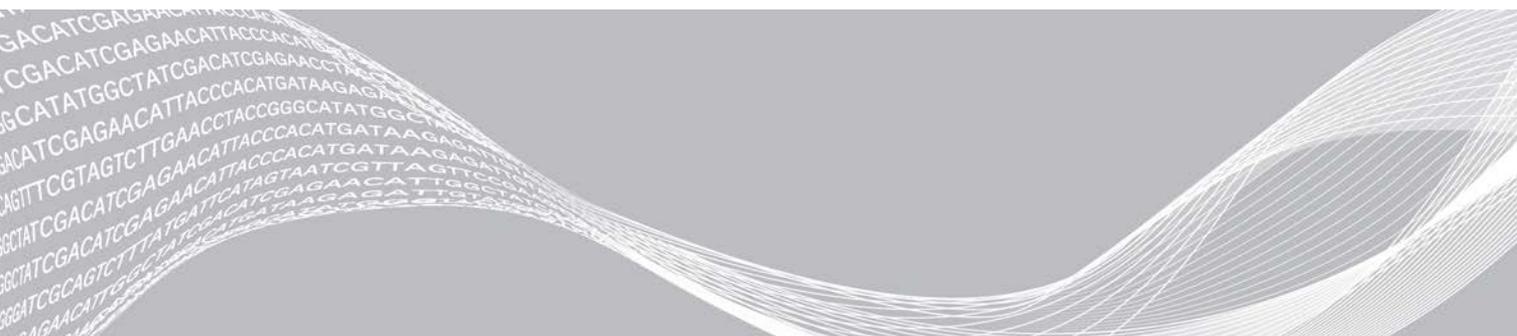


NovaSeq 6000

Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas

Visão geral	3
Materiais de consumo e equipamentos	4
Protocolo A: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento padrão)	5
Protocolo B: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento de Xp)	10
Protocolo C: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento padrão)	14
Protocolo D: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento Xp)	17
Protocolo E: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento padrão)	20
Protocolo F: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento Xp)	25
Histórico de revisões	32
Assistência técnica	33



Este documento e seu conteúdo são 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 registrada, 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 inteiramente lido e entendido 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 SOFTWARE).

© 2020 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.

Visão geral

Este guia explica como desnaturar e diluir bibliotecas preparadas para sequenciamento no sistema NovaSeq 6000™ Illumina®.

Este guia deve ser usado juntamente com o Guia do Sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358).

Orientações da biblioteca

Todas as instruções se aplicam a métodos de preparação de biblioteca compatíveis e presumem um tamanho de inserção típico para aplicações NovaSeq 6000 compatíveis.

- ▶ Para obter melhores resultados, agrupe e desnature bibliotecas para sequenciamento imediato.
- ▶ Dilua a biblioteca para uma concentração de carga apropriada para a aplicação. Uma concentração de carga muito baixa ou muito elevada tem um impacto negativo sobre a porcentagem de passagem de clusters pelo filtro (% de PF). Uma baixa concentração da biblioteca aumenta o sequenciamento de duplicados. Uma concentração excessivamente alta da biblioteca diminui a % de PF.
- ▶ A obtenção de uma % de PF ideal requer uma quantificação precisa da biblioteca e um controle de qualidade adequado. Para obter recomendações, consulte a documentação do seu kit de preparação de bibliotecas.
- ▶ Para protocolos de Xp, carregue um tubo de biblioteca vazio na posição n.º 8 do cartucho de cluster antes de configurar a execução do sequenciamento. O tubo de biblioteca vazio é usado para preparar a mistura condicionadora antes da distribuição para a lâmina de fluxo. A mistura condicionadora ajuda a aumentar a eficiência da clusterização para o sequenciamento.

Variações do protocolo

Siga o protocolo de desnaturação e diluição adequado para o procedimento usado durante a preparação da biblioteca.

- ▶ **Carregamento padrão (Protocolo A)** — As bibliotecas são normalizadas usando procedimentos padrão de quantificação e controle de qualidade de bibliotecas recomendados na documentação de preparação da biblioteca. Para essas bibliotecas, siga o *Protocolo A: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento padrão)* na página 5.
- ▶ **Carregamento Xp (Protocolo B)** — As bibliotecas são normalizadas usando procedimentos padrão de quantificação e controle de qualidade de bibliotecas recomendados na documentação de preparação da biblioteca. Para essas bibliotecas, siga o *Protocolo B: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento de Xp)* na página 10.
- ▶ **Bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA - (carregamento padrão - Protocolo C)** — Para bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA usando carregamento padrão, siga o *Protocolo C: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento padrão)* na página 14.
- ▶ **Bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA - (carregamento de Xp - Protocolo D)** — Para bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA usando carregamento de Xp, siga o *Protocolo D: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento Xp)* na página 17.
- ▶ **Bibliotecas TruSight Oncology 500 HT - (carregamento padrão - Protocolo E)** — Para bibliotecas TruSight Oncology 500 HT usando carregamento padrão, siga o *Protocolo E: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento padrão)* na página 20.

- ▶ **Bibliotecas TruSight Oncology 500 HT - (carregamento de Xp - Protocolo F)** — Para bibliotecas TruSight Oncology 500 HT usando carregamento de Xp, siga o *Protocolo F: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento Xp)* na página 25.

Práticas recomendadas

- ▶ Para obter melhores resultados, comece a descongelar os cartuchos de SBS e de cluster antes de desnaturar e diluir bibliotecas. Para obter instruções, consulte o *Guia do Sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358)*.

Materiais de consumo e equipamentos

Materiais de consumo

Os seguintes materiais de consumo são necessários para desnaturar e diluir bibliotecas.

Materiais de consumo	Fornecedor	Finalidade
[Protocolos A e B] 1 N NaOH	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição a 0,2 N para a desnaturação de bibliotecas.
[Protocolos A e B] 10 mM Tris-HCl, pH 8,5	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de bibliotecas e um controle de PhiX opcional antes da desnaturação.
[Protocolos A e B] 400 mM Tris-HCl, pH 8,0	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Neutralização de bibliotecas e um controle de PhiX opcional após a desnaturação.
[Protocolos C, D, E e F] 1 M Tris-HCl, pH 8,0	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Neutralização de bibliotecas e um controle de PhiX opcional após a desnaturação.
[Protocolos C, D, E e F] Água livre de RNase/DNase	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de NaOH para a desnaturação de bibliotecas. Diluição de Tween 20 e de hipoclorito de sódio para uma limpeza de manutenção.
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Uso geral.
Tubo de microcentrífuga, 1,5 ml	VWR, catálogo n.º 20170-038 ou equivalente	Combinação de volumes ao diluir NaOH e bibliotecas.
Pontas de pipeta, 20 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
Pontas de pipeta, 200 µl	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Pipetagem para diluição e carregamento de bibliotecas.
[Protocolos A e B] Água, aprovada para uso em laboratório	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Diluição de NaOH para a desnaturação de bibliotecas. Diluição de Tween 20 e de hipoclorito de sódio para uma limpeza de manutenção.
[Fluxo de trabalho do NovaSeq XP] Um dos seguintes kits: • Kit NovaSeq XP com 2 cavidades • Kit NovaSeq Xp com 4 cavidades	Illumina: • catálogo n.º 20021664 • catálogo n.º 20021665	Carregar bibliotecas manualmente na lâmina de fluxo: • Kit de duas cavidades para lâminas de fluxo SP, S1 e S2 • Kit de quatro cavidades para lâminas de fluxo S4

Materiais de consumo	Fornecedor	Finalidade
[Fluxo de trabalho do NovaSeq XP] Um dos seguintes kits: <ul style="list-style-type: none"> • Kit NovaSeq XP com 2 cavidades v1.5 • Kit NovaSeq XP com 4 cavidades v1.5 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • catálogo n.º 20043130 • catálogo n.º 20043131 	Carregar bibliotecas manualmente na lâmina de fluxo: <ul style="list-style-type: none"> • Kit de duas cavidades para lâminas de fluxo SP, S1 e S2 • Kit de quatro cavidades para lâminas de fluxo S4
[Fluxo de trabalho do NovaSeq XP] Tubos de 0,5 ml e 1,7 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório	Necessário para mistura de ExAmp.
[Fluxo de trabalho do NovaSeq XP] [Opcional] Um dos seguintes conjuntos do coletor: <ul style="list-style-type: none"> • Conjunto do coletor de duas cavidades do NovaSeq XP • Conjunto do coletor de quatro cavidades do NovaSeq XP 	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> • catálogo n.º 20021666 • catálogo n.º 20021667 	Coletores de reposição do NovaSeq Xp para carregamento manual de bibliotecas em uma lâmina de fluxo.
[Opcional] Controle de PhiX v3	Illumina, n.º do catálogo FC-110-3001	Fazer spike-in em um controle de PhiX.

PhiX e os seguintes materiais de consumo para desnaturação e diluição de bibliotecas são fornecidos no kit de preparação de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA e no kit de preparação de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT.

Materiais de consumo	Finalidade
RSB	Para a diluição de bibliotecas e a diluição e desnaturação do controle de PhiX opcional.
HP3	2 N NaOH para a desnaturação do controle de PhiX opcional.

Equipamento

O seguinte equipamento é usado para desnaturar bibliotecas que foram normalizadas usando um método baseado em beads.

Equipamento	Fornecedor
[Protocolos C, D, E e F] Bloco de aquecimento para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório

Protocolo A: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento padrão)

Use o Protocolo A para desnaturar e diluir bibliotecas que foram normalizadas usando procedimentos padrão de quantificação e controle de qualidade de bibliotecas recomendados na documentação de preparação da biblioteca.

Para carregamento de Xp, use o *Protocolo B: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento de Xp)* na página 10.

Para bibliotecas TSO500 ctDNA, siga o *Protocolo C: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento padrão)* na página 14 ou o *Protocolo D: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento Xp)* na página 17.

Para bibliotecas TSO500 HT, siga o *Protocolo E: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento padrão)* na página 20 ou o *Protocolo F: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento Xp)* na página 25.

Criar um pool de bibliotecas normalizadas

Use as seguintes instruções para normalizar bibliotecas para a concentração adequada e, em seguida, agrupe. As bibliotecas sequenciadas na mesma lâmina de fluxo devem ser combinadas em um único pool normalizado.

- 1 Consulte, na tabela a seguir, o número típico de leituras e a complexidade recomendada por aplicação e tipo de lâmina de fluxo.

Tabela 1 Complexidade recomendada do pool de bibliotecas

Aplicação	Tipo de lâmina de fluxo	Leituras tipo paired-end que passam pelo filtro por lâmina de fluxo (B)	Bibliotecas por cavidade
Genomas humanos	SP	1,3–1,6	~2
	S1	2,6–3,2	~4
	S2	6,6–8,2	~10
	S4	16–20	~24
Exomas	SP	1,3–1,6	~20
	S1	2,6–3,2	~40
	S2	6,6–8,2	~100
	S4	16–20	~250
Transcriptomas	SP	1,3–1,6	~16
	S1	2,6–3,2	~32
	S2	6,6–8,2	~82
	S4	16–20	~200

Normalizar as bibliotecas para o pool

- 1 Determine a concentração da biblioteca agrupada necessária com base na concentração da carga final desejada.

Consulte *Concentrações de carga recomendadas* na página 7.

Concentração de carga final (pM)	Concentração da biblioteca agrupada (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- 2 Normalize as bibliotecas para a concentração da biblioteca agrupada desejada usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
Para obter ajuda na diluição de bibliotecas para a concentração adequada, consulte o [Pooling Calculator no site da Illumina](#).

Concentrações de carga recomendadas

A concentração de carga de DNA ideal depende do tipo de biblioteca e do tamanho de inserção. A tabela a seguir fornece as concentrações de carga de DNA recomendadas com base em bibliotecas da Illumina com tamanhos de inserção ≤ 450 bp. Carregue bibliotecas com tamanhos de inserção menores na extremidade inferior do intervalo recomendado. Para bibliotecas >450 bp, podem ser necessárias concentrações de carga maiores.



OBSERVAÇÃO

Para bibliotecas geradas por métodos de preparação distintos dos da Illumina, talvez você precise executar inicialmente uma titulação do tipo específico da sua biblioteca para obter uma concentração ideal de semente para fornecer a melhor % de PF. Quando a concentração ideal é determinada, ela deve ser aplicável para tipos de bibliotecas idênticas à frente.

Tabela 2 Concentrações de carga recomendadas para fluxo de trabalho padrão (versão 1.1 ou posterior do software)

Tipo de biblioteca	Concentração de carga final (pM)	Concentração de carga agrupada (nM)
PhiX ¹	250	1,25
Pool de bibliotecas de DNA PCR-free da Illumina	400–600 ²	2–3 ²
Pool de bibliotecas de DNA TruSeq PCR-free	175–350	0,875–1,75
Pool de bibliotecas de DNA PCR-amplified	300–600	1,5–3,0
Lâmina única ³	250–500	1,25–2,5

¹ Para uma execução somente de PhiX.

² Calculada com base em 450 bp como tamanho mediano da inserção, 660 g/mol como massa de DNA e valores de concentração de ssQubit.

³ A lâmina única foi verificada somente para o fluxo de trabalho de Xp.

Se você tiver otimizado uma concentração de carga final para HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 ou HiSeq™ 3000, use 1,5× essa concentração para o NovaSeq 6000. Por exemplo, se a sua concentração de carga final para HiSeq X for 200 pM, use 300 pM no NovaSeq 6000.

Agrupar bibliotecas normalizadas e adicionar um controle PhiX opcional

- 1 Combinar o volume apropriado de cada biblioteca normalizada em um novo tubo de microcentrifuga para que seja produzido um dos seguintes volumes finais:

Modo	Volume final (µl)
SP/S1	100
S2	150
S4	310

Por exemplo, para um pool sêxtuplo de bibliotecas e modo S2, combine 25 µl de cada biblioteca que foi normalizada na mesma concentração. Ou, para um pool quádruplo e modo S1, combine 25 µl de cada biblioteca não desnaturada normalizada.

- 2 **[Opcional]** Armazene as bibliotecas *não agrupadas* restantes a uma temperatura de -25 °C a -15 °C.
- 3 **[Opcional]** Faça spike-in de 1% de PhiX não desnaturado da seguinte forma:
 - a Dilua 10 nM de PhiX em 2,5 nM usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
 - b Adicione o volume apropriado de PhiX 2,5 nM não desnaturado ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas.

Modo	PhiX 2,5 nM (µl) não desnaturado	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)
SP/S1	0,6	100
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Ao fazer spike-in em PhiX, 1% é a quantidade recomendada para bibliotecas bem equilibradas. Bibliotecas de baixa diversidade podem exigir mais. Para usar um controle de PhiX com bibliotecas de baixa diversidade, entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter orientações.

Preparar uma diluição fresca de NaOH

Prepare uma diluição *fresca* de 0,2 N de NaOH para desnaturar bibliotecas para o sequenciamento. Para evitar que pequenos erros de pipetagem afetem a concentração final de NaOH, é preparado um volume extra.



CUIDADO

É essencial usar a diluição fresca de 0,2 N de NaOH para o processo de desnaturação. A desnaturação inadequada pode reduzir o rendimento.

- 1 Combine os volumes a seguir em um tubo de microcentrífuga para diluir 1 N de NaOH em 0,2 N:

Tabela 3 Modo SP/S1/S2

Reagente	Volume para uma lâmina de fluxo (µl)	Volume para duas lâminas de fluxo (µl)
Água aprovada para uso em laboratório	40	80
Armazene 1 N de NaOH	10	20

Esses volumes resultam em 50 µl 0,2 N de NaOH para uma lâmina de fluxo ou 100 µl 0,2 N de NaOH para duas lâminas de fluxo.

Tabela 4 Modo S4

Reagente	Volume para uma lâmina de fluxo (µl)	Volume para duas lâminas de fluxo (µl)
Água aprovada para uso em laboratório	80	160
Armazene 1 N de NaOH	20	40

Esses volumes resultam em 100 µl 0,2 N de NaOH para uma lâmina de fluxo ou 200 µl 0,2 N de NaOH para duas lâminas de fluxo.

- 2 Inverta várias vezes para misturar ou agite completamente. Mantenha o tubo tampado e use em até **12 horas**.

Desnaturar pool de bibliotecas e controle de PhiX opcional

- 1 Adicione 0,2 N de NaOH ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas e PhiX opcional da seguinte maneira:

Lâmina de fluxo	0,2 N de NaOH	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)	Volume resultante
SP/S1	25	100	125 µl ou 125,6 µl com PhiX
S2	37	150	187 µl ou 187,9 µl com PhiX
S4	77	310	387 µl ou 388,9 µl com PhiX

- 2 Tampe e, em seguida, agite brevemente.
- 3 Centrifugue a 280 × g por até um minuto.
- 4 Incube à temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturar.
- 5 Adicione 400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 da seguinte forma, para neutralizar.

Modo	400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume resultante
SP/S1	25	150 µl ou 150,6 µl com PhiX
S2	38	225 µl ou 225,9 µl com PhiX
S4	78	465 µl ou 466,9 µl com PhiX

- 6 Tampe e, em seguida, agite brevemente.
- 7 Centrifugue a 280 × g por até um minuto.
- 8 Transfira o volume total da biblioteca desnaturada ou da biblioteca desnaturada e do PhiX para o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.
- 9 Prossiga imediatamente para o carregamento do tubo da biblioteca no cartucho de cluster e para a configuração da execução.
Os cartuchos de reagentes, incluindo o tubo da biblioteca, devem ser carregados no instrumento em até **30 minutos**.
- 10 **[Opcional]** Se não puder continuar imediatamente, tampe o tubo da biblioteca e armazene em -25 °C a -15 °C por até 3 semanas. Não congele novamente depois de descongelado.



CUIDADO

Armazene o tubo da biblioteca somente se necessário. O armazenamento de longo prazo entre -25 °C e -15 °C pode aumentar duplicados, reduzindo o rendimento.



OBSERVAÇÃO

Depois de desnaturar e diluir as bibliotecas e de preparar o controle de PhiX opcional, vá para *Preparar os cartuchos de SBS e cluster* na seção Fluxo de trabalho padrão do *Guia do Sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 100000019358).

Protocolo B: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento de Xp)

Use o Protocolo B para desnaturar e diluir bibliotecas que foram normalizadas usando procedimentos padrão de quantificação e controle de qualidade de bibliotecas recomendados na documentação de preparação da biblioteca. Para o carregamento de cavidades endereçável, consulte o capítulo Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp no Guia do Sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358).

Para carregamento padrão, use o *Protocolo A: Agrupar e desnaturar as bibliotecas para sequenciamento (carregamento padrão)* na página 5.

Para bibliotecas TSO500 ctDNA, siga o *Protocolo C: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento padrão)* na página 14 ou o *Protocolo D: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento Xp)* na página 17.

Para bibliotecas TSO500 HT, siga o *Protocolo E: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento padrão)* na página 20 ou o *Protocolo F: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento Xp)* na página 25.

Criar um pool de bibliotecas normalizadas

Use as seguintes instruções para normalizar bibliotecas para a concentração adequada e, em seguida, agrupe. As bibliotecas sequenciadas na mesma cavidade devem ser combinadas em um único pool. O volume total por cavidade de cada pool normalizado é mostrado na tabela a seguir. Se o mesmo pool for sequenciado em mais de uma cavidade, multiplique o valor da [Tabela 5](#) pelo número de cavidade.

Tabela 5 Volume total de bibliotecas agrupadas

Modo	Volume total de bibliotecas por cavidade (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Para o fluxo de trabalho Xp, é obtida a saída de dados para cada cavidade, ao contrário de todas as cavidades em conjunto para o fluxo de trabalho padrão. Como resultado, os pools de bibliotecas do fluxo de trabalho Xp contêm menos bibliotecas em comparação com o fluxo de trabalho padrão.

Consulte, na tabela a seguir, o número típico de leituras e a complexidade recomendada por aplicação e tipo de lâmina de fluxo.

Tabela 6 Complexidade recomendada do pool de bibliotecas

Aplicação	Tipo de lâmina de fluxo	Leituras tipo paired-end que passam pelo filtro por cavidade (B)	Bibliotecas por cavidade
Genomas humanos	SP	0,65 a 0,8	1
	S1	1,3–1,6	~2
	S2	3,3–4,1	~5
	S4	4,0–5,0	~6

Aplicação	Tipo de lâmina de fluxo	Leituras tipo paired-end que passam pelo filtro por cavidade (B)	Bibliotecas por cavidade
Exomas	SP	0,65 a 0,8	~10
	S1	1,3–1,6	~20
	S2	3,3–4,1	~50
	S4	4,0–5,0	~62
Transcriptomas	SP	0,65 a 0,8	~8
	S1	1,3–1,6	~16
	S2	3,3–4,1	~41
	S4	4,0–5,0	~50

Normalizar as bibliotecas para o pool

- Determine a concentração da biblioteca agrupada necessária com base na concentração da carga final desejada.

Consulte *Concentrações de carga recomendadas* na página 11.

Concentração de carga final (pM)	Concentração da biblioteca agrupada (nM)
100	0,5
150	0,75
200	1,0
250	1,25
300	1,5
350	1,75
400	2,0
450	2,25
500	2,5

- Normalize as bibliotecas para a concentração de carga da biblioteca agrupada desejada usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.

Para obter ajuda na diluição de bibliotecas para a concentração adequada, consulte o Pooling Calculator em support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html.

Concentrações de carga recomendadas

A concentração de carga de DNA ideal depende do tipo de biblioteca e do tamanho de inserção. A tabela a seguir fornece as concentrações de carga de DNA recomendadas com base em bibliotecas da Illumina com tamanhos de inserção ≤ 450 bp. Carregue bibliotecas com tamanhos de inserção menores na extremidade inferior do intervalo recomendado. Para bibliotecas > 450 bp, podem ser necessárias concentrações de carga maiores.

Tabela 7 Concentrações de carga recomendadas

Tipo de biblioteca	Concentração de carga final (pM)	Concentração de carga agrupada (nM)
PhiX ¹	100	0,5
Pool de bibliotecas de DNA PCR-free da Illumina	300–400 ²	1,5–2,0 ²
Pool de bibliotecas de DNA TruSeq PCR-free	115–235	0,575–1,175
Pool de bibliotecas de DNA PCR-amplified	200–400	1,0–2,0
Lâmina única	175 a 275	0,875 a 1,375

¹ Para uma execução somente de PhiX.

² Calculada com base em 450 bp como tamanho mediano da inserção, 660 g/mol como massa de DNA e valores de concentração de ssQubit.

Se você tiver otimizado a concentração de carga para HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 ou HiSeq™ 3000, use aproximadamente a mesma concentração para o fluxo de trabalho do NovaSeq XP. Se você tiver otimizado a concentração de carga para o fluxo de trabalho NovaSeq padrão, use cerca de 1/3 a menos para o fluxo de trabalho do NovaSeq XP.



OBSERVAÇÃO

Pode ser necessário titular as bibliotecas para obter a concentração de semeadura ideal. Quando a concentração ideal é determinada, ela é aplicável para tipos de bibliotecas idênticas.

Agrupar bibliotecas normalizadas e adicionar um controle PhiX opcional

- 1 Combinar o volume apropriado de cada biblioteca normalizada em um novo tubo de microcentrifuga para que sejam produzidos os volumes finais adequados por cavidade.

Modo	Volume total de bibliotecas por cavidade (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Por exemplo, para um pool sêxtuplo de bibliotecas e modo S4, combine 5 µl de cada biblioteca que foi normalizada na mesma concentração.

- 2 **[Opcional]** Armazene as bibliotecas *não agrupadas* restantes a uma temperatura de -25 °C a -15 °C.
- 3 **[Opcional]** Faça spike-in de 1% de PhiX não desnaturado da seguinte forma.
 - a Dilua 10 nM de PhiX em 0,25 nM usando 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.
 - b Adicione o volume apropriado de PhiX ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas.

Modo	PhiX 0,25 nM(µl) não desnaturado	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)
SP/S1	0,7	18
S2	0,8	22
S4	1,1	30

Ao fazer spike-in em PhiX, 1% é a quantidade recomendada para bibliotecas bem equilibradas. Bibliotecas de baixa diversidade podem exigir mais. Para usar um controle de PhiX com bibliotecas de baixa diversidade, entre em contato com o suporte técnico da Illumina para obter orientações.

Preparar uma diluição fresca de NaOH

Prepare uma diluição **fresca** de 0,2 N de NaOH para desnaturar bibliotecas para o sequenciamento. Para minimizar pequenos erros de pipetagem que possam afetar a concentração de NaOH final, prepare pelo menos 30 µl de NaOH diluído por lâmina de fluxo. Para uma execução de lâmina de fluxo dupla, prepare 60 µl de NaOH diluído.



CUIDADO

É essencial usar a diluição fresca de 0,2 N de NaOH para o processo de desnaturação. A desnaturação inadequada pode reduzir o rendimento.

- Para uma lâmina de fluxo, combine os volumes a seguir em um tubo de microcentrifuga para diluir 1 N de NaOH em 0,2 N:
 - ▶ Água aprovada para uso em laboratório (24 µl)
 - ▶ Armazene 1 N de NaOH (6 µl)
 Esses volumes resultam em 30 µl de 0,2 N de NaOH. Para duas lâminas de fluxo, dobre os volumes.
- Inverta várias vezes para misturar ou agite completamente. Mantenha o tubo tampado e use em até **12 horas**.

Desnaturar pool de bibliotecas e controle de PhiX opcional

- Adicione 0,2 N de NaOH ao tubo do pool de bibliotecas não desnaturadas e PhiX opcional da seguinte maneira:

Modo	0,2 N de NaOH (µl)	Pool de bibliotecas não desnaturadas (µl)	Volume resultante
SP/S1	4,0	18,0	22,0 µl ou 22,7 µl com PhiX
S2	5,0	22,0	27,0 µl ou 27,8 µl com PhiX
S4	7,0	30,0	37,0 µl ou 38,1 µl com PhiX

- Tampe e, em seguida, agite brevemente.
- Centrifugue no máximo a 280 × g durante 1 minuto.
- Incube à temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturar.
- Adicione 400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 da seguinte forma, para neutralizar.

Modo	400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume resultante
SP/S1	5,0	27,0 µl ou 27,7 µl com PhiX
S2	6,0	33,0 µl ou 33,8 µl com PhiX
S4	8,0	45,0 µl ou 46,1 µl com PhiX

- Tampe e, em seguida, agite brevemente.
- Centrifugue no máximo a 280 × g durante 1 minuto.
- Mantenha as bibliotecas desnaturadas em gelo até estarem prontas para a adição da mistura máster de ExAmp.
- [Opcional]** Se não puder continuar imediatamente, tampe o tubo e armazene em -25 °C a -15 °C por até três semanas. Não congele novamente depois de descongelado.



CUIDADO

Armazene os pools das bibliotecas desnaturadas somente se necessário. O armazenamento de longo prazo pode aumentar as duplicatas, que diminuem o rendimento.



OBSERVAÇÃO

Depois de desnaturar e diluir as bibliotecas e de preparar o controle de PhiX opcional, vá para *Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma* na seção Fluxo de trabalho do Xp do *Guia do Sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 1000000019358).

Protocolo C: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento padrão)

O fluxo de trabalho do NovaSeq padrão para bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA é usado para desnaturação e diluição de bibliotecas que serão carregadas no sistema NovaSeq 6000. Para o carregamento de cavidades endereçável, consulte o capítulo Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp no *Guia do sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 1000000019358). As bibliotecas preparadas usando o fluxo de trabalho TruSight Oncology 500 ctDNA são normalizadas em uma concentração inicial pronta para pooling de amostras.

Use o Protocolo C no sequenciamento de bibliotecas TSO500 ctDNA no modo S2 ou S4. Você pode sequenciar até oito bibliotecas por lâmina de fluxo S2 e até 16 bibliotecas por lâmina de fluxo S4.

Para carregamento de Xp, use o *Protocolo D: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento Xp)* na página 17.

Preparar controle de PhiX [opcional]

Preparação

- 1 Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.
- 2 Descongele um tubo de PhiX 10 nM (10 µl/tubo).
- 3 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dHP3 (HP3 diluído).
- 4 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dTris (Tris-HCl diluído).
- 5 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dPhiX (PhiX diluído).

Preparar uma diluição fresca de NaOH

- 1 Agite o HP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 2 Combine os volumes a seguir no tubo de dHP3.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agite o dHP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.

Preparar uma diluição fresca de Tris-HCl

- 1 Combine os volumes a seguir no tubo dTris.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agite o dTris para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir PhiX

- 1 Agite o RSB para misturar.
- 2 Agite o controle de PhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 3 Combine os volumes a seguir no tubo de dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Controle de PhiX (6,0 µl)
- 4 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 5 **[Opcional]** O dPhiX pode ser armazenado ade -25 °C a -15 °C por até 3 meses.

Desnaturar PhiX

- 1 Adicione 8 µl de dHP3 ao tubo de dPhiX.
- 2 Descarte o tubo de dHP3.
- 3 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 4 Coloque em temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5 Adicione imediatamente 8 µl de dTris ao tubo de dPhiX para neutralizar a reação.
- 6 Descarte o tubo de dTris.
- 7 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
A concentração final de PhiX é 2,5 nM.
- 8 **[Opcional]** Armazene PhiX 2,5 nM desnaturado de -25 °C a -15 °C por até 2 semanas.

Agrupar bibliotecas normalizadas

Preparação

Acesse a página de suporte do TruSight Oncology 500 ctDNA no site da Illumina para obter mais informações sobre o número de amostras por pool suportado por lâmina de fluxo.

- 1 Se a placa de bibliotecas normalizadas (NL) estiver armazenada, descongele-a à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugue-a a 280 × g por 1 minuto.
- 2 Preequeça o bloco de aquecimento a 96 °C.
- 3 Prepare um balde de gelo.

Procedimento

- 1 Prepare uma pipeta com 30 µl e pipete delicadamente para misturar as bibliotecas na placa NL cinco vezes.
 - ▶ Use pontas novas para cada biblioteca.Para obter o desempenho ideal no sequenciamento das bibliotecas, misture as bibliotecas conforme as instruções.
- 2 Prepare um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com tampa rosqueada rotulado PDL (bibliotecas de DNA agrupadas).

- Transfira volumes iguais de cada biblioteca de DNA da placa NL para o tubo PDL para gerar um dos seguintes volumes:

Modo	Volume recomendado do pool (µl)
S2	100
S4	200

Por exemplo, para um pool óctuplo de bibliotecas e modo S2, combine 12,5 µl de cada biblioteca que foi normalizada na mesma concentração.

- Agite o tubo de PDL para misturar.
- Centrifugue ligeiramente o tubo de PDL.

Desnaturar bibliotecas normalizadas

- Coloque o tubo de PDL no bloco de aquecimento a 96 °C durante 2 minutos.
- Coloque imediatamente em gelo por 5 minutos.
- Agite o tubo de PDL para misturar e centrifugue ligeiramente.
- Coloque o tubo de PDL em gelo.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURO

No caso de uma interrupção, armazene as bibliotecas desnaturadas a -25 °C a -15 °C por até 30 dias. Para usar pools de bibliotecas, descongele os tubos e repita *Desnaturar bibliotecas normalizadas* na página 16 antes de ir para a etapa seguinte.

Diluir bibliotecas e adicionar um controle de PhiX opcional

Preparar RSB

- Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.

Preparar PhiX 2,5 nM desnaturado

- Se o PhiX desnaturado estiver armazenado, remova o PhiX 2,5 nM desnaturado do armazenamento de -25 °C a -15 °C e descongele até a temperatura ambiente.
- Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir bibliotecas

- Prepare um novo tubo DIL1 de microcentrífuga de 1,5 ml (Diluição 1).
- Agite o tubo de PDL para misturar.
- Centrifugue ligeiramente o tubo de PDL.
- Adicione o volume apropriado de PDL e RSB ao tubo DIL1 conforme indicado a seguir.

Modo	PDL (µl)	RSB (µl)	Volume resultante (µl)
S2	< 65	160	225
S4	134	331	465

- 5 **[Opcional]** Adicione o volume apropriado de PhiX 2,5 nM desnaturado ao tubo DIL1 conforme mostrado a seguir.

Modo	PhiX 2,5 nM (µl)	Volume resultante (µl)
S2	0,9	225,9
S4	1,9	466,9

- 6 Agite o tubo DIL1 para misturar.
- 7 Centrifugue ligeiramente o tubo DIL1.
- 8 Transfira o volume total do tubo DIL1 para o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.
- 9 Vá imediatamente para *Preparar os cartuchos de SBS e cluster* na seção Fluxo de trabalho padrão do *Guia do Sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358)*.
Os cartuchos de reagentes, incluindo o tubo da biblioteca, devem ser carregados no instrumento em até **30 minutos**.

Protocolo D: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento Xp)

O fluxo de trabalho do NovaSeq Xp para bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA é usado para desnaturação e diluição de bibliotecas que serão carregadas no sistema NovaSeq 6000. As bibliotecas preparadas usando o fluxo de trabalho TruSight Oncology 500 ctDNA são normalizadas em uma concentração inicial pronta para pooling de amostras. Para o carregamento de cavidades endereçável, consulte o capítulo Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp no *Guia do sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358)*.

Use o Protocolo D no sequenciamento de bibliotecas TSO500 ctDNA no modo S4 para carregamento de cavidades endereçável. Você pode sequenciar até seis bibliotecas por cavidade.

Para carregamento padrão, use o *Protocolo C: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 ctDNA (carregamento padrão)* na página 14.

Preparar controle de PhiX [opcional]

Preparação

- 1 Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.
- 2 Descongele um tubo de PhiX 10 nM (10 µl/tubo).
- 3 Prepare um tubo de microcentrífuga rotulado como dHP3 (HP3 diluído).
- 4 Prepare um tubo de microcentrífuga rotulado como dTris (Tris-HCl diluído).
- 5 Prepare um tubo de microcentrífuga rotulado como dPhiX (PhiX diluído).

Preparar uma diluição fresca de NaOH

- 1 Agite o HP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 2 Combine os volumes a seguir no tubo de dHP3.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)

- 3 Agite o dHP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.

Preparar uma diluição fresca de Tris-HCl

- 1 Combine os volumes a seguir no tubo dTris.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agite o dTris para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir PhiX

- 1 Agite o RSB para misturar.
- 2 Agite o controle de PhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 3 Combine os volumes a seguir no tubo de dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Controle de PhiX (6,0 µl)
- 4 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 5 **[Opcional]** O dPhiX pode ser armazenado ade -25 °C a -15 °C por até 3 meses.

Desnaturar PhiX

- 1 Adicione 8 µl de dHP3 ao tubo de dPhiX.
- 2 Descarte o tubo de dHP3.
- 3 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 4 Coloque em temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5 Adicione imediatamente 8 µl de dTris ao tubo de dPhiX para neutralizar a reação.
- 6 Descarte o tubo de dTris.
- 7 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 8 Adicione 216 µl de RSB à solução de PhiX diluído e desnaturado.
- 9 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
A concentração final de PhiX é 0,25 nM.
- 10 **[Opcional]** Armazene PhiX 0,25 nM desnaturado de -25 °C a -15 °C por até 2 semanas.

Agrupar bibliotecas normalizadas

Preparação

Acesse a página de suporte do TruSight Oncology 500 ctDNA no site da Illumina para obter mais informações sobre o número de amostras por pool suportado por lâmina de fluxo.

- 1 Se a placa de bibliotecas normalizadas (NL) estiver armazenada, descongele-a à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugue-a a 280 × g por 1 minuto.
- 2 Preequeça o bloco de aquecimento a 96 °C.
- 3 Prepare um balde de gelo.

Procedimento

- 1 Prepare uma pipeta com 30 µl e pipete delicadamente para misturar as bibliotecas na placa NL cinco vezes.
 - Use pontas novas para cada biblioteca.
 Para obter o desempenho ideal no sequenciamento das bibliotecas, misture as bibliotecas conforme as instruções.

- 2 Prepare um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com tampa rosqueada rotulado PDL_L1 (bibliotecas de DNA agrupadas_Cavidade 1). Repita para todas as cavidades adicionais (consulte a [Tabela 8](#)).

Tabela 8 Convenção de nomenclatura do tubo PDL

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- 3 Transfira 5 µl de cada biblioteca de DNA normalizada da placa NL para o tubo PDL e, em seguida, repita para cada cavidade adicional.
- 4 Agite cada tubo de PDL para misturar.
- 5 Centrifugue ligeiramente cada tubo de PDL.

Desnaturar bibliotecas normalizadas

- 1 Coloque cada tubo de PDL em um bloco de aquecimento a 96 °C durante 2 minutos.
- 2 Coloque imediatamente em gelo por 5 minutos.
- 3 Agite cada tubo de PDL para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 4 Coloque os tubos de PDL em gelo.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURO

No caso de uma interrupção, armazene as bibliotecas desnaturadas a -25 °C a -15 °C por até 30 dias. Para usar pools de bibliotecas, descongele os tubos e repita *Desnaturar bibliotecas normalizadas* na página 19 antes de ir para a etapa seguinte.

Diluir bibliotecas e adicionar um controle de PhiX opcional

Preparar RSB

- 1 Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.

Preparar PhiX 0,25 nM desnaturado

- 1 Se o PhiX desnaturado estiver armazenado, remova o PhiX 0,25 nM desnaturado do armazenamento de -25 °C a -15 °C e descongele até a temperatura ambiente.
- 2 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir bibliotecas

- 1 Prepare um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com tampa rosqueada rotulado DIL1_L1 (Diluição 1_Cavidade 1). Repita para todas as cavidades adicionais (consulte a [Tabela 9](#)).

Tabela 9 Convenção de nomenclatura do tubo DIL1

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

- Agite os tubos de PDL para misturar.
- Centrifugue ligeiramente os tubos de PDL.
- Transfira o volume apropriado de PDL e RSB para o tubo DIL1 conforme indicado a seguir.

Modo	PDL (µl)	RSB (µl)	Volume resultante (µl)
S4	6,8	38,2	45

- [Opcional]** Adicione o volume apropriado de PhiX 0,25 nM desnaturado a cada tubo DIL1 conforme mostrado a seguir.

Modo	PhiX 0,25 nM (µl)	Volume resultante (µl)
S4	1,1	46,1

- Agite os tubos DIL1 para misturar.
- Centrifugue ligeiramente os tubos DIL1.
- Depois de desnaturar e diluir as bibliotecas e de preparar o controle de PhiX opcional, vá para *Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma* na seção Fluxo de trabalho do Xp do *Guia do Sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 1000000019358).

Protocolo E: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento padrão)

O fluxo de trabalho do NovaSeq padrão para bibliotecas TruSight Oncology 500 HT é usado para desnaturação e diluição de bibliotecas que serão carregadas no sistema NovaSeq 6000. Para o carregamento padrão, consulte o capítulo Fluxo de trabalho do NovaSeq padrão no *Guia do sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 1000000019358). As bibliotecas preparadas usando o fluxo de trabalho TruSight Oncology 500 HT são normalizadas em uma concentração inicial pronta para pooling de amostras.

Use o Protocolo E no sequenciamento de bibliotecas TSO500 HT no modo SP, S1, S2 ou S4 com carregamento padrão. Você pode sequenciar até 16 amostras por célula de fluxo SP, 32 amostras por célula de fluxo S1, 72 amostras por célula de fluxo S2 e até 192 amostras por célula de fluxo S4.

Acesse a página de suporte do TruSight Oncology 500 HT no site da Illumina para obter mais informações sobre o número de amostras por pool suportado por lâmina de fluxo.

Para carregamento de Xp, use o *Protocolo F: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento Xp)* na página 25.

Preparar controle de PhiX [opcional]

Preparação

- Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.
- Descongele um tubo de PhiX 10 nM (10 µl/tubo).
- Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dHP3 (HP3 diluído).
- Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dTris (Tris-HCl diluído).

- 5 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dPhiX (PhiX diluído).

Preparar uma diluição fresca de NaOH

- 1 Agite o HP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 2 Combine os volumes a seguir no tubo de dHP3.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agite o dHP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.

Preparar uma diluição fresca de Tris-HCl

- 1 Combine os volumes a seguir no tubo dTris.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agite o dTris para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir PhiX

- 1 Agite o RSB para misturar.
- 2 Agite o controle de PhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 3 Combine os volumes a seguir no tubo de dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Controle de PhiX (6,0 µl)
- 4 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 5 **[Opcional]** O dPhiX pode ser armazenado ade -25 °C a -15 °C por até 3 meses.

Desnaturar PhiX

- 1 Adicione 8 µl de dHP3 ao tubo de dPhiX.
- 2 Descarte o tubo de dHP3.
- 3 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 4 Coloque em temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5 Adicione imediatamente 8 µl de dTris ao tubo de dPhiX para neutralizar a reação.
- 6 Descarte o tubo de dTris.
- 7 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
A concentração final de PhiX é 2,5 nM.
- 8 **[Opcional]** Armazene PhiX 2,5 nM desnaturado de -25 °C a -15 °C por até 2 semanas.

Agrupar bibliotecas normalizadas

Preparação

Acesse a página de suporte do TruSight Oncology 500 HT no site da Illumina para obter mais informações sobre o número de amostras por pool suportado por lâmina de fluxo.

- 1 Se a placa de bibliotecas normalizadas (NL) estiver armazenada, descongele-a à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugue-a a $280 \times g$ por 1 minuto.
- 2 Preaqueça o bloco de aquecimento a 96°C .
- 3 Prepare um balde de gelo.

Procedimento

- 1 Prepare uma pipeta multicanal com $30\ \mu\text{l}$ e pipete delicadamente para misturar as bibliotecas na placa NL cinco vezes.
 - ▶ Use pontas novas para cada biblioteca.O desempenho do sequenciamento das bibliotecas será diminuído se as bibliotecas não forem suficientemente misturadas antes do pooling.
- 2 Selecione uma das seguintes opções para agrupar as bibliotecas normalizadas:
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas de amostras de RNA e de amostras de DNA simultaneamente, consulte *Agrupar RNA e DNA na página 22*.
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas somente de amostras de DNA, consulte *Agrupar somente DNA na página 22*.

Agrupar RNA e DNA

- 1 Prepare um tubo de microcentrifuga de $1,5\ \text{ml}$ com tampa rosqueada rotulado PRL (bibliotecas de RNA agrupadas).
 - ▶ Se estiver agrupando mais de 40 bibliotecas de RNA (cDNA), prepare um tubo TPRL (bibliotecas de RNA agrupadas transferidas) adicional de microcentrifuga de $1,5\ \text{ml}$ com tampa rosqueada.
- 2 Prepare um tubo de microcentrifuga de $1,5\ \text{ml}$ com tampa rosqueada rotulado PDL (bibliotecas de DNA agrupadas).
 - ▶ Se estiver agrupando mais de 40 bibliotecas de DNA, prepare um tubo TPDL (bibliotecas de DNA agrupadas transferidas) adicional de microcentrifuga de $1,5\ \text{ml}$ com tampa rosqueada.
- 3 Transfira $5\ \mu\text{l}$ de cada biblioteca de RNA normalizada da placa NL para o tubo PRL.
- 4 Transfira $5\ \mu\text{l}$ de cada biblioteca de DNA normalizada da placa NL para o tubo PDL.
- 5 Agite cada tubo para misturar.
- 6 Centrifugue ligeiramente cada tubo.
- 7 Se o tubo PRL contiver mais de 40 bibliotecas de RNA, transfira $200\ \mu\text{l}$ do tubo PRL para o tubo TPRL e, em seguida, descarte o tubo PRL.
- 8 Se o tubo PDL contiver mais de 40 bibliotecas de DNA, transfira $200\ \mu\text{l}$ do tubo PDL para o tubo TPDL e, em seguida, descarte o tubo PDL.
- 9 Vá para *Desnaturar bibliotecas normalizadas na página 23*.

Agrupar somente DNA

- 1 Prepare um tubo de microcentrifuga de $1,5\ \text{ml}$ com tampa rosqueada rotulado PDL (bibliotecas de DNA agrupadas).
 - ▶ Se estiver agrupando mais de 40 bibliotecas de DNA, prepare um tubo TPDL (bibliotecas de DNA agrupadas transferidas) adicional de microcentrifuga de $1,5\ \text{ml}$ com tampa rosqueada.
- 2 Transfira $5\ \mu\text{l}$ de cada biblioteca de DNA normalizada da placa NL para o tubo PDL.

- 3 Agite o tubo de PDL para misturar.
- 4 Centrifugue ligeiramente o tubo de PDL.
- 5 Se o tubo PDL contiver mais de 40 bibliotecas de DNA, transfira 200 µl do tubo PDL para o tubo TPDL e, em seguida, descarte o tubo PDL.

Desnaturar bibliotecas normalizadas

- 1 Agite e centrifugue ligeiramente cada um dos tubos a seguir.
 - ▶ PRL (≤40 bibliotecas de RNA) ou TPRL (>40 bibliotecas de RNA)
 - ▶ PDL (≤40 bibliotecas de DNA) ou TPDL (>40 bibliotecas de DNA)
- 2 Coloque em um bloco de aquecimento a 96 °C durante 2 minutos.
- 3 Coloque imediatamente em gelo por 5 minutos.
- 4 Agite cada tubo para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 5 Coloque os tubos em gelo.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURO

No caso de uma interrupção, armazene as bibliotecas desnaturadas a -25 °C a -15 °C por até 30 dias. Para usar pools de bibliotecas, descongele os tubos e repita *Desnaturar bibliotecas normalizadas na página 29* antes de ir para a etapa seguinte.

Diluir bibliotecas e adicionar um controle de PhiX opcional

Preparar RSB

- 1 Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.

Preparar PhiX 2,5 nM desnaturado

- 1 Se o PhiX desnaturado estiver armazenado, remova o PhiX 2,5 nM desnaturado do armazenamento de -25 °C a -15 °C e descongele até a temperatura ambiente.
- 2 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir bibliotecas

- 1 Prepare um novo tubo DIL1 de microcentrifuga de 1,5 ml (Diluição 1).
- 2 Selecione uma das seguintes opções para diluir suas bibliotecas:
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas de amostras de RNA e de amostras de DNA simultaneamente, consulte *Diluir bibliotecas de RNA e DNA na página 23*.
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas somente de amostras de DNA, consulte *Diluir somente bibliotecas de DNA na página 24*.

Diluir bibliotecas de RNA e DNA

- 1 Agite e centrifugue ligeiramente cada um dos tipos de tubos a seguir:
 - ▶ PRL (≤40 bibliotecas de RNA) ou TPRL (>40 bibliotecas de RNA)
 - ▶ PDL (≤40 bibliotecas de DNA) ou TPDL (>40 bibliotecas de DNA)

- 2 Transfira o volume apropriado de PRL ou TPRL desnaturado para o tubo DIL1.

Modo	PRL ou TPRL (µl)
SP/S1	10,4
S2	15,6
S4	32,2

- 3 Transfira o volume apropriado de PDL ou TPDL desnaturado para o tubo DIL1.

Modo	PDL ou TPDL (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	41,6	52
S2	62,4	78
S4	128,8	161

- 4 Adicione o volume apropriado de RSB ao tubo DIL1.

Modo	RSB (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	98	150
S2	147	225
S4	304	465

- 5 **[Opcional]** Adicione o volume apropriado de PhiX 2,5 nM desnaturado ao tubo DIL1.

Modo	PhiX 2,5 nM (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	0,6	150,6
S2	0,9	225,9
S4	1,9	466,9

- 6 Agite o tubo DIL1 para misturar.

- 7 Centrifugue ligeiramente o tubo DIL1.

- 8 Transfira o volume total do tubo DIL1 para o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.

- 9 Vá imediatamente para *Preparar os cartuchos de SBS e cluster* na seção Fluxo de trabalho padrão do *Guia do Sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358)*.

Os cartuchos de reagentes, incluindo o tubo da biblioteca, devem ser carregados no instrumento em até **30 minutos**.



OBSERVAÇÃO

Use 10 ciclos de índice quando sequenciar bibliotecas TSO500 HT.

Diluir somente bibliotecas de DNA

- 1 Agite o tubo e centrifugue ligeiramente.

- ▶ PDL (≤40 bibliotecas de DNA)
- ▶ TPDL (>40 bibliotecas de DNA)

- 2 Adicione o volume apropriado de PDL ou TPDL ao tubo DIL1.

Modo	PDL ou TPDL (µl)
SP/S1	52
S2	78
S4	161

- 3 Adicione o volume apropriado de RSB ao tubo DIL1.

Modo	RSB (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	98	150
S2	147	225
S4	304	465

- 4 **[Opcional]** Adicione o volume apropriado de PhiX 2,5 nM desnaturado ao tubo DIL1.

Modo	PhiX 2,5 nM (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	0,6	150,6
S2	0,9	225,9
S4	1,9	466,9

- 5 Agite o tubo DIL1 para misturar.
- 6 Centrifugue ligeiramente o tubo DIL1.
- 7 Transfira o volume total do tubo DIL1 para o tubo da biblioteca fornecido com o kit de reagentes NovaSeq 6000.
- 8 Vá imediatamente para *Preparar os cartuchos de SBS e cluster* na seção Fluxo de trabalho padrão do *Guia do Sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358)*. Os cartuchos de reagentes, incluindo o tubo da biblioteca, devem ser carregados no instrumento em até **30 minutos**.



OBSERVAÇÃO

Use 10 ciclos de índice quando sequenciar bibliotecas TSO500 HT.

Protocolo F: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento Xp)

O fluxo de trabalho do NovaSeq Xp para bibliotecas TruSight Oncology 500 HT é usado para desnaturação e diluição de bibliotecas que serão carregadas no sistema NovaSeq 6000. Para o carregamento de cavidades endereçável, consulte o capítulo Fluxo de trabalho do NovaSeq Xp no *Guia do sistema NovaSeq 6000 (documento n.º 1000000019358)*. As bibliotecas preparadas usando o fluxo de trabalho TruSight Oncology 500 HT são normalizadas em uma concentração inicial pronta para pooling de amostras.

Use o Protocolo F no sequenciamento de bibliotecas TSO500 HT no modo SP, S1, S2 ou S4 com carregamento Xp. Você pode sequenciar até oito amostras por cavidade em uma célula de fluxo SP, 16 amostras por cavidade em uma célula de fluxo S1, 36 amostras por cavidade em uma célula de fluxo S2 e 48 amostras por cavidade em uma célula de fluxo S4.

Acesse a página de suporte do TruSight Oncology 500 HT no site da Illumina para obter mais informações sobre o número de amostras por pool suportado por lâmina de fluxo.

Para carregamento padrão, use o *Protocolo E: Método de desnaturação e diluição de bibliotecas TruSight Oncology 500 HT (carregamento padrão)* na página 20.

Preparar controle de PhiX [opcional]

Preparação

- 1 Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.
- 2 Descongele um tubo de PhiX 10 nM (10 µl/tubo).
- 3 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dHP3 (HP3 diluído).
- 4 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dTris (Tris-HCl diluído).
- 5 Prepare um tubo de microcentrifuga rotulado como dPhiX (PhiX diluído).

Preparar uma diluição fresca de NaOH

- 1 Agite o HP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 2 Combine os volumes a seguir no tubo de dHP3.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agite o dHP3 para misturar e centrifugue ligeiramente.

Preparar uma diluição fresca de Tris-HCl

- 1 Combine os volumes a seguir no tubo dTris.
 - ▶ Água livre de RNase/DNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agite o dTris para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir PhiX

- 1 Agite o RSB para misturar.
- 2 Agite o controle de PhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 3 Combine os volumes a seguir no tubo de dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Controle de PhiX (6,0 µl)
- 4 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 5 **[Opcional]** O dPhiX pode ser armazenado ade -25 °C a -15 °C por até 3 meses.

Desnaturar PhiX

- 1 Adicione 8 µl de dHP3 ao tubo de dPhiX.
- 2 Descarte o tubo de dHP3.
- 3 Agite o tubo de dPhiX para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 4 Coloque em temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5 Adicione imediatamente 8 µl de dTris ao tubo de dPhiX para neutralizar a reação.

- 6 Descarte o tubo de dTris.
- 7 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 8 Adicione 216 µl de RSB ao tubo de dPhiX.
- 9 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
A concentração final de PhiX é 0,25 nM.
- 10 **[Opcional]** Armazene PhiX 0,25 nM desnaturado de -25 °C a -15 °C por até 2 semanas.

Agrupar bibliotecas normalizadas

Preparação

Acesse a página de suporte do TruSight Oncology 500 HT no site da Illumina para obter mais informações sobre o número de amostras por pool suportado por lâmina de fluxo.

- 1 Se a placa de bibliotecas normalizadas (NL) estiver armazenada, descongele-a à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugue-a a 280 × g por 1 minuto.
- 2 Preequeça o bloco de aquecimento a 96 °C.
- 3 Prepare um balde de gelo.

Procedimento

- 1 Prepare uma pipeta multicanal com 30 µl e pipete delicadamente para misturar as bibliotecas na placa NL cinco vezes.
 - ▶ Use pontas novas para cada biblioteca.O desempenho do sequenciamento das bibliotecas será diminuído se as bibliotecas não forem suficientemente misturadas antes do pooling.
- 2 Selecione uma das seguintes opções para agrupar as bibliotecas normalizadas.
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas de amostras de RNA e de amostras de DNA simultaneamente, consulte *Agrupar RNA e DNA na página 27*.
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas somente de amostras de DNA, consulte *Agrupar somente DNA na página 28*.



OBSERVAÇÃO

No procedimento, use as tabelas de convenção de nomenclatura como guias para a rotulagem dos tubos. Certifique-se de que os tubos que você transferir tenham a rotulagem correta para a cavidade da lâmina de fluxo correspondente.

Agrupar RNA e DNA

- 1 Prepare um tubo PRL de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa rosqueada com o número da cavidade da lâmina de fluxo. Repita para todas as cavidades adicionais. Use a *Tabela 10* como guia.
 - ▶ Se estiver agrupando mais de 40 bibliotecas de RNA (cDNA), prepare um tubo TPRL adicional de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa rosqueada com o número da cavidade da lâmina de fluxo. Repita para todas as cavidades adicionais.

Tabela 10 Convenção de nomenclatura para tubos de RNA

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
SP/S1	PRL_L1	PRL_L2	N/A	N/A
S2	PRL_L1	PRL_L2	N/A	N/A
S4	PRL_L1	PRL_L2	PRL_L3	PRL_L4

- Prepare um tubo PDL de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa rosqueada com o número da cavidade da lâmina de fluxo. Repita para todas as cavidades adicionais. Use a [Tabela 11](#) como guia.
 - Se estiver agrupando mais de 40 bibliotecas de DNA, prepare um tubo TPDL adicional de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa rosqueada com o número da cavidade da lâmina de fluxo. Repita para todas as cavidades adicionais.

Tabela 11 Convenção de nomenclatura para tubos de DNA

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
SP/S1	PDL_L1	PDL_L2	N/A	N/A
S2	PDL_L1	PDL_L2	N/A	N/A
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- Transfira 5 µl de cada biblioteca de RNA normalizada da placa NL para o tubo PRL. Repita para todas as cavidades adicionais.
- Transfira 5 µl de cada biblioteca de DNA normalizada da placa NL para o tubo PDL. Repita para todas as cavidades adicionais.
- Agite cada tubo para misturar.
- Centrifugue ligeiramente cada tubo.
- Se o tubo PRL contiver mais de 40 bibliotecas de RNA, transfira 200 µl do tubo PRL para o tubo TPRL e, em seguida, descarte o tubo PRL. Repita para todas as cavidades adicionais.
- Se o tubo PDL contiver mais de 40 bibliotecas de DNA, transfira 200 µl do tubo PDL para o tubo TPDL e, em seguida, descarte o tubo PDL. Repita para todas as cavidades adicionais.
- Vá para [Desnaturar bibliotecas normalizadas na página 29](#).

Agrupar somente DNA

- Prepare um tubo PDL de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa rosqueada com o número da cavidade da lâmina de fluxo. Repita para todas as cavidades adicionais. Use a [Tabela 12](#) como guia.

Tabela 12 Convenção de nomenclatura para tubos de DNA

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
SP/S1	PDL_L1	PDL_L2	N/A	N/A
S2	PDL_L1	PDL_L2	N/A	N/A
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- Se estiver agrupando mais de 40 bibliotecas de DNA, prepare um tubo TPRL (bibliotecas de DNA agrupadas transferidas) adicional de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa rosqueada com o número da cavidade da lâmina de fluxo. Repita para todas as cavidades adicionais.
- Transfira 5 µl de cada biblioteca de DNA normalizada da placa NL para o tubo PDL. Repita para todas as cavidades adicionais.

- 3 Agite cada tubo para misturar.
- 4 Centrifugue ligeiramente cada tubo.
- 5 Se o tubo PDL contiver mais de 40 bibliotecas de DNA, transfira 200 µl do tubo PDL para o tubo TPDL e, em seguida, descarte o tubo PDL. Repita para todas as cavidades adicionais.

Desnaturar bibliotecas normalizadas

- 1 Agite e centrifugue ligeiramente cada um dos tubos a seguir:
 - ▶ PRL (≤ 40 bibliotecas de RNA) ou TPRL (> 40 bibliotecas de RNA)
 - ▶ PDL (≤ 40 bibliotecas de DNA) ou TPDL (> 40 bibliotecas de DNA)
- 2 Coloque em um bloco de aquecimento a 96 °C durante 2 minutos.
- 3 Coloque imediatamente em gelo por 5 minutos.
- 4 Agite cada tubo para misturar e centrifugue ligeiramente.
- 5 Coloque os tubos em gelo.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURO

No caso de uma interrupção, armazene as bibliotecas desnaturadas a -25 °C a -15 °C por até 30 dias. Para usar pools de bibliotecas, descongele os tubos e repita *Desnaturar bibliotecas normalizadas* na página 29 antes de ir para a etapa seguinte.

Diluir bibliotecas e adicionar um controle de PhiX opcional

Preparar RSB

- 1 Tire o RSB do armazenamento de 2 °C a 8 °C ou -25 °C a -15 °C e coloque-o na temperatura ambiente.

Preparar PhiX 0,25 nM desnaturado

- 1 Se o PhiX desnaturado estiver armazenado, remova o PhiX 0,25 nM desnaturado do armazenamento de -25 °C a -15 °C e descongele até a temperatura ambiente.
- 2 Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

Diluir bibliotecas

- 1 Selecione uma das seguintes opções para diluir suas bibliotecas.
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas de amostras de RNA e de amostras de DNA simultaneamente, consulte *Diluir bibliotecas de RNA e DNA* na página 29.
 - ▶ Para sequenciar bibliotecas derivadas somente de amostras de DNA, consulte *Diluir somente bibliotecas de DNA* na página 31.

Diluir bibliotecas de RNA e DNA

- 1 Prepare um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com tampa de rosca para combinar bibliotecas de PRL e PDL. Repita para todas as cavidades adicionais. Use a [Tabela 13](#) como guia.

Tabela 13 Convenção de nomenclatura para tubos combinados de PRL e PDL

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
SP/S1	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	N/A	N/A
S2	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	N/A	N/A
S4	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	PRL+PDL_L3	PRL+PDL_L4

- 2 Agite e centrifugue ligeiramente cada um dos tipos de tubos a seguir:
 - ▶ PRL (≤ 40 bibliotecas de RNA) ou TPRL (> 40 bibliotecas de RNA)
 - ▶ PDL (≤ 40 bibliotecas de DNA) ou TPDL (> 40 bibliotecas de DNA)
- 3 Transfira 5 μl de cada tubo de PRL ou TPRL para o tubo de PRL+PDL correspondente.
- 4 Transfira 20 μl de cada tubo de PDL ou TPDL para o tubo de PRL+PDL correspondente.
- 5 Agite os tubos de PRL+PDL para misturar.
- 6 Centrifugue ligeiramente os tubos de PRL+PDL.
- 7 Prepare um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa de rosca para diluir as bibliotecas de PRL+PDL combinadas. Repita para todas as cavidades adicionais. Use a [Tabela 14](#) como guia.

Tabela 14 Convenção de nomenclatura para tubos DIL 1

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
SP/S1	DIL1_L1	DIL1_L2	N/A	N/A
S2	DIL1_L1	DIL1_L2	N/A	N/A
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

- 8 Transfira o volume apropriado de PRL e PDL combinados para cada um dos tubos DIL1 correspondentes.

Lâmina de fluxo	PRL+PDL (μl)
SP/S1	4
S2	5
S4	6,8

- 9 Transfira o volume apropriado de RSB para cada um dos tubos DIL1 correspondentes.

Lâmina de fluxo	RSB (μl)	Volume resultante (μl)
SP/S1	23	27
S2	28	33
S4	38,2	45

- 10 **[Opcional]** Adicione o volume apropriado de PhiX 0,25 nM desnaturado a cada um dos tubos DIL1 correspondentes.

Lâmina de fluxo	PhiX 0,25 nM (μl)	Volume resultante (μl)
SP/S1	0,7	27,7
S2	0,8	33,8
S4	1,1	46,1

- 11 Agite os tubos DIL1 para misturar.
- 12 Centrifugue ligeiramente os tubos DIL1.

- 13 Depois de desnaturar e diluir as bibliotecas e de preparar o controle de PhiX opcional, vá para *Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma* na seção Fluxo de trabalho do Xp do *Guia do Sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 1000000019358).



OBSERVAÇÃO

Use 10 ciclos de índice quando sequenciar bibliotecas TSO500 HT.

Diluir somente bibliotecas de DNA

- 1 Prepare um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com tampa de rosca para diluir as bibliotecas de PDL. Repita para todas as cavidades adicionais. Use a [Tabela 15](#) como guia.

Tabela 15 Convenção de nomenclatura para tubos

Lâmina de fluxo	Cavidade 1	Cavidade 2	Cavidade 3	Cavidade 4
SP/S1	DIL1_L1	DIL1_L2	N/A	N/A
S2	DIL1_L1	DIL1_L2	N/A	N/A
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

- 2 Agite o tubo e centrifugue ligeiramente os tubos de PDL ou TPDL.
3 Transfira o volume apropriado de PDL ou TPDL para cada um dos tubos DIL1 correspondentes.

Lâmina de fluxo	PDL ou TPDL (µl)
SP/S1	4
S2	5
S4	6,8

- 4 Transfira o volume apropriado de RSB para cada um dos tubos DIL1 correspondentes.

Lâmina de fluxo	RSB (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	23	27
S2	28	33
S4	38,2	45

- 5 **[Opcional]** Adicione o volume apropriado de PhiX 0,25 nM desnaturado a cada um dos tubos DIL1 correspondentes.

Lâmina de fluxo	PhiX 0,25 nM (µl)	Volume resultante (µl)
SP/S1	0,7	27,7
S2	0,8	33,8
S4	1,1	46,1

- 6 Agite os tubos DIL1 para misturar.
7 Centrifugue ligeiramente os tubos DIL1.
8 Depois de desnaturar e diluir as bibliotecas e de preparar o controle de PhiX opcional, vá para *Preparar a lâmina de fluxo e a plataforma* na seção Fluxo de trabalho do Xp do *Guia do Sistema NovaSeq 6000* (documento n.º 1000000019358).



OBSERVAÇÃO

Use 10 ciclos de índice quando sequenciar bibliotecas TSO500 HT.

Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000106351 v03	Novembro de 2020	Adicionadas informações sobre ciclos de índice no sequenciamento de bibliotecas de alta produtividade TruSight Oncology 500.
Documento n.º 1000000106351 v02	Julho de 2020	Adicionadas informações no suporte do Kit de reagentes NovaSeq 6000 v1.5.
Documento n.º 1000000106351 v01	Março de 2020	Adicionados Protocolos E e F para métodos de carregamento TruSight Oncology 500 HT padrão e Xp.
Documento n.º 1000000106351 v00	Janeiro de 2020	Versão inicial.

Assistência técnica

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

Site: www.illumina.com
 E-mail: techsupport@illumina.com

Telefones do suporte ao cliente da Illumina

Região	Ligação gratuita	Regional
América do Norte	+1(800) 809-4566	
Alemanha	+49 8001014940	+49 8938035677
Austrália	1-800-775-688	
Áustria	+43 800006249	+43 19286540
Bélgica	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Coreia do Sul	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80820183	+45 89871156
Espanha	+34 911899417	+34 800300143
Finlândia	+358 800918363	+358 974790110
França	+33 805102193	+33 170770446
Hong Kong, China	800960230	
Irlanda	+353 1800936608	+353 016950506
Itália	+39 800985513	+39 236003759
Japão	0800-111-5011	
Noruega	+47 800 16836	+47 21939693
Nova Zelândia	0800.451.650	
Países Baixos	+31 8000222493	+31 207132960
Reino Unido	+44 8000126019	+44 2073057197
Singapura	1-800-579-2745	
Suécia	+46 850619671	+46 200883979
Suíça	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan, China	00806651752	
Outros países	+44-1799-534000	

Fichas de dados de segurança (SDSs) — Disponíveis no site da Illumina em support.illumina.com/sds.html.

Documentação do produto – Disponível para download em support.illumina.com.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Califórnia 92122, EUA
+1 (800) 809-ILMN (4566)
+1 (858) 202-4566 (fora da América do Norte)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

Somente para pesquisa. Não deve ser usado para procedimentos de diagnóstico.

© 2020 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

illumina[®]