SCHEDA TECNICA

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Risultati dell'esoma mirati e uniformi da un unico partner

- Conveniente copertura dell'esoma utilizzando un pannello esomico mirato, completo e aggiornato
- Kit di preparazione delle librerie di facile utilizzo con metodi di automazione qualificati
- Soluzione e supporto end-to-end di alta qualità
- Flessibilità a livello di contenuto, con pannello mitocondriale e opzioni di addizione personalizzate

illumina®

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

Sequenziamento dell'esoma end-to-end con un unico partner affidabile

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment offre risultati economici di sequenziamento dell'intero esoma (WES, Whole-Exome Sequencing) umano con prestazioni e qualità dei dati eccezionali. La soluzione per la preparazione e l'arricchimento delle librerie di facile utilizzo fa parte di un flusso di lavoro end-to-end che va dai campioni ai report (Figura 1). I metodi qualificati Illumina sono disponibili su una vasta gamma di piattaforme di automazione tramite i nostri partner. Partendo da DNA genomico (gDNA, genomic DNA) estratto o da input diretto di sangue o saliva*, Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment combina la rapida chimica di preparazione delle librerie basata su tagmentazione e su microsfere seguita dall'arricchimento dell'esoma mediante cattura ibrida (Figura 2).[1] La chimica di Illumina DNA Prep with Enrichment supporta la normalizzazione integrata del DNA in ingresso di alta qualità (pari o superiore a 50 ng), che consente il semplice raggruppamento basato sul volume per l'ibridazione e fornisce persino l'output del sequenziamento di ciascuna libreria esomica arricchita. Le librerie sono sequenziate su NovaSeq™ 6000 System, NovaSeq X System, NextSeq™ 1000 System, NextSeq 2000 System o NextSeq 550 System. La premiata analisi secondaria DRAGEN™ esegue l'identificazione di varianti.[2] Per le malattie genetiche, la piattaforma Emedgene applica l'intelligenza artificiale spiegabile (XAI, Explainable Artificial Intelligence) e l'automazione per ottimizzare l'interpretazione e la creazione di report per i pannelli esomici.

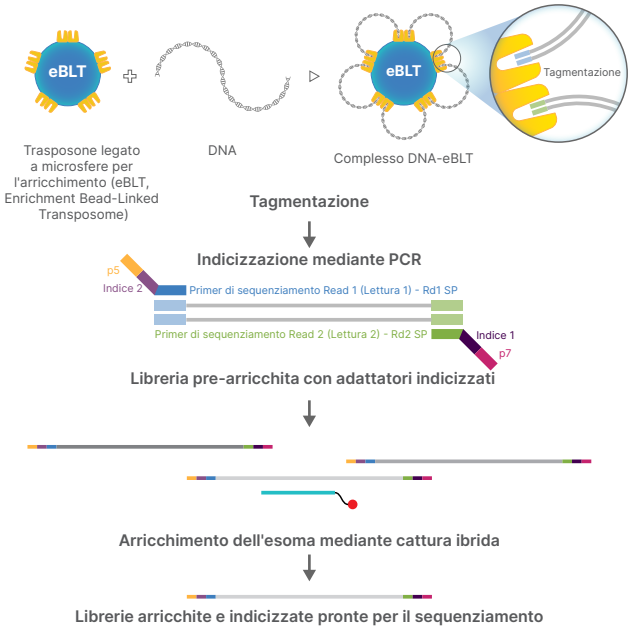


Figura 2: ottimizzazione della preparazione delle librerie basata su tagmentazione con arricchimento dell'esoma. I trasposoni legati a microsfere per l'arricchimento (eBLT, enrichment Bead-Linked Transposome) realizzano una reazione di tagmentazione uniforme dall'elevata tolleranza con quantità variabili di campioni di DNA in ingresso.[1] A seguito dell'arricchimento mediante cattura ibrida, le librerie esomiche sono pronte per il sequenziamento.

Figura 1: dai campioni ai report con un singolo partner. Illumina supporta un flusso di lavoro end-to-end per WES. Il gDNA estratto (o il DNA di sangue o saliva in conformità ai protocolli di estrazione diretta) viene immesso nella preparazione delle librerie con Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. I metodi qualificati Illumina sono disponibili su una vasta gamma di piattaforme di automazione. Sequenziamento in base alle esigenze di scalabilità e produttività sugli strumenti Illumina. L'analisi secondaria e l'identificazione di varianti accurate e rapide vengono eseguite con l'app DRAGEN Enrichment. Per le patologie genetiche, Emedgene consente un'interpretazione e una segnalazione intuitive.

* I protocolli per il prelievo diretto di sangue e saliva richiedono Flex Lysis Reagent Kit. I dati visualizzati sono generati dal gDNA estratto, non da sangue o saliva. Le prestazioni di sangue e saliva possono variare in base alla qualità del campione.

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

Copertura conveniente e completa delle varianti associate alla malattia nei database pubblici

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment utilizza un pannello di arricchimento degli esomi mirato, completo e aggiornato. Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel, incluso nel kit, è più piccolo di Illumina Exome Panel e ha migliorato la copertura della regione target per le varianti riportate nei database pubblici (Tabella 1 e Tabella 2). Questa copertura mirata rende possibile una soluzione WES conveniente con un numero ottimale di campioni per corsa di sequenziamento (Tabella 3).

Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel riguarda sequenze codificanti curate (CDS, Curated Coding Sequence) di RefSeq, sequenze consenso codificanti (CCDS, Consensus Coding Sequence), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), il Cancer Gene Census ottenuto dal Catalog of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) e l'Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (Tabella 1) con copertura eccezionale di varianti patogene o probabilmente patogene riportate nei database ClinVar e ACMG (Tabella 2).[3-9]

La copertura del genoma mitocondriale (chrM) può essere aggiunta facilmente utilizzando Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel come pannello addizionato nel protocollo Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Mitochondrial Panel offre una copertura completa dei 16.659 bp e 37 geni del chrM, consentendo l'arricchimento e il sequenziamento delle varianti del DNA mitocondriale (mtDNA, mitochondrial DNA).

Tabella 1: copertura migliorata della regione target in dimensioni convenienti con Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel

Pannello esomico	Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel	Illumina Exome Panel
Dimensioni	37,5 Mb	500 Mb
RefSeq CDS[3]	99,1%	98,2%
CCDS CDS[4]	99,9%	99,5%
ACMG 73 geni CDS[5]	99,9%	99,3%
COSMIC Cancer Gene Census CDS[6,7]	99,9%	99,3%
OMIM[8]	99,1%	97,7%

Tabella 2: ricerca clinica. Contenuto mirato su Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel

CDS di varianti patogene o probabilmente patogene in ClinVar[a,9]	98,6%
CDS di 73 varianti patogene o probabilmente patogene in ACMG[b,5]	99,9%

a. L'archivio pubblico ClinVar riporta le relazioni tra variazioni umane e fenotipi con prove a sostegno. Le varianti patogene/probabilmente patogene sono riportate sulla base delle linee guida di classificazione ClinVar.
b. L'elenco delle varianti patogene/probabilmente patogene in ACMG include le varianti sovrapposte tra le sequenze codificanti curate dei geni ACMG e le varianti patogene/probabilmente patogene in ClinVar.

Tabella 3: numero stimato di librerie Exome 2.5 Enrichment per cella a flusso e sistema di sequenziamento[a]

Profondità di copertura del target media desiderata	NextSeq 550 System[b]		NextSeq 2000 System		NovaSeq 6000 System			
	Output medio	Output elevato	P2[c]	P3	SP	S1	S2	S4
50×	6	19	19	57	34	69	176	428[d]
100×	3	9	9	28	17	34	88	214
200×	1	4	4	14	8	17	45	109

a. Le stime si basano su lunghezza di lettura di 2 × 101 bp, calcolata sulla base di tipici esperimenti interni. Il numero di campioni può variare a seconda della gestione del flusso di lavoro, della qualità del campione o della libreria di input e dell'output effettivo del sequenziamento di ciascuna piattaforma e cella a flusso. I dati effettivi sono stati acquisiti sul NovaSeq 6000 System utilizzando celle a flusso S4 ed estrapolati in altri strumenti e celle a flusso.
b. I kit di reagenti NextSeq 550 supportano lunghezze di lettura di 2 × 150 bp.
c. Sul NextSeq 1000 System sono disponibili anche celle a flusso P2 con la stessa processività del campione.
d. Il raggruppamento di così tante librerie arricchite richiede indici aggiuntivi.

I dati di sequenziamento generati con Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostrano un'eccellente uniformità della copertura su un'alta percentuale di target e con una profondità della sequenza pari o superiore a 20× utilizzando un output di 5 Gb e due diversi tempi di ibridazione per l'arricchimento (Figura 3).

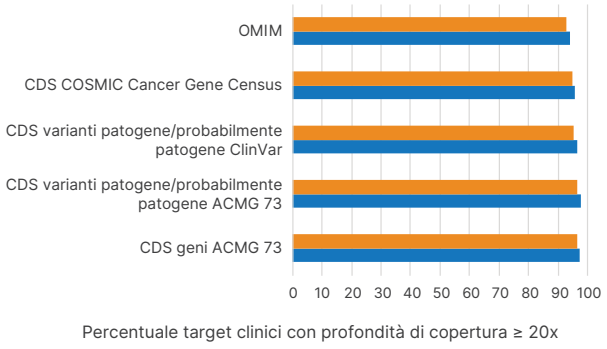


Figura 3: copertura ampia e completa delle varianti associate alla malattia nei database pubblici. Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con tempistiche di ibridazione pari a 1,5 ore (arancione) o a 16 ore (blu) mostra una percentuale di copertura media elevata, con profondità pari o superiore a 20×, dei target dei database pubblici, inclusi ACMG, ClinVar, OMIM e COSMIC.[5-9]

Prestazioni di alta qualità

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra prestazioni eccezionali dei saggi di arricchimento. I dati sono stati raccolti utilizzando il kit Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment e il pannello incluso Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel con tempistiche di ibridazione di 1,5 ore o 16 ore. A scopo di confronto, il saggio è stato eseguito anche utilizzando il pannello originale Illumina Exome Panel e il medesimo protocollo tranne che per l'ibridazione di 1,5 ore e per le temperature di lavaggio, che sono state ridotte a 58 °C in ragione dell'impiego di sonde più corte (con etichetta "IEP 1,5 ore" nella Figura 4 e nella Figura 5).

Le metriche delle prestazioni dell'app DRAGEN Enrichment e della Picard pipeline[10] rivelano una percentuale ottimale di letture mappabili, letture su target (in base alla percentuale di letture che attraversano il filtro per letture uniche allineate, arricchimento percentuale di letture "padded" uniche e arricchimento percentuale di basi "padded" uniche) ed eccezionale copertura media del target per Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con le sonde Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 (Figura 4).

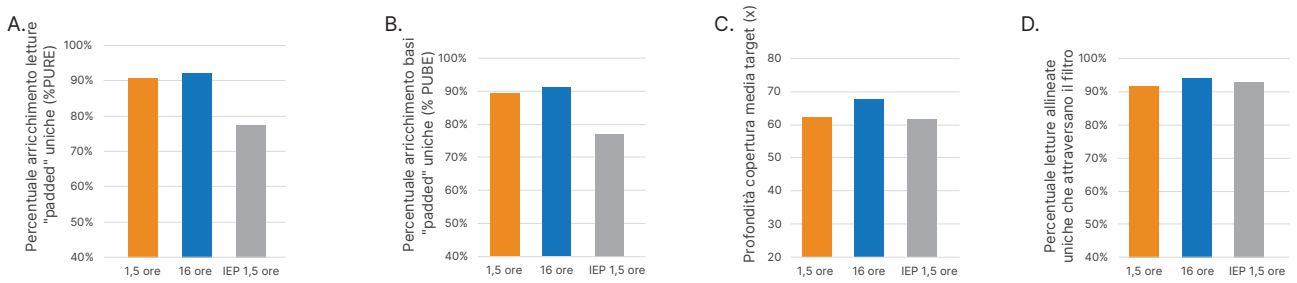


Figura 4: eccellenti prestazioni di saggio di arricchimento di Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con un tempo di ibridazione di 1,5 ore (arancione) o 16 ore (blu) mostra solide prestazioni rispetto a Illumina Exome Panel (IEP 1,5 ore, grigio). Metriche DRAGEN: (A) arricchimento percentuale di letture "padded" uniche (% PURE, dimensioni "padded" 150 bp); (B) arricchimento percentuale di basi "padded" uniche (% PUBE, dimensioni "padded" 150 bp) e (C) profondità di copertura media del target. Metriche Picard: (D) percentuale di letture che attraversano il filtro per letture uniche allineate. Le librerie arricchite sono state sequenziate sul NovaSeq 6000 System, cella a flusso S4 con output di 5 Gb (50 milioni di letture paired-end, 25 milioni di cluster) e lunghezze di lettura 2 × 101 bp.

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

Profondità e uniformità della copertura

Ulteriori analisi dimostrano un'eccellente uniformità della copertura di Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment rispetto a Illumina Exome Panel (Figura 5). Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment assicura una copertura uniforme con un'alta percentuale di basi a una profondità di lettura di 20× o superiore, una penalità base di 80 volte e una bassa percentuale di obiettivi di copertura pari a zero.

Le prestazioni uniformi tra i tempi di ibridazione di 1,5 ore e 16 ore mostrano come i laboratori siano in grado di accelerare i loro flussi di lavoro con tempi di ibridazione di 1,5 ore o di estendere le loro ibridazioni durante la notte se ciò si adatta meglio al loro flusso di lavoro.

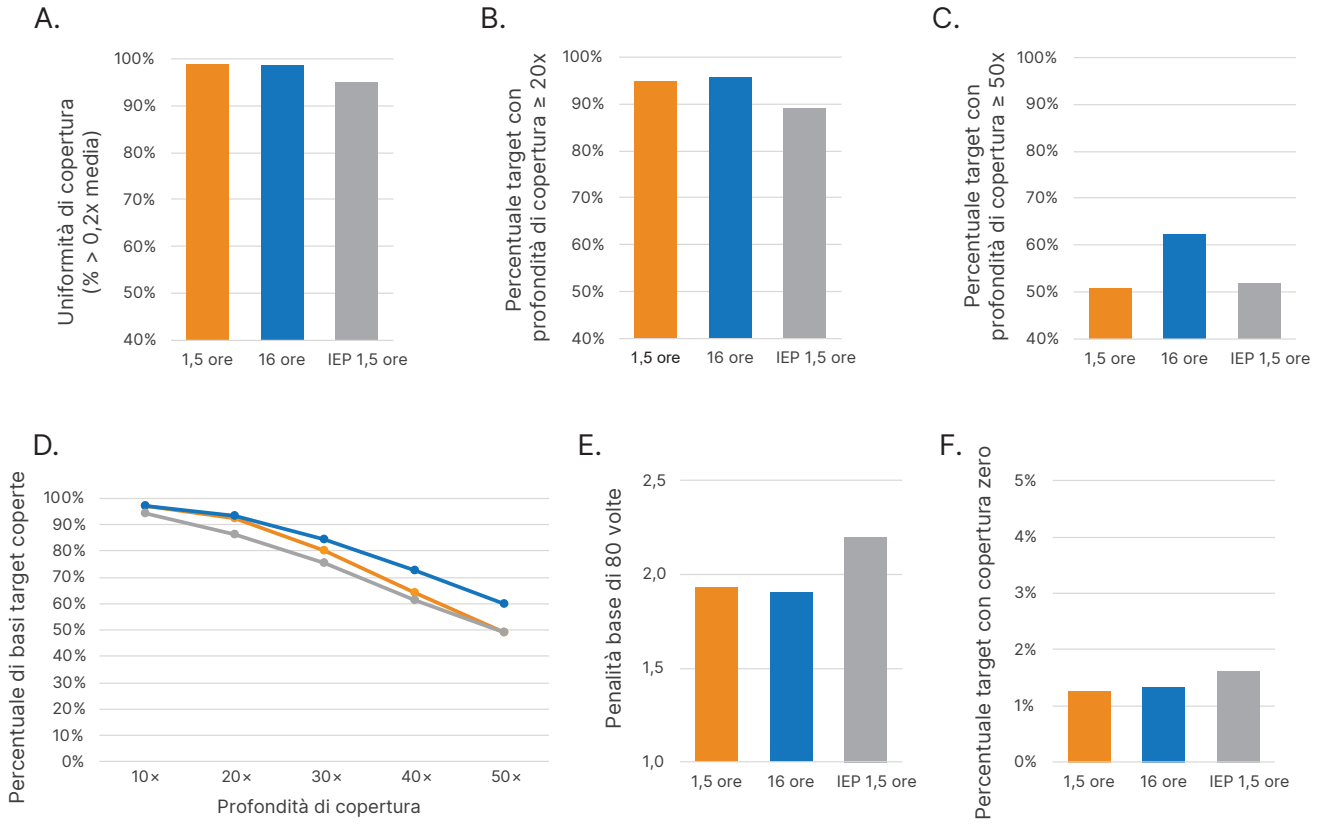


Figura 5: eccellente copertura e uniformità indipendenti dal tempo di ibridazione. Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment che usa un tempo di ibridazione di 1,5 ore (arancione) o 16 ore (blu) mostra un'eccellente uniformità di copertura rispetto a Illumina Exome Panel (IEP 1,5 ore, grigio) con esecuzione in parallelo. Metriche DRAGEN: (A) uniformità di copertura (percentuale > 0,2× copertura media); (B) percentuale di target coperti a ≥ 20× e (C) percentuale di target coperti a ≥ 50×. Metriche Picard: (D) percentuale di basi target con profondità di copertura 10×, 20×, 30×, 40× e 50×; (E) penalità base di 80 volte (entità della sovracopertura necessaria per aumentare l'80% delle basi nei target di copertura diversi da zero al livello di copertura medio in tali target) e (F) percentuale di target con copertura zero. Le librerie arricchite sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System, cella a flusso S4 con output di 5 Gb (50 milioni di letture paired-end, 25 milioni di cluster) e lunghezze di lettura di 2 × 101 bp.

Il DNA mitocondriale presente nella cellula è più abbondante rispetto al DNA nucleare. Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel può essere utilizzato a diverse concentrazioni rispetto al pannello esomico, dimostrando flessibilità nella copertura mtDNA variabile senza influire sulla copertura target media dell'esoma o sull'uniformità della copertura (Figura 6).

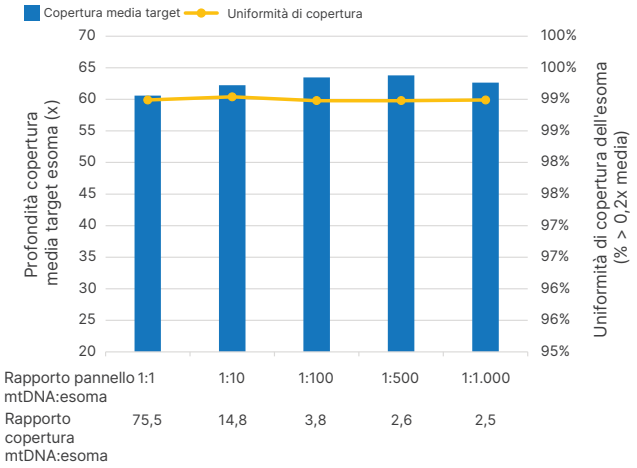


Figura 6: copertura uniforme dell'esoma con copertura mitocondriale aggiuntiva. I rapporti variabili di Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel mostrano omogeneità a livello di copertura target media dell'esoma (barre blu) e uniformità della copertura (linea gialla). Un totale di 72 campioni di DNA di linee cellulari umane provenienti dal Coriell Institute (NA24143, NA24149 e NA24385) è stato arricchito (6 pool x 12-plex) con rapporti del pannello mtDNA:esoma che variavano da 1:1 a 1:1000 in reazioni di ibridazione di 16 ore. Tutte le 72 librerie arricchite sono state sequenziate su NovaSeq 6000 System utilizzando un'unica cella a flusso S4 con output di 5 Gb (50 milioni di letture paired-end, 25 milioni di cluster) e l'analisi di arricchimento è stata eseguita con l'app DRAGEN Enrichment.

Contenuto WES personalizzato

Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel può essere personalizzato con un pannello supplementare per aggiungere dei target o aumentare la copertura target per gli esperimenti WES. Illumina Custom Enrichment Panel v2 può essere progettato per estendere la copertura del sequenziamento a nuovi target o per approfondire la copertura delle regioni target WES esistenti (Figura 7, Tabella 4). I pannelli vengono progettati per un elenco personalizzato di target e aggiunti facilmente al protocollo di Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment sotto forma di pannelli addizionati, con o senza l'aggiunta di un pannello mitocondriale addizionato. I pannelli personalizzati vengono progettati tramite DesignStudio™ o con l'aiuto del team di progettazione Illumina Concierge.

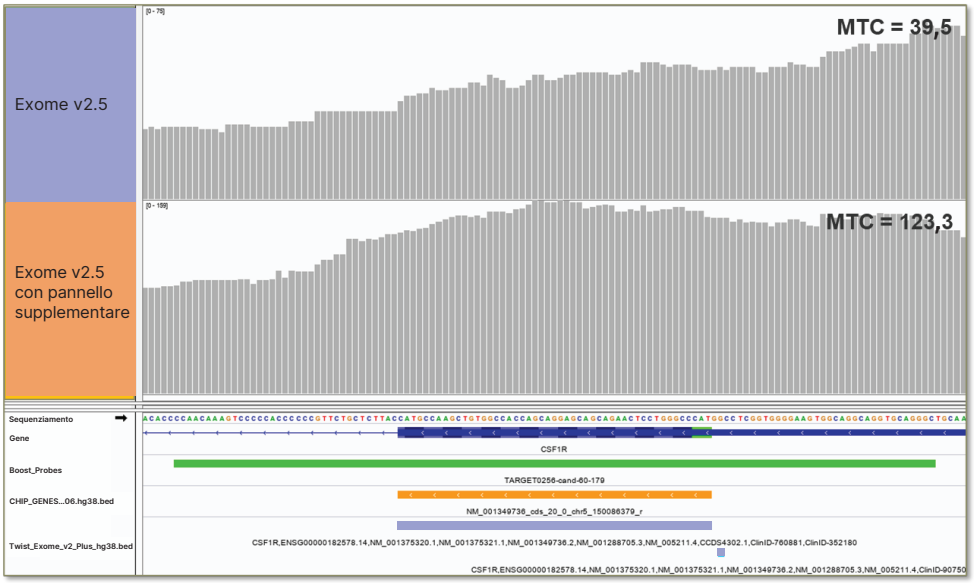
Tabella 4: il pannello addizionato Illumina Custom Enrichment Panel v2 aumenta la copertura target[a]

Parametro	Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment	Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con pannello addizionato
Copertura media target	63×	124×
Uniformità di copertura	98,3%	98,4%
Percentuale di target con copertura di 20×	96,7%	98,6%
Percentuale di target con copertura di 50×	66,6%	96,3%
Dropout AT	0,01%	1,08%
Dropout GC	9,9%	2,3%

a. Il protocollo di Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment è stato eseguito con e senza pannello addizionato personalizzato mirato alle regioni coperte da Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel ed è stata analizzata la copertura delle regioni di interesse del pannello addizionato.

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

CSF1R
chr5:150086379-150086427



BCORL1
chrX:13001295-130016213

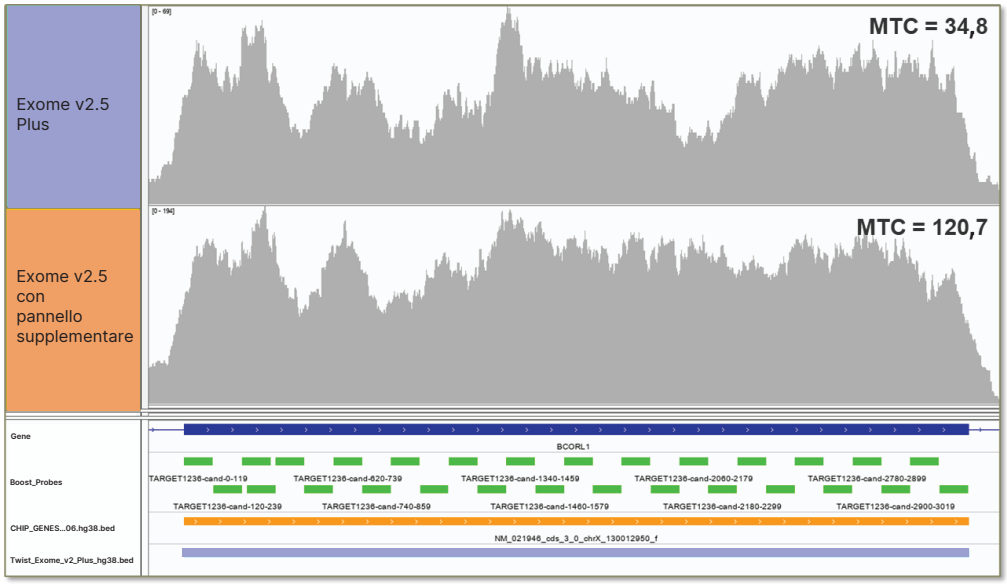


Figura 7: Illumina Custom Enrichment Panel v2 migliora la copertura dei target WES. È stato progettato un pannello Illumina Custom Enrichment Panel v2 composto da 2.689 sonde che coprono 2.689 target esonici in Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. Il protocollo di Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment è stato eseguito con e senza pannello addizionato personalizzato ed è stata analizzata la copertura delle regioni di interesse del pannello addizionato. La copertura target media (MTC, Mean Target Coverage) delle regioni di interesse è migliorata di circa due volte e la percentuale di target coperti a 50× è aumentata significativamente con il pannello addizionato.

Riepilogo

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment rappresenta una soluzione WES umana affidabile e ben progettata, efficace ed efficiente. Il pannello incluso Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel fornisce contenuti completi e aggiornati che coprono le varianti associate alla malattia contenute nei database pubblici e il pannello opzionale Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel aggiunge una copertura completa del chrM. Il pannello di arricchimento ottimizzato personalizzabile consente un'elevata processività dei campioni, il che permette di ottenere i risultati di sequenziamento dell'esoma contenendo i costi. L'eccellente copertura uniforme facilita l'analisi e l'interpretazione a valle. È possibile conseguire ulteriori vantaggi in termini di efficienza adottando i metodi qualificati Illumina su una gamma di piattaforme di automazione, disponibili tramite i nostri partner. Con Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, i laboratori possono ora beneficiare di un flusso di lavoro di sequenziamento dell'esoma end-to-end di alta qualità, dai campioni ai report, fornito da un unico partner.

Maggiori informazioni

Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Metodi qualificati Illumina per l'automazione

Analisi secondaria DRAGEN

Analisi terziaria con Emedgene

Strumento di progettazione del saggio DesignStudio

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation Set B (96 samples, 12-plex)[a]	20077595
Illumina DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation Set D (96 samples, 12-plex)[a]	20077596
Flex Lysis Reagent Kit (96 reactions)[b]	20018706
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)[c]	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)[c]	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)[c]	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)[c]	20091650
Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel (96 samples, 12 plex)[d]	20093180
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (32 µl, 120 bp)[e]	20073953
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (384 µl, 120 bp)[e]	20073952
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (1536 µl, 120 bp)[e]	20111339

a. I kit includono i reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment per la preparazione delle librerie e l'ibridazione, le microsfere Illumina Purification Beads per la pulizia/selezione delle dimensioni, le sonde di arricchimento per Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e una piastra dell'adattatore.
b. Kit necessario per l'input diretto di sangue.
c. Scegliere un set di indici diverso, se si preferisce.
d. Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel contiene 32 µl di pannello di oligonucleotidi, materiale sufficiente per 8 reazioni di ibridazione a 4 µl ciascuna.
e. I pannelli di arricchimento personalizzati per i campioni umani possono essere progettati tramite lo strumento Illumina DesignStudio. L'assistenza alla progettazione per i contenuti non umani è fornita dal team di progettazione Illumina Concierge. Per maggiori informazioni sui servizi di progettazione Concierge, contattare il rappresentante commerciale Illumina.

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

Bibliografia

1. Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Data Sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-dna-prep-for-enrichment-770-2020-010/illumina-dna-prep-enrichment-data-sheet-770-2020-010.pdf. Pubblicato il 29 ottobre 2020. Consultato il 27 luglio 2023.
2. Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN Wins at PrecisionFDA Truth Challenge V2 Showcase Accuracy Gains from Alt-aware Mapping and Graph Reference Genomes. illumina.com/science/genomics-research/articles/dragen-wins-precisionfda-challenge-accuracy-gains. Pubblicato il 2 giugno 2021. Consultato il 27 luglio 2023.
3. NIH National Library of Medicine. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database. Sito web NCBI. ncbi.nlm.nih.gov/refseq. Aggiornato il 18 luglio 2023. Consultato il 27 luglio 2023.
4. CCDS - database della Consensus CDS (CCDS). Sito web NCBI. ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi. Aggiornato il 9 novembre 2022. Consultato il 27 luglio 2023.
5. NIH National Library of Medicine. ACMG Recommendations for Reporting of Secondary Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. Sito web NCBI. ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg. Aggiornato il 27 giugno 2023. Consultato il 27 luglio 2023.
6. Catalog of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Sito web COSMIC. cancer.sanger.ac.uk/cosmic/download. Pubblicato il 23 maggio 2023. Consultato il 27 luglio 2023.
7. Cancer Gene Census. Sito web COSMIC. cancer.sanger.ac.uk/census. Pubblicato il 23 maggio 2023. Consultato il 27 luglio 2023.
8. Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Sito web OMIM. omim.org. Aggiornato il 26 luglio 2023. Consultato il 27 luglio 2023.
9. Database ClinVar. Sito web NCBI. ncbi.nlm.nih.gov/clinvar. Aggiornato il 24 luglio 2023. Consultato il 27 luglio 2023.
10. Genome Analysis Toolkit (GATK). The Broad Institute. gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360037428871-CollectHsMetrics-Picard. Pubblicato il 7 gennaio 2020. Consultato il 27 luglio 2023.

illumina®

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-00002 ITA v5.0