

# illumina Complete Long Read Prep, Human

Una soluzione scalabile e a elevate prestazioni per il sequenziamento dell'intero genoma umano di letture lunghe

- WGS umano esaustivo sia di letture lunghe sia di letture brevi utilizzando un unico strumento
- Risultati affidabili e altamente accurati grazie a preparazione delle librerie e prestazioni di analisi ottimizzate
- Flusso di lavoro compatibile con l'automazione che può essere completato in un giorno con requisiti di input di DNA basso

**illumina**<sup>®</sup>

## Introduzione

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) consente agli scienziati di decifrare il genoma per ottenere una comprensione più approfondita della biologia. La comprovata chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) di Illumina assieme alla premiata analisi secondaria DRAGEN™ fornisce dati del sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) di straordinaria accuratezza.<sup>1</sup> I più recenti progressi apportati all'analisi DRAGEN stanno colmando le rimanenti lacune presenti nei geni più difficili da mappare.<sup>2,3</sup> Una piccolissima frazione delle regioni geniche può ancora trarre vantaggi da lunghezze di lettura più lunghe per ottenere una risoluzione accurata e una mappatura di queste regioni difficili. Tuttavia, l'utilità e l'adozione di molte delle soluzioni di sequenziamento di letture lunghe sono limitate in quanto presentano svantaggi a causa di elevati requisiti di input di DNA, flussi di lavoro complessi con bassa processività e risultati altamente variabili.<sup>4-7</sup>

L'Illumina Complete Long Reads rende il sequenziamento di letture lunghe accessibile e ottimizzato per i laboratori genomici. L'Illumina Complete Long Prep, Human è il primo prodotto basato su questa nuova tecnologia per letture lunghe. Il saggio WGS a elevate prestazioni utilizza un flusso di lavoro NGS standard per generare sequenze di letture lunghe contigue sul NovaSeq™ 6000 System e sulla serie NovaSeq X (Figura 1). L'efficiente protocollo di preparazione delle librerie può essere completato in un giorno, è facile da scalare per gli studi a elevata processività e richiede solo 50 ng di input di DNA senza dover eseguire estrazioni specializzate, frammentazione (shearing) o selezione della dimensione.

## Generazione di letture lunghe di elevata qualità sulle piattaforme NovaSeq

L'Illumina Complete Long Read Prep, Human è compatibile con i sistemi di sequenziamento NovaSeq X Plus, NovaSeq X e NovaSeq 6000 e consente agli utenti di utilizzare lo stesso strumento per accedere sia ai dati delle letture lunghe sia delle letture brevi (Tabella 1). Il saggio è flessibile e consente di ottenere risultati coerenti su campioni di qualità variabile, oltre a richiedere il 90% in meno di input di DNA rispetto ad altre soluzioni per letture lunghe (Figura 2). Poiché il saggio è resistente agli inibitori e ai contaminanti comuni, funziona bene con il DNA ottenuto da sangue, saliva o tessuto.

L'Illumina Complete Long Reads unisce un saggio di preparazione delle librerie proprietario, la comprovata chimica di sequenziamento SBS di Illumina e un'efficace analisi secondaria DRAGEN per generare dati altamente accurati di letture lunghe (Figura 3). I frammenti lunghi di DNA a singola molecola vengono marcati enzimaticamente con pattern unici (o landmark), quindi amplificati e sequenziati. I landmark consentono al software di distinguere regioni ripetitive o difficili da mappare e di generare letture lunghe con un N50 di 5-7 kb (Figura 2). I dati delle letture lunghe vengono combinati con una libreria WGS non marcata per generare lunghe letture contigue che sono una rappresentazione esaustiva e accurata del frammento a molecola singola originario.



Figura 1: Flusso di lavoro di Illumina Complete Long Read: accesso ai dati del WGS esaustivo delle letture lunghe utilizzando un protocollo di preparazione delle librerie ottimizzato e scalabile, il sequenziamento sul NovaSeq 6000 System o sulla serie NovaSeq X e l'analisi secondaria DRAGEN. Con la libreria di Illumina Complete Long Read è necessario preparare, sequenziare e analizzare una libreria WGS standard 30x.

a. Sebbene sia possibile utilizzare un input minimo di 10 ng, Illumina raccomanda di utilizzare 50 ng di DNA.

Tabella 1: Processività dei campioni raccomandata per il saggio Illumina Complete Long Read<sup>a,b,c</sup>

Kit di reagenti da 300 cicli	Campioni per cella a flusso	Output per cella a flusso	Durata della corsa
NovaSeq 6000 S4 Reagents	4	Circa 3 Tb	Circa 44 ore
NovaSeq X Series 10B Reagents	4	Circa 3 Tb	Circa 24 ore
NovaSeq X Series 25B Reagents	10-11	Circa 8 Tb	Circa 48 ore

- a. Richiede corse di sequenziamento da 2 × 150 bp e genera una copertura di circa 30× dell'Illumina Complete Long Reads.
- b. Per l'analisi richiede 30× i dati del genoma intero umano di letture brevi standard dallo stesso campione. Si raccomanda l'Illumina DNA PCR-Free Prep. Sono compatibili anche i kit WGS di terze parti. Le librerie non marcate non devono essere preparate o sequenziate in parallelo; è possibile utilizzare i file FASTQ di un campione precedentemente analizzato.
- c. Se il sequenziamento delle librerie Illumina Complete Long Read viene eseguito sulle piattaforme NovaSeq, il punteggio Q30 riportato per una corsa potrebbe risultare al di sotto delle specifiche del NovaSeq. Questo non indica un problema relativo alle prestazioni con la corsa di sequenziamento o con la libreria.

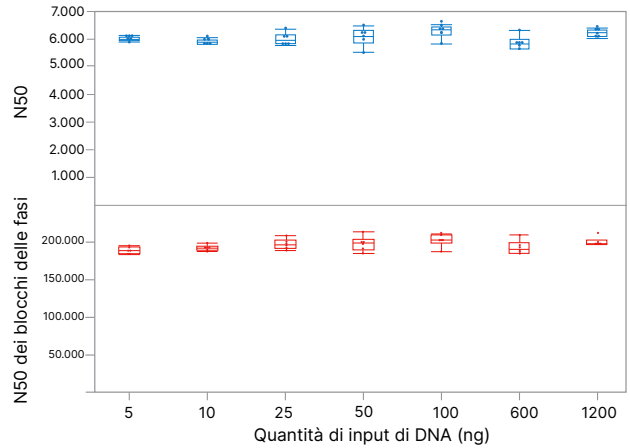


Figura 2: Il saggio Illumina Complete Long Read fornisce risultati coerenti su diverse quantità di input di DNA: input di DNA da 5 ng a 1.200 ng generano qualità dei dati simile per N50 e N50 dei blocchi delle fasi. N50 è definito come la lunghezza della sequenza del contig più breve al 50% della lunghezza dell'assemblaggio totale. Può inoltre essere utilizzato come una misura della dimensione dei blocchi di determinazione delle fasi.

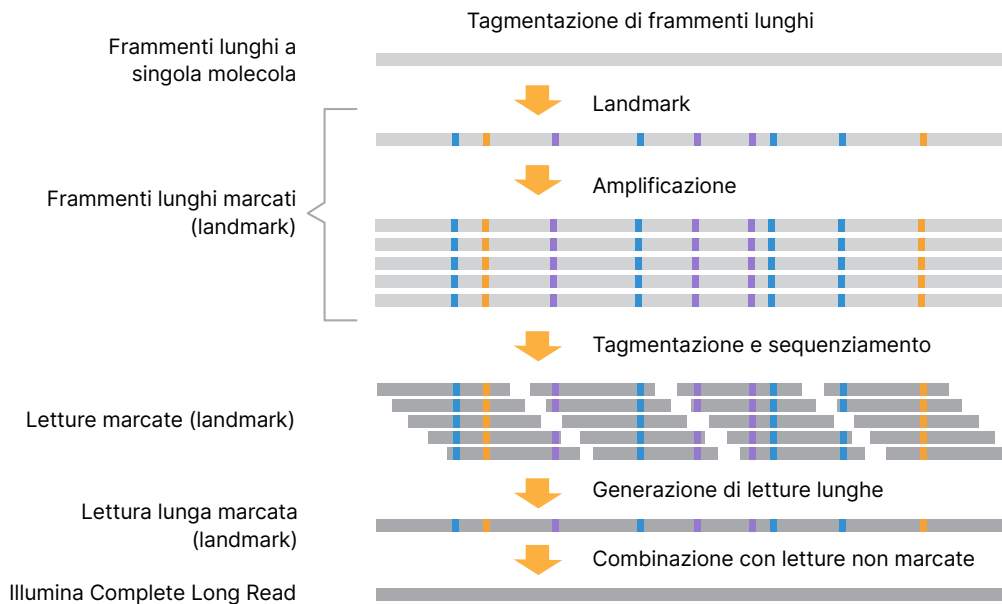


Figura 3: Come funziona il saggio Illumina Complete Long Reads: il saggio utilizza la tagmentazione<sup>8</sup> per generare frammenti lunghi di DNA (> 10 kb), eliminando la frammentazione (shearing) o la selezione della dimensione. I frammenti lunghi vengono marcati (landmark) a livello di singola molecola per catturare e preservare le informazioni sulla lettura lunga all'interno del frammento (senza codici a barre o adattatori complessi). Questi frammenti lunghi marcati (landmark) vengono amplificati, quindi una seconda fase di tagmentazione prepara le librerie per il sequenziamento. Durante l'analisi, l'efficace software DRAGEN genera letture lunghe e combina i dati con una libreria WGS standard non marcata (dallo stesso campione, sequenziato separatamente) per produrre letture lunghe complete e altamente accurate.

## Accesso al sequenziamento WGS altamente accurato

I dati dell'Illumina Complete Long Read integrano i dati WGS di letture brevi standard e forniscono informazioni più esaustive sui genomi interi mediante:

- Identificazione di varianti in regioni difficili e problematiche da mappare con regioni ripetitive o con elevata omologia
- Risoluzione di varianti strutturali complesse, pseudogeni e ampie inserzioni-delezioni (indel)
- Determinazione delle fasi di varianti e identificazione di aplotipi

I dati dell'Illumina Complete Long Read dimostrano una migliore accuratezza nell'identificazione di varianti su diversi tipi di variante rispetto ai dati altamente accurati del WGS umano generati utilizzando l'Illumina DNA PCR-Free Prep per la preparazione delle librerie e l'analisi secondaria DRAGEN<sup>3</sup> (Figura 4). Con i set di dati del PrecisionFDA Truth Challenge v2, il punteggio F1 è stato del 99,87%; ciò riflette la precisione e il richiamo per WGS utilizzando il saggio Illumina Complete Long Read (Figura 5).<sup>9,10</sup>

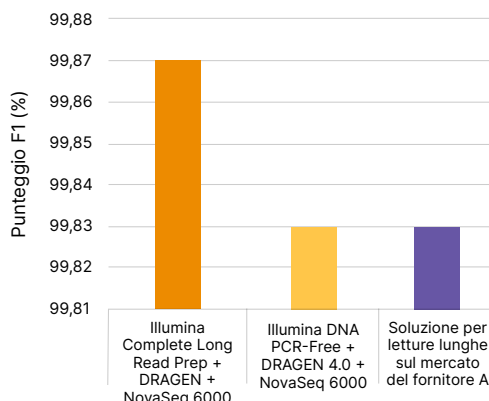


Figura 5: Un nuovo standard di accuratezza: l'Illumina Complete Long Read Prep, Human fornisce accuratezza senza precedenti nell'identificazione di varianti, come misurata dal punteggio F1 (%), un calcolo dei risultati veri positivi e veri negativi sotto forma di una percentuale dei risultati totali.

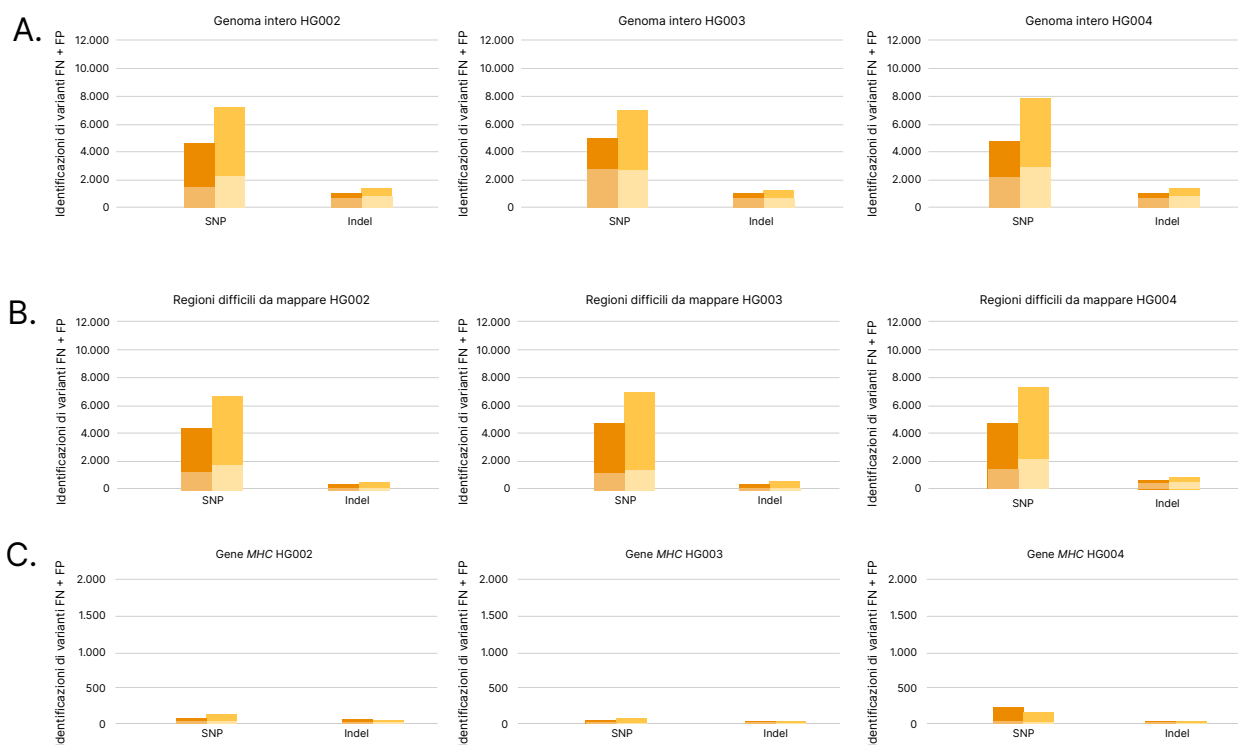


Figura 4: Il saggio Illumina Complete Long Read esegue l'identificazione di varianti altamente accurata per regioni geniche difficili: accuratezza nell'identificazione di varianti di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) e di indel misurata come falsi positivi (FP, False Positive) e falsi negativi (FN, False Negative) per i campioni di riferimento umano HG002, HG003 e HG004 del Genome in a Bottle.<sup>11</sup> Confronto dei dati del WGS ottenuti dal saggio Illumina Complete Long Read (arancio) e da Illumina DNA PCR-Free Prep (giallo) su (A) intero genoma, (B) regioni difficili da mappare e (C) gene *MHC*.

## Flusso di lavoro scalabile e ottimizzato per studi a elevata processività

Il flusso di lavoro di Illumina Complete Long Read Prep è altamente scalabile e supporta il sequenziamento WGS esaustivo per più campioni. Il protocollo di preparazione delle librerie è semplice e può essere completato in circa 8 ore (con circa 4 ore di interventi manuali), richiede solo strumentazione da laboratorio standard ed è facile da automatizzare. Con il NovaSeq X Plus System, gli utenti possono generare con elevata accuratezza fino a 3.000 genomi l'anno.\* L'Illumina Complete Long Reads può essere utilizzato per aumentare i set di dati WGS esistenti oppure come strumento reflex per la scoperta più approfondita di varianti.

## Riepilogo

Le informazioni sulle letture lunghe possono contribuire a risolvere le regioni più difficili del genoma. L'Illumina Complete Long Read Prep, Human consente ai laboratori genomici di accedere facilmente al sequenziamento WGS esaustivo poiché sullo stesso strumento possono essere analizzate sia letture lunghe sia letture brevi. Il flusso di lavoro è ottimizzato e standard ed è in sinergia con la comprovata chimica di SBS di Illumina e l'analisi DRAGEN fornisce il genoma intero più scalabile e accurato sul mercato. Le future offerte di prodotti amplieranno l'utilità dell'Illumina Complete Long Reads.

## Maggiori informazioni

[Illumina Complete Long Read Prep, Human](#)

[Tecnologia di sequenziamento delle letture lunghe](#)

## Bibliografia

1. 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](https://illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html). Consultato il 12 gennaio 2023.
2. Illumina. Scheda tecnica della piattaforma DRAGEN Bio-IT. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680.pdf). Pubblicato nel 2022. Consultato il 1° febbraio 2023.
3. Illumina. Accuracy improvements in germline small variant calling with the DRAGEN Bio-IT Platform. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf). Pubblicato nel 2022. Consultato il 1° febbraio 2023.
4. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. [pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-for-PacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf](https://pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-for-PacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf). Pubblicato nel 2022. Consultato il 12 gennaio 2023.
5. Pacific Biosciences. Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. [pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genome-and-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf](https://pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genome-and-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf). Pubblicato nel 2022. Consultato il 12 gennaio 2023.
6. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. [store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html](https://store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html). Consultato il 12 gennaio 2023.
7. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. [pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf](https://pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf). Pubblicato nel 2018. Consultato il 12 gennaio 2023.
8. Illumina. Tagmentation. [illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html](https://illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html). Consultato il 12 gennaio 2023.
9. Illumina. Dati in archivio. 2022.
10. PrecisionFDA. Truth Challenge V2: Calling Variants from Short and Long Reads in Difficult-to-Map Regions. [precision.fda.gov/challenges/10](https://precision.fda.gov/challenges/10). Consultato il 12 gennaio 2023.
11. Genome in a Bottle. National Institute of Standards and Technology. [nist.gov/programs-projects/genome-bottle](https://nist.gov/programs-projects/genome-bottle). Consultato il 12 gennaio 2023.

\* La potenziale processività si ottiene quando l'Illumina Complete Long Read Prep, Human viene utilizzato con il NovaSeq X Plus System, in corse con doppia cella a flusso con le celle a flusso 25B.

### Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina Complete Long Read Prep, Human (24 samples)	20089108
Illumina Complete Long Read Prep, Human (8 samples)	20086823
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
Illumina Complete Long Read WGS App	20100421



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

© 2023 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-01420 ITA v1.1