no ilmnadmin.
6. Selecione o menu do software de controle e depois **DRAGEN**.
7. Na seção Genome (Genoma), selecione **View Installed Genomes** (Visualizar genomas instalados) para visualizar uma lista de todos os genomas Illumina e personalizados que estão instalados.
8. Feche o modal.
9. Selecione **Choose** (Escolher) em Import New Reference Genomes (Importar novos genomas de referência), navegue até o arquivo do genoma de referência (\*.tar.gz) na unidade de rede portátil ou montada e selecione **Open** (Abrir).
10. Selecione **Import** (Importar).

## Importar arquivos de linha de base com ruído

Se estiver usando o fluxo de trabalho do DRAGEN Enrichment em modo somático, você poderá usar um arquivo de linha de base com ruído para filtrar ruído sistemático ou de sequenciamento. É possível baixar arquivos de ruído personalizados padrão no [Site de Suporte da Illumina](#) ou criar um arquivo de linha de base com ruído personalizado.

## Gerar um arquivo de linha de base com ruído personalizado

Se estiver usando o modo somático, você poderá usar um arquivo de linha de base com ruído personalizado. O arquivo de linha de base com ruído é elaborado com amostras normais que não correspondem ao indivíduo de quem as amostras provêm. A quantidade recomendada de amostras normais é 50.

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

- Use o servidor da DRAGEN Bio-IT Platform. Para obter instruções, consulte a *assistência on-line* da DRAGEN Bio-IT Platform.
- Use o aplicativo DRAGEN Baseline Builder no BaseSpace Sequence Hub. Use o pipeline BCL Convert no Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) do BaseSpace Sequence Hub para gerar arquivos FASTQ. Quando a execução do sequenciamento estiver concluída e 50 amostras estiverem disponíveis, insira os arquivos FASTQ no aplicativo DRAGEN Baseline Builder.

## Importar arquivos de linha de base utilizando interface do usuário

Após importar o arquivo de linha de base, você pode configurar a execução do sequenciamento utilizando o fluxo de trabalho do DRAGEN Enrichment no modo somático.

1. Baixe um arquivo de linha de base padrão do [Site de Suporte da Illumina](#) ou baixe o arquivo de linha de base personalizado do servidor DRAGEN ou do aplicativo DRAGEN Baseline Builder.
2. No menu do software de controle, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicativo).
3. Faça login no ilmnadmin.
4. Selecione **Applications** (Aplicativos) e depois selecione **Favorites** (Favoritos).
5. Selecione **+Other Locations** (Outros locais) e depois selecione **Computer** (Computador).
6. Clique duas vezes em **usr** e depois em **local**.
7. Clique duas vezes em **illumina** e depois em **aux\_files**.
8. Arraste o arquivo de linha de base com ruído para **aux\_files**.

## Importar os arquivos de linha de base utilizando o terminal

Após importar o arquivo de linha de base, você pode configurar a execução do sequenciamento utilizando o fluxo de trabalho do DRAGEN Enrichment no modo somático.

1. Baixe um arquivo de linha de base padrão do [Site de Suporte da Illumina](#) ou baixe o arquivo de linha de base personalizado do servidor DRAGEN ou do aplicativo DRAGEN Baseline Builder.
2. No menu do software de controle, selecione **Minimize Application** (Minimizar aplicativo).
3. Faça login no ilmnadmin.
4. Selecione **Applications** (Aplicativos).
5. Em **Favorites** (Favoritos), selecione **Terminal**.

6. Digite o seguinte comando:

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

## Configurar o modo de execução

O modo de execução se aplica a todas as execuções e determina onde inserir os parâmetros de execução e como analisar dados.

### Modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido)

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Selecione **Online Run Setup** (Configuração de execução on-line) no BaseSpace Sequence Hub Services e Proactive Support.
3. Defina outras configurações corretamente selecionando uma das seguintes opções:
  - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proativo e monitoramento de execução) ou **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento).
  - b. Menu suspenso para **Hosting Location** (Local de hospedagem).
  - c. **[Opcional]** Informe um **Private Domain Name** (Nome de domínio privado).
4. Selecione **Save** (Salvar).

### Modo Local ou Standalone (Autônomo)

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Selecione **Run Setup** (Configuração de execução) no BaseSpace Sequence Hub Services e Proactive Support.
3. Defina outras configurações corretamente selecionando uma das seguintes opções:
  - a. **Proactive Support Only** (Somente suporte proativo) **Proactive and Run Monitoring** (Proativo e monitoramento de execução), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) ou **None** (Nenhum).



O BaseSpace Sequence Hub só permitirá recolocar a funcionalidade na fila se a opção **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) estiver selecionada. Em caso de planilha de amostras inválida, isso permitirá que você faça correções na planilha de amostras e recolocar a análise de demultiplexação na fila. Para recolocar a funcionalidade do instrumento na fila, consulte [Recolocar uma execução na fila na página 85](#).

- b. Menu suspenso para **Hosting Location** (Local de hospedagem).
  - c. **[Opcional]** Informe um **Private Domain Name** (Nome de domínio privado).
4. Selecione **Save** (Salvar).

Sample Sheet Considerations (Considerações sobre a planilha de amostras) somente para modo Local ou Standalone (Autônomo)

É necessário usar um formato de arquivo de planilha de amostras v2 para analisar com o DRAGEN. O formato de arquivos de planilha de amostras v2 também é compatível com aplicativos do BaseSpace Sequence Hub não habilitados para o DRAGEN. Para obter informações sobre como criar uma planilha de amostras no formato de arquivo v2, consulte [Configurações da planilha de amostras v2 na página 89](#).

## Personalização do instrumento

Esta seção contém informações sobre como definir as configurações de personalização disponíveis. Para definir uma pasta de saída padrão, consulte [Especificar o local da pasta de saída padrão na página 15](#).

### Nomear o instrumento

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Selecione Instrument Nickname (Apelido do instrumento) e insira o nome escolhido para o instrumento.  
O nome é exibido na parte superior de todas as telas.
3. Selecione **Save** (Salvar).

### Definir preferências de desnaturação e diluição

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Escolha se deseja ou não desnaturar e diluir bibliotecas automaticamente dentro do instrumento. Por padrão, será configurada a opção selecionada na execução anterior.
  - Para desnaturar e diluir bibliotecas automaticamente dentro do instrumento, selecione **Denature and Dilute On Board** (Desnaturar e diluir dentro do instrumento).
  - Para desnaturar e diluir bibliotecas manualmente, desmarque a caixa de seleção **Denature and Dilute On Board** (Desnaturar e diluir dentro do instrumento).Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do NextSeq 1000 e 2000* (documento n.º 1000000139235) para instruções sobre como desnaturar e diluir bibliotecas manualmente.

## Definir preferência de descarte de reagente automático

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Escolha se o sistema descartará automaticamente ou não os reagentes não utilizados no compartimento de reagentes gastos após cada execução para simplificar o descarte de resíduos do reagente ao término da execução:
  - Para descartar automaticamente, marque a caixa de seleção **Purge Reagent Cartridge** (Descartar cartucho de reagente).
  - Para ignorar o descarte automático, desmarque a caixa de seleção **Purge Reagent Cartridge** (Descartar cartucho de reagente). Essa é a configuração padrão.Descartar reagentes não utilizados aumenta o fluxo de trabalho em até 2 horas.
3. Selecione **Save** (Salvar).

## Configurar atualizações de software

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Decida se o sistema verificará automaticamente as atualizações de software:
  - Para verificar automaticamente, marque a caixa de seleção **Autocheck for software updates** (Verificação automática de atualizações de software).
  - Para verificar manualmente, desmarque a caixa de seleção **Autocheck for software updates** (Verificação automática de atualizações de software).A verificação automática de atualizações necessita de uma conexão à Internet. Para obter mais informações sobre instalação de atualizações de software, consulte [Atualizações de software na página 77](#).
3. Selecione **Save** (Salvar).

## Altere o brilho do LCD

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Mova o cursor LCD Brightness (Brilho do LCD) até a porcentagem desejada.
3. Selecione **Save** (Salvar).

## Definir um servidor proxy

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

1. No menu do software de controle, selecione **Settings** (Configurações).
2. Selecione as configurações de proxy atuais para abrir a tela Proxy Settings (Configurações de proxy).
3. Selecione a caixa de seleção **Enable Proxy** (Habilitar proxy) e digite o endereço da porta IP do servidor.

4. **[Opcional]** Se o servidor de proxy necessitar de autenticação, selecione a caixa de seleção **Requires Username and Password** (Necessita de nome de usuário e senha) e digite o nome de usuário e a senha.
5. Selecione **Save** (Salvar) para salvar 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 configurações de proxy.
  - Selecione **No, Take Me Back** (Não, me leve de volta) para voltar à página Settings (Configurações). As novas configurações de proxy estão salvas, mas não serão aplicadas até você reiniciar o sistema.

# Materiais de consumo e equipamento

Esta seção relaciona tudo o que vem com o kit de reagentes com condições de armazenamento. Também é possível visualizar quais materiais de consumo e equipamentos auxiliares você precisa adquirir para concluir o protocolo e realizar procedimentos de manutenção e solução de problemas.

## Materiais de consumo de sequenciamento

O sequenciamento no NextSeq 1000/2000 necessita de pelo menos um kit de reagentes Illumina NextSeq 1000/2000 P2 de uso único ou um kit de reagentes Illumina NextSeq 1000/2000 P3 de uso único. 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 Sequenciamento NextSeq 1000 é compatível apenas com o kit de reagentes Illumina NextSeq 1000/2000 P2.

O kit de reagentes fornece o cartucho e a lâmina de fluxo para o sequenciamento. Ao receber o kit de reagentes NextSeq 1000/2000 P2 ou kit de reagentes Illumina NextSeq 1000/2000 P3:

- Armazene imediatamente os componentes nas temperaturas indicadas para garantir o desempenho adequado.
- Não abra nenhuma embalagem metálica até ser orientado a isso.
- Armazene cartuchos na caixa própria para evitar rasgos e perfurações na embalagem metálica.
- Armazene cartuchos com as setas apontando para cima.


 Se o rótulo do cartucho não estiver voltado para cima, os dados de sequenciamento serão impactados negativamente.

Tabela 2 Componentes do kit

Material de consumo	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Dimensões
Cartucho	1	-25 °C a -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 pol. × 7 pol. × 5 pol.)
Lâmina de fluxo	1	2 °C a 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 pol. × 5 pol. × 0,75 pol.)



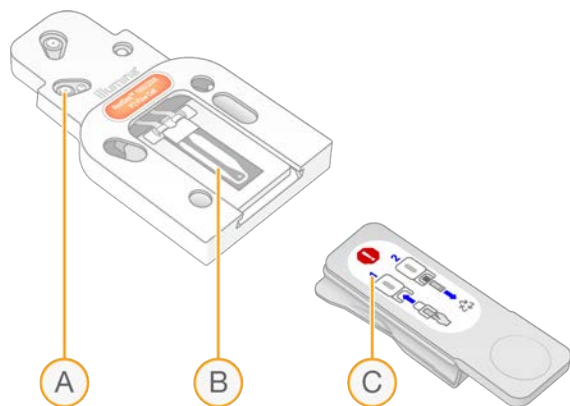
Material de consumo	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Dimensões
RSB com Tween 20	1	-25 °C a -15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm) (1,6 pol. x 2,6 pol x 2 pol.)

\*Transportado em temperatura ambiente.

Ambos os materiais de consumo têm identificadores para controlar e garantir a compatibilidade. O cartucho e a lâmina de fluxo utilizam RFID<sup>1</sup>.

### Lâmina de fluxo

A lâmina de fluxo é uma lâmina de fluxo de cavidade única padronizada. Um cartucho plástico envolve a lâmina de fluxo com base em vidro. Uma aba cinza cobre e se projeta para fora da lâmina de fluxo para garantir o manuseio seguro.



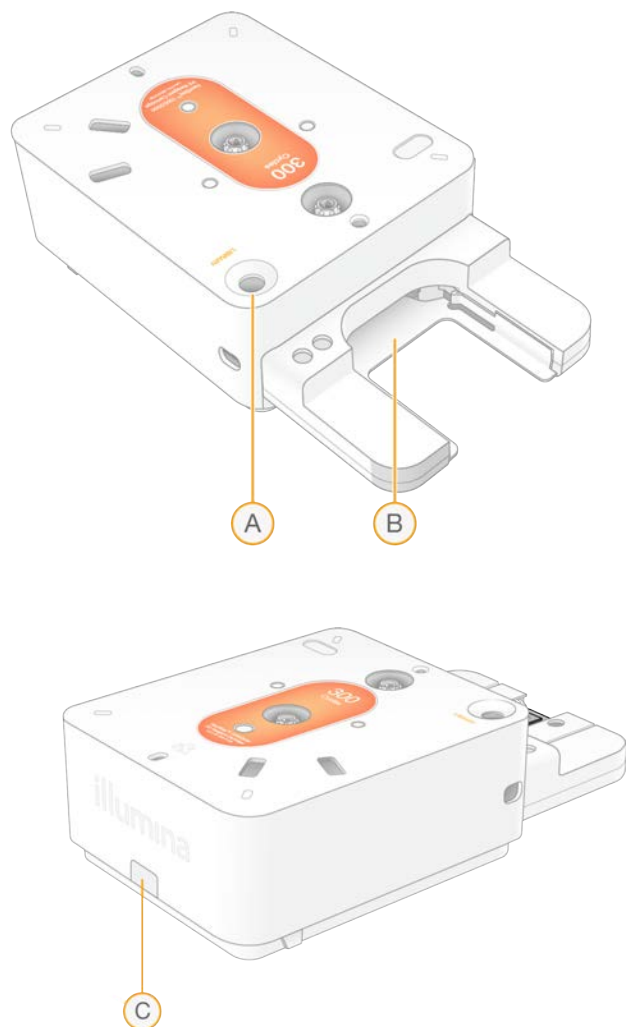
- A. Cartucho de plástico
- B. Lâmina de fluxo
- C. Aba cinza

Milhões de nanoporos recobrem a superfície interna da lâmina de fluxo. Os clusters são gerados nos nanoporos, nos quais ocorre a reação de sequenciamento. A organização padronizada dos nanoporos aumenta as leituras e os dados de saída.

<sup>1</sup>identificação por radiofrequência

## Cartucho

O cartucho de reagente para o sequenciamento é pré-carregado com reagentes de clustering, sequenciamento, paired-end e indexação. Um reservatório com selo de alumínio está reservado para bibliotecas, e uma ranhura na parte dianteira está reservada para a lâmina de fluxo.



- A. Reservatório da biblioteca
- B. Ranhura para a lâmina de fluxo
- C. Conector de drenagem

O cartucho contém todos os materiais de consumo para uma execução: reagentes, biblioteca e lâmina de fluxo. A biblioteca e a lâmina de fluxo são carregadas no cartucho descongelado, que é então carregado no instrumento. Após o início da execução, os reagentes e a biblioteca são transferidos automaticamente do cartucho para a lâmina de fluxo.

O cartucho contém bombas, válvulas e todos os fluxos de reagentes do sistema, inclusive um reservatório na parte de baixo para coletar reagentes usados. O cartucho é descartado depois da execução e, por isso, não é necessário limpar o instrumento.

### Número compatível de ciclos



O rótulo do cartucho indica o número de ciclos analisados e não quantos ciclos são executados. A lâmina de fluxo é compatível com qualquer número de ciclos e com qualquer tipo de leitura.

Todos os cartuchos de 100 ciclos e 200 ciclos contêm 38 ciclos a mais. Os cartuchos de 300 contêm 27 ciclos a mais. Por exemplo, o cartucho de 300 ciclos fornece reagentes suficientes para até 327 ciclos de sequenciamento. Para obter informações sobre o número de ciclos a serem sequenciados, consulte [Número de ciclos em uma leitura na página 32](#).

### Descrições dos símbolos

A tabela a seguir descreve os símbolos localizados no material de consumo ou na embalagem deste.

Símbolo	Descrição
	A data em que o material de consumo expira. Para obter um resultado melhor, use o material de consumo antes dessa data.
	Indica o fabricante (Illumina).
	O uso previsto é uso restrito em pesquisa (URP).
	Indica o número da peça para que o material de consumo possa ser identificado. <sup>1</sup>
	Indica o código do lote para identificar o lote de fabricação do material de consumo. <sup>1</sup>

Símbolo	Descrição
	Indica um risco à saúde.
	Faixa de temperatura de armazenamento em graus Celsius. Armazene o material de consumo na faixa de temperatura indicada. <sup>2</sup>

## Materiais de consumo auxiliares

Adquira os seguintes materiais de consumo para sequenciamento e manutenção.

### Materiais de consumo para sequenciamento

Tabela 3 Materiais de consumo para sequenciamento

Material de consumo	Fornecedor	Finalidade
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral.
Kit de reagentes NextSeq 1000/2000 P2 (v3)	Illumina: N.º de catálogo 20046811 (100 ciclos) N.º de catálogo 20046812 (200 ciclos) N.º de catálogo 20046813 (300 ciclos)	Fornece o cartucho de reagente, a lâmina de fluxo e o NextSeq 1000/2000 RSB com Tween 20 para uma execução única. Compatível com NextSeq 1000 e NextSeq 2000.
Kit de reagentes NextSeq 2000 P3	Illumina: N.º de catálogo 20046810 (50 ciclos) N.º de catálogo 20040559 (100 ciclos) N.º de catálogo 20040560 (200 ciclos) N.º de catálogo 20040561 (300 ciclos)	Fornece o cartucho de reagente, a lâmina de fluxo e o NextSeq 1000/2000 RSB com Tween 20 para uma execução única. Compatível somente com o NextSeq 2000.

<b>Material de consumo</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Finalidade</b>
Microtubos, 1,5 ml	Fisher Scientific, catálogo n.º 14-222-158 ou tubos equivalentes do tipo “low bind”	Diluição de bibliotecas na concentração de carga.
Pontas de pipeta, 10 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição e carregamento de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 1000 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Perfuração do selo de alumínio do reservatório da biblioteca.
[Opcional] Controle de PhiX v3	Illumina, n.º do catálogo FC-110-3001	Realização de uma execução apenas de PhiX ou um spike-in em um controle de PhiX.
[Opcional] Toalhas de papel	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Secar o cartucho depois de banho-maria.

## Materiais de consumo para manutenção

Tabela 4 Materiais de consumo para manutenção

<b>Material de consumo</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Finalidade</b>
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral.
Troca do filtro de ar do NextSeq 1000/2000*	Illumina, catálogo n.º 20029759	Troca do filtro de ar a cada seis meses.

\* O instrumento é entregue com um componente instalado e um sobressalente. Quando não estiver em garantia, as substituições serão feitas pelo usuário. Mantenha embalado até usar.

## Equipamento auxiliar

Adquira o seguinte equipamento para fins de sequenciamento.

<b>Item</b>	<b>Origem</b>	<b>Finalidade</b>
Congelador, -25 °C a -15 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Armazenar o cartucho.

<b>Item</b>	<b>Origem</b>	<b>Finalidade</b>
Balde de gelo	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Reservar bibliotecas até o sequenciamento.
Pipeta, 10 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas na concentração de carga.
Pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas na concentração de carga e carregamento de bibliotecas no cartucho.
Pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas na concentração de carga.
Refrigerador, 2 °C a 8 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Armazenar a lâmina de fluxo ou descongelar o cartucho.
[Opcional] Um dos seguintes banhos-maria com temperatura controlada ou equivalentes que possam ser mantidos a 25 °C: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Banho-maria circulante Thermo Scientific Precision 35 L (comporta 5 cartuchos simultaneamente)</li> <li>• Banho-maria circulante SHEL LAB 22L Digital (comporta 3 cartuchos simultaneamente)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific, n.º do catálogo TSCIR 35</li> <li>• Shel Lab, n.º do catálogo SWBC22</li> </ul>	Descongelamento do cartucho.

# Protocolo

Esta seção fornece instruções passo a passo sobre como preparar materiais de consumo, diluir bibliotecas e configurar uma execução do sequenciamento em um dos quatro modos de execução (os modos Cloud, Hybrid e Local utilizam DRAGEN ou BaseSpace Sequence Hub, enquanto o modo Standalone é uma execução autônoma projetada para gerar dados de cBCL somente para fluxos de trabalho de análises).

Ao manusear reagentes e outros produtos químicos, use óculos de segurança, um jaleco e luvas sem pó.

Antes de iniciar um protocolo, verifique se tem os materiais de consumo e o equipamento necessários. Consulte [Materiais de consumo e equipamento na página 24](#).

Siga os protocolos na ordem apresentada usando os volumes, as temperaturas e as durações especificadas.

## Considerações sobre o sequenciamento

Antes de iniciar o protocolo, releia as informações a seguir para se preparar para diluir bibliotecas e configurar a execução. Atingir a carga de concentração ótima é essencial para o sucesso do sequenciamento e da análise. Informar a quantidade correta de ciclos em uma leitura ajuda a garantir a saída de dados ideal.

### Volume e concentrações de carga

O volume de carga é 20 µl. A concentração de carga varia conforme o tipo de biblioteca:

Tipo de biblioteca	Concentração de carga (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1.000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1.000
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1.200

Tipo de biblioteca	Concentração de carga (pM)
TruSeq DNA Nano 550	1.500
TruSeq Stranded mRNA	1.000

Para outros tipos de biblioteca, 650 pM é a concentração de carga inicial recomendada. Otimize essa concentração nas execuções subsequentes para identificar uma concentração de carga que produza consistentemente dados que atendam às especificações.

**i** Para otimizar a concentração de carga, use a métrica % Loading Concentration (Percentual de concentração de carga) no arquivo de saída `PrimaryAnalysisMetrics.csv` disponível após a conclusão da execução. Se o % Loading Concentration (Percentual de concentração de carga) for < 95%, aumente a concentração de carga em incrementos de 100 pM para execuções posteriores.

## Número de ciclos em uma leitura

Para cada leitura, a inserção de um mínimo de 26 ciclos e um máximo de 151 ciclos ajuda a garantir a qualidade dos dados. O número exato de ciclos depende de seu experimento. O NextSeq 1000/2000 Control Software necessita de pelo menos 1 ciclo para Read 1 (Leitura 1), mas exibe uma advertência quando a quantidade de ciclos da Read 1 (Leitura 1) for inferior a 26.

O total de ciclos para Read 1 (Leitura 1), Index 1 (Índice 1), Index 2 (Índice 2) e Read 2 (Leitura 2) não pode ser superior à quantidade de ciclos compatível com o kit mais 38 ciclos para kits de 100 e 200 ciclos e 27 ciclos para kits P3 de 300 ciclos. O NextSeq 1000/2000 Control Software exibirá uma advertência quando Index 1 e Index 2 forem inferiores a 6 ciclos. A advertência não será exibida se o Index 1 ou o Index 2 forem iguais a 0 ciclo.

Os números mínimo e máximo de ciclos abrangem um ciclo extra. Adicione sempre um ciclo à duração desejada da leitura para corrigir os efeitos de phasing e prephasing. Duração da leitura é o número de ciclos de **sequenciamento** na Leitura 1 e na Leitura 2, que exclui os ciclos extras e os ciclos de índice. Para mais informações, consulte Correção de phasing no [Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis na página 59](#).

Exemplo de configuração de execução:

- Para uma duração da leitura de 35 (leitura única), digite **36** no campo Read 1 (Leitura 1).
- Para uma duração da leitura de 150 por leitura (tipo paired-end), digite **151** no campo Read 1 (Leitura 1) e **151** no campo Read 2 (Leitura 2).



# Planejar uma execução do sequenciamento no BaseSpace Sequence Hub

Use a Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub para criar e configurar suas configurações de execução. Caso você esteja configurando uma execução no modo Cloud (Nuvem) ou modo Hybrid (Híbrido), envie a configuração de execução para a lista de execuções planejadas de sua conta BaseSpace Sequence Hub na guia Planned Runs (Execuções planejadas). As execuções disponíveis para sequenciamento nos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 são exibidas na guia Planned Runs (Execuções planejadas). Caso você esteja configurando uma execução em modo Local, use Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) para criar e exportar sua planilha de amostras em formato de arquivo v2. Se preferir, consulte [Configurações da planilha de amostras v2 na página 89](#) para criar uma planilha de amostras sem BaseSpace Sequence Hub utilizando um modelo fornecido.

A Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) do BaseSpace Sequence Hub não oferece suporte a mais de 1536 amostras.

## Configurar uma execução

1. Navegue até o BaseSpace Sequence Hub.
2. Insira seu endereço de e-mail e senha do BaseSpace Sequence Hub e selecione **Sign In** (Acessar).
3. Selecione a guia **Runs** (Execuções) e selecione o menu suspenso **New Run** (Nova execução).
4. Selecione **NextSeq 1000/2000**.
5. No campo Run Name (Nome da execução), digite um nome exclusivo de sua preferência para identificar a execução atual.  
O nome da execução pode conter um máximo de 225 caracteres alfanuméricos, espaços, traços e sublinhados.
6. Selecione um dos seguintes locais de análise.
  - **BaseSpace**: analisa dados de sequenciamento na nuvem.
  - **Local**: analisa dados de sequenciamento do instrumento ou gera uma planilha de amostras v2 para modo Local ou Hybrid (Híbrido).
7. Selecione um tipo de análise e versão.  
Para mais informações sobre análises secundárias, consulte [Arquivos de saída da análise secundária do DRAGEN na página 64](#) ou a documentação do aplicativo BaseSpace Sequence Hub. Caso você tenha selecionado a análise DRAGEN Single Cell RNA, consulte a página NextSeq 1000/2000 Products Files para obter informações sobre compatibilidade de kit de preparação de bibliotecas de RNA de lâmina única de terceiros.



Para análise do instrumento, a versão selecionada deve corresponder à versão do DRAGEN instalada no instrumento. Para confirmar a versão do DRAGEN instalada no instrumento, consulte [Fluxo de trabalho e atualizações de licença DRAGEN na página 79](#).

8. **[Opcional]** Defina os kits de índice personalizado da seguinte maneira.
 

Caso você esteja usando mais de uma biblioteca, as bibliotecas devem ter os mesmos comprimentos de leitura de índice.

  - a. Selecione **Add Custom Index Adapter Kit** (Incluir kit adaptador do índice personalizado) no menu suspenso Index Adapter Kit (Kit de adaptador do índice).
  - b. Selecione um tipo de modelo e informe o nome do kit, as sequências adaptadoras, as estratégias de índice e as sequências de índice.
 

Verifique se as sequências adaptadoras do segundo índice (i5) estão em orientação direta.
  - c. Selecione **Create New Kit** (Criar novo kit).
9. **[Opcional]** Defina os kits personalizados de preparação de bibliotecas da seguinte maneira.
  - a. Selecione **Add Custom Library Prep Kit** (Incluir kit personalizado de preparação de biblioteca) no menu suspenso Library Prep Kit (Kit de preparação de biblioteca).
  - b. Informe o nome, tipos de leitura, ciclos de leitura padrão e kits adaptadores de índice compatíveis para seu kit personalizado de preparação de biblioteca.
  - c. Selecione **Create New Kit** (Criar novo kit).
10. Selecione as seguintes configurações de instrumento. De acordo com o kit de preparação de biblioteca, as opções recomendadas são selecionadas automaticamente. Alguns kits de preparação de biblioteca contêm números de codificação rígida de leituras de índice e tipos de leitura, que não podem ser alterados.
  - Kit de preparação da biblioteca
  - Kit de adaptadores de índice
  - Número de leituras de índice
  - Tipo de leitura
  - Número de ciclos de sequenciamento por leitura

**i** | Se a opção Not Specified (Não especificado) estiver selecionada para o kit de preparação de biblioteca, o número de leituras de índice não será atualizado até as sequências de índice serem digitadas na seção Sample Data (Dados da amostra).
11. Digite as informações da amostra na planilha Sample Data (Dados da amostra) usando uma das seguintes opções. Para agrupar amostras por agregação de dados durante análise posterior, atribua um nome para o grupo na coluna Project (Projeto).
  - Selecione **Import Data** (Importar dados) e selecione sua planilha de amostras. Verifique se a planilha de amostras cumpre os requisitos de formatação. Consulte [Configurações da planilha de amostras v2 na página 89](#). Alterar a planilha de amostras após o download inicial pode resultar em falha na análise.
  - Cole IDs de amostras e as posições de poços da placa de índice ou índices i7 e i5 diretamente de um arquivo externo. Antes de colar, digite a quantidade de linhas de amostras no campo Rows (Linhas) e selecione +. Os IDs da amostra podem conter até 20 caracteres alfanuméricos, hifens e sublinhados.

**i** | As placas de índice com layout fixo necessitam de entradas para a posição de poço. Os índices que não têm layout fixo necessitam de índices i7 e i5. Os índices i5 devem ser informados na orientação direta.

- Informe manualmente os IDs de amostras e posições de poços ou índices correspondentes. Se a opção Not Specified (Não especificado) estiver selecionada para o kit de preparação de biblioteca, informe as sequências do índice 2 (i5) na orientação direta.

12. Selecione **Next** (Avançar).

## Configurar análise secundária

Defina as configurações para o tipo de análise selecionado para a execução. Para mais informações sobre fluxos de trabalho de análise DRAGEN, consulte [Arquivos de saída da análise secundária do DRAGEN na página 64](#).

### Illumina DRAGEN BCL Convert

Use as etapas a seguir para configurar a análise Illumina DRAGEN BCL Convert.

1. Informe as seguintes configurações opcionais.

Configuração	Descrição
AdapterRead1	Sequência adaptadora para a leitura 1. Se estiver usando um kit de preparação da biblioteca Illumina, deixe o campo AdapterRead1 vazio.
AdapterRead2	Sequência adaptadora para a leitura 2. Se estiver usando um kit de preparação da biblioteca Illumina, deixe o campo AdapterRead2 vazio.
BarcodeMismatchesIndex1	A quantidade permitida de disparidades entre a primeira leitura de índice e a sequência de índice. O valor padrão é 1. Se um código de barras for 6 bp, o valor recomendado é 0.
BarcodeMismatchesIndex2	A quantidade permitida de disparidades entre a segunda leitura de índice e a sequência de índice. O valor padrão é 1. Se um código de barras for 6 bp, o valor recomendado é 0.

Configuração	Descrição
OverrideCycles	<p>Cadeia de texto usada para especificar ciclos UMI e mascarar ciclos de uma leitura. Os seguintes valores são permitidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N: especifica ciclos a serem ignorados.</li> <li>• Y: especifica ciclos de sequenciamento.</li> <li>• I: especifica ciclos de índice.</li> <li>• U: especifica os ciclos UMI a serem cortados.</li> </ul> <p>Cada elemento é separado por ponto-e-vírgula. Estes são alguns exemplos de saída do OverrideCycles.</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

2. Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
3. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
  - **gzip**: salva os arquivos FASTQ em formato gzip.
  - **DRAGEN**: salva os arquivos FASTQ em formato ora.
4. Conclua a configuração da execução.
  - Para enviar a configuração da execução para sua conta do BaseSpace Sequence Hub, selecione **Submit Run** (Enviar execução). As execuções enviadas ao BaseSpace Sequence Hub serão exibidas na lista de execuções planejadas e estarão disponíveis para sistemas que utilizem o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido).
  - Para salvar a configuração de execução como planilha de amostra no formato de arquivo v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar planilha de amostras) na lista suspensa **Submit Run** (Enviar execução). É necessário uma planilha de amostra para iniciar execuções em sistemas usando o modo Local. Esta opção só estará disponível se o local da análise selecionado for Local.

## Illumina DRAGEN Enrichment

Use as etapas a seguir para configurar a análise Illumina DRAGEN Enrichment.

1. Selecione um genoma de referência.
 

Se possível, utilize um genoma de referência com alt aware.
2. Selecione um arquivo \*.bed que contenha as regiões para onde você gostaria de direcionar ou carregar um novo arquivo personalizado.
 

Verifique se o genoma de referência do arquivo BED corresponde ao genoma de referência selecionado na etapa 1. Para um novo arquivo BED personalizado, utilize o seguinte formato de nome: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Modo Local:** selecione **Select Custom File (Local)** [Selecionar arquivo personalizado (local)] para carregar uma execução única ou **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)] para uso repetido.
  - **Modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido):** selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)]. O arquivo BED personalizado só estará disponível no Workgroup (Grupo de trabalho) em que foi carregado.
3. Selecione uma linha genética ou um identificador de variante somática.
  4. **[Opcional]** Se estiver usando o identificador de variante somática, selecione um arquivo de linha de base com ruído. Para mais informações, consulte [Importar arquivos de linha de base com ruído na página 18](#).
  5. Selecione um formato de saída de mapa/alinhamento.
  6. Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
  7. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
    - **gzip:** salva os arquivos FASTQ em formato gzip.
    - **DRAGEN:** salva os arquivos FASTQ em formato ora.
  8. Conclua a configuração da execução.
    - Para enviar a configuração da execução para sua conta do BaseSpace Sequence Hub, selecione **Submit Run** (Enviar execução). As execuções enviadas ao BaseSpace Sequence Hub serão exibidas na lista de execuções planejadas e estarão disponíveis para sistemas que utilizem o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido).
    - Para salvar a configuração de execução como planilha de amostra no formato de arquivo v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar planilha de amostras) na lista suspensa **Submit Run** (Enviar execução). Os arquivos compatíveis com planilha de amostras e análise secundária serão baixados em uma pasta \*.zip e são necessários para iniciar execuções em sistemas usando o modo Local. Esta opção só estará disponível se o local da análise selecionado for Local.

## Illumina DRAGEN Germline

Use as etapas a seguir para configurar a análise Illumina DRAGEN Germline.

1. Selecione o genoma de referência.  
Se possível, utilize um genoma de referência com alt aware.
2. Selecione um formato de saída de mapa/alinhamento.
3. Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
4. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
  - **gzip:** salva os arquivos FASTQ em formato gzip.

- **DRAGEN:** salva os arquivos FASTQ em formato ora.
5. Conclua a configuração da execução.
    - Para enviar a configuração da execução para sua conta do BaseSpace Sequence Hub, selecione **Submit Run** (Enviar execução). As execuções enviadas ao BaseSpace Sequence Hub serão exibidas na lista de execuções planejadas e estarão disponíveis para sistemas que utilizem o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido).
    - Para salvar a configuração de execução como planilha de amostra no formato de arquivo v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar planilha de amostras) na lista suspensa **Submit Run** (Enviar execução). Os arquivos compatíveis com planilha de amostras e análise secundária serão baixados em uma pasta \*.zip e são necessários para iniciar execuções em sistemas usando o modo Local. Esta opção só estará disponível se o local da análise selecionado for Local.

## Illumina DRAGEN RNA

Use as etapas a seguir para configurar a análise Illumina DRAGEN RNA.

1. Selecione o genoma de referência.  
Se possível, utilize um genoma de referência sem alt aware.
2. Selecione um formato de saída de mapa/alinhamento.
3. Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
4. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
  - **gzip:** salva os arquivos FASTQ em formato gzip.
  - **DRAGEN:** salva os arquivos FASTQ em formato ora.
5. **[Opcional]** Carregue um arquivo de anotação de RNA em formato transferência de gene (GTF).
  - **Modo Local:** selecione **Select Custom File (Local)** [Selecionar arquivo personalizado (local)] para carregar uma execução única ou **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)] para uso repetido.
  - **Modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido):** selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)]. O arquivo GTF só estará disponível no Workgroup (Grupo de trabalho) em que foi carregado.

Depois que o arquivo GTF foi carregado em um grupo de trabalho do BaseSpace Sequence Hub, selecione o arquivo de anotação de RNA do menu suspenso.
6. Selecione se deseja ou não ativar a expressão diferencial.
7. Caso você tenha habilitado a expressão diferencial, selecione um valor de controle ou comparação para cada amostra.

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

8. Conclua a configuração da execução.
  - Para enviar a configuração da execução para sua conta do BaseSpace Sequence Hub, selecione **Submit Run** (Enviar execução). As execuções enviadas ao BaseSpace Sequence Hub serão exibidas na lista de execuções planejadas e estarão disponíveis para sistemas que utilizem o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido).
  - Para salvar a configuração de execução como planilha de amostra no formato de arquivo v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar planilha de amostras) na lista suspensa **Submit Run** (Enviar execução). Os arquivos compatíveis com planilha de amostras e análise secundária serão baixados em uma pasta \*.zip, se houver um arquivo GTF opcional, e serão necessários para iniciar execuções em sistemas usando o modo Local. Esta opção só estará disponível se o local da análise selecionado for Local.

## Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Use as etapas a seguir para configurar a análise Illumina DRAGEN Single Cell RNA.

1. Selecione o genoma de referência.  
Se possível, utilize um genoma de referência sem alt aware.
2. **[Opcional]** Carregue um arquivo de anotação de RNA em formato transferência de gene (GTF).
  - **Modo Local:** selecione **Select Custom File (Local)** [Selecionar arquivo personalizado (local)] para carregar uma execução única ou **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)] para uso repetido.
  - **Modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido):** selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)]. O arquivo GTF só estará disponível no Workgroup (Grupo de trabalho) em que foi carregado.

Depois que o arquivo GTF foi carregado em um grupo de trabalho do BaseSpace Sequence Hub, selecione o arquivo de anotação de RNA do menu suspenso.

3. Selecione um formato de saída de mapa/alinhamento.
4. Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
5. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
  - **gzip:** salva os arquivos FASTQ em formato gzip.
  - **DRAGEN:** salva os arquivos FASTQ em formato ora.
6. Selecione a configuração idêntica ao seu tipo de kit de preparação da biblioteca.  
Por exemplo, se você selecionou o Single Cell RNA Library Kit 1 como kit de preparação de biblioteca, selecione Type 1 (Tipo 1) para o Configuration Type (Tipo de configuração).

7. Selecione a leitura do código de barras.
8. **[Opcional]** Edite o número de bases nos códigos de barras e no UMI. Esses valores são preenchidos automaticamente, de acordo com o kit de preparação da biblioteca e o tipo de configuração selecionada.
9. Selecione a orientação da fita.
10. **[Opcional]** Selecione um arquivo que contenha suas sequências de códigos de barras ou carregue um novo arquivo personalizado.
11. Se estiver usando o tipo de configuração Advanced/Custom (Avançada/personalizada), informe os valores para a quantidade de ciclos cancelados, a posição do código de barras e a posição do UMI.
12. Conclua a configuração da execução.
  - Para enviar a configuração da execução para sua conta do BaseSpace Sequence Hub, selecione **Submit Run** (Enviar execução). As execuções enviadas ao BaseSpace Sequence Hub serão exibidas na lista de execuções planejadas e estarão disponíveis para sistemas que utilizem o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido).
  - Para salvar a configuração de execução como planilha de amostra no formato de arquivo v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar planilha de amostras) na lista suspensa **Submit Run** (Enviar execução). Os arquivos compatíveis com planilha de amostras e análise secundária serão baixados em uma pasta \*.zip, se houver um arquivo GTF opcional, e serão necessários para iniciar execuções em sistemas usando o modo Local. Esta opção só estará disponível se o local da análise selecionado for Local.

## Illumina DRAGEN Amplicon

Use as etapas a seguir para configurar a análise Illumina DRAGEN Amplicon.

1. Selecione o genoma de referência.
2. Selecione um arquivo \*.bed que contenha as regiões para onde você gostaria de direcionar ou carregar um novo arquivo personalizado.

Verifique se o genoma de referência do arquivo BED corresponde ao genoma de referência selecionado na etapa 1. Para um novo arquivo BED personalizado, utilize o seguinte formato de nome: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido):** selecione **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)]. O arquivo BED personalizado só estará disponível no Workgroup (Grupo de trabalho) em que foi carregado.
  - **Modo Local:** selecione **Select Custom File (Local)** [Selecionar arquivo personalizado (Local)] para carregar uma execução única ou **Upload Custom File (BaseSpace)** [Carregar arquivo personalizado (BaseSpace)] para uso repetido.
3. Selecione uma linha genética ou um identificador de variante somática.
  4. Selecione um formato de saída de mapa/alinhamento.



5. **[Local]** Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
6. Selecione se deseja ou não salvar uma cópia dos arquivos FASTQ. Os arquivos FASTQ só serão gerados se você selecionar que deseja manter os arquivos FASTQ.
7. Selecione uma das seguintes opções de formato de saída FASTQ:
  - **gzip**: salva os arquivos FASTQ em formato gzip.
  - **DRAGEN**: salva os arquivos FASTQ em formato ora.
8. Conclua a configuração da execução.
  - Para enviar a configuração da execução para sua conta do BaseSpace Sequence Hub, selecione **Submit Run** (Enviar execução). As execuções enviadas ao BaseSpace Sequence Hub serão exibidas na lista de execuções planejadas e estarão disponíveis para sistemas que utilizem o modo Cloud (Nuvem) ou Hybrid (Híbrido).
  - **[Local]** Para salvar a configuração de execução como planilha de amostra no formato de arquivo v2, selecione **Export Sample Sheet** (Exportar planilha de amostras) na **lista suspensa** Submit Run (Enviar execução). Os arquivos compatíveis com planilha de amostras e análise secundária serão baixados em uma pasta \*.zip e são necessários para iniciar execuções em sistemas usando o modo Local. Esta opção só estará disponível se o local da análise selecionado for Local.

## Descongela o cartucho embalado e a lâmina de fluxo

Esta etapa descongela o cartucho *na embalagem fechada* e prepara a lâmina de fluxo. Descongele o cartucho embalado usando um destes três métodos: banho-maria controlado, refrigerador ou ar em temperatura ambiente. Use o cartucho imediatamente após o descongelamento, sem recongelar. Se não for possível usar o cartucho imediatamente após o descongelamento, consulte [Voltar a armazenar materiais de consumo na página 84](#).

Figura 4 Cartucho embalado



### Descongelar cartucho em banho-maria controlado

1. Vista um novo par de luvas sem pó e retire o cartucho do armazenamento.
  2. Retire o cartucho da caixa, mas **não abra a embalagem metálica**.
- !** Descongelar uma embalagem rasgada ou perfurada em banho-maria pode causar falha de sequenciamento. Em vez disso, descongele em temperatura ambiente ou em um refrigerador.
3. Descongele o cartucho embalado em banho-maria controlado a 25°C por 6 horas:
    - Qualquer que seja a quantidade de cartuchos que você esteja descongelando, mantenha a água a uma profundidade de 9,5 cm a 10 cm.
    - Defina a temperatura controlada do banho-maria em 25°C.
    - Coloque a embalagem com o rótulo para cima em banho-maria sem submergir.

**!** Não tente forçar o cartucho para submergir. Se o rótulo da embalagem não estiver para cima ou se o cartucho virar durante o descongelamento, os dados de sequenciamento serão impactados negativamente.

    - Não ultrapasse 8 horas de banho-maria.
    - Não descongele simultaneamente mais cartuchos do que a capacidade do banho-maria. Para banhos-maria compatíveis, consulte [Equipamento auxiliar na página 29](#).
    - Não empilhe os cartuchos.
  4. Retire o cartucho do banho-maria e seque-o com papel-toalha.

## Descongelo do cartucho em um refrigerador

1. Vista um novo par de luvas sem pó.
2. Um dia antes da execução prevista, remova o cartucho do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
3. Retire o cartucho da caixa, mas **não abra a embalagem metálica**.
4. À temperatura ambiente, posicione o cartucho de modo que o rótulo fique voltado para cima e o ar possa circular nas laterais e na parte superior.
  - ⚠ Se o rótulo da embalagem não estiver voltado para cima, os dados de sequenciamento serão impactados negativamente.
5. Descongele em temperatura ambiente por 6 horas.
6. Em um refrigerador com temperatura entre 2 °C e 8 °C, posicione o cartucho de modo que o rótulo fique voltado para cima e o ar possa circular nas laterais.
  - ⚠ Se o rótulo da embalagem não estiver voltado para cima, os dados de sequenciamento serão impactados negativamente.
7. Descongele no refrigerador por 12 horas. Não ultrapasse 72 horas.

## Descongelo do cartucho em temperatura ambiente

1. Vista um novo par de luvas sem pó.
2. Remova o cartucho do armazenamento de -25 °C a -15 °C.
3. Retire o cartucho da caixa, mas **não abra a embalagem metálica**.
4. Posicione o cartucho de modo que o rótulo fique voltado para cima e o ar possa circular nas laterais e na parte superior.
  - ⚠ Se o rótulo da embalagem não estiver voltado para cima, os dados de sequenciamento serão impactados negativamente.
5. Descongele em temperatura ambiente por 9 horas. Não ultrapasse 16 horas.

## Preparar a lâmina de fluxo e o cartucho

1. Prepare a lâmina de fluxo da seguinte maneira.
  - a. Retire uma nova lâmina de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
  - b. Reserve o pacote não aberto em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos para evitar condensação ao remover a lâmina de fluxo do pacote. A preparação da lâmina de fluxo agora garante que ela atingirá a temperatura ambiente a tempo.
2. Se estiver usando o método de descongelamento no refrigerador:
  - a. Remova o cartucho descongelado do armazenamento de 2 °C a 8 °C.

- b. Reserve o cartucho fechado em temperatura ambiente pelo menos por 15 minutos antes do sequenciamento. Não ultrapasse 1 hora.

## Diluir bibliotecas

Se estiver usando desnaturação e diluição integradas, esta etapa dilui bibliotecas até a concentração de carga aplicável. Um spike-in PhiX<sup>1</sup> opcional de 2% oferece outras medidas, diversidade de base ou um controle positivo. O percentual de spike-in PhiX deve ser aumentado para bibliotecas com diversidade de base inferior.

Se estiver desnaturando e diluindo bibliotecas manualmente, utilize o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. Esta etapa se aplica somente em desnaturação e diluição integradas.

### Diluir a biblioteca até 2 nM

1. [Opcional] Remova 10 nM de material PhiX do armazenamento de -25 °C a -15 °C.  
O PhiX é necessário apenas para um spike-in opcional ou uma execução apenas de PhiX.
2. [Opcional] Descongele o PhiX em temperatura ambiente por 5 minutos e quantifique usando um método baseado em fluorescência, como Qubit, para confirmar a concentração do PhiX.  
Se não for possível quantificar, utilize a concentração de 10 nM.
3. Agite a biblioteca ou o PhiX por alguns momentos e centrifugue a 280 × g por 1 minuto.
4. Utilizando o RSB with Tween 20 como diluente, prepare uma biblioteca de pelo menos 24 µl 2 nM em um microtubo tipo low-bind.  
Para instruções sobre o spike-in do PhiX, consulte [Adicionar um controle de PhiX \(opcional\) na página 45](#).
5. Agite por alguns momentos e depois centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.

### Dilua a biblioteca de 2 nM até a concentração de carga

1. Combine os seguintes volumes em um microtubo do tipo “low-bind” para preparar 24 µl de biblioteca diluídos até a concentração de carga apropriada:

Tipo de biblioteca*	Concentração de carga (pM)	Volume da biblioteca 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

<sup>1</sup>O PhiX tem uma pequena biblioteca da Illumina pronta para o uso, com representação equilibrada de nucleotídeos.

Tipo de biblioteca*	Concentração de carga (pM)	Volume da biblioteca de 2 nM (µl)	Volume do RSB com Tween 20 (µl)
Illumina DNA Prep with Enrichment	1.000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1.000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1.200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1.500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1.000	12	12
100% PhiX	650	7,8	16,2

\* Para os tipos de biblioteca que não constam da lista, comece com uma concentração de carga de 650 pM e otimize para execuções subsequentes.

Esta tabela fornece exemplos de concentrações de carga. O NextSeq 1000/2000 é compatível com todos os kits de preparação de bibliotecas da Illumina, mas a concentração ideal de carga pode variar.

- Agite por alguns momentos e depois centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- Reserve a biblioteca diluída em gelo até estar pronta para o sequenciamento. Faça o sequenciamento das bibliotecas diluídas na concentração de carga no mesmo dia em que forem diluídas.
- Faça o seguinte:
  - Se estiver adicionando PhiX, consulte [Adicionar um controle de PhiX \(opcional\) na página 45](#).
  - Se não estiver adicionando PhiX ou estiver realizando uma execução somente de PhiX, consulte [Carregar materiais de consumo no cartucho na página 46](#).

### Adicionar um controle de PhiX (opcional)

- Combine os seguintes volumes em um tubo do tipo low-bind para preparar 20 µl 1 nM de PhiX:
  - 10 nM de PhiX (2 µl)
  - RSB com Tween 20 (18 µl)
- Agite por alguns momentos e depois centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- Acrescente 1 µl 1 nM de PhiX a uma biblioteca de 24 µl diluída ao final da concentração de carga. Esses volumes geram um spike-in de PhiX de ~2%. O percentual real varia conforme a qualidade e a quantidade da biblioteca.

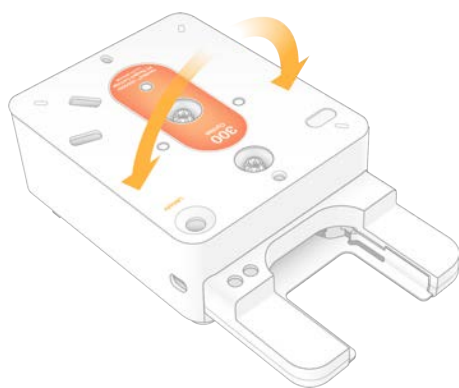
- Reserve a biblioteca diluída com spike-in de PhiX até estar pronta para o sequenciamento.  
Faça o sequenciamento das bibliotecas com spike-in de PhiX no mesmo dia em que forem diluídas.

## Carregar materiais de consumo no cartucho

Esta etapa prepara o cartucho para sequenciamento misturando os reagentes pré-carregados e carregando as bibliotecas diluídas e a lâmina de fluxo.

### Preparar o cartucho

- Abra a embalagem do cartucho rasgando ou cortando com tesoura no local marcado na parte superior em qualquer lado.
- Retire o cartucho da embalagem. Descarte a embalagem e o dessecante
- Inverta o cartucho dez vezes para misturar os reagentes.  
Os componentes internos podem se deslocar durante a inversão, o que é normal.



### Carregar a lâmina de fluxo

- Abra a embalagem metálica rasgando ou cortando com tesoura a abertura superior em qualquer lado.  
Se não for possível usar a lâmina de fluxo imediatamente, consulte [Voltar a armazenar materiais de consumo na página 84](#).

2. Retire a lâmina de fluxo da embalagem.

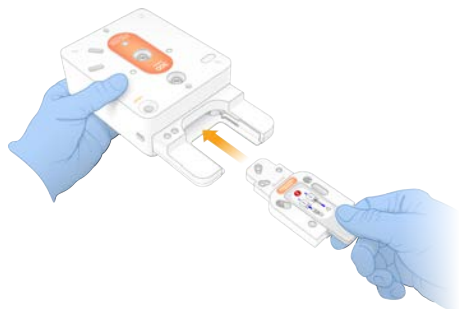
Reserve a embalagem metálica e o dessecante, caso necessite voltar ao armazenamento da lâmina de fluxo. O dessecante fica em uma bolsa na parte inferior da embalagem metálica. Descarte-os quando o sequenciamento iniciar.



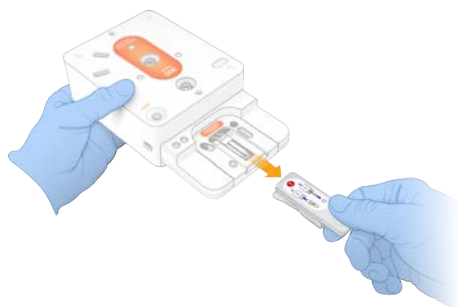
3. Segure a lâmina de fluxo pela aba cinza com o rótulo voltado para cima.

4. Empurre para inserir a lâmina de fluxo na ranhura da parte dianteira do cartucho.

Um clique audível indica que a lâmina de fluxo está no lugar. Com o carregamento correto, a aba cinza se projeta para fora do cartucho.



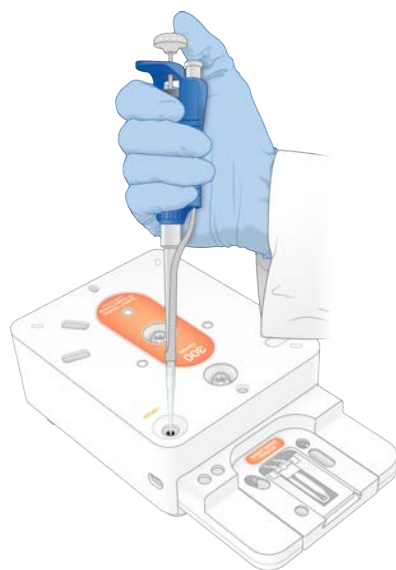
5. Puxe e retire a aba cinza para expor a lâmina de fluxo. Jogue a aba no lixo reciclável.



## Carregar bibliotecas

1. Com o uso de uma nova ponta de pipeta P1000, fure o reservatório da biblioteca e empurre a parte metálica para as bordas para alargar o orifício.
2. Descarte a ponta da pipeta para evitar contaminação.

3. Adicione uma biblioteca diluída de 20 µl na **parte inferior** do reservatório abaixando lentamente a ponta da pipeta até a parte inferior do reservatório antes de distribuir. Evite tocar na parte metálica.




## Iniciar execução de sequenciamento

Esta etapa inicia uma execução do sequenciamento em um dos quatro modos:


- **Modo Cloud (Nuvem):** seleciona-se a execução de uma lista de execuções planejadas no NextSeq 1000/2000 Control Software. Durante o sequenciamento, os dados cBCL são carregados no BaseSpace Sequence Hub. Após o sequenciamento, o DRAGEN no BaseSpace Sequence Hub é iniciado automaticamente.
- **Modo Hybrid (Híbrido):** seleciona-se a execução de uma lista de execuções planejadas no NextSeq 1000/2000 Control Software. Após o sequenciamento, a análise do instrumento se inicia automaticamente. Os dados cBCL e arquivos de saída da análise secundária DRAGEN são armazenados na pasta de saída selecionada.
- **Modo Local:** uma planilha de amostras em formato de arquivo v2 é importada manualmente para o NextSeq 1000/2000 Control Software. Após o sequenciamento, a análise do instrumento se inicia automaticamente. Os dados cBCL e arquivos de saída da análise secundária do DRAGEN são armazenados na pasta de saída selecionada. Se a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) estiver selecionada, a análise poderá ser iniciada pelos aplicativos do BaseSpace Sequence Hub após a conclusão do sequenciamento.
- **Modo Standalone (Autônomo):** configure uma execução, seguindo as instruções do NextSeq 1000/2000 Control Software para gerar dados cBCL.

⚠ | Se o visor for aberto durante a verificação antes da execução ou durante a execução, poderá haver falha na execução.



-  Durante a abertura e o fechamento do visor, mantenha as mãos afastadas do instrumento para evitar ferimentos.

## Iniciar uma execução na nuvem ou híbrida

1. Configure o modo de execução, conforme descrito em [Configurar o modo de execução na página 20](#).
  2. Selecione **Start** (Iniciar).
  3. Digite suas credenciais de acesso no BaseSpace Sequence Hub e selecione **Sign In** (Acessar).
  4. Caso tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento), selecione o Workgroup (Grupo de trabalho) que contenha sua execução criada no Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub.
-  É necessário selecionar um grupo de trabalho para prevenir erros. Antes de continuar, verifique se selecionou um grupo de trabalho.
5. Selecione **Next** (Avançar).
  6. Selecione sua execução.
  7. Confirme a versão de Analysis (Análise), Run Length (Comprimento de execução) e Secondary Analysis (Análise secundária) que corresponde à execução correta.  
A análise exibe Cloud\_ para indicar que aquela análise ocorre no BaseSpace Sequence Hub.
  8. Selecione **Review** (Revisão).
  9. **[Opcional]** Digite o local do primer da leitura personalizada e o primer de índice personalizado. Para informações sobre como preparar e incluir primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)*. Acesse a página Compatible Products (Produtos compatíveis) de seu kit de preparação de biblioteca para verificar se primers personalizados Illumina são necessários.
  10. **[Opcional]** Selecione uma receita personalizada. Para mais informações, consulte [Sequenciamento de ciclo escuro na página 104](#).  
Caso esteja usando o NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 e o kit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus ou o kit Illumina Stranded mRNA Prep, a receita personalizada é selecionada automaticamente.
  11. **[Opcional]** Para desnaturar e diluir bibliotecas manualmente, desmarque a caixa de seleção **Denature and Dilute On Board** (Desnaturar e diluir dentro do aparelho). Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. A seleção padrão será definida nas configurações do NextSeq 1000/2000 Control Software.
  12. **[Opcional]** Para alterar a pasta de saída, selecione o campo Output Folder (Pasta de saída) e digite um novo local.

O campo Output Folder (Pasta de saída) é preenchido automaticamente com suas configurações padrão e é obrigatório, a menos que a opção **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) esteja selecionada.


Caso você tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento), Save to BaseSpace Sequence Hub (Salvar no BaseSpace Sequence Hub) exibirá Enabled (Habilitado).

Caso você tenha selecionado Proactive and Run Monitoring (Proativo e monitoramento de execução), Save to BaseSpace Sequence Hub (Salvar no BaseSpace Sequence Hub) exibirá Disabled (Desabilitado).

13. Revise as informações de execução e selecione **Prep** (Preparação).

## Iniciar uma execução local

1. Configure o modo de execução, conforme descrito em [Configurar o modo de execução na página 20](#).
2. Selecione **Start** (Iniciar).
3. Caso tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) ou Proactive and Run Monitoring (Proativo e monitoramento de execução), digite suas credenciais de acesso no BaseSpace Sequence Hub e selecione **Sign In** (Acessar).
4. Caso tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento), selecione o BaseSpace Sequence Hub Workgroup onde deseja salvar sua execução e selecione **Next** (Avançar).

 É necessário selecionar um grupo de trabalho para prevenir erros. Antes de continuar, verifique se selecionou um grupo de trabalho.

5. Selecione **Choose...** (Escolher) em Start With Sample Sheet (Iniciar com planilha de amostras) e navegue até a planilha de amostras em formato v2 no instrumento, unidade portátil ou unidade de rede montada do NextSeq 1000/2000. Os nomes de arquivo da planilha de amostras não podem conter caracteres especiais.

O NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 detecta automaticamente a versão do DRAGEN para a planilha de amostras e solicita que você altere as versões, se necessário. A versão do DRAGEN deve estar instalada no sistema. Para informações sobre instalação, consulte, [Atualizações de software na página 77](#).

- **Instrument Run Setup Used** (Configuração de execução do instrumento utilizada): selecione a pasta .zip que contém a planilha de amostras v2 e os arquivos de apoio, se aplicável. Senão, selecione a planilha de amostras v2.
- **Instrument Run Setup Not Used** (Configuração de execução do instrumento não utilizada): verifique se o arquivo de apoio da análise secundária está localizado no mesmo diretório que a planilha de amostras v2.

- i** | A planilha de amostras selecionada deverá estar em formato v2. Para criar uma planilha de amostras v2, baixe a planilha de amostras gerada por Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub ou edite um modelo de planilha de amostras v2 fornecido na página de suporte do NextSeq 1000/2000. Consulte [Configurações da planilha de amostras v2 na página 89](#) para mais informações sobre formatação e requisitos da planilha de amostra v2. Verifique se os arquivos mencionados na planilha de amostras estão localizados na mesma pasta que a planilha de amostras.
6. Selecione **Review** (Revisão).
  7. **[Opcional]** Digite o local do primer da leitura personalizada e o primer de índice personalizado. Para informações sobre como preparar e incluir primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)*. Acesse a página **Compatible Products** (Produtos compatíveis) de seu kit de preparação de biblioteca para verificar se primers personalizados Illumina são necessários.
  8. **[Opcional]** Selecione uma receita personalizada. Para mais informações, consulte [Sequenciamento de ciclo escuro na página 104](#).  
Caso esteja usando o NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 e o kit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus ou o kit Illumina Stranded mRNA Prep, a receita personalizada é selecionada automaticamente.
  9. **[Opcional]** Para desnaturar e diluir bibliotecas manualmente, desmarque a caixa de seleção **Denature and Dilute On Board** (Desnaturar e diluir dentro do aparelho). Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. A seleção padrão será definida nas configurações do NextSeq 1000/2000 Control Software.
  10. **[Opcional]** Para alterar a pasta de saída, selecione o campo **Output Folder** (Pasta de saída) e digite um novo local.  
O campo **Output Folder** (Pasta de saída) é preenchido automaticamente com suas configurações padrão e é obrigatório, a menos que a opção **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) esteja selecionada.  
Caso você tenha selecionado **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento), **Save to BaseSpace Sequence Hub** (Salvar no BaseSpace Sequence Hub) exibirá **Enabled** (Habilitado).  
Caso você tenha selecionado **Proactive and Run Monitoring** (Proativo e monitoramento de execução), **Save to BaseSpace Sequence Hub** (Salvar no BaseSpace Sequence Hub) exibirá **Disabled** (Desabilitado).
  11. Revise as informações de execução e selecione **Prep** (Preparação).

## Iniciar uma execução autônoma

1. Configure o modo de execução, conforme descrito em [Configurar o modo de execução na página 20](#).
2. Selecione **Start** (Iniciar).

3. Caso tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) ou Proactive and Run Monitoring (Proativo e monitoramento de execução), digite suas credenciais de acesso no BaseSpace Sequence Hub e selecione **Sign In** (Acessar).
4. Caso tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento), selecione o BaseSpace Sequence Hub Workgroup onde deseja salvar sua execução e selecione **Next** (Avançar).
5. Selecione **Set Up New Run** (Configurar nova execução).
6. No campo Run Name (Nome da execução), digite um nome exclusivo de sua preferência para identificar a execução atual.  
O nome da execução pode conter caracteres alfanuméricos, traços, hifens e sublinhados.
7. Para Read Type (Tipo de leitura), selecione quantas leituras de sequenciamento serão efetuadas:
  - **Single Read** (Leitura única): efetua uma só leitura, que é a opção mais simples e rápida.
  - **Paired End**: efetua duas leituras, que geram dados com qualidade mais alta e fornecem um alinhamento mais preciso.
8. Insira o número de ciclos efetuados em cada leitura:  
Não existe um número máximo de ciclos de índice, mas a soma dos ciclos de leitura com os ciclos de índice deve ser menor do que o número de ciclos indicado no rótulo do cartucho mais 27.

**Read 1** (Leitura 1): digite de **1** a **151** ciclos.

**Index 1** (Índice 1): insira o número de ciclos para o primer de Índice 1 (i7). Para uma execução apenas de PhiX, digite **0** em ambos os campos de índice.

**Index 2** (Índice 2): insira o número de ciclos para o primer de Índice 2 (i5).

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

9. Caso tenha selecionado Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento), selecione **Choose...** (Escolher...) para importar uma planilha de amostras.

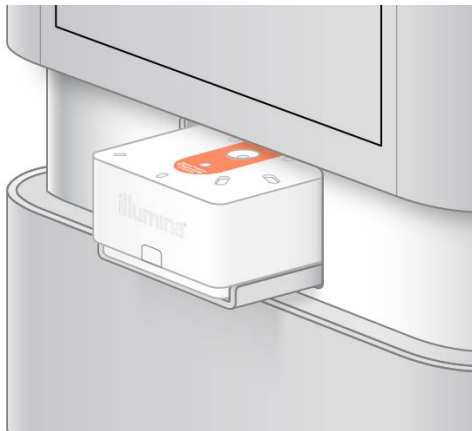
O NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 detecta automaticamente a versão do DRAGEN para a planilha de amostras e solicita que você altere as versões, se necessário. A versão do DRAGEN deve estar instalada no sistema. Para informações sobre instalação, consulte [Atualizações de software na página 77](#).

- i** | A planilha de amostras selecionada deverá estar em formato v2. Para criar uma planilha de amostras v2, baixe a planilha de amostras gerada por Instrument Run Setup (Configuração de execução do instrumento) no BaseSpace Sequence Hub ou edite um modelo de planilha de amostras v2 fornecido na página de suporte do NextSeq 1000/2000. Consulte [Configurações da planilha de amostras v2 na página 89](#) para mais informações sobre formatação e requisitos da planilha de amostra v2. Verifique se os arquivos mencionados na planilha de amostras estão localizados na mesma pasta que a planilha de amostras.

10. **[Opcional]** Digite o local do primer da leitura personalizada e o primer de índice personalizado. Para informações sobre como preparar e incluir primers personalizados, consulte o *Guia de primers personalizados do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139569)*. Acesse a página Compatible Products (Produtos compatíveis) de seu kit de preparação de biblioteca para verificar se primers personalizados Illumina são necessários.
11. **[Opcional]** Selecione uma receita personalizada. Para mais informações, consulte [Sequenciamento de ciclo escuro na página 104](#)
12. **[Opcional]** Para desnaturar e diluir bibliotecas manualmente, desmarque a caixa de seleção **Denature and Dilute On Board** (Desnaturar e diluir dentro do aparelho). Consulte o *Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas do NextSeq 1000 e 2000 (documento n.º 1000000139235)*. A seleção padrão será definida nas configurações do NextSeq 1000/2000 Control Software.
13. **[Opcional]** Para alterar a pasta de saída, selecione o campo Output Folder (Pasta de saída) e digite um novo local.  
O campo Output Folder (Pasta de saída) é preenchido automaticamente com suas configurações padrão e é obrigatório, a menos que a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) esteja selecionada.
14. Selecione **Prep** (Preparação).

### Carregar os materiais de consumo no instrumento

1. Verifique se o cartucho foi previamente descongelado e invertido 10 vezes para mistura antes de carregar a lâmina de fluxo (aba cinza removida) e a biblioteca diluída.
2. Selecione **Load** (Carregar).  
O NextSeq 1000/2000 Control Software abre o visor e ejeta a bandeja.
3. Coloque o cartucho na bandeja com o rótulo virado para cima e a lâmina de fluxo dentro do instrumento. Empurre o cartucho até ele travar no lugar.




4. Selecione **Close** (Fechar) para retrain o cartucho e fechar o visor.  
O NextSeq 1000/2000 Control Software exibe informações dos materiais de consumo escaneados após ~3 minutos.

5. [Opcional] Selecione **Eject Cartridge** (Ejetar cartucho) para remover o cartucho.  
O visor abrirá após 1 minuto e ejetará o cartucho.
6. Selecione **Sequence** (Sequência).

## Verificações pré-execução

As verificações pré-execução abrangem uma verificação do instrumento seguida de uma verificação de fluidos. A verificação de fluidos perfura os selos do cartucho, fazendo o instrumento emitir 3 ou 4 sons de estouro. Isso é esperado. O reagente passou então pela lâmina de fluxo.

 Depois que a verificação de fluidos se inicia, os materiais de consumo não podem ser reutilizados.

1. Aguarde cerca de 15 minutos até que as verificações pré-execução sejam concluídas.  
A execução é iniciada automaticamente após uma conclusão bem-sucedida.
2. Se ocorrer um erro durante a verificação do instrumento, selecione **Retry** (Tentar novamente) para refazer a verificação.  
Quando uma verificação estiver em andamento, o respectivo círculo será exibido em movimento.
3. Para resolver erros recorrentes, consulte [Resolução de mensagens de erro na página 83](#).

## Monitorar o progresso da execução

1. Monitore o progresso e as métricas das execuções quando forem exibidos na tela Sequencing (Sequenciamento).
  - **Estimated run completion** (Conclusão prevista da execução): data e hora aproximadas da conclusão da execução. A métrica da conclusão prevista da execução requer 10 execuções anteriores para calcular precisamente o tempo de conclusão.
  - **Average %Q30** (Média %Q30): a média percentual de identificação de bases com um Q-score  $\geq 30$ .
  - **Projected Yield** (Rendimento projetado): o número esperado de bases identificadas para a execução.
  - **Total Reads PF** (Total de leitura do filtro de passagem): a quantidade de passagens de clusters pelo filtro tipo paired-end (se aplicável), em milhões.
  - **Real Time Demux** (Demultiplexação em tempo real): status da demultiplexação quando iniciada no começo da Read 2 (Leitura 2) após a conclusão dos ciclos Read 1 (Leitura 1), Index 1 (Índice 1) e Index 2 (Índice 2). O status exibirá Complete (Concluído), mesmo que os ciclos de índice não tenham sido realizados. Não disponível para execuções no modo Cloud (Nuvem).
  - **Real Time Alignment** (Alinhamento em tempo real): status do alinhamento da Read 1 (Leitura 1) quando iniciado no começo da Read 2 (Leitura 2) após a conclusão dos ciclos Read 1 (Leitura 1), Index 1 (Índice 1) e Index 2 (Índice 2). Não disponível para execuções no modo Cloud (Nuvem).

As métricas de Q30 e rendimento são exibidas depois do ciclo 26 (~6 horas após o início da execução).

2. Para monitorar os processos da execução, selecione o menu do software de controle e depois **Process Management** (Gerenciamento de processos).
3. Para cancelar uma execução, selecione **End Run** (Encerrar execução). Para mais informações sobre cancelamento de execuções, consulte [Cancelar uma execução na página 84](#).
4. Descarregue os materiais de consumo do instrumento. Remova o cartucho do instrumento em até 3 dias.

## Descarregar materiais de consumo

1. Quando o sequenciamento estiver concluído, selecione **Eject Cartridge** (Ejetar cartucho). O software ejeta o cartucho usado do instrumento.
2. Remova o cartucho da bandeja.
3. Remova a lâmina de fluxo do cartucho.
4. Descarte a lâmina de fluxo, que contém componentes eletrônicos, de acordo com os padrões aplicáveis para sua região.
5. [Opcional] Remova o conector de drenagem abaixo do logotipo Illumina na lateral do cartucho sobre uma superfície adequada (por exemplo, uma pia ou um recipiente para resíduos líquidos perigosos) com o conector na horizontal ou virado para baixo, afastado de seu rosto. Drene os reagentes utilizados, segundo as normas aplicáveis para sua região. O tempo de drenagem varia conforme o tamanho do cartucho, caso o descarte automático do reagente não esteja ativado.



**Esse conjunto de reagentes contém produtos químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use equipamento de proteção, incluindo proteção para os olhos, luvas e jaleco, apropriado para risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduo químico e descarte-os de acordo com as leis e regulamentações regionais, nacionais e locais aplicáveis.** Para obter mais informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte a SDS em [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

6. Descarte o cartucho de reagente.  
Não é necessário fazer uma limpeza após a execução porque os fluidos de reagentes são descartados com o cartucho.
7. Selecione **Close Door** (Fechar porta) para recarregar a bandeja e voltar à tela Home (Página inicial). O software recarrega a bandeja automaticamente, e os sensores confirmam a remoção do cartucho.

## Limpar a bandeja do cartucho

Apenas será necessário limpar a bandeja do cartucho se o reagente vazar na bandeja do cartucho.

1. Remova o cartucho do instrumento.
2. Vista um novo par de luvas sem pó e outros equipamentos de proteção.
3. Borrife uma solução branqueadora 10% em um pano.
4. Passe o pano na bandeja do cartucho e remova a solução branqueadora imediatamente utilizando um pano de limpeza pesada.  
A solução branqueadora manchará a bandeja do cartucho, se não for removida imediatamente.
5. Borrife uma solução de etanol 70% na bandeja do cartucho e remova imediatamente usando um pano de limpeza pesada.
6. Coloque a bandeja do cartucho de volta na posição de carga.



# Saída do sequenciamento

Esta seção descreve o software Real-Time Analysis, que realiza identificação de base, atribui pontuações de qualidade e gera dados de saída. Saiba mais sobre os diferentes tipos de arquivo e onde localizá-los após uma execução.

## Visão geral do Real-Time Analysis (RTA)

Os Sistemas de sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000 executam o RTA3, uma implementação do software Real-Time Analysis, no instrumento Compute Engine (CE). O RTA3 extrai intensidades de imagens recebidas da câmera, executa a identificação de bases, atribui uma pontuação da qualidade às identificações de bases, alinha ao PhiX e gera relatórios de dados em arquivos InterOp para exibição no Instrument Control Software.

Para otimizar o tempo de processamento, o RTA3 armazena informações na memória. Se o RTA3 for desligado, o processamento não será restabelecido e qualquer dado de execução processado na memória será perdido.

### Entradas do RTA3

O RTA3 requer imagens de blocos contidas na memória local do sistema para processamento. O RTA3 recebe informações da execução e comandos do software de controle.

### Saídas do RTA3

As imagens de cada canal de cor são passadas na memória para o RTA3 como blocos. Nessas imagens, o RTA3 gera um conjunto de arquivos de identificação de bases com pontuação de qualidade e arquivos de filtro. Todas as outras saídas são arquivos de saída de apoio.

Tipo de arquivo	Descrição
Arquivos de identificação de bases	Cada bloco analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases concatenado (*.cbcl). Blocos de mesma cavidade e superfície são agregados em um arquivo *.cbcl para cada cavidade e superfície.
Arquivos de filtro	Cada bloco produz um arquivo de filtro (*.filter) que especifica se um cluster passa pelos filtros.
Arquivos de localização de cluster	Os arquivos de localização de cluster (*.locs) contêm as coordenadas X e Y para cada cluster em um bloco. Um arquivo de localização do cluster é gerado para cada execução.

Os arquivos de saída são usados para análise posterior no DRAGEN e no BaseSpace Sequence Hub.

## Tratamento de erros

O RTA3 cria arquivos de registro e os grava na pasta Logs (Registros). Os erros são gravados em um arquivo de texto em formato de arquivo \*.log.

Os arquivos de registro a seguir são transferidos para o destino de saída final ao término do processamento:

info\_00000.log resume eventos importantes da execução.

error\_00000.log lista erros que ocorreram durante uma execução.

warning\_00000.log lista avisos que ocorreram durante uma execução.

## Blocos da lâmina de fluxo

Os blocos são pequenas áreas de imagem na lâmina de fluxo. A câmera captura uma imagem por bloco.

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

Tabela 5 Blocos da lâmina de fluxo

Componente da lâmina de fluxo	Lâmina de fluxo NextSeq 1000/2000 P2	Lâmina de fluxo NextSeq 1000/2000 P3	Descrição
Cavidades	1	2	As cavidades são opticamente distintas, mas não são canais que fluem separados.
Superfícies	2	2	As lâminas de fluxo P2 e P3 são captadas em duas superfícies: superior e inferior. A imagem da superfície superior de um bloco é captada primeiro.
Feixes por cavidade	6	6	Um feixe é uma coluna em uma cavidade da lâmina de fluxo.
Blocos por faixa	11	11	Um bloco é uma porção de uma faixa e apresenta uma área com imagens na lâmina de fluxo.
Total de blocos gerados	132	264	Cavidades × superfícies × faixas × blocos por faixa é igual ao número total de blocos.

## Nomenclatura do bloco

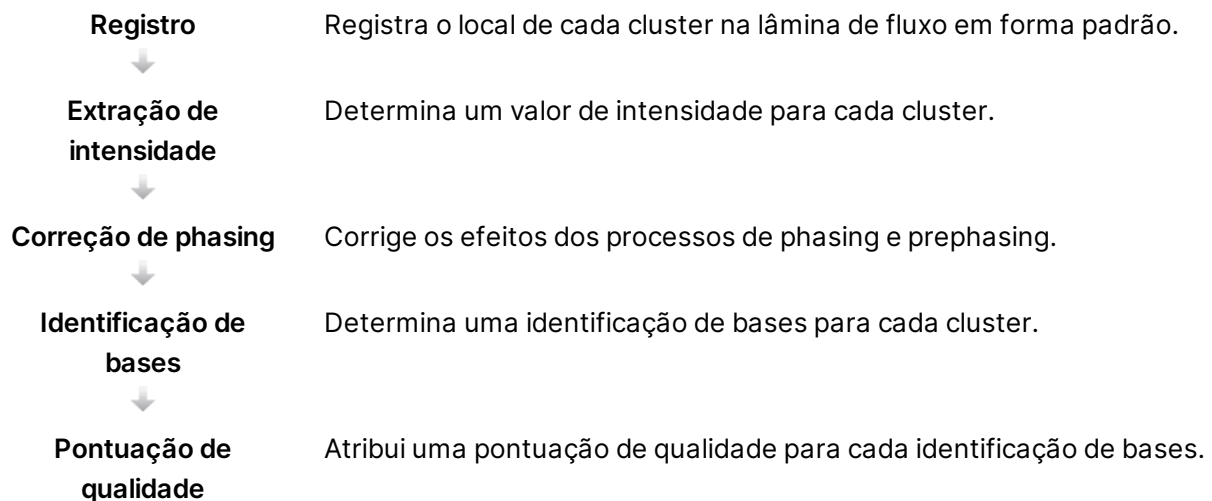
O nome do bloco é um número de quatro dígitos que representa a posição do bloco na lâmina de fluxo. Por exemplo, o nome do bloco 1205 indica superfície superior, faixa 2, bloco 5.

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

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

Os últimos dois dígitos representam o número do bloco. Para números das faixas 1 a 4, a numeração começa com 01 na extremidade de saída da lâmina de fluxo até 11 na extremidade de entrada. Para números das faixas 5 e 6, a numeração começa com 01 na extremidade de entrada e 11 na extremidade de saída.

## Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis



### Registro

O registro alinha uma imagem à matriz quadrada rotacionada de nanoporos na lâmina de fluxo, em forma padrão. Devido ao arranjo ordenado dos nanoporos, as coordenadas X e Y para cada cluster em um bloco são predeterminadas. As posições de cluster são gravadas em um arquivo local do cluster (s.locs) para cada execução.

Se o registro falhar para qualquer imagem em um ciclo, não serão geradas identificações de bases para o bloco no ciclo. Use o Sequencing Analysis Viewer para identificar as imagens que apresentaram falha no registro.

### Extração de intensidade

Após o registro, a extração de intensidade calcula um valor de intensidade para cada nanoporo em uma determinada imagem. Se o registro falhar, a intensidade para aquele bloco não poderá ser extraída.

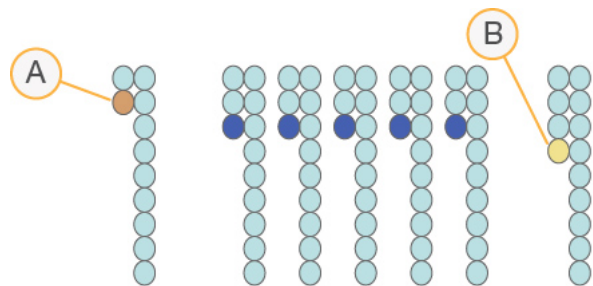
## Correção de phasing

Durante a reação de sequenciamento, cada fita de DNA em um cluster se estende por uma base por ciclo. Os processos de phasing e prephasing ocorrem quando uma fita fica fora de fase com o ciclo de incorporação atual.

O phasing ocorre quando uma base fica para trás.

O prephasing ocorre quando uma base fica adiantada.

Figura 5 Phasing e prephasing



- A. Leitura com uma base em phasing
- B. Leitura com uma base em prephasing

O RTA3 corrige os efeitos do phasing e do prephasing, o que potencializa a qualidade dos dados em cada ciclo ao longo da execução.

## Identificação de bases

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

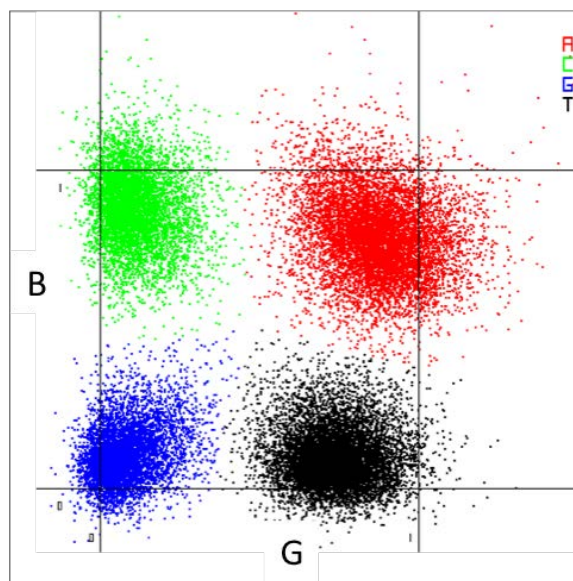
A ausência de identificação é designada como N. Isso ocorre quando um cluster não passa pelo filtro, o registro falha ou um cluster é deslocado para fora da imagem.

As intensidades para cada cluster são extraídas das imagens verdes e azuis e comparadas entre si, o que resulta em quatro populações distintas. Cada população corresponde a uma base. O processo de identificação de bases determina a que população cada cluster pertence.

Tabela 6 Identificações de bases em sequenciamento de dois canais

Base	Canal verde	Canal azul	Resultado
A	1 (presente)	1 (presente)	Clusters que mostram intensidade nos canais verde e azul.
C	0 (ausente)	1 (presente)	Clusters que mostram intensidade apenas no canal azul.
G	0 (ausente)	0 (ausente)	Clusters que não mostram qualquer intensidade em locais de cluster conhecidos.
T	1 (presente)	0 (ausente)	Clusters que mostram intensidade apenas no canal verde.

Figura 6 Visualização de intensidades de clusters



**i** | A cor de cada cluster corresponde aos gráficos de %Base no Sequence Analysis Viewer (SAV) e em Run Data by Cycle (Executar dados por ciclo) no BaseSpace Sequence Hub e não correspondem necessariamente ao canal verde e azul.

### Passagem de clusters pelo filtro

Durante a execução, o RTA3 filtra os dados brutos para remover leituras que não estão de acordo com o limite de qualidade dos dados. Clusters de sobreposição e de baixa qualidade são removidos.

Para a análise de dois canais, o RTA3 usa um sistema de base populacional para determinar a pureza (medida de pureza de intensidade) de uma identificação de bases. Os clusters passam pelo filtro (PF) quando não mais que uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos tem uma pureza inferior a um

limite fixo. Quando incluído, o alinhamento PhiX é realizado no ciclo 26 em um subconjunto de blocos para clusters que passaram pelo filtro. Os clusters que não passam pelo filtro não passam pelo processo de identificação de bases nem são alinhados.

## Pontuações de qualidade

Uma pontuação de qualidade (Q-Score) é uma previsão da probabilidade de uma identificação de bases errada. Um Q-score mais alto indica que uma identificação de bases tem mais qualidade e probabilidade de estar correta. Após a determinação da Q-Score, os resultados são registrados em arquivos de identificação de bases (\*.cbcl).

A Q-Score sucintamente comunica pequenas probabilidades de erro. As pontuações de qualidade são representadas como Q(X), em que X é a pontuação. A tabela a seguir mostra a relação entre uma pontuação de qualidade e a probabilidade de erro.

Q-Score Q(X)	Probabilidade de erro
Q40	0,0001 (1 em 10.000)
Q30	0,001 (1 em 1.000)
Q20	0,01 (1 em 100)
Q10	0,1 (1 em 10)

## Pontuação de qualidade e relatórios

A pontuação de qualidade calcula um conjunto de preditores para cada identificação de bases e usa esses valores para consultar o Q-score em uma tabela de qualidade. Tabelas de qualidade são criadas para fornecer previsões de qualidade com precisão ideal para execuções geradas por uma configuração específica de plataforma de sequenciamento e versão de química.

**i** | A pontuação de qualidade baseia-se em uma versão modificada do algoritmo Phred.

Para gerar a Q-table para os Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000, três grupos de identificação de bases foram determinados, com base na clusterização dessas funções preditivas específicas. Após o agrupamento das identificações de bases, calculou-se empiricamente a taxa média de erros para cada um dos três grupos, e os Q-scores correspondentes foram registrados na Q-table com as funções preditivas correlacionadas àquele grupo. Desse modo, há somente três Q-scores possíveis com RTA3, e esses Q-scores representam a taxa média de erros do grupo ([Pontuação Q-score simplificada com RTA3 na página 63](#)). Em geral, isso resulta em uma pontuação de qualidade simplificada, porém altamente precisa. Os três grupos da tabela de qualidade correspondem a identificações de base marginais (< Q15), médias (~Q20) e de alta qualidade (> Q30), que recebem pontuações específicas de 12, 23 e 37, respectivamente. Além disso, atribui-se uma pontuação nula igual a 2 a todos os não codificantes. Esse modelo de relatório de Q-score reduz os requisitos de espaço de armazenamento e largura de banda sem afetar a precisão e o desempenho.

Figura 7 Pontuação Q-score simplificada com RTA3



## Arquivos de saída de sequenciamento

Tipo de arquivo	Descrição, local e nome do arquivo
Arquivos de identificação de bases concatenadas	Cada cluster analisado é incluído em um arquivo de identificação de bases concatenadas, agregado em um arquivo por ciclo, cavidade e superfície. O arquivo agregado contém a identificação de bases concatenadas e a pontuação de qualidade codificada. Os arquivos de identificação de bases concatenadas são usados pelo BaseSpace Sequence Hub ou bcl2fastq2. Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, por exemplo L001_1.cbcl
Arquivos de localização de cluster	Para cada lâmina de fluxo, um arquivo de localização do cluster binário contém as coordenadas XY para os clusters em um bloco. Um layout hexagonal que corresponde ao layout do nanopoço da lâmina de fluxo predefine as coordenadas. Data/Intensities s_[cavidade].locs
Arquivos de filtro	O arquivo de filtro especifica se um cluster passou pelos filtros. Os arquivos de filtro são gerados no ciclo 26 usando 25 ciclos de dados. Um arquivo de filtro é gerado para cada bloco. Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter

Tipo de arquivo	Descrição, local e nome do arquivo
Arquivos InterOp	Os arquivos de relatórios binários podem ser visualizados no instrumento com o Instrument Control Software à exceção do instrumento no SAV no BaseSpace Sequence Hub. Os arquivos InterOp são atualizados ao longo da execução. Pasta <code>InterOp</code>
Arquivo de informações da execução	Lista o nome da execução, o número de ciclos em cada leitura, se a leitura é uma leitura de índice e o número de faixas e blocos da lâmina de fluxo. O arquivo de informações da execução é criado no início da execução. [Pasta principal], <code>RunInfo.xml</code>

## Arquivos de saída da análise secundária do DRAGEN

A DRAGEN Bio-IT Platform analisa a saída do sequenciamento do instrumento utilizando um dos seguintes pipelines de análise.

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

Esta seção fornece informações sobre cada pipeline do DRAGEN, inclusive informações sobre arquivos de saída. Além de gerar arquivos para cada pipeline específico, o DRAGEN fornece métricas da análise em arquivo `<sample_name>.metrics.json` e os relatórios descritos em [Pipeline do DRAGEN BCL Convert na página 69](#). Para mais informações sobre o DRAGEN, consulte a página de suporte da [DRAGEN Bio-IT Platform](#).

Todos os pipelines do DRAGEN são compatíveis com arquivos BCL de descompressão de entrada e arquivos BAM/CRAM de compressão de saída.

Considerações sobre arquivos de saída:

- Para pipelines Germline, RNA, Enrichment e DNA Amplicon que executam análise no instrumento, os arquivos BAM não serão carregados no BaseSpace Sequence Hub se a opção Proactive, Run Monitoring and Storage (Proativo, monitoramento de execução e armazenamento) estiver selecionada.



## Pipeline DRAGEN Enrichment

O pipeline DRAGEN Enrichment é compatível com as seguintes funcionalidades: se estiver usando o DRAGEN 3.7 ou posterior, tanto o modo linha genética como somático (apenas tumor) são compatíveis.

- Demultiplexação de amostra
- Mapeamento e alinhamento, inclusive classificação e duplicação de marcações
- Pequena chamada de variante
- Chamada de variante estrutural

Para realizar uma chamada de variante, um arquivo \*.bed deve estar incluído na planilha de amostras ou especificado em Instrument Run Setup (Configuração de execução no instrumento) no BaseSpace Sequence Hub. A chamada de variante estrutural é gerada apenas para leituras tipo paired-end no modo germline (linha genética).

Se estiver utilizando o DRAGEN Enrichment versão 3.8 ou posterior, utilize um arquivo de linha de base com ruído para melhorar o desempenho em modo somático. Consulte [Importar arquivos de linha de base com ruído na página 18](#).

O pipeline gera os seguintes arquivos de saída.

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ou</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Pequena chamada de variante	VCF e gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Chamada de variante estrutural	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>

\* Os arquivos de saída gVCF só estão disponíveis para o modo germline (linha genética).

## Pipeline DRAGEN Germline

O pipeline DRAGEN Germline é compatível com as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostra
- Mapeamento e alinhamento, inclusive classificação e duplicação de marcações
- Pequena chamada de variante
- Chamada de variante estrutural para leituras tipo paired-end
- Copiar número da chamada de variante para todos os genomas humanos

- Repetir expansões para genomas humanos
- Regiões de homozigidade para genomas humanos
- Detecção de CYP2D6 [DRAGEN v3.8 ou posterior]

A chamada de variante estrutural é gerada apenas para leituras tipo paired-end.

O pipeline gera os seguintes arquivos de saída.

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ou</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Pequena chamada de variante	VCF e gVCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Identificador de variante estrutural	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>
Copiar número de variantes	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.cnv.vcf.gz</li> </ul>
Repetir expansão	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.repeats.vcf.gz</li> </ul>
Regiões de homozigidade	CSV e BED	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.roh_metrics.csv</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.roh.bed</li> </ul>
Detecção de CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.cyp2d6.tsv</li> </ul>

## Pipeline DRAGEN DNA Amplicon

O pipeline do DRAGEN é compatível com as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostra
- Mapeamento e alinhamento, inclusive classificação e duplicação de marcações
- Pequena chamada de variante em modo linha genética ou somático

Para realizar uma chamada de variante, um arquivo \*.bed deve estar incluído na planilha de amostras ou especificado em Instrument Run Setup (Configuração de execução no instrumento) no BaseSpace Sequence Hub.

O pipeline gera os seguintes arquivos de saída.

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ou</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Pequena chamada de variante	VCF e gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>

\* Os arquivos de saída gVCF só estão disponíveis no modo germline (linha genética).

## DRAGEN RNA Pipeline

O pipeline DRAGEN RNA é compatível com as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostra
- Mapeamento e alinhamento, inclusive classificação e duplicação de marcações
- Detecção de fusão de genes
- Quantificação de transcrição
- **[DRAGEN v3.8 ou posterior]** Expressão gênica diferencial

Para gerar arquivos de saída, especifique um arquivo GTF na planilha de amostras ou verifique se o padrão `genes.gtf.gz` existe para esse genoma de referência.

O pipeline gera os seguintes arquivos de saída.

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída	Descrição
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.bam</code> ou</li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.cram</code></li> </ul>	Saída de alinhamento que cumpre com as especificações do SAM.
Detecção de fusão de genes	Texto simples	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.fusion_candidates.preliminary</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Candidatos à fusão antes da aplicação dos filtros.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.fusion_candidates.final</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Candidatos à fusão após a aplicação dos filtros.</li> </ul>
Quantificação de transcrição	Texto simples	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>sample_name.quant.genes.sf</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultados da quantificação de transcrição no nível do gene.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>sample_name.quant.sf</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todos os resultados de quantificação de transcrição.</li> </ul>
Expressão diferencial	PNG	Consulte a tabela de arquivos de saída de expressão diferencial a seguir.	Para gerar arquivos de saída, deve-se configurar uma comparação na planilha de amostras.

Os arquivos a seguir são fornecidos quando a expressão diferencial está ativa.

Nome do arquivo	Descrição
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Contém métricas de análise de expressão diferencial.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Descreve o número de leituras mapeadas para cada gene de cada amostra nos grupos de controle e comparação.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Um mapa de calor da expressão dos genes expressos de maneira diferentes para amostras nos grupos de controle e comparação. O mapa de calor exibe apenas genes expressos de maneiras diferentes com o P-value ajustado $< -0,05$ . Se houver mais de 30 genes expressos de maneiras diferentes, somente os 30 principais genes expressos de maneiras diferentes serão usados. Se o DESeq1 não conseguir fazer a conversão ou se não houver genes expressos de maneiras diferentes, o arquivo não será gerado.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Contém a variação das razões de expressão gênica como função de intensidade média de sinal. Para exibir as diferenças entre as medidas tomadas nas duas amostras, o gráfico transforma os dados em escalas M (razão de log) e A (média) e converte os valores em gráficos. O gráfico MA exibe as alterações da dobra de $\log_2$ atribuíveis a determinada variante sobre a média de contagens normalizadas para todas as amostras. Os pontos serão vermelhos, se o P-value ajustado for inferior a 0,1. Os pontos que saem da janela são exibidos no gráfico como triângulos abertos. Os triângulos que apontam para cima representam uma alteração positiva na dobra de log. Os triângulos que apontam para baixo representam uma alteração negativa na dobra de log.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	O gráfico exibe os dois principais componentes que explicam a maior parte da variação.

Nome do arquivo	Descrição
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Contém os resultados do DESeq2, que descrevem a expressão de média, log2 (alteração de dobra), erro padrão de log2, P-value, P-value ajustado e o status da expressão de cada gene.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Contém contagens regularizadas transformadas pelo log que foram calculadas pelo DESeq2.

## Pipeline DRAGEN Single Cell RNA

O DRAGEN é compatível com as seguintes funcionalidades:

- Demultiplexação de amostra
- Mapeamento e alinhamento, inclusive classificação e duplicação de marcações
- Classificação de lâmina e gene

Para gerar arquivos de saída, especifique um arquivo GTF na planilha de amostras ou verifique se o padrão `genes.gtf.gz` existe para esse genoma de referência.

O pipeline gera os seguintes arquivos de saída.

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída
Mapeamento/alinhamento	BAM ou CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ou</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Classificação de lâmina/gene	TSV, CSV e MTX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.scRNA.barcodeSummary.tsv</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.scRNA.genes.tsv</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.scRNA.matrix.mtx</li> </ul>
Relatórios de análise	HTML	<sample_name>.dragen.scrna-report.*.html

## Pipeline do DRAGEN BCL Convert

O pipeline do DRAGEN BCL Convert usa dados BCL gerados de sua execução do sequenciamento das informações da planilha de amostra para gerar um arquivo FASTQ para cada amostra. O nome do arquivo FASTQ é `<sample_name>.fastq.gz`.

O pipeline gera os seguintes relatórios.

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída
Demultiplexação	CSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Demultiplex_Stats.csv</li> </ul>
Métricas do adaptador	CSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adapter_Metrics.csv</li> </ul>

Componente	Tipo	Nome do arquivo de saída
Salto de índice	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 a quantidade de leituras de filtro de passagem que estão atribuídas a cada amostra na planilha de amostras. Quaisquer leituras não associadas claramente a uma amostra são classificadas como indeterminadas. O relatório também inclui informações sobre as pontuações de qualidade nas bases das leituras do filtro de passagem (PF) atribuídas a cada amostra.

As informações a seguir estão incluídas.

Metric (Métrica)	Descrição
Lane (Cavidade)	A cavidade da lâmina de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
SampleID	O ID da amostra na planilha de amostras. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo exibirá <code>undetermined</code> (indeterminado).
Índice	A concatenação da Index Read 1 (Leitura de índice 1) e da Index Read 2 (Leitura de índice 2) da planilha de amostras separada por hífen. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo exibirá <code>undetermined</code> (indeterminado).
# Reads (N.º de leituras)	O número de leituras do PF demultiplexadas para a amostra na cavidade especificada.
# Perfect Index Reads (N.º de leituras de índice perfeitas)	Número de leituras com perfeita correspondência ao conjunto de sequências de índice especificadas na planilha de amostras.
# One Mismatch Index Reads (N.º de leituras de índice com uma divergência)	Número de leituras com um erro no conjunto de sequências de índice especificadas na planilha de amostras.
# of $\geq$ Q30 Bases (PF) [Número de bases $\geq$ Q30 (PF)]	Número de bases, inclusive adaptadores, correspondentes a leituras que passam pelo limite de qualidade Q30.
Mean Quality Score (PF) [Pontuação média de qualidade (PF)]	A pontuação média de qualidade para leituras correspondentes à amostra na cavidade especificada. O valor inclui bases de adaptador.

## Adapter Metrics Reports (Relatório de métricas do adaptador)

O arquivo de métricas do adaptador contém o número do adaptador e das bases de amostras associadas a cada leitura.

As informações a seguir estão incluídas.

Metric (Métrica)	Descrição
Lane (Cavidade)	A cavidade da lâmina de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
Sample_ID	O ID da amostra na planilha de amostras. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo exibirá <code>undetermined</code> (indeterminado).
index (índice)	A sequência index1 da planilha de amostras. O campo ficará vazio se o index (índice) não estiver especificado na planilha de amostras ou se o valor do ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).
index2	A sequência index2 da planilha de amostras. O campo ficará vazio se o index2 não estiver especificado na planilha de amostras ou se o valor do ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).
R1_AdapterBases	Número de bases correspondentes à AdapterRead1 na planilha de amostras.
R1_SampleBases	Número de bases cortadas ou mascaradas da Read 1 (Leitura 1) para a cavidade ou amostra correspondente.
R2_AdapterBases	Número de bases correspondentes à AdapterRead2 na planilha de amostras.
R2_SampleBases	Número de bases cortadas ou mascaradas da Read 2 (Leitura 2) para a cavidade e amostra correspondente.
# Reads (N.º de leituras)	Número de leituras da amostra na cavidade especificada.

## Index Hopping Counts Report (Relatório de contagens do salto de índice)

O relatório de contagens do salto de índice contém o número de leituras para cada índice esperado e saltado das execuções de índice duplo. O relatório inclui apenas índices duplos únicos por cavidade onde não se detectou colisão de códigos de barras em nenhum dos índices. Para gerar uma métrica de salto de índice para uma cavidade, cada par de entradas dentro de cada índice deve ter uma distância de Hamming de pelo menos  $2N + 1$ , em que N representa a tolerância para divergência de código de barras especificada no índice.

As informações a seguir estão incluídas.

Para execuções sem índice, execuções de índice único ou cavidades que não contenham índices duplos únicos, o arquivo contém somente cabeçalhos.

<b>Metric (Métrica)</b>	<b>Descrição</b>
Lane (Cavidade)	A cavidade da lâmina de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
# Reads (N.º de leituras)	Número de leituras da amostra na cavidade especificada.
SampleID	O ID da amostra na planilha de amostras. Se uma leitura não corresponder a uma amostra, o campo exibirá <code>undetermined</code> (indeterminado).
index (índice)	A sequência <code>index1</code> da planilha de amostras. O campo ficará vazio se uma leitura for do tipo <code>single-end</code> ou se o valor do ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).
index2	A sequência <code>index2</code> da planilha de amostras. O campo ficará vazio se uma leitura for do tipo <code>single-end</code> ou se o valor do ID da amostra for <code>undetermined</code> (indeterminado).

### Top Unknown Barcodes Report (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 cavidade que não foram identificados na planilha de amostras, de acordo com o número de divergências permitidas. Se houver mais de um valor de índice posicionado na entrada da 100ª maior contagem de índices, todos os valores de índice com a mesma contagem serão exibidos como a 100ª entrada.

As informações a seguir estão incluídas:

<b>Metric (Métrica)</b>	<b>Descrição</b>
Lane (Cavidade)	A cavidade da lâmina de fluxo em que a amostra foi sequenciada.
index (índice)	A sequência de cada índice desconhecido na Read1 do índice. Se nenhum índice desconhecido for encontrado, o campo ficará vazio.



<b>Metric (Métrica)</b>	<b>Descrição</b>
index2	A sequência de cada índice desconhecido na Read 2 (Leitura 2) do índice. Se a execução teve apenas uma leitura ou se nenhum índice desconhecido for encontrado, o campo ficará vazio.
# Reads (N.º de leituras)	Número de leituras da amostra na cavidade especificada.

## Relatórios de controle de qualidade do Illumina DRAGEN

Para todos os pipelines, o DRAGEN FastQC gera gráficos de controle de qualidade por padrão. Os resultados de controle de qualidade são armazenados na pasta `AggregatedFastqcMetrics` e por resultados de amostra são armazenados na pasta `<sample_name>`.

Os relatórios de controle de qualidade não são gerados se o número de amostras for inferior a 512.

Os seguintes gráficos de controle de qualidade são fornecidos.

<b>Gráfico de controle de qualidade</b>	<b>Descrição</b>
adapter_content	O percentual de sequências para cada par de base.
positional_mean_quality	Média da pontuação em escala Phred da qualidade da base para cada posição de leitura.
gc_content	O percentual de conteúdo GC para cada leitura de sequenciamento.
positional_quality.read_1	O valor médio em escala Phred da qualidade das bases com um nucleotídeo específico e determinada localização na Read 1 (Leitura 1).
gc_quality	
positional_quality.read_2	O valor médio em escala Phred da qualidade das bases com um nucleotídeo específico e em determinado local na Read 2 (Leitura 2).
n_content	
read_length	O comprimento de sequência de cada leitura.
positional_base_content.read_1	Número de bases de cada nucleotídeo específico em determinados locais da Read 1 (Leitura 1).

Gráfico de controle de qualidade	Descrição
read_quality	Média da pontuação em escala Phred da qualidade para cada leitura de sequenciamento.
positional_base_content.read_2	Número de bases de cada nucleotídeo específico em determinados locais da Read 2 (Leitura 2).

## Estrutura da pasta de saída da análise secundária do DRAGEN

Por padrão, o DRAGEN gera arquivos de saída na pasta de saída selecionada na guia Settings (Configurações). Para cada fluxo de trabalho, o DRAGEN produz um relatório de resumo no arquivo `report.html`.

### 📁 Data (Dados)

📄 `report.html`

📄 `report_files`

### 📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr_.txt`

📄 `*stdout_.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Executar arquivos de entrada (por exemplo, arquivos BED, GTF)

### 📁 sample\_name

#### 📁 enrich\_caller , germline\_seq, dna\_amplicon\_seq, rna\_seq ou scrna\_seq

#### 📁 sample\_name

📄 `*.png`

📄 `dragen_*.log`

📄 `sample_name.*.metrics.csv`

📄 **[DNA]** `sample_name.*.vcf.gz`

📄 **[DNA]** `sample_name.*.gvcf.gz`: não disponível para o pipeline do DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon (somático).

- 📄 sample\_name.\*.bam ou sample\_name.\*.cram
- 📄 Logs (Registros)
- 📄 [RNA] sample\_name.fusion\_candidates.filter\_info
- 📄 [RNA] sample\_name.fusion\_candidates.final
- 📄 [RNA] sample\_name.quant.genes.sf
- 📄 [RNA] sample\_name.quant.sf
- 📄 sample\_name.metrics.json
- 📄 [scRNA] sample\_dragen-scRNA-report.\*.html
- 📄 [scRNA] sample\_name.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Germline] sample\_name.roh\_metrics.csv
- 📄 [Germline] sample\_name.roh.bed
- 📄 [Germline] sample\_name.cyp2d6.tsv
- 📄 sample\_name.fastqc\_metrics.csv
- 📄 sample\_name.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 (Registros)

- 📄 \*.txt
- 📄 \*.csv

📁 **fastq**: disponível somente se o KeepFastq estiver configurado como verdadeiro.

- 📄 \*.fastq.gz

**ora\_fastq:** disponível somente se o FastqCompressionFormat estiver configurado 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 (Relatórios)**

Demultiplex\_Stats.csv

RunInfo.xml

Trim\_Metrics.csv

fastq\_list.csv

SampleSheet.csv

Index\_Hopping\_Counts.csv

Top\_Unknown\_Barcodes.csv

**Read1InstrumentAnalyticsMetrics:** somente para leituras do tipo paired-end.

##### **0001**

dataset.json

##### **0002**

dataset.json

Adapter\_Metrics.csv

Demultiplex\_Stats.csv

Index\_Hopping\_Counts.csv

**Read1Metrics:** somente para leituras do tipo paired-end.

Adapter\_Metrics.csv


Index\_Hopping\_Counts.csv

# Manutenção

Esta seção descreve os procedimentos necessários para manter um sistema saudável. Saiba como instalar atualizações de software, alterar o filtro de ar e realizar outros procedimentos periódicos de manutenção. Manter o software de controle atualizado garante que o sistema tenha as correções de bugs e recursos mais recentes instalados para um desempenho ideal.

## Liberar espaço no disco rígido

Uma execução do sequenciamento exige cerca de 200 GB de espaço no disco rígido local. Quando houver pouco espaço, será exibida uma mensagem de advertência. Efetue as etapas a seguir para liberar espaço e excluir execuções concluídas e genomas de referência instalados em uma pasta de execução temporária.

 Exclua execuções apenas por meio do NextSeq 1000/2000 Control Software em vez de manualmente pelo sistema operacional. Excluir as execuções manualmente pode impactar negativamente o software de controle.

1. No menu do software de controle, selecione **Disk Management** (Gerenciamento de disco). A tela Disk Management (Gerenciamento de disco) é exibida com uma lista de execuções e genomas de referências salvos no disco rígido.
2. Na execução que você deseja excluir, selecione **Delete** (Excluir). A exclusão de uma execução exclui a pasta de execução local. A pasta de saída, que é uma cópia da pasta de execução, é mantida.
3. Na caixa de diálogo, selecione **Yes, Delete Run** (Sim, excluir execução) para confirmar a exclusão da execução.
4. Repita as etapas 2 e 3 para cada execução que deseja excluir.
5. No genoma que você deseja excluir, selecione **Delete Genome** (Excluir genoma).
6. Na caixa de diálogo, selecione **Yes, Delete Genome** (Sim, excluir genoma).
7. Repita as etapas 5 e 6 para cada genoma que deseja excluir.
8. Ao concluir, feche Disk Management (Gerenciamento de disco) para voltar à tela Home (Página inicial).

## Atualizações de software

A atualização do software garante que seu sistema tenha os recursos e correções mais recentes. As atualizações de software fazem parte de um pacote do sistema, que abrange o seguinte software:

- NextSeq 1000/2000 Control Software

- Receitas do NextSeq 1000/2000
- Serviço de cópia universal
- Real-Time Analysis

**i** | Os módulos do DRAGEN não estão incluídos no pacote do sistema. Instale-os separadamente, se necessário. Acesse o software do módulo DRAGEN nas páginas de suporte.

O sistema está configurado para fazer download de atualizações de software de modo automático ou manual:

- **Automatic updates** (Atualizações automáticas): é feito o download automático das atualizações do BaseSpace Sequence Hub para serem instaladas. Essa opção necessita de uma conexão à Internet, mas não uma conta no BaseSpace Sequence Hub.
- **Manual updates** (Atualizações manuais): o download das atualizações é feito manualmente da Web, e elas são salvas localmente ou em um dispositivo portátil e instaladas do local salvo. Essa opção não necessita de uma conexão à Internet para o instrumento.

### Instalar uma atualização automática do software


1. Verifique se não há execuções de sequenciamento ou análises secundárias do instrumento em andamento.
2. Faça login no ilmnadmin.
3. Selecione **Software Update** (Atualização de software) no menu do software de controle. Os sistemas configurados para atualizações automáticas exibem um alerta quando uma atualização de software está disponível.
4. Para verificar uma atualização, selecione **Check Online for Software Update** (Verificar atualização de software on-line).
5. Selecione **Update Now** (Atualizar agora) para fazer download da nova versão do software. Quando o download estiver concluído, o software de controle será fechado, e o assistente de instalação será exibido.  
O software de controle reinicia automaticamente. Toda atualização de firmware ocorre automaticamente depois da reinicialização.

**i** | Não é possível cancelar uma atualização depois que a instalação iniciar. Só é possível cancelar a atualização durante o download.

### Instalar uma atualização manual do software

1. Faça login no ilmnadmin.
2. Verifique se não há execuções de sequenciamento ou análises secundárias do instrumento em andamento.

3. Quando uma atualização de software estiver disponível, faça download do pacote instalador (\*.tar.gz) da [página de suporte dos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#). Salve o instalador em um local ou unidade portátil.
4. Se você salvou o instalador em uma unidade portátil, conecte a unidade em uma porta USB 3.0, localizada nas laterais e na parte posterior do instrumento.
5. No software de controle, selecione **Software Update** (Atualização de software) no menu do software de controle.
6. Selecione **Choose...** (Escolher...) para navegar até o instalador.
7. Selecione **Update Now** (Atualizar agora) para iniciar a instalação.  
O software de controle exibe um indicador de ocupado durante a instalação.  
O software de controle reinicia automaticamente. Toda atualização de firmware ocorre automaticamente depois da reinicialização.

 Não é possível cancelar uma atualização depois que a instalação iniciar. Só é possível cancelar a atualização durante o download.

## Fluxo de trabalho e atualizações de licença DRAGEN

Somente administradores do sistema podem instalar fluxos de trabalho DRAGEN e renovar licenças DRAGEN.

### Renovar licença DRAGEN on-line

Se o NextSeq 1000/2000 estiver conectado à Internet, atualize a licença da plataforma DRAGEN Bio-IT Platform da seguinte maneira.

1. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter uma nova chave de licença.
2. Aguarde 24 horas para a licença ser atualizada automaticamente ou atualize a licença imediatamente conforme as instruções a seguir.
  - a. Selecione o menu do software de controle e depois **DRAGEN**.
  - b. Selecione **Check Online** (Verificar on-line) para ver se há uma nova chave de licença DRAGEN disponível.
  - c. Se estiver disponível, selecione **Update** (Atualizar).

### Renovar licença DRAGEN off-line

Se o NextSeq 1000/2000 não estiver conectado à Internet, atualize a licença da plataforma DRAGEN Bio-IT Platform da seguinte maneira.

1. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter uma nova chave de licença. Salve o arquivo `license.zip` em uma unidade local ou portátil.

2. Se você salvou o arquivo \*.zip em uma unidade portátil, conecte a unidade em uma porta USB 3.0, localizada nas laterais e na parte posterior do instrumento. Mova o instrumento cuidadosamente conforme necessário para acessar a parte posterior.
3. Selecione o menu do software de controle e depois **DRAGEN**.
4. Selecione **Choose** (Escolher) para navegar pelo arquivo \*.zip e selecione **Open** (Abrir).

### Instalar fluxos de trabalho DRAGEN on-line

Se o NextSeq 1000/2000 estiver conectado à Internet, você poderá instalar os fluxos de trabalho DRAGEN diretamente no NextSeq 1000/2000 Control Software. A instalação de fluxos de trabalho DRAGEN on-line só está disponível no NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3.

1. Selecione o menu do software de controle e depois **Process Management** (Gerenciamento de processos).
2. Verifique se não há execuções de sequenciamento ou análises secundárias do instrumento em andamento.
3. Selecione o menu do software de controle e depois **DRAGEN**.  
Em **Version** (Versão), a seção **Available Workflows** (Fluxos de trabalho disponíveis) relaciona os fluxos de trabalho atualmente instalados no sistema.
4. Para instalar fluxos de trabalho DRAGEN no NextSeq 1000/2000 Control Software, selecione **Check Online** (Verificar on-line).  
Nem todas as versões e fluxos de trabalho DRAGEN são compatíveis com a instalação on-line. Para outros fluxos de trabalho, utilize a instalação off-line.
5. Marque a caixa de seleção dos fluxos de trabalho que deseja instalar. Caso não esteja instalada, instale primeiro a versão mais recente do BCL Convert.  
É possível visualizar informações sobre a versão mais recente de um fluxo de trabalho nas notas de versão.
6. Selecione **Install** (Instalar) para iniciar a instalação.
7. Digite o `ilmnadmin` para a senha do sistema e selecione **Authenticate** (Autenticar).

### Instalar fluxos de trabalho DRAGEN off-line

1. Quando uma atualização do fluxo de trabalho DRAGEN estiver disponível, baixe o instalador (\*.tar.gz) da [página de suporte do DRAGEN](#). Salve o instalador em um local ou unidade portátil.
2. Se você salvou o instalador em uma unidade portátil, conecte a unidade em uma porta USB 3.0, localizada nas laterais e na parte posterior do instrumento. Mova o instrumento cuidadosamente conforme necessário para acessar a parte posterior.
3. Selecione o menu do software de controle e depois **Process Management** (Gerenciamento de processos).



4. Verifique se não há execuções de sequenciamento ou análises secundárias do instrumento em andamento.
5. Selecione o menu do software de controle e depois **DRAGEN**.
6. Em Version (Versão), selecione **Browse for New Version** (Procurar uma nova versão) para navegar para o instalador.
7. Selecione **Install** (Instalar) para iniciar a instalação.
8. Digite o ilmnadmin para a senha do sistema e selecione **Authenticate** (Autenticar).

## Trocar o filtro de ar

Use as seguintes instruções para trocar um filtro de ar vencido a cada 6 meses.

O filtro de ar é um cartucho retangular de uso único que cobre o ventilador no lado direito do instrumento. Ele garante o resfriamento e evita a entrada de resíduos no sistema. O instrumento é fornecido com um filtro de ar e um sobressalente. Outros sobressalentes são incluídos mediante um contrato de serviço do instrumento ou poderão ser comprados separadamente da Illumina.

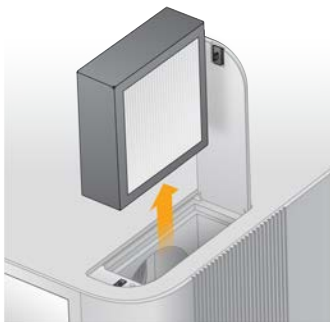
1. Na parte superior do instrumento, pressione o lado direito do painel superior para desengatar, conforme apresentado na ilustração a seguir.



2. Abra o painel.



3. Aperte para soltar o cartucho de filtro de ar, remova-o do centro do painel e descarte-o.



4. Insira um novo filtro de ar no receptáculo e aperte para fixá-lo.
5. Feche o painel superior e aperte para colocá-lo no lugar.



6. Retorne o instrumento à localização original.

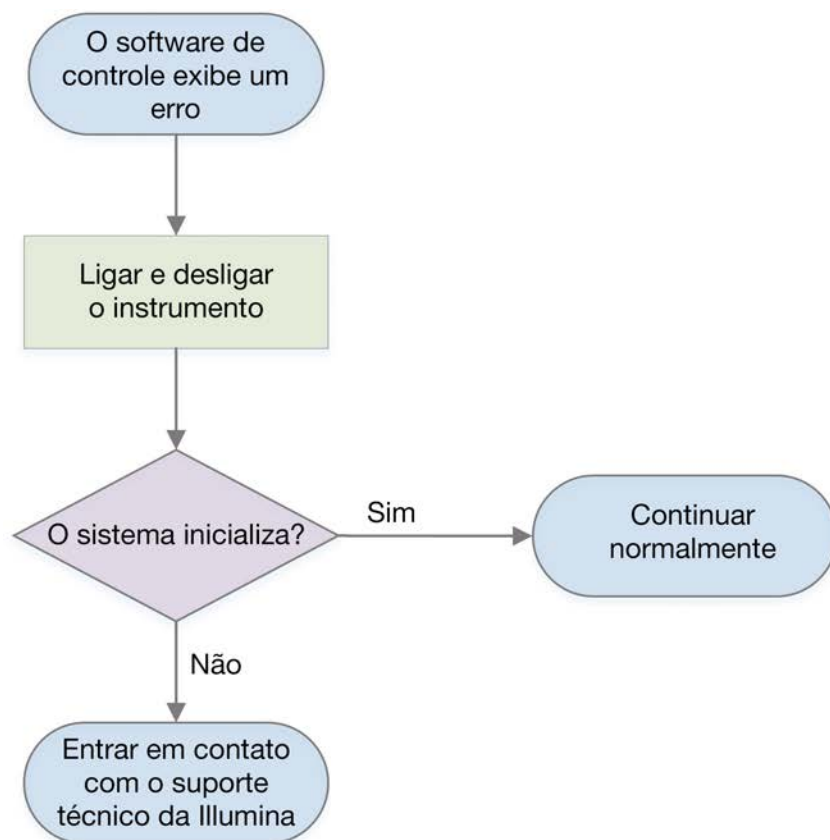
# Solução de problemas

Esta seção contém instruções passo a passo para cancelar uma execução, ligar e desligar o instrumento e outros procedimentos para solução de problemas.

## Resolução de mensagens de erro

Este apêndice fornece instruções detalhadas para várias etapas de resolução de problemas. O fluxograma abaixo fornece uma visão geral para a resolução de problemas de mensagens de erro que são exibidas durante a inicialização, a configuração de execuções ou o sequenciamento, e não são resolvidas com uma nova tentativa.

Muitos erros podem ser resolvidos com uma operação de ligar e desligar: desligando o instrumento e depois ligando-o novamente. Para mais informações sobre como ligar e desligar, consulte [Ligar e desligar o instrumento na página 85](#).



## Voltar a armazenar materiais de consumo

Use as instruções a seguir para armazenar um cartucho descongelado e uma lâmina de fluxo caso ocorra um erro em algum instrumento durante a verificação pré-execução do instrumento antes da verificação de fluidos.

1. Separe a lâmina de fluxo do cartucho.
  2. Remova e descarte a biblioteca diluída do reservatório (até ~18 µl).
- !** Prepare uma nova diluição da mesma biblioteca para a próxima execução para evitar contaminação cruzada da amostra com a biblioteca residual do reservatório.
3. Em um armazenamento com 2°C to 8°C, posicione o cartucho de modo que o rótulo fique voltado para cima e o ar possa circular em todas as laterais.  
Não ultrapasse 72 horas. Se o cartucho foi descongelado no refrigerador por 12 horas durante a noite, não ultrapasse 60 horas.
  4. Devolva a lâmina de fluxo à embalagem metálica original com o dessecante.
  5. Feche a embalagem metálica com fita e coloque em armazenamento de 2°C a 8°C.  
Não ultrapasse 72 horas.

## Cancelar uma execução

1. Selecione **End Run** (Encerrar execução).
2. Para descartar automaticamente o cartucho de reagente, marque a caixa de seleção **Purge Reagent Cartridge** (Descartar cartucho de reagente).  
A seleção padrão será definida nas configurações do NextSeq 1000/2000 Control Software.
3. Selecione **Yes, end the sequencing run** (Sim, encerrar a execução do sequenciamento).  
O cancelamento de uma execução é definitivo. O software não pode retomar a execução e os materiais de consumo não podem ser reutilizados depois da parte de verificação do instrumento das verificações antes da execução.
4. Selecione **Eject Cartridge** (Ejetar cartucho) para abrir o visor e ejetar a bandeja.
5. Remova o cartucho da bandeja.
6. Armazene ou descarte o cartucho, dependendo de quando ocorreu o cancelamento:

Circunstância	Ocorrência
Você cancelou antes ou durante a pré-execução do instrumento e deseja reaproveitar os materiais de consumo.	Consulte <a href="#">Voltar a armazenar materiais de consumo na página 84</a> .
Todas as outras circunstâncias.	Consulte <a href="#">Descarregar materiais de consumo na página 55</a> .

7. Selecione **Close Door** (Fechar porta) para recarregar a bandeja e voltar à tela Home (Página inicial). Os sensores confirmam a remoção do cartucho.

## Recolocar uma execução na fila

Se um erro for exibido para Status of Secondary Analysis (Status da Análise Secundária) no Process Management (Gerenciamento de processo), você poderá recolocar a execução na fila para realizar uma análise do DRAGEN do instrumento novamente nos arquivos cBCL gerados. A pasta de execução original deverá ainda estar presente no instrumento para usar a funcionalidade de recolocação na fila. Utilizar a funcionalidade de recolocação na fila não recoloca execuções na fila no BaseSpace Sequence Hub. Para recolocar na fila no BaseSpace Sequence Hub, consulte Fix Sample Sheet (Consertar planilha de amostras) no BaseSpace Sequence Hub Help Center.

1. Atualize a planilha de amostras v2 e salve a planilha de amostras em uma unidade de rede portátil ou montada.
2. Se você salvou a planilha de amostras em uma unidade portátil, conecte a unidade em uma porta USB 3.0, localizada nas laterais e na parte posterior do instrumento. Mova o instrumento cuidadosamente conforme necessário para acessar a parte posterior.
3. Selecione o menu do software de controle e depois **Process Management** (Gerenciamento de processos).
4. Verifique se não há execuções de sequenciamento ou análises secundárias do instrumento em andamento.
5. Selecione **Requeue** (Recolocar na fila) ao lado da execução concluída para recolocar na fila.
6. Selecione **Choose** (Escolher) para navegar até a planilha de amostras atualizada e selecione **Open** (Abrir).
7. Selecione **Start Requeue** (Iniciar recolocação na fila).

## Ligar e desligar o instrumento

A reinicialização do instrumento com segurança desliga e reinicia o sistema para restaurar uma conexão perdida, alinhar uma especificação ou resolver uma falha de inicialização. As mensagens de software indicam quando se deve ligar e desligar para resolver um erro ou advertência.

1. No menu do software de controle, selecione **Shut Down Instrument** (Desligar instrumento).
2. Se o sistema não encerrar, pressione e segure o botão de alimentação do lado direito do instrumento até que a luz diminua de intensidade.
3. Quando o botão de alimentação pulsar, pressione o interruptor para o lado de desativação (posição **O**), no painel traseiro.  
O botão de alimentação poderá continuar a pulsar depois que a alimentação for desligada.

Figura 8 Local do interruptor articulado



4. Aguarde 30 segundos.
5. Aperte o lado de ativação (posição I) do interruptor articulado.
6. Quando o botão de alimentação pulsar, aguarde 30 segundos e pressione-o.

Figura 9 Localização do botão de energia



7. Aguarde cerca de 5 minutos para o sistema operacional carregar. Quando o sistema operacional carregar, faça login no sistema.  
O software de controle será iniciado e inicializará o sistema. Aguarde cerca de 5 minutos para o sistema inicializar. A tela Home (Página inicial) será exibida quando a inicialização estiver concluída.

## Executar uma verificação do sistema

Não é necessário realizar uma verificação do sistema para a operação normal ou a manutenção do instrumento. No entanto, um representante do suporte técnico da Illumina pode pedir que você realize uma verificação do sistema para fins de solução de problemas.

Quatro verificações de subsistema levam cerca de 58 minutos para solucionar problemas de erros de pré-execução e outras questões. Os testes confirmam se os componentes estão devidamente alinhados e funcionais.

Os resultados dos testes ficarão na pasta de saída `system-check` localizada em `/usr/local/illumina/system-check`.

Descarregue o cartucho antes de executar verificações do sistema.

## Executar uma verificação do sistema

1. No menu do software de controle, selecione **System Checks** (Verificações do sistema).
2. Selecione a caixa de seleção para qualquer uma das seguintes verificações do sistema que você deseja realizar.
  - **Network Connectivity** (Conectividade de rede): verifica o status e o desempenho de sua conexão de rede.
  - **Enclosure** (Compartimento): verifica o desempenho do sistema termal e do mecanismo de levantamento do visor.
  - **Motion** (Movimento): verifica os limites de percurso e desempenho do estágio Z e do estágio XY.
  - **Optics** (Óptica): verifica o desempenho do módulo de captura de imagens.
3. Selecione **Start** (Iniciar).

## Restaurar para as configurações de fábrica

Restaure o sistema aos padrões de fábrica para reverter o software ou recuperar de uma configuração indesejável. Esta função deve ser usada somente por um representante Illumina.

## Capturar imagem instalada

Capture uma imagem do sistema para fazer backup de uma instalação de software que esteja funcionando corretamente. Essa imagem do sistema poderá ser restaurada futuramente. Recomenda-se capturar a imagem do sistema imediatamente após concluir a instalação inicial e alterar a senha com um representante da Illumina.

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

As opções do sistema operacional são exibidas rapidamente antes de continuar automaticamente com o NextSeq 1000/2000 Control Software.



Como apenas uma imagem fica retida na memória, essa ação substituirá a imagem capturada anteriormente.

3. Aguarde cerca de 30 minutos para que o sistema capture a imagem instalada atualmente. A captura pode incluir várias reinicializações. Quando concluída, o sistema é reinicializado com a imagem instalada atualmente na memória.

## Restaurar imagem capturada

Restaure o sistema à imagem capturada anteriormente para recuperar-se de uma configuração indesejável.

1. Reinicie o Linux.
2. Quando solicitado a escolher o sistema operacional, selecione **Restore Installed Image** (Restaurar imagem instalada).  
As opções do sistema operacional são exibidas rapidamente antes de continuar automaticamente com o NextSeq 1000/2000 Control Software.



As senhas estão vinculadas à imagem do sistema. Após a restauração, use as senhas da imagem restaurada para acessar o sistema.

3. Aguarde cerca de 30 minutos até a restauração ser concluída.  
A restauração pode incluir várias reinicializações. Quando concluída, o sistema é reinicializado com a imagem restaurada.



# Recursos e referências

## Configurações da planilha de amostras v2

Se estiver seguindo o modo Local, você pode usar o formato de arquivo de planilha de amostras v2 para definir suas configurações de execução. Crie a planilha de amostras no Instrument Run Setup ou editando um *modelo de planilha de amostras v2 dos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000*. Ao editar a planilha de amostras, verifique se as seguintes seções e campos estão incluídos na ordem listada e cumprem os requisitos. Após a edição, utilize uma unidade de rede portátil ou montada para transferir a planilha de amostras para os Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Ao navegar para a planilha de amostras no software de controle, ele é copiado para uma pasta de pré-execução no instrumento para que a unidade portátil possa ser removida.

Verifique se as configurações da planilha de amostras v2 cumprem os seguintes requisitos:

- As sequências de índice especificadas na seção BCLConvert\_Data da planilha de amostras devem corresponder ao kit de índice no NextSeq 1000/2000.
- Se estiver usando o NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2, a versão do DRAGEN especificada na planilha de amostras deve estar instalada e ativa no sistema. Para informações sobre instalação, consulte [Atualizações de software na página 77](#).
- Se estiver usando o NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3, a versão do DRAGEN especificada na planilha de amostras deve estar instalada no sistema. O software de controle detecta automaticamente a versão do DRAGEN para a planilha de amostras e solicita que você altere as versões ativas, se necessário. Para informações sobre instalação, consulte [Atualizações de software na página 77](#).

Se estiver utilizando o DRAGEN, você precisará definir outras configurações. Para mais informações, consulte [Configurações da planilha de amostras do DRAGEN na página 93](#)

Baixe o modelo de planilha de amostras v2 de Product Files (Arquivos de produtos) da página de suporte dos Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000. Caso você tenha criado uma planilha de amostras utilizando o Instrument Run Setup, alterar a planilha de amostras após o download inicial pode resultar em falha de análise.

Os nomes de arquivo não podem conter caracteres especiais.

### [Header] Requisitos

A seção [Header] contém diversas informações sobre sua execução. Estes são os campos e descrições [Header] disponíveis.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
FileFormatVersion	Sim	A versão da planilha de amostras. Digite 2 para o valor.
RunName	Não	Nome de execução exclusivo de sua preferência. O RunName pode conter caracteres alfanuméricos, traços, sublinhados e pontos. Se o RunName contiver espaços ou caracteres especiais, a análise não funcionará.
RunDescription	Não	Descrição da execução.
InstrumentPlatform	Não	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Não	NextSeq 1000/2000

### [Reads] Requisitos

A seção [Reads] descreve o número de ciclos de sequenciamento usados para leitura genômica e de índice 1 e 2. Os seguintes campos e descrições de [Reads] estão disponíveis.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
Read1Cycles	Sim	Número de ciclos na primeira leitura. O valor deve ser um número inteiro maior que zero.
Read2Cycles	Não	Número de ciclos na segunda leitura.
Index1Cycles	Não	Número de ciclos na primeira leitura de índice. Necessário para sequenciamentos com mais de uma amostra. O máximo são 10 ciclos.
Index2Cycles	Não	Número de ciclos na segunda leitura de índice. O máximo são 10 ciclos.

## [Sequencing\_Settings] Requisitos

Use a seção [Sequencing\_Settings] para especificar o kit de preparação de biblioteca que você está usando.

Campo	Necessário	Descrição
LibraryPrepKits	Não	<p>Seu kit de preparação de biblioteca. Somente um kit de preparação de biblioteca é permitido.</p> <p>No NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3, a receita personalizada necessária é selecionada automaticamente, se o kit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus ou o kit Illumina Stranded mRNA Prep estiver especificado no kit de preparação de biblioteca.</p> <p>Digite um dos valores a seguir.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus— ILMNStrandedTotalRNA</li> <li>Kit Illumina Stranded mRNA Prep —ILMNStrandedmRNA</li> </ul>

## Requisitos do BCL Convert

As seções da conversão em BCL fornecem informações sobre converter seus dados de BCL para FASTQ. As opções de conversão em BCL inclui duas seções separadas: [BCLConvert\_Settings] e [BCLConvert\_Data]. As seções de conversão em BCL necessitam de informações sobre as sequências adaptadoras do índice. Para identificar a sequência adaptadora compatível para cada leitura e índice, consulte *Sequências do adaptador Illumina (documento n.º 1000000002694)*.

Estes são os campos e descrições [BCLConvert\_Settings] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Não	A quantidade permitida de disparidades entre a primeira leitura de índice e a sequência de índice. Os valores podem ser 0, 1 ou 2. O valor padrão é 1.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
BarcodeMismatchesIndex2	Não	A quantidade permitida de disparidades entre a segunda leitura de índice e a sequência de índice. Os valores podem ser 0, 1 ou 2. O valor padrão é 1.
FastqCompressionFormat	Não	Para gerar arquivos FASTQ no formato *.gz, digite <code>gzip</code> . Para salvar os arquivos FASTQ como *.ora e usar com o DRAGEN Decompression, digite <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Não	A sequência a ser cortada ou mascarada da leitura 1. A sequência adaptadora da leitura 1 que contém A, C, G ou T. O AdapterRead1 corta ciclos por padrão.
AdapterRead2	Não	A sequência a ser cortada ou mascarada da leitura 2. A sequência adaptadora da leitura 2 que contém A, C, G ou T. O AdapterRead2 corta ciclos por padrão.
OverrideCycles	Não	<p>Cadeia de texto usada para especificar ciclos UMI e mascarar ciclos de uma leitura. Os seguintes valores são permitidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N: especifica ciclos a serem ignorados.</li> <li>• Y: especifica ciclos de sequenciamento.</li> <li>• I: especifica ciclos de índice.</li> <li>• U: especifica os ciclos UMI a serem cortados.</li> </ul> <p>Cada elemento é separado por ponto-e-vírgula. Estes são alguns exemplos de saída do OverrideCycles.</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

Estes são os campos e descrições [BCLConvert\_Data] disponíveis.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos, hifens e sublinhados. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço ou sublinhado. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515.
Índice	Não	Sequência de índice associada à amostra. Somente A, C, T, G são permitidos. Necessário para sequenciamentos com mais de uma amostra.
Index2	Não	A segunda sequência de índice associada à amostra. Somente A, C, T, G são permitidos. Verifique se as sequências adaptadoras do segundo índice (i5) estão em orientação direta. O DRAGEN reverte automaticamente índices de complemento i5 durante a análise secundária.
Lane (Cavidade)	Não	A cavidade da lâmina de fluxo. As cavidades são representadas por um valor inteiro.

## Configurações da planilha de amostras do DRAGEN

Esta seção descreve os requisitos da planilha de amostras para cada pipeline do DRAGEN. Inclua suas configurações de pipeline do DRAGEN, como a última seção de sua planilha de amostras. Só é possível usar um pipeline do DRAGEN.

Cada pipeline do DRAGEN contém seções separadas para configurações e dados.

## Requisitos de pipeline do DRAGEN Germline

Estes são os campos e descrições [DragenGermline\_Settings] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão do software deve corresponder à versão especificada na seção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg19_alt_aware. Use o nome do genoma de referência localizado em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para usar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>assistência on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do arquivo de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se nenhum valor for especificado, o padrão é nenhum.
KeepFastq	Não	Para salvar arquivos de saída FASTQ, digite <code>true</code> (verdadeiro). Para remover arquivos de saída FASTQ, digite <code>false</code> (falso).

Estes são os campos e descrições [DragenGermline\_Data] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. Os IDs de amostra devem corresponder aos IDs especificados na seção BCLConvert_Data.

## Requisitos de pipeline do DRAGEN RNA

Estes são os campos e descrições [DrogenRNA\_Settings] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão do software deve corresponder à versão especificada na seção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_noalt_with_decoy. Use o nome do genoma de referência localizado em <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Para usar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>assistência on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Não	O arquivo contendo anotações de gene do RNA. Somente caracteres alfanuméricos são permitidos. Se não houver, utiliza-se o arquivo de anotação padrão no genoma de referência especificado.
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do arquivo de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se nenhum valor for especificado, o padrão é nenhum.
KeepFastq	Não	Para salvar arquivos de saída FASTQ, digite <code>true</code> (verdadeiro). Para remover arquivos de saída FASTQ, digite <code>false</code> (falso).
DifferentialExpressionEnable	Não	Para ativar a expressão gênica diferencial, digite <code>true</code> (verdadeiro). Digite <code>false</code> (falso) para excluir a expressão gênica diferencial da análise.

Estes são os campos e descrições [DrogenRna\_Data] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. Os IDs de amostra devem corresponder aos IDs especificados na seção BCLConvert_Data.
Comparison<N>	Não	O valor de controle ou comparação para cada amostra. Se não houver valor de controle ou comparação para a amostra, a amostra é marcada com <i>na</i> . Todas as amostras marcadas com controle são comparadas a todas as amostras marcadas com comparação. O valor <i>N</i> reflete o grupo de comparação das amostras.

### Requisitos de pipeline do DRAGEN Enrichment

Estes são os campos e descrições [DrogenEnrichment\_Settings] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão do software deve corresponder à versão especificada na seção BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Sim	O nome do genoma de referência. Por exemplo, hg38_alt_aware. Os genomas de referência estão localizados em <i>/usr/local/illumina/genomes</i> . Para usar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>assistência on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
BedFile	Sim	O arquivo bed que contém as regiões a serem direcionadas.



<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
GermlineOrSomatic	Sim	Para realizar análise da linha genética de enriquecimento, digite <code>germline</code> (linha genética). Para realizar análise somática de enriquecimento, digite <code>somatic</code> (somática).
KeepFastq	Não	Para salvar arquivos de saída FASTQ, digite <code>true</code> (verdadeiro). Para remover arquivos de saída FASTQ, digite <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do arquivo de saída. Os valores permitidos são <code>bam</code> ou <code>cram</code> . Se nenhum valor for especificado, o padrão é nenhum.
AuxNoiseBaselineFile	Não	O nome do arquivo de linha de base com ruído. Você pode usar formato de arquivo <code>*.txt</code> ou <code>*.gz</code> . Os arquivos de linha de base com ruído só estão disponíveis quando se utiliza o modo somático. Para mais informações, consulte <a href="#">Importar arquivos de linha de base com ruído na página 18</a> .

Estes são os campos e descrições [DragenEnrichment\_Data] disponíveis.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, <code>Sample1-DQB1-022515</code> . Os IDs de amostra devem corresponder aos IDs especificados na seção <code>BCLConvert_Data</code> .

## Requisitos de pipeline do DRAGEN DNA Amplicon

Estes são os campos e descrições [DragenAmplicon\_Settings] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão do software deve corresponder à versão especificada na seção 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 usar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>assistência on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
DnaBedFile	Sim	O arquivo bed que contém as regiões a serem direcionadas. O arquivo bed pode ser inserido em formato *.txt ou *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Sim	Para realizar análise da linha genética DNA Amplicon, digite <code>germline</code> (linha genética). Para realizar análise somática DNA Amplicon, digite <code>somatic</code> (somática).
KeepFastq	Não	Para salvar arquivos de saída FASTQ, digite <code>true</code> (verdadeiro). Para remover arquivos de saída FASTQ, digite <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do arquivo de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se nenhum valor for especificado, o padrão é nenhum.

Estes são os campos e descrições [DragenAmplicon\_Data] disponíveis.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. Os IDs de amostra devem corresponder aos IDs especificados na seção BCLConvert_Data.
DnaOrRna	Sim	O tipo de análise Amplicon a ser realizada. Somente a análise de DNA é compatível com o DRAGEN v3.8. Digite <code>dna</code> .

### Requisitos de pipeline do DRAGEN Single Cell RNA

Estes são os campos e descrições [DragenSingleCellRNA\_Settings] disponíveis. Para mais informações sobre compatibilidade com kits de terceiros, consulte a página de suporte DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility (Compatibilidade de produtos da plataforma DRAGEN Bio-IT).

#### Single Cell Library Kit 1—5

As configurações de planilha de amostras a seguir se aplicam a kits de preparação de bibliotecas com a mesma estrutura genética dos DRAGEN Single Cell Library Kits 1—5. Use a página de suporte DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility (Compatibilidade de produtos da plataforma DRAGEN Bio-IT) para confirmar a estrutura genética de seu kit.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão do software deve corresponder à versão especificada na seção BCLConvert_Settings.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
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 usar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>assistência on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Não	Digite um dos seguintes valores: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF: com a fita para frente. SF é o valor padrão.</li> <li>• SR: com a fita reversa.</li> <li>• U: sem fita.</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Não	O arquivo contendo anotações de gene do RNA. Somente caracteres alfanuméricos são permitidos. Se não houver, utiliza-se o arquivo de anotação padrão no genoma de referência especificado.
BarcodeRead	Não	A localização dentro da execução do sequenciamento da leitura do código de barras, que contém tanto o código de barras como o UMI. Os valores podem conter <code>Read1</code> ou <code>Read2</code> . O valor padrão é <code>Read1</code> .
BarcodePosition	Sim	A localização das bases correspondentes ao código de barras dentro do valor inserido no campo BarcodeRead. As posições da base são indexadas iniciando pela posição zero. Insira o valor de BarcodePosition no seguinte formato: <code>0_&lt;posição final do código de barras&gt;</code> Por exemplo, se um código de barras contém 16 bases, o valor é <code>0_15</code> .

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
UmiPosition	Sim	A localização das bases correspondentes ao UMI dentro do valor inserido no campo BarcodeRead. Insira o valor de UmiPosition no seguinte formato: <posição inicial do UMI>_<posição final do UMI>  Por exemplo, se o UMI contém 10 bases e o código de barras contém 16, o valor é 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Não	O nome do arquivo que contém as sequências de código de barras a serem incluídas. O nome do arquivo pode conter caracteres alfanuméricos, traços, sublinhados e pontos.
KeepFastq	Não	Para salvar arquivos de saída FASTQ, digite <code>true</code> (verdadeiro). Para remover arquivos de saída FASTQ, digite <code>false</code> (falso).
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do arquivo de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se nenhum valor for especificado, o padrão é nenhum.

Estes são os campos e descrições [DragenSingleCellRNA\_Data] disponíveis.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. Os IDs de amostra devem corresponder aos IDs especificados na seção BCLConvert_Data.

## Single Cell Library Kit 6

As configurações de planilha de amostras a seguir se aplicam a kits de preparação de biblioteca com a mesma estrutura genética dos DRAGEN Single Cell Library Kits 6. Consulte a página de suporte DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility (Compatibilidade de produtos da plataforma DRAGEN Bio-IT) para confirmar a estrutura genética de seu kit.

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
SoftwareVersion	Sim	A versão do software DRAGEN instalada atualmente no sistema. Use todos os três inteiros incluídos no nome da versão. Por exemplo, 3.5.7. A versão do software deve corresponder à versão especificada na seção 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 usar um genoma de referência personalizado, consulte a <i>assistência on-line do aplicativo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Não	Digite um dos seguintes valores: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF: com a fita para frente.</li> <li>• SR: com a fita reversa.</li> <li>• U: sem fita.</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Não	O arquivo contendo anotações de gene do RNA. Somente caracteres alfanuméricos são permitidos. Se não houver, utiliza-se o arquivo de anotação padrão no genoma de referência especificado.
BarcodeRead	Não	A localização dentro da execução do sequenciamento da leitura do código de barras, que contém tanto o código de barras como o UMI. Os valores podem conter <code>Read1</code> ou <code>Read2</code> . O valor padrão é <code>Read1</code> .

<b>Campo</b>	<b>Necessário</b>	<b>Descrição</b>
BarcodePosition	Sim	<p>A localização das bases correspondentes aos códigos de barras dentro do valor inserido no campo BarcodeRead. As posições da base são indexadas iniciando pela posição zero. Insira o valor de BarcodePosition no seguinte formato: 0_&lt;posição final do primeiro código de barras&gt;+&lt;posição inicial do segundo código de barras&gt;_&lt;posição final do segundo código de barras&gt;+&lt;posição inicial do terceiro código de barras&gt;_&lt;posição final do terceiro código de barras&gt;</p> <p>Por exemplo, a estrutura a seguir resultaria no valor 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 bases no primeiro código de barras (0_8).</li> <li>• 12 bases entre o primeiro e o segundo código de barras.</li> <li>• 9 bases no segundo código de barras (21_29).</li> <li>• 13 bases entre o segundo e o terceiro código de barras.</li> <li>• 9 bases no terceiro código de barras (43_51).</li> </ul>
UmiPosition	Sim	<p>A localização das bases correspondentes ao UMI dentro do BarCodeRead especificado. Digite a cadeia de caracteres no seguinte formato: &lt;posição inicial do UMI&gt;_&lt;posição final do UMI&gt;</p> <p>Por exemplo, se o UMI contém 8 bases e a quantidade de bases antes do UMI é igual a 51, o valor é 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Não	<p>O nome do arquivo que contém as sequências de código de barras a serem incluídas na lista de permissões. O nome do arquivo pode conter caracteres alfanuméricos, traços, sublinhados e pontos.</p>
KeepFastq	Não	<p>Para salvar arquivos de saída FASTQ, digite <code>true</code> (verdadeiro). Para remover arquivos de saída FASTQ, digite <code>false</code> (falso).</p>

Campo	Necessário	Descrição
MapAlignOutFormat	Não	A formatação do arquivo de saída. Os valores permitidos são bam ou cram. Se nenhum valor for especificado, o padrão é nenhum.

Estes são os campos e descrições [DragenSingleCellRNA\_Data] disponíveis.

Campo	Necessário	Descrição
Sample_ID	Sim	O ID da amostra. O ID da amostra pode conter até 20 caracteres alfanuméricos. O ID diferencia maiúsculas e minúsculas. Separe cada identificador com um traço. Por exemplo, Sample1-DQB1-022515. Os IDs de amostra devem corresponder aos IDs especificados na seção BCLConvert_Data.

## Sequenciamento de ciclo escuro

Esta seção descreve como usar o sequenciamento de ciclo escuro na receita.

O sequenciamento de ciclo escuro é usado para concluir apenas as etapas químicas do ciclo de sequenciamento. Consulte a página Compatible Products (Produtos compatíveis) de seu kit de preparação de biblioteca no [Illumina Support Site](#) para verificar se o sequenciamento de ciclo escuro é necessário.

Siga as etapas a seguir para o sequenciamento de ciclo escuro.

### Editar o arquivo de receita

- Baixe o arquivo de receita XML no [Illumina Support Site](#).
- Edite o arquivo XML da receita.
  - Identifique a seção de protocolo adequada com base em sua configuração de leitura e sequenciamento de índice. Há cinco protocolos diferentes possíveis por receita personalizada que podem ser editados.  
Por exemplo, o protocolo para uma única Read 1 (Leitura 1) sem configuração de sequenciamento de índice seria `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
  - Antes de `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` e `<ReadRef ReadName="Read 2"/>`, insira a seguinte etapa de ciclo escuro em uma nova linha.  
`<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
  - Informe a etapa do ciclo escuro em uma nova linha para cada ciclo escuro necessário.
- Salve o arquivo XML da receita.



Esta é uma amostra de receita com ciclo escuro:

```
<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 à execução

- 1 Em Run Setup (Configuração da execução) do software de controle, selecione **Choose** (Escolher) em Custom Recipe (Receita personalizada).
- 2 Navegue até o arquivo XML da receita atualizado.
- 3 Selecione **Open** (Abrir).
4. Volte para [Iniciar execução de sequenciamento na página 48](#) (Iniciar execução do sequenciamento).

# Índice

## %

% PF 61

## A

alertas 6, 77, 85  
algoritmo Phred 62  
alimentação CA  
    entrada 4  
alinhamento de especificações 85  
almofadas 29  
amplificação 8  
análise  
    métodos 5, 9  
análise baseada na nuvem 1  
análise de imagens 5  
análise local 1  
apelido 21  
arquivos BCL 6  
arquivos CBCL 62  
arquivos de filtro 57, 63  
arquivos de identificação de bases 9, 57  
arquivos de identificações de bases 63  
arquivos de registro 58  
arquivos InterOp 57, 63  
assinatura no Enterprise 14  
assistência técnica 109  
atualizações automáticas 77  
atualizações manuais de software 77  
ausência de identificações 59

## B

bandeja coletora  
    almofadas 29  
barra de luzes 3  
barra de status 3  
BaseSpace Sequence Hub 1  
    configurações 14  
    documentação 14  
bcl2fastq2 57

bibliotecas

    desnaturação 8

blocos 57

botão de alimentação 3, 85

## C

cabo de alimentação 4  
cabo Ethernet 4  
câmeras 58  
caminhos UNC 52  
canal verde 60  
canal vermelho 60  
cartucho  
    orientação de carga 53  
cavidades 58  
CE 57  
ciclos de leitura 32  
ciclos extras 32  
compartimento dos materiais de consumo 3  
compressas branqueadoras 29  
compressas com álcool 29  
Compute Engine 57  
conexão à Internet 14  
conexões perdidas 85  
configuração da execução  
    exemplos 32  
configuração inicial 81, 87-88  
configurações de áudio 21  
configurações de som 21  
contagem de execuções 6  
controle de PhiX v3 28  
controle dos materiais de consumo 1  
conversão FASTQ 57

## D

dados de desempenho 14  
dados de desempenho do instrumento 14  
datas de vencimento 81  
desnaturação 8  
diluição de bibliotecas 8

disco rígido 6, 77  
documentação 109  
domínio privado 14  
domínios 14  
duração da leitura 32

## E

edição de parâmetros de execução 52  
encerramento 85  
endereço IP 6  
erros 6, 85  
    mensagens 83  
    probabilidade 62  
espaço em disco 6, 77  
especificações de congeladores 29  
especificações de refrigeradores 29  
exclusão de execuções 6, 77

## F

faixas 58-59  
falhas de registro 59  
filtragem de clusters 61  
filtro de pureza 61  
filtros de ar  
    local 81  
    reposições 29  
fragmentos da receita 6

## G

garantia 29  
geração de imagens 57-58  
geração de modelo 59

## I

ícones 6  
identificação de bases 5  
Illumina Proactive Support 14  
imagens 57  
índice  
    ciclos 32

inicialização 86  
    falha 85  
instalação do software 77  
instalador do pacote do sistema 77  
intensidades de cluster 59  
interruptor articulado 4  
interruptor deslizante 85

## K

kit de teste 29  
kits 28  
    números de catálogo 29

## L

leitura única 52  
ligar e desligar 83  
locais de cluster 57, 63  
local de hospedagem 14  
local do servidor 14  
Local Run Manager 5

## M

materiais de consumo  
    controle 1  
    digitalização 53  
métricas de execuções 57  
miniaturas 63  
monitor 3  
mouse 4  
mover 4

## N

nanopoços 59  
nome do computador 6  
nomear  
    nome do computador 6  
    nome do instrumento 21  
nucleotídeos 60  
numeração de bloco 59  
numeração de superfície 59

número de série 6  
números de catálogo 28  
números do ciclo 32

## P

pacote de software 1, 5  
padrões de fábrica 87-88  
páginas de suporte 77  
parâmetros de execução  
edição 52  
passagem pelo filtro (PF) 61  
pasta de execução 77  
pasta de saída 52, 77  
pasta de saída padrão 52  
phasing e prephasing 60  
PhiX 29  
alinhamento 57  
porta Ethernet 4  
portas  
fechamento 53  
portas USB 4  
Process Management 77

## Q

Q-Scores 62  
qualidade dos dados 61

## R

reagentes do NextSeq 1000/2000 28  
receitas 77  
registros de erro 58  
reinicialização 87-88  
reposições 81  
RunInfo.xml 63

## S

sem identificações 60  
sequenciamento de dois canais 60  
Sequencing Analysis Viewer 57, 59  
Serviço de cópia universal 5, 77

sistema operacional 86  
software  
alertas de atualização 22  
instalação 77  
reversão 87-88  
software de reversão 87-88  
solução tampão de ressuspensão 28  
status da execução 6  
substituto do RSB 28  
suporte ao cliente 109

## T

tabelas de qualidade 62  
tamanho da execução 77  
teclados 4  
técnica, ajuda 109  
tipo paired-end 52

## U

unidade D 77  
unidades mapeadas 52

## V

valores de intensidade 59  
ventiladores 81  
verificações do sistema 83

## W

white papers 62  
Windows  
login 86

# Assistência técnica

Para obter assistência técnica, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Site: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
E-mail: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Números de telefone do suporte técnico da Illumina

Região	Ligação gratuita	Internacional
Alemanha	+49 (800) 101-4940	+49 (89) 3803-5677
Austrália	+61 (1800) 775-688	
Áustria	+43 (800) 006-249	+43 (1) 928-6540
Bélgica	+32 (800) 77-160	+32 (3) 400-2973
Canadá	+1 (800) 809-4566	
China		+86 (400) 066-5835
Coreia do Sul	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 (80) 82-0183	+45 (89) 87-1156
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) 0510-2193	+33 (1) 7077-0446
Hong Kong, China	+852 (800) 960-230	
Índia	+91 8006-500375	
Indonésia		0078036510048
Irlanda	+353 (1800) 936-608	+353 (1) 695-0506
Itália	+39 (800) 985-513	+39 236003759
Japão	+81 (0800) 111-5011	
Malásia	+60 (1800) 80-6789	
Noruega	+47 (800) 16-836	+47 (21) 93-9693
Nova Zelândia	+64 (800) 451-650	

Região	Ligação gratuita	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) 008-83979	+46 (8) 506-19671
Suíça	+41 (800) 200-442	+41 (56) 580-0000
Tailândia	+66 (1800) 011-304	
Taiwan, China	+886 (8) 066-51752	
Vietnã	+84 (1206) 5263	

**Fichas de dados de segurança (SDSs)** – Disponíveis no site da Illumina em [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

**Documentação do produto** – Disponível para download em [support.illumina.com](http://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](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Somente para uso em pesquisa. Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico.**

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

**illumina**<sup>®</sup>