

Soluzione di sequenziamento dell'esoma NextSeq™ 1000 e NextSeq 2000

Flusso di lavoro integrato per un'efficiente analisi dell'esoma e un'accurata identificazione di varianti

- Preparazione delle librerie e arricchimento dell'esoma ottimizzati per una copertura altamente uniforme delle regioni codificanti
- Sistemi di sequenziamento da banco flessibili e scalabili per un'eccezionale qualità dei dati
- Pipeline di analisi dei dati integrata con prestazioni pluripremiate per l'identificazione di mutazioni comuni e di varianti somatiche rare

illumina®

Introduzione

La soluzione di sequenziamento dell'esoma NextSeq 1000 e NextSeq 2000 offre un flusso di lavoro ottimizzato dal DNA ai risultati per esaminare le regioni codificanti le proteine del genoma. La soluzione sfrutta la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) di Illumina leader del settore e la chimica XLEAP-SBS™ ottimizzata per il sequenziamento mediante sintesi (SBS, sequencing by synthesis) per fornire un'eccezionale qualità dei dati. Questa copertura dell'esoma ad alta precisione consente l'identificazione di varianti codificanti reali per un'ampia gamma di applicazioni, tra cui genetica della popolazione, ricerca sulle malattie genetiche e studi sul cancro. Il flusso di lavoro integrato consente di ottimizzare la preparazione delle librerie e l'arricchimento dell'esoma, il sequenziamento con pulsanti e l'analisi rapida e accurata dei dati (Figura 1). Con interventi manuali minimi, la soluzione di sequenziamento dell'esoma NextSeq 1000 e NextSeq 2000 rappresenta un metodo altamente flessibile ed efficiente per interrogare l'esoma.



Figura 2: NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sfruttano la chimica XLEAP-SBS e integrano l'analisi secondaria per semplificare i flussi di lavoro di sequenziamento.

Flusso di lavoro semplice ed efficiente

La soluzione di sequenziamento dell'esoma NextSeq 1000 e NextSeq 2000 offre un flusso di lavoro semplificato e integrato, consentendo ai ricercatori di massimizzare la loro produttività. Inizia con la preparazione delle librerie e l'arricchimento dell'esoma utilizzando un kit di librerie come Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment.

Le librerie preparate vengono caricate su una cella a flusso, quindi sul NextSeq 1000 System o sul NextSeq 2000 System per il sequenziamento (Figura 2). Il NextSeq 1000 System e il NextSeq 2000 System presentano diverse configurazioni di cella a flusso di sequenziamento che consentono ai ricercatori di scalare i propri studi sull'esoma in base alle proprie esigenze. L'analisi dei dati, inclusi l'allineamento e l'identificazione di varianti, viene eseguita facilmente con la pipeline DRAGEN™ Enrichment integrata nello strumento o nel cloud con BaseSpace™ Sequence Hub o Illumina Connected Analytics.



Figura 1: flusso di lavoro per il sequenziamento dell'esoma con NextSeq 1000 e NextSeq 2000. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System fanno parte di un flusso di lavoro NGS semplice e integrato che fornisce dati di sequenziamento degli esomi altamente accurati. Le durate variano in base all'esperimento e al tipo di saggio.

a. La configurazione del kit include Illumina DNA Prep with Enrichment e Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

Procedure ottimizzate di preparazione delle librerie e arricchimento dell'esoma

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment combina la preparazione rapida delle librerie tramite l'arricchimento dell'esoma e la chimica dei trasposoni legati su microsfere Illumina con Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. Grazie alla copertura completa dell'esoma da soli 10 ng di input, Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment consente ai laboratori di analizzare preziosi campioni di DNA, producendo nel contempo elevate percentuali di arricchimento e uniformità della copertura. Il rilevamento altamente sensibile delle varianti a bassa frequenza consente ai laboratori di identificare le varianti codificanti vere e le mutazioni somatiche rare.

La tagmentazione su microsfere elimina la necessità di shearing meccanico per frammentare il DNA. Questo semplifica il flusso di lavoro per un tempo totale di circa sei ore con meno di due ore di interventi manuali. I ricercatori possono anche sfruttare questi vantaggi in termini di flusso di lavoro e qualità dei dati utilizzando Illumina DNA Prep with Enrichment con altri pannelli di esomi. Scegliere il contenuto del pannello da diversi fornitori, tra cui Agilent, Twist Bioscience e Integrated DNA Technologies (IDT) (Tabella 1).

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System forniscono potenza e versatilità per ottimizzare il flusso di lavoro di sequenziamento dell'esoma. Senza necessità di lavaggi, sono necessari meno di 10 minuti per caricare e avviare il sistema. Per NextSeq 2000 System, i reagenti P4 consentono il sequenziamento di circa 41 campioni in circa 34 ore con lunghezze di letture paired-end di 100 bp.*

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sono compatibili con un'ampia gamma di kit di preparazione delle librerie di Illumina e di terze parti e offrono flessibilità nell'utilizzo di applicazioni diverse. I ricercatori possono passare facilmente da un progetto di sequenziamento all'altro, come il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) dell'esoma, in massa e a singola cellula e altri metodi. Ad esempio, i ricercatori possono associare il sequenziamento dell'esoma al sequenziamento del trascrittoma per valutare se le varianti identificate alterano l'espressione dei trascritti.

* La processività può variare in base a molti fattori, tra cui la dimensione del pannello dell'esoma e il kit di preparazione delle librerie utilizzati.

Table 1: specifiche del pannello dell'esoma

| Funzione pannello ^a | Illumina Exome 2.5 Panel ^b | Agilent | Twist | IDT |
|---|---------------------------------------|---------|---------|------------|
| Dimensione pannello | 37,5 Mb | 36 Mb | 33 Mb | 39 Mb |
| Dimensione sonda | 120 bp | N/A | 120 bp | 120 bp |
| Tipo di sonda | dsDNA | RNA | dsDNA | ssDNA |
| Durata arricchimento (Hyb) | 1,5 ore | 16 ore | 1,5 ore | 1,5-16 ore |
| Database utilizzati per la progettazione del pannello dell'esoma ^c | | | | |
| RefSeq ¹ | 99,1% | 99,88% | 99,08% | 99,45% |
| GENCODE ² | 98,02% | 97,29% | 96,01% | 96,82% |
| CCDS ³ | 99,90% | 99,91% | 99,76% | 99,67% |
| Geni noti UCSC ⁴ | 99,89% | 98,72% | 97,63% | 98,13% |
| ClinVar ⁵ | 98,60% | 73,41% | 72,56% | 72,90% |

- Dimensione del pannello = lunghezza totale della sequenza nelle regioni target; dimensione della sonda = lunghezza della sonda di ibridazione (Hyb) dell'arricchimento; tipo di sonda = gli oligonucleotidi della sonda possono essere RNA, DNA, a singolo filamento (ss) o a doppio filamento (ds).
- Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.
- Le percentuali si riferiscono alla quantità di database coperti da ciascun pannello dell'esoma.

È inoltre disponibile un'ampia gamma di soluzioni personalizzabili di risequenziamento mirato Illumina per convalidare le varianti rilevate da qualsiasi applicazione di sequenziamento.

Identificazioni di "varianti codificanti vere"

Una variante codificante vera è un'identificazione accurata delle basi che differiscono dalla sequenza di consenso all'interno di una regione codificante. Non si tratta di un falso positivo (dove una variante viene identificata ma non esiste realmente) o di un falso negativo (dove una variante che esiste realmente non viene identificata). Un sistema con un'elevata percentuale di identificazione di falsi positivi richiede un'ampia convalida a valle, causando l'aumento dei costi e dei tempi di sperimentazione. Un sistema con un'elevata percentuale di identificazione di falsi negativi non è in grado di rilevare risultati potenzialmente importanti, spesso in regioni altamente ripetitive o che contengono allungamenti omopolimerici. L'identificazione di varianti codificanti vere è una funzione della preparazione e dell'arricchimento delle librerie di alta qualità, dell'accuratezza del sequenziamento e dell'accuratezza dell'analisi secondaria.

Maggiori informazioni con la chimica XLEAP-SBS

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sono basati sulla chimica XLEAP-SBSTM che è, ad oggi, la chimica di sequenziamento più veloce e più efficace in grado di fornire la massima qualità. La chimica XLEAP-SBS sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System consente di ottenere il massimo output di letture e il minimo prezzo per lettura di qualsiasi sequenziatore da banco Illumina. I sistemi forniscono un'accuratezza di almeno l'85% delle basi superiori a Q30[†] a 2 × 100 bp (Tabella 2) e hanno un'elevata accuratezza anche in regioni altamente difficili (ad es. regioni ricche di GC o omopolimeri), producendo un'elevata percentuale di varianti codificanti vere. Le basse percentuali di falsi positivi e falsi negativi riducono drasticamente il tempo e il costo della convalida a valle. Grazie all'eccezionale qualità dei dati offerta, NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System rappresentano l'opzione ideale per uno studio completo dell'esoma.

Grazie alla comprovata tecnologia NGS di Illumina, NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System consentono ai ricercatori di confrontare e integrare i dati generati su tutti i sistemi. Ad esempio, i dati di sequenziamento dell'esoma con NextSeq 1000 e NextSeq 2000 possono essere integrati con i dati provenienti da studi di follow-up eseguiti con pannelli mirati o studi di sequenziamento dell'esoma su larga scala eseguiti su NovaSeq™ X Series (Tabella 3).

[†] Q30 = 1 errore su 1.000 identificazioni delle basi o un'accuratezza pari al 99,9%.

Analisi semplificata con l'analisi secondaria DRAGEN

I laboratori possono eseguire l'analisi dei dati di sequenziamento dell'esoma utilizzando l'analisi secondaria DRAGEN di Illumina, una suite di pipeline di analisi dei dati accurate, complete ed efficienti, disponibili sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System.[‡] Questa pluripremiata soluzione informatica PrecisionFDA[§] utilizza algoritmi ottimizzati e con accelerazione hardware per aiutare gli utenti a superare le difficoltà nell'analisi dei dati e ridurre la necessità di affidarsi a esperti informatici esterni.

La pipeline DRAGEN Enrichment analizza l'output del NextSeq 1000 System e del NextSeq 2000 System ed esegue l'identificazione accurata di varianti in meno di due ore dopo il completamento di una corsa di sequenziamento (Figura 3). La pipeline fornisce una precisione leader nel settore nella mappatura e nell'identificazione di varianti piccole ed è disponibile nelle modalità Germline e Somatic.⁶⁻⁸

[‡] L'hardware DRAGEN è incluso nel NextSeq 1000 System e nel NextSeq 2000 System. Una licenza DRAGEN è inclusa nello strumento e non deve essere acquistata separatamente.

[§] L'analisi secondaria DRAGEN è stata insignita del premio Best Performance per le regioni difficili da mappare e del premio Best Performance per tutte le regioni comparative per i dati di sequenziamento Illumina durante il PrecisionFDA Truth Challenge 2020 V2.^{7,8}

Table 2: parametri delle prestazioni di NextSeq 1000 e NextSeq 2000 per il sequenziamento dell'esoma

| | Letture single-end ^a | Lunghezza lettura | Output ^a | Durata della corsa ^b | Qualità dei dati ^c |
|--|---------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagents ^d | 100 milioni | 2 × 150 bp | 30 Gb | 17 ore | |
| NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagents ^d | 400 milioni | 2 × 100 bp | 80 Gb | 19 ore | ≥85% di basi al di sopra di Q30 |
| NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagents ^{d,e} | 1,2 miliardi | 2 × 100 bp | 240 Gb | 31 ore | |
| NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagents ^e | 1,7 miliardi | 2 × 100 bp | 330 Gb | 34 ore | |

a. Le specifiche per gli output si basano su una singola cella a flusso utilizzando la libreria del campione di controllo PhiX Illumina a densità cluster supportate.

b. La durata della corsa include la generazione di cluster, il sequenziamento e l'identificazione delle basi sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System.

c. I punteggi qualitativi si basano su una libreria di campioni di controllo PhiX Illumina. Le prestazioni possono variare in base al tipo e alla qualità della libreria, alla dimensione dell'inserimento, alla concentrazione di caricamento e ad altri fattori sperimentali. La percentuale di basi con punteggio qualitativo superiore a Q30 rappresenta la media su un'intera corsa.

d. I reagenti XLEAP-SBS per le celle a flusso P1, P2 e P3 sono disponibili nel 2° trimestre del 2024.

e. I reagenti P3 e P4 sono disponibili solo per il NextSeq 2000 System.

Con l'app DRAGEN Enrichment integrata, l'analisi può essere impostata durante la pianificazione della corsa, semplificando il flusso di lavoro dal campione alla risposta. L'app DRAGEN Enrichment su BaseSpace Sequence Hub e Illumina Connected Analytics offre funzionalità avanzate per la visualizzazione dei risultati e l'ordinamento delle tabelle in un'interfaccia intuitiva adatta agli utenti sia nuovi sia esperti.

L'output della pipeline DRAGEN Enrichment può essere inserito direttamente in un'ampia gamma di strumenti di analisi a valle disponibili in BaseSpace Sequence Hub e Illumina Connected Analytics. Oltre all'analisi DRAGEN, entrambe le soluzioni cloud includono una crescente comunità di strumenti software per la visualizzazione, l'analisi e la condivisione.

Assistenza tecnica completa di Illumina

Illumina mette a disposizione il suo team di assistenza di massimo livello composto da ricercatori esperti nella preparazione delle librerie, nel sequenziamento e nell'analisi. Questo team dedicato include tecnici dell'assistenza in loco (FSE, field service engineer) altamente qualificati, scienziati delle applicazioni tecniche (TAS, technical applications scientist), tecnici delle applicazioni in loco (FAS, field applications scientist), ingegneri per il supporto dei sistemi, bioinformatici ed esperti di reti IT, tutti formati in modo approfondito sulla tecnologia NGS e sulle applicazioni che i clienti di Illumina utilizzano in tutto il mondo. **L'assistenza tecnica** è disponibile telefonicamente cinque giorni la settimana oppure online 24/7 in tutto il mondo e in diverse lingue.

Grazie a questo eccezionale servizio di assistenza, Illumina aiuta gli utenti a massimizzare l'efficacia dei loro NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System, formare i nuovi dipendenti e apprendere le tecniche più recenti e le migliori pratiche.

Tabella 3: processività del sequenziamento dell'esoma Illumina per sistema

| Sistema di sequenziamento | Reagenti per il sequenziamento | N. di esomi per corsa ^a |
|---|--------------------------------|------------------------------------|
| NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System | P1 300 cycles | Circa 3 |
| | P2 200 cycles | 10 |
| | P3 ^b 200 cycles | 30 |
| | P4 ^b 200 cycles | Circa 41 |
| NovaSeq X Series ^c | 1.5B 200 cycles | Circa 41 |
| | 10B 200 cycles | Circa 250 |
| | 25B 300 cycles | Circa 750 ^d |

- a. Per il numero degli esomi si presumono circa 8 Gb per campione per ottenere 100x di copertura. La processività può variare in base a molti fattori, tra cui la dimensione del pannello dell'esoma e il kit di preparazione delle librerie utilizzati.
- b. I reagenti P3 e P4 sono disponibili solo per il NextSeq 2000 System.
- c. Il NovaSeq X Plus System può gestire corse a singola cella a flusso o a doppia cella a flusso. Il NovaSeq X System può gestire corse a singola cella a flusso.
- d. È disponibile un massimo di 384 doppi indici unici. Per la NovaSeq X Series, il caricamento indipendente delle corsie consente il multiplex di più campioni.

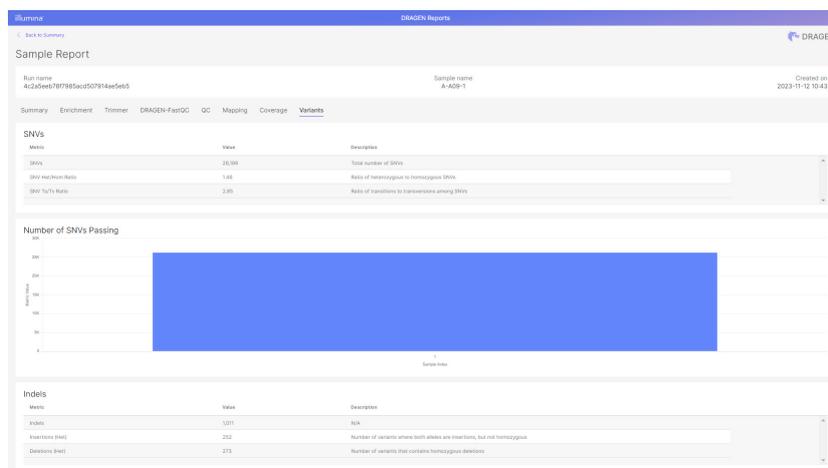


Figura 3: pipeline DRAGEN Enrichment. Esempio di screenshot di accuratezza leader del settore nella mappatura e nell'identificazione di varianti piccole con la pipeline DRAGEN Enrichment, disponibile sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System o sul cloud con BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics.

Riepilogo

La soluzione di sequenziamento dell'esoma NextSeq 1000 e NextSeq 2000 offre un flusso di lavoro integrato e scalabile per l'identificazione di varianti nelle regioni codificanti. La soluzione combina la potenza, la velocità e la flessibilità del NextSeq 1000 Sequencing System e del NextSeq 2000 Sequencing System con una chimica XLEAP-SBS altamente robusta, opzioni di preparazione e arricchimento delle librerie di alta qualità e un software di analisi rapido e facile da utilizzare.

Maggiori informazioni

[Sequenziamento dell'esoma](#)

[Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment](#)

[NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System](#)

[Analisi secondaria DRAGEN](#)

[Dati demo su BaseSpace Sequence Hub](#)

Bibliografia

1. NIH National Library of Medicine. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database. ncbi.nlm.nih.gov/refseq. Aggiornato il 18 luglio 2023. Consultato il 25 agosto 2023.
2. The GENCODE Project. GENCODE: Encyclopedia of genes and gene variants. genencodegenes.org/. Consultato il 25 agosto 2023.
3. Sito web NCBI. Database delle sequenze consenso codificanti (CCDS, consensus coding sequence). ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi. Aggiornato il 9 novembre 2022. Consultato il 25 agosto 2023.
4. University of California, Santa Cruz Genome Browser. UCSC Known Genes. genome.ucsc.edu/. Aggiornato il 18 agosto 2023. Consultato il 25 agosto 2023.
5. NIH National Library of Medicine. ClinVar Database. ncbi.nlm.nih.gov/clinvar. Aggiornato il 28 agosto 2023. Consultato il 28 agosto 2023.
6. Illumina. [Accuracy improvements in germline small variant calling with the DRAGEN Platform](#). Consultato il 25 agosto 2023.
7. Sito web PrecisionFDA. Truth Challenge V2: Calling variants from short and long reads in difficult-to-map regions. precision.fda.gov/challenges/10. Consultato il 25 agosto 2023.
8. Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN Wins at Precision-FDA Truth Challenge V2 Showcase Accuracy Gains from Alt-aware Mapping and Graph Reference Genomes. illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html. Consultato il 25 agosto 2023.

Informazioni per gli ordini

| Prodotto | N. di catalogo |
|--|----------------|
| NextSeq 2000 Sequencing System | 20038897 |
| NextSeq 1000 Sequencing System | 20038898 |
| NextSeq 1000 to NextSeq 2000 upgrade | 20047256 |
| NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b} | 20100983 |
| NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b} | 20100982 |
| NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a,b} | 20100981 |
| NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b} | 20100987 |
| NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a,b} | 20100986 |
| NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b} | 20100985 |
| NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a,b} | 20100984 |
| NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b} | 20100990 |
| NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a,b} | 20100989 |
| NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b} | 20100988 |

a. I kit di reagenti XLEAP-SBS per gli strumenti NextSeq 1000 e NextSeq 2000 vengono spediti e conservati alla stessa temperatura dei kit di reagenti SBS standard.

b. Reagenti XLEAP-SBS per celle a flusso P1, P2 e P3 disponibili nel 2° trimestre del 2024. La configurazione del kit include Illumina DNA Prep with Enrichment e Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

c. La configurazione del kit include Illumina DNA Prep with Enrichment e Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

Informazioni per gli ordini

| Prodotto | N. di catalogo |
|--|----------------|
| NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (50 cycles) ^a | 20100995 |
| NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^a | 20100994 |
| NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^a | 20100993 |
| NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^a | 20100992 |
| NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read and Index Primers ^a | 20112856 |
| NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Index Primer Kit ^a | 20112858 |
| NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read Primer Kit ^a | 20112859 |
| Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation Set B (96 samples, 12-plex) ^c | 20077595 |
| Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation Set D (96 samples, 12-plex) ^c | 20077596 |
| Illumina DNA Prep with Enrichment, (S) Tagmentation (16 samples) | 20025523 |
| Illumina DNA Prep with Enrichment, (S) Tagmentation (96 samples) | 20025524 |
| Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) | 20091654 |
| Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) | 20091656 |
| Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) | 20091658 |
| Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) | 20091660 |

a. I kit di reagenti XLEAP-SBS per gli strumenti NextSeq 1000 e NextSeq 2000 vengono spediti e conservati alla stessa temperatura dei kit di reagenti SBS standard.

b. Reagenti XLEAP-SBS per celle a flusso P1, P2 e P3 disponibili nel 2° trimestre del 2024. La configurazione del kit include Illumina DNA Prep with Enrichment e Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

c. La configurazione del kit include Illumina DNA Prep with Enrichment e Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-00479 ITA v3.0