

Nextera™ DNA Exome

Il flusso di lavoro semplice ottimizza la preparazione delle librerie e l'arricchimento dell'esoma per accelerare il sequenziamento dell'esoma umano.

Punti principali

- Flessibilità per diverse progettazioni di studi**
 Chimica ottimizzata per accomodare quantità di input basso
- Preparazione delle librerie e arricchimento dell'esoma efficienti**
 Flusso di lavoro rapido e di facile automazione che impiega meno di due giorni, con solo tre ore di interventi manuali
- Identificazioni delle varianti accurate**
 La copertura elevata e il sequenziamento sul target forniscono dati accurati
- Soluzione integrata di flusso di lavoro**
 Il flusso di lavoro completo ottimizza il sequenziamento dell'esoma dalla preparazione delle librerie all'analisi dei dati

Introduzione

La comunità scientifica ha riconosciuto il sequenziamento dell'esoma come metodo potente per la scoperta di potenziali varianti causative per malattie genetiche.¹⁻³ Nextera DNA Exome, in precedenza in commercio con il nome di TruSeq™ Rapid Exome Kit, fornisce un flusso di lavoro di sequenziamento dell'esoma veloce, unendo la preparazione delle librerie con l'arricchimento dell'esoma in un singolo processo ottimizzato, senza la necessità di attrezzature per la frammentazione del DNA.

Flessibilità per diverse progettazioni di studi

Nextera DNA Exome è ottimizzato per 50 ng di input di DNA. La chimica dei trasposoni migliorata fornisce distorsioni ridotte nonché preparazione delle librerie e arricchimento dell'esoma coerenti su una gamma di quantità di DNA (Figura 1). L'enzima dei trasposoni è altamente tollerante a diverse quantità di input di DNA ed è in grado di accomodare incoerenze minori nella quantificazione del DNA. Il kit supporta il raggruppamento in pool delle librerie prima dell'arricchimento, consentendo ai laboratori di analizzare contemporaneamente fino a 12 campioni in base al volume del campione da elaborare. Nextera DNA Exome presenta un flusso di lavoro di facile automazione per semplificare e ottimizzare ancora di più i processi di laboratorio.

Contenuto esonico mirato

Nextera DNA Exome è ottimizzato per fornire una copertura uniforme e specifica di 45 Mb di contenuto esonico. Il gruppo di sonde è stato progettato per arricchire 214.405 esoni (Tabella 2). Questa progettazione mirata, accoppiata con arricchimento specifico e uniforme, consente il sequenziamento completo dell'esoma e l'identificazione affidabile di varianti codificanti vere.

Tabella 1: Contenuto esonico con Nextera DNA Exome e TruSeq DNA Exome

Specifiche della copertura	Nextera DNA Exome o TruSeq DNA Exome
Dimensione target	45 Mb
N. di esoni target	214.405
Contenuto target	esoni codificanti
Percentuale di copertura dell'esoma (per database)	
RefSeq ^a	99,45%
CCDS ^b	98,83%
ENSEMBL ^c	99,68%
GENCODE v19 ^d	99,68%

- RefSeq - database delle sequenze di riferimento NCBI. www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/. Consultato l'11 febbraio, 2015.
- CCDS - database della Consensus CDS (CCDS). www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi. Consultato l'11 febbraio, 2015.
- ENSEMBL - Ensembl Genome Browser. www.ensembl.org/index.html. Consultato l'11 febbraio, 2015.
- GENCODE - Progetto GENCODE: enciclopedia dei geni e delle varianti geniche. www.encodegenes.org/. Consultato l'11 febbraio, 2015.

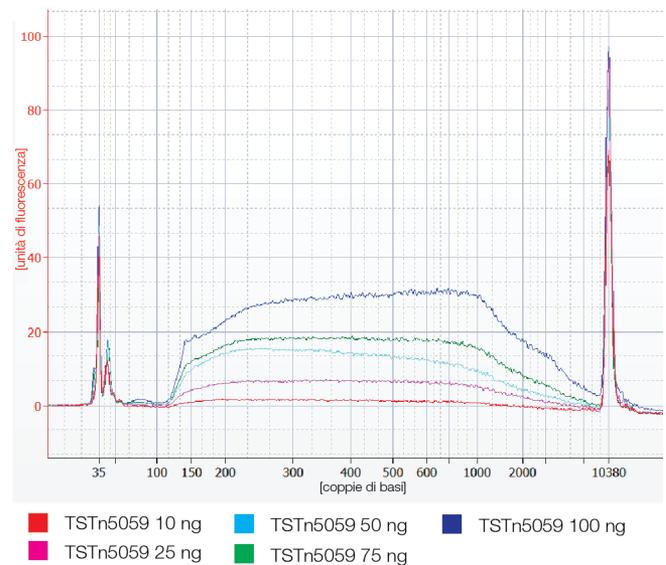


Figura 1: Reazione tramite marcatori (tagmentation) coerente per diverse quantità di input: la chimica dei trasposoni migliorata è altamente tollerante a diverse quantità di input di DNA riducendo le distorsioni e fornendo risultati coerenti. I risultati sono stati calcolati su uno strumento Bioanalyzer.

Preparazione delle librerie e arricchimento dell'esoma efficienti

Nextera DNA Exome permette di preparare le librerie e di arricchire l'esoma in meno di due giorni, con sole tre ore di interventi manuali (Figura 3). La preparazione delle librerie comincia con una reazione tramite marcatori (tagmentation), in cui il DNA genomico viene contemporaneamente frammentato e marcato da adattatori (Figura 3A). Il DNA tagmentato è amplificato e gli indici di sequenziamento sono aggiunti dalla PCR (Figura 3B). Sono raggruppate in pool fino a 12 librerie; il pool delle librerie viene concentrato e le librerie denaturate in DNA a filamento singolo (Figura 3C). Le sonde biotilate, specifiche per la regione target, sono utilizzate per due cicli di ibridazione (Figure 3D e 3E). Il pool viene arricchito per le regioni desiderate utilizzando microsferi coniugate con la streptavidina che si legano alle sonde biotilate. I frammenti di DNA biotilato legati alle microsferi coniugate con la streptavidina vengono magneticamente raccolti (pull-down) dalla soluzione. I frammenti di DNA arricchito sono eluiti dalle microsferi e ulteriormente amplificati dalla PCR (Figura 3F). Le librerie amplificate sono pulite e pronte per il sequenziamento (Figura 3G).

Identificazioni delle varianti accurate

Le librerie preparate con Nextera DNA Exome forniscono copertura elevata, con l'85% delle letture coperte a una profondità di 20x (Figura 2). Una tale copertura elevata fornisce identificazioni delle varianti accurate. Più del 99,58% delle identificazioni delle varianti ottenute mediante Nextera DNA Exome corrisponde ai dati di riferimento standard contenuti nel database del National Institute of Standards and Technology (NIST) (Figura 4).^{5,6}

Nextera DNA Exome fornisce in media il 75% delle letture di sequenziamento sul target (Figura 6). Questa elevata percentuale sul target richiede meno cicli di sequenziamento per ottenere i livelli di copertura desiderati, tuttavia si ottiene ancora copertura uniforme per risultati di elevata sicurezza. Permette inoltre il sequenziamento di più esomi per corsa, per consentire ai laboratori di massimizzare i budget disponibili (Tabella 2).

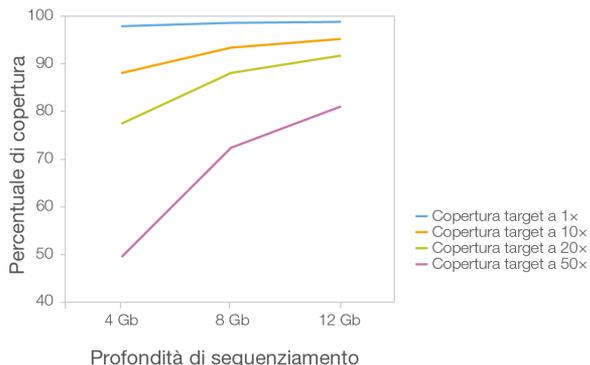


Figura 2: Efficacia della copertura a varie profondità: Nextera DNA Exome garantisce una copertura eccezionale a diverse profondità di sequenziamento, con una copertura di > 80% dei target fino a una profondità di 20x.



* Illumina raccomanda di fermarsi a questo punto e di riprendere il flusso di lavoro il giorno successivo, se necessario.

Figura 3: Flusso di lavoro rapido ed efficiente: Nextera DNA Exome completa la preparazione delle librerie e l'arricchimento dell'esoma in meno di due giorni e fornisce una maggiore flessibilità grazie a punti di arresto sicuri.

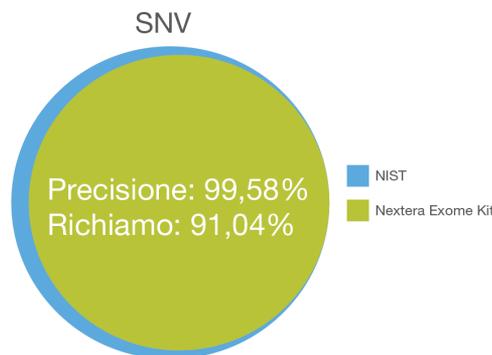


Figura 4: Elevata correlazione con il database NIST: le identificazioni delle varianti a singolo nucleotide (SNV, single nucleotide variant) ottenute con Nextera DNA Exome dimostrano l'elevata concordanza con i dati di riferimento standard. Il campione di DNA NA12878 del Centre de l'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) è stato sequenziato a una profondità di copertura di 100x. **La precisione** è la probabilità che una variante identificata sia accurata. **Il richiamo** è la probabilità di identificare una variante convalidata.

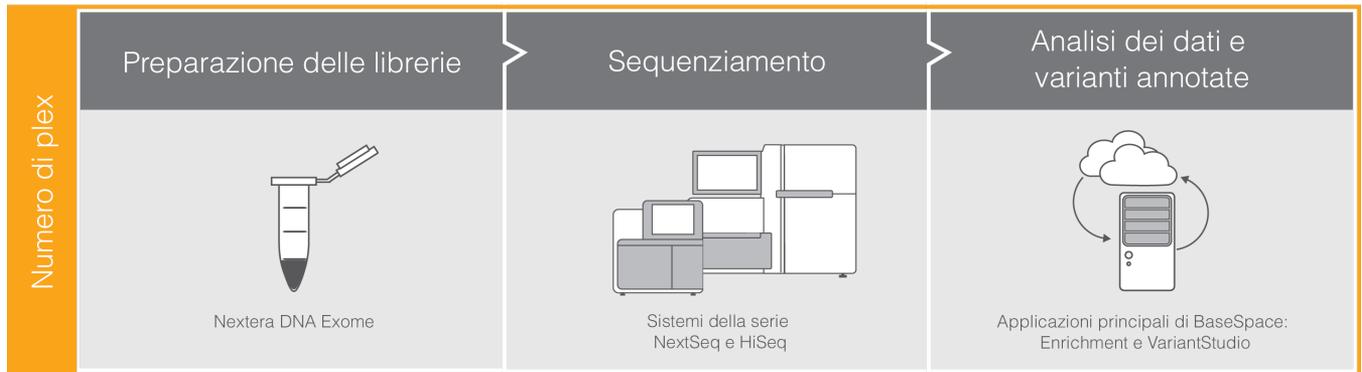


Figura 5: Flusso di lavoro del sequenziamento dell'esoma: Nextera DNA Exome fa parte di un flusso di lavoro del sequenziamento dell'esoma integrato che include la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati.

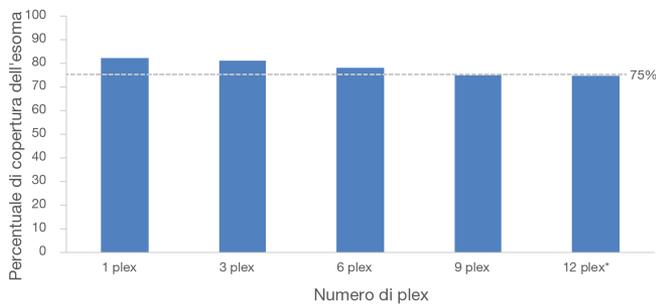


Figura 6: Arricchimento sul target: Nextera DNA Exome fornisce in media il 75% delle letture di sequenziamento sul target a 4 Gb per esoma per un sequenziamento dell'esoma efficiente ed efficace in termini di costi.

Tabella 2: Confronto del rendimento con Nextera DNA Exome^a

Sistema di sequenziamento	N. di esomi per corsa a 50x	N. di esomi per corsa a 100x
Serie MiSeq	1	N/A
Serie NextSeq		
Cella a flusso Mid-Output (Output medio)	3	2
Cella a flusso High-Output (Output elevato)	12	6
Serie HiSeq		
Sistema HiSeq 2500, modalità Rapid Run (Corsa rapida), doppia cella a flusso	24	12
Sistema HiSeq 2500, modalità High Output (Output elevato), doppia cella a flusso	156	78
Sistema HiSeq 3000	96	48
Sistema HiSeq 4000, doppia cella a flusso	192	96

a. Il numero di esomi stimati sequenziati per corsa è calcolato con una copertura media di 50x e 100x, rispettivamente. Illumina raccomanda una lunghezza di lettura di 2 x 75 bp su tutti i sequenziatori quando si utilizza Nextera DNA Exome.

* Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc., 2015.

Flusso di lavoro di sequenziamento integrato

Nextera DNA Exome fa parte di una soluzione compatta e supportata che guida i ricercatori dalla preparazione delle librerie all'analisi dei dati (Figura 5). Il kit unisce la preparazione delle librerie e l'arricchimento dell'esoma, eliminando la necessità di acquistare indici, microsferi per la purificazione dei campioni e altro materiale ausiliario. Tutti i componenti di Nextera DNA Exome sono progettati, ottimizzati e convalidati assieme analiticamente, eliminando la necessità di valutare componenti multipli e disparati. Gli esperti scienziati Illumina forniscono una singola fonte di supporto tecnico e sul campo per ciascuna fase del flusso di lavoro. Unendosi alla comunità Illumina, i ricercatori possono sfruttare l'esperienza del team di supporto Illumina e collaborare con un'ampia rete di scienziati che utilizzano la tecnologia Illumina.

Nextera DNA Exome è compatibile con le serie MiSeq™, NextSeq™, HiSeq™ e NovaSeq™ di sistemi di sequenziamento. I sistemi di sequenziamento Illumina utilizzano il sequenziamento per sintesi chimica (SBS) per generare più del 90% dei dati di sequenziamento al mondo.* I dati di sequenziamento vengono trasferiti automaticamente dai sistemi Illumina a BaseSpace® Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico Illumina. BaseSpace Sequence Hub rimuove molte delle complessità create da un tipico flusso di lavoro di analisi, semplificando l'analisi dei dati e l'interpretazione biologica. BaseSpace Sequence Hub offre un ecosistema consolidato di strumenti integrati per l'analisi dei dati progettati per i biologi. Con le applicazioni BaseSpace, gli strumenti di analisi preferiti dagli esperti sono raccolti in un'interfaccia utente intuitiva e di facile utilizzo, per permettere a qualsiasi ricercatore di accedere a un gruppo di strumenti di analisi affidabile senza la necessità di avere precedente esperienza in bioinformatica (Figura 7). I ricercatori possono scegliere di analizzare i dati dell'esoma utilizzando l'applicazione BWA Enrichment, che utilizza il metodo BWA/GATK standard nel settore, oppure l'applicazione Isaac™ Enrichment, che utilizza un gruppo di strumenti Illumina veloce e accurato.⁶

Per i biologi che studiano la base genetica della malattia, l'applicazione VariantStudio permette l'identificazione e l'interpretazione funzionale di varianti di singolo nucleotide (SNV), inserzioni e delezioni (Indel) associate alla malattia. I ricercatori possono filtrare e isolare rapidamente varianti consequenziali per arricchire i dati di sequenziamento con contesto biologico. I risultati significativi vengono esportati in report sintetici. L'applicazione VariantStudio permette ai ricercatori di esplorare il significato biologico in pochi semplici passaggi.

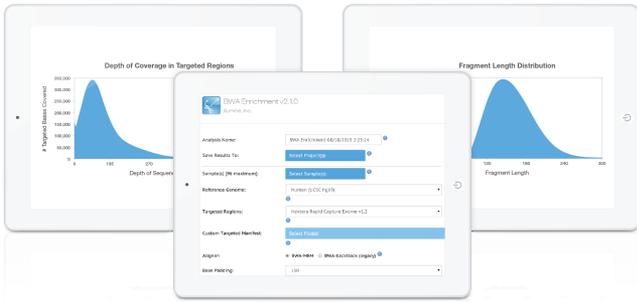


Figura 7: Analisi semplificata dei dati con le applicazioni BaseSpace: i dati di sequenziamento di Nextera DNA Exome possono essere caricati facilmente e senza rischi su BaseSpace Sequence Hub e analizzati con l'applicazione BWA Enrichment. I risultati sono forniti in formati di facile lettura.

Confronto delle prestazioni per il sequenziamento dell'esoma

Illumina offre due soluzioni integrate di flusso di lavoro per il sequenziamento dell'esoma. Sono disponibili inoltre flussi di lavoro che combinano la preparazione delle librerie Illumina con TruSeq DNA Exome o Nextera DNA Exome, con successivo arricchimento dell'esoma con xGen® Universal Blockers, xGen Lockdown Reagents e xGen Exome Research Panel v1.0, disponibili da IDT (Tabella 3).

Tabella 3: Confronto delle prestazioni per il flusso di lavoro dell'esoma

Metrica	TruSeq-xGen ^a	Nextera-xGen ^a	TruSeq Exome	Nextera Exome
Input di DNA	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng
Tipi di campione	DNA	DNA	DNA e FFPE	DNA
Interventi manuali	5 ore	2 ore	6 ore	3 ore
Durata totale del saggio	2,5 giorni	2 giorni	2,5 giorni	2 giorni
Durata dell'ibridazione	4 ore	4 ore	16 ore	2 ore
% sul target	> 91%	> 92%	> 80%	> 75%
% di copertura a 20x ^b	> 95%	Più dell'85%	> 90%	Più dell'85%

- a. Le specifiche del flusso di lavoro di arricchimento dell'esoma Illumina-IDT si basano su dati preliminari registrati su BaseSpace Sequence Hub.
 b. La percentuale di copertura a 20x è stata determinata per i kit TruSeq-xGen e Nextera-xGen con un sequenziamento di 3,5 Gb. La percentuale di copertura a 20x è stata determinata per i kit TruSeq DNA Exome e Nextera DNA Exome con un sequenziamento di 8 Gb.

Riepilogo

Nextera DNA Exome fornisce un metodo semplice e ottimizzato per individuare e comprendere varianti codificanti con eccezionale accuratezza dei dati. Il flusso di lavoro veloce di preparazione delle librerie e di arricchimento dell'esoma fornisce librerie pronte al sequenziamento in meno di due giorni e offre flessibilità nella pianificazione dei progetti in base al volume del campione. Come parte di un flusso di lavoro completo che consiste in un'eccellente tecnologia di sequenziamento e in strumenti di analisi semplici da usare, Nextera DNA Exome permette ai ricercatori di implementare il sequenziamento dell'esoma in modo efficiente ed efficace in termini di costi.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni sul sequenziamento dell'esoma, accedere a www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Nextera Exome Kit (24 campioni)	20020616
Nextera Exome Kit (96 campioni)	20020617

Bibliografia

- Litchfield K, Summersgill B, Yost S, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun.* 2015;6:5973.
- Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol.* 2014;76:473–483.
- Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med.* 2011;13:255–262.
- Standard Reference Data (www.nist.gov/srd). Consultato l'11 febbraio 2015.
- Genome in a Bottle Consortium | Advances in Biological and Medical Measurement Science (sites.stanford.edu/abms/giab). Consultato il 20 febbraio 2015.
- Raczky C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics.* 2013;29:2041–2043.