

## **SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

A Plataforma de Sequenciamento de Nova Geração está equipada com os seguintes equipamentos: plataforma HISEQ2500 e MiSEQ da Illumina® e S5 da Thermo Fisher® para realização do sequenciamento de Nova Geração (NGS).

As principais aplicações do serviço de NGS são as seguintes:

### **DNA-seq:**

- Sequenciamento “de novo” de genomas simples e complexos
- Ressequenciamento de genomas
- Sequenciamento de exomas
- Sequenciamento de painéis gênicos
- Outras aplicações: sob consulta. Favor entrar em contato com a Plataforma.

### **RNA-seq:**

- Sequenciamento de transcriptomas completos
- Outras aplicações: sob consulta. Favor entrar em contato com a Plataforma.

## **COMO UTILIZAR OS SERVIÇOS: CADASTRO DO GRUPO DE PESQUISA E FORMULÁRIO DE ENVIO DAS AMOSTRAS**

Para utilizar os serviços da Plataforma é necessário que o interessado faça um cadastro no site da Rede de Plataformas Tecnológicas (<https://plataformas.fiocruz.br/>). Será através desse cadastro que as informações como a liberação de resultados e o faturamento dos serviços realizados serão encaminhados para o cliente.

Com o cadastro inicial, o cliente irá receber, através do e-mail cadastrado, o login e senha de acesso ao sistema da Rede de Plataformas Tecnológicas para poder preencher o formulário para envio de amostras para o sequenciamento, acessar e fazer download dos resultados e alterar os dados para o pagamento dos serviços.

## **CONTROLE DE QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS**

A Plataforma não faz extração ou purificação de amostras de DNA/RNA. A responsabilidade pela preparação (extração, purificação, quantificação, etc), armazenamento, transporte, entrega de amostras de DNA/RNA na Plataforma é do cliente/ solicitante responsável pelo projeto. A Plataforma não se responsabiliza por qualquer prejuízo ou degradação sofrida pelas amostras de DNA devido a problemas durante o processo desde a preparação até a chegada destas a Plataforma.

Um dos pontos mais críticos no sequenciamento de Nova Geração é a qualidade das amostras. A qualidade do resultado do sequenciamento será diretamente proporcional à qualidade das amostras. Por isso, todas as amostras recebidas na Plataforma são primeiramente avaliadas utilizando o equipamento TapeStation da Agilent® para verificar a sua pureza e integridade. Para amostras de RNA é obtido o RIN (RNA Integrity Number) que deve ser maior ou igual a 8 e para amostras de DNA é observado o perfil da curva e do gel virtual obtidos para constatação de que não há picos ou arrastes característicos de DNA degradado. Amostras de RNA com RIN menor que 8 e amostras de DNA que apresentem degradação não estão aptas para a preparação das bibliotecas e deverão ser substituídas. O cliente será informado por e-mail dos resultados de qualidade das suas amostras e sobre amostras que deverão ser substituídas.

As amostras íntegras seguem para quantificação no equipamento Qubit da Thermo Fisher® para verificar se apresentam a massa/contração mínima necessária para a preparação das bibliotecas. A tabela a seguir mostra as massas/concentrações mínimas necessárias para a preparação em cada caso. As amostras que não apresentarem a massa mínima necessária para a preparação das bibliotecas deverão ser substituídas. Neste caso o cliente também será informado por e-mail caso alguma amostra precise ser substituída.

As amostras rejeitadas ficarão disponíveis durante três meses para que o cliente venha retirá-las, depois deste prazo estas amostras rejeitadas serão descartadas. As amostras aprovadas para sequenciamento, ficarão disponíveis por três meses após a data de envio dos resultados brutos, depois desse prazo também serão descartadas.

## MASSA NECESSÁRIA PARA PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS

As amostras que passarem pelo controle de qualidade inicial, seguem para a preparação de bibliotecas. A Plataforma disponibiliza o serviço de preparação de bibliotecas para sequenciamento NGS dos seguintes tipos: DNA, DNA mate-pair, exoma humano e RNA. A tabela a seguir mostra os tipos de bibliotecas que são preparadas, o kit que é utilizado para o preparo em cada caso e a quantidade de material de partida necessário em cada caso.

| <b>Tipo de Biblioteca</b><br><b>Kit utilizado para preparação</b>                                                                                        | <b>Massa/concentração mínima</b><br><b>necessária</b>                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DNA</b><br>Illumina TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit LT (F-121-3001)<br><br>Illumina Nextera DNA Sample Preparation Kit (FC-121-1031)       | 2 microgramas de DNA em um volume máximo de 50 microlitros de água ultra pura                                                                                        |
| <b>DNA mate-pair</b><br>Illumina Nextera Mate Pair Sample Preparation Kit (FC-132-1001) – somente protocolo GEL FREE                                     | 4 microgramas de DNA em um volume máximo de 50 microlitros de água ultra pura                                                                                        |
| <b>DNA exoma humano</b><br>Illumina Nextera Rapid Capture Exome Kit (FC-140-1083)<br><br>Illumina Nextera Rapid Capture Expanded Exome Kit (FC-140-1004) | 2 microgramas de DNA em um volume máximo de 50 microlitros de água ultra pura                                                                                        |
| <b>RNA-seq</b><br>Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit (RS-122-2001)<br><br>Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (RS-122-2101)     | RNA total*: 2 microgramas em um volume máximo de 50 microlitros de água ultra pura<br>mRNA*: 400 nanogramas em um volume máximo de 10 microlitros de água ultra pura |

\*No caso de amostras de RNA, o protocolo Illumina utiliza a cauda Poly-A para eliminação de RNA ribossomal. No caso de procariotos, que não possuem cauda Poly-A é de responsabilidade do cliente a remoção do RNA ribossomal e a entrega de amostras contendo somente RNA mensageiro ou realizar aquisição de kit específico indicado pela plataforma a ser enviado juntamente com as amostras.

Caso o cliente queira sequenciar outros tipos de material, a construção das bibliotecas é de própria responsabilidade. As bibliotecas devem ser entregues prontas para o sequenciamento. Neste caso, o cliente é responsável pela qualificação e quantificação das amostras, preparo das bibliotecas, qualificação e quantificação das bibliotecas prontas. A plataforma recebe as bibliotecas prontas e faz a validação, as diluições sequenciais das bibliotecas e prepara os pools para a clusterização e o sequenciamento. Caso o cliente deseje, ele mesmo pode fazer as diluições sequenciais das bibliotecas e preparar os pools para a clusterização. A plataforma recebe os pools prontos e eles seguem direto para a clusterização e o sequenciamento. Nos casos em que o cliente é responsável pela preparação das bibliotecas, a qualidade das bibliotecas é de responsabilidade do cliente e, portanto, a qualidade e a quantidade de reads gerados, as quais dependem diretamente da qualidade das bibliotecas, também são de responsabilidade do cliente.

## **SEQUENCIAMENTO E PRAZO DE ENTREGA DOS RESULTADOS**

Com as bibliotecas prontas, elas seguem para o sequenciamento. A partir desta etapa podemos prosseguir através de 2 caminhos: o cliente faz aquisição dos kits de sequenciamento e o utiliza na sua totalidade ou irá precisar aguardar até que sejam recebidas amostras suficientes para completar todas as lanes da flow-cell de acordo com o sequenciamento escolhido. Assim, é formada uma fila de espera e todas as solicitações são atendidas seguindo-se a ordem da fila de serviços, sendo que a confirmação mais recente entra sempre no final da fila. Este tempo de espera varia de acordo com a demanda pelo serviço de sequenciamento. Considerando a demanda atual, o tempo médio para a entrega dos resultados costuma ocorrer dentro dos tempos abaixo:

Sequenciamento Paired-end 100 bp high output: de 75 a 120 dias;

Sequenciamento Single-end 100 bp high output: de 90 a 150 dias;

Sequenciamento Paired-end 150 bp rapid run: de 90 a 150 dias;

Sequenciamento Single-end 150 bp rapid run: de 120 a 180 dias;

## **ENTREGA DOS RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO**

Quando a corrida de sequenciamento termina, é feita a demultiplexação dos reads. Este processo consiste na separação dos reads gerados na lane dentre as bibliotecas presentes na mesma lane, ou multiplexadas na mesma lane, de acordo com o índice que a identifica.

O cliente recebe um e-mail informando que os resultados estão disponíveis para download. Os arquivos FASTQ são disponibilizados para download no BaseSpace Illumina ou via link disponibilizado pela RPT04A para sequenciamento S5.

A responsabilidade pelo download, armazenamento e transporte dos resultados é do cliente. Por questões de segurança, a Plataforma manterá uma cópia dos dados do pesquisador, a qual ficará armazenada por um prazo máximo de três meses, contados a partir da data de disponibilização dos resultados. Após este prazo, os dados podem ser descartados definitivamente da base de dados da Plataforma, de maneira que não garantimos mais o acesso aos dados após esse prazo.

## **SIGILO DOS DADOS, ÉTICA E BIOSEGURANÇA**

A Plataforma mantém sigilo sobre todas as informações e amostras submetidas para a realização dos serviços de sequenciamento e os resultados gerados são propriedade exclusiva do cliente. No entanto, a Plataforma se reserva o direito de utilizar os resultados para estabelecer suas normas internas e validar os métodos e protocolos utilizados. A plataforma não se responsabiliza pela confidencialidade de dados disponibilizados pelo cliente a terceiros.

No caso de serviços para projetos de pesquisa envolvendo estudos com humanos e/ou animais, o cliente é responsável pela obtenção das aprovações necessárias das respectivas Comissões de Ética e Biossegurança da(s) entidade(s) na(s) qual(is) o projeto de pesquisa está sendo desenvolvido e declara possuir todos os comprovantes de aprovação necessários para os experimentos solicitados.

#### CITANDO A PLATAFORMA

Para que a Plataforma possa continuar sendo financiado com verbas públicas e a sua plataforma técnica possa ser constantemente atualizada, é fundamental que o pesquisador/aluno cite a Plataforma nas publicações resultantes dos serviços utilizados.

- Na metodologia, na descrição do Sequenciamento de Nova Geração, citar que o protocolo foi realizado na plataforma de Sequenciamento de Nova Geração da Fiocruz e está de acordo com o que consta em nosso site: <http://plataformas.fiocruz.br/site>

- Em monografias, teses, artigos científicos, pôster e resumos de congressos, citar junto às fontes de fomento a "Plataforma Genômica – Sequenciamento de Nova Geração – RPT01J (Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ)".

- Citação da Plataforma nos agradecimentos – Exemplo: "The authors are grateful to the Plataforma Genômica— Sequenciamento de Nova Geração - RPT01J - Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ".