

Sistema di sequenziamento iSeq™ 100

Il sistema di sequenziamento più piccolo e accessibile di Illumina consente un rapido ed efficace sequenziamento a bassa processività ed è adatto praticamente a tutti i laboratori.

Punti principali

- Rapida generazione dei dati**
 Eseguce progetti più piccoli su uno strumento dedicato a bassa processività con rapidi tempi di elaborazione
- Qualità della libreria conveniente e test “proof of principle”**
 Valutazione della qualità della libreria prima di ampie corse, esecuzione di studi pilota o generazione di dati da trasmettere
- Operazioni indipendenti e convenienti**
 Controllo del processo di sequenziamento dall'inizio alla fine e mantenimento di una programmazione indipendente interna senza bisogno di esternalizzare
- Elevata sensibilità analitica ed eccezionale accuratezza dei dati**
 Trae vantaggio dalla più elevata sensibilità analitica nella rilevazione di varianti e trascritti rari rispetto al sequenziamento con qPCR o con metodo di Sanger^{1,2}



Figura 2: Sistema iSeq 100: misurando poco più di 0,028 metri cubi, il sistema iSeq 100 offre la potenza del NGS nel più compatto sistema di sequenziamento da banco della gamma Illumina.

Introduzione

Vi presentiamo il più innovativo sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing). Il sistema compatto Illumina iSeq 100 (Figura 1) combina la tecnologia CMOS (Complementary MOS, Metal Oxide Semiconductor) con la comprovata precisione della chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS) di Illumina per offrire dati altamente precisi con rapidi tempi di elaborazione. Il sistema iSeq 100 genera 1,2 Gb di dati per corsa in 17,5 ore e offre l'alta risoluzione e la sensibilità analitica necessarie per la rilevazione di varianti e trascritti rari.^{1,2}

Pur essendo di ingombro ridotto, il sistema iSeq 100 offre grossi vantaggi. Consente corse rapide e su piccola scala, a costi contenuti, senza la necessità di sistemi più grandi. Con un sistema iSeq 100 nel

proprio laboratorio, i ricercatori possono eseguire corse quando vogliono, senza dover aspettare di raggiungere lotti di dimensioni ottimali per sistemi a più alta processività e senza il bisogno di esternalizzare. Inoltre, i ricercatori possono gestire il processo di sequenziamento dall'inizio alla fine, con maggiore sicurezza sull'integrità del campione e sui risultati dell'analisi dei dati. Con un prezzo di listino accessibile a praticamente qualsiasi laboratorio, il sistema iSeq 100 offre una soluzione conveniente per processi di sequenziamento di nuova generazione indipendenti e su piccola scala.

Flusso di lavoro ottimizzato, in tre fasi

Il sistema iSeq 100 fa parte di un flusso di lavoro ottimizzato in tre fasi che comprende: preparazione della libreria, sequenziamento e analisi dei dati (Figura 2).



Figura 1: Flusso di lavoro del sistema iSeq 100: il sistema iSeq 100 fa parte di un flusso di lavoro ottimizzato da DNA a dati.

Tabella 1: Parametri delle prestazioni del sistema iSeq 100^a

Configurazione corsa	Lecture (filtrazione)/corsa	Output	Punteggio qualitativo ^b	Durata della corsa ^c
1 × 36 bp	4 M	144 Mb	> 85%	9 ore
1 × 50 bp	4 M	200 Mb	> 85%	9 ore
1 × 75 bp	4 M	300 Mb	> 80%	10 ore
2 × 75 bp	4 M	600 Mb	> 80%	13 ore
2 × 150 bp	4 M	1,2 Gb	> 80%	17,5 ore

a. I parametri delle prestazioni possono variare in base al tipo di campione, alla qualità del campione e ai cluster che attraversano il filtro.

b. La percentuale di basi con punteggio qualitativo superiore a Q30 rappresenta la media di un'intera corsa.

c. La durata comprende generazione di cluster, sequenziamento, identificazione delle basi e punteggio di qualità.



Figura 3: Portafoglio di sistemi di sequenziamento NGS Illumina: i sistemi NGS Illumina offrono soluzioni per un'ampia gamma di applicazioni, tipi di campione e necessità di processività. Ciascuna di esse fornisce dati di elevata precisione con processività flessibile e flussi di lavoro semplici ed ottimizzati.

Rapida preparazione delle librerie

Il sistema iSeq 100 è compatibile con tutta la serie dei kit di preparazione delle librerie Illumina. Con i kit Nextera™ XT e Nextera DNA Flex Library Prep Kit, i ricercatori possono preparare librerie in multiplex in tre o quattro ore per il sequenziamento di piccoli genomi e quello diretto di ampliconi long-range. Inoltre, la nuova soluzione di risequenziamento mirato AmpliSeq™ per Illumina Targeted Resequencing, produce contenuti sapientemente realizzati. I pannelli mirati AmpliSeq sono disponibili in versione fissa e pronta all'uso, in versione progettata per comunità oppure possono essere personalizzati per soddisfare specifiche necessità di ricerca. In base al kit, i kit di preparazione delle librerie Illumina hanno bisogno del quantitativo minimo di 1 ng di DNA o RNA (cDNA) input e hanno la flessibilità necessaria per adattarsi al DNA estratto da campioni fissati in formalina o inclusi in paraffina (FFPE), quali tessuti tumorali conservati.

Il sistema iSeq 100 è compatibile con tutti i kit di preparazione delle librerie Illumina, consentendo completa compatibilità con tutti gli strumenti Illumina. Tale compatibilità incrociata consente ai ricercatori di confrontare facilmente i dati dei diversi sistemi o di passare a sistemi più grandi, quali MiniSeq™, MiSeq™ o NextSeq™ (Figura 3).

Sequenziamento sul sistema iSeq 100

Dopo la preparazione delle librerie, queste vengono caricate in una cartuccia di reagenti preriempita per il sistema iSeq 100. Con la cartuccia preriempita, avviare una corsa sul sistema iSeq 100 è talmente semplice che si può scongelare, caricare e avviare in cinque minuti (durata totale degli interventi manuali). Il sistema iSeq 100 integra in un unico strumento le fasi di denaturazione delle librerie, l'amplificazione clonale, il sequenziamento e l'analisi dei dati, eliminando così la necessità di acquistare apparecchiature accessorie. L'intuitiva interfaccia utente mostra istruzioni per ogni fase dell'impostazione della corsa e dei processi di avvio, consentendo ai ricercatori di eseguire varie applicazioni di sequenziamento con una minima formazione e tempi di impostazione ridotti.

Sensibilità analitica e precisione elevate grazie alla chimica SBS

Durante la corsa di sequenziamento, il sistema iSeq 100 si avvale della comprovata SBS Illumina, la chimica per NGS più utilizzata al mondo.³ Il sistema iSeq 100 garantisce dati di elevata qualità con oltre l'80% delle basi e un punteggio qualitativo pari o superiore a Q30* (Tabella 1, Figura 4).

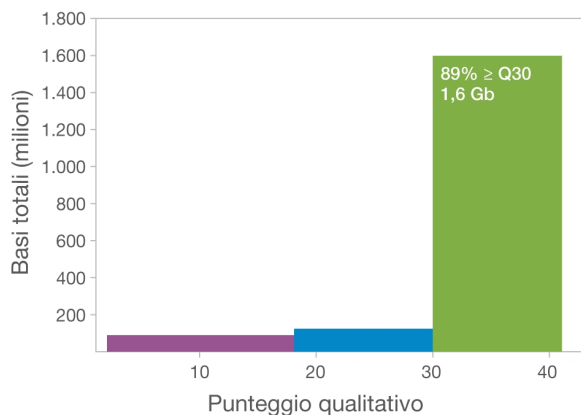


Figura 4: Punteggi della qualità del sistema iSeq 100: un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione delle probabilità di errore nell'identificazione delle basi. Un punteggio qualitativo di 30 (Q30) è ampiamente considerato il termine di paragone per dati di elevata qualità.⁴ La corsa di un pool microbico su sistema iSeq 100 configurata su 2 × 151 bp garantisce che l'89% delle basi abbiano un punteggio qualitativo pari o superiore a Q30.

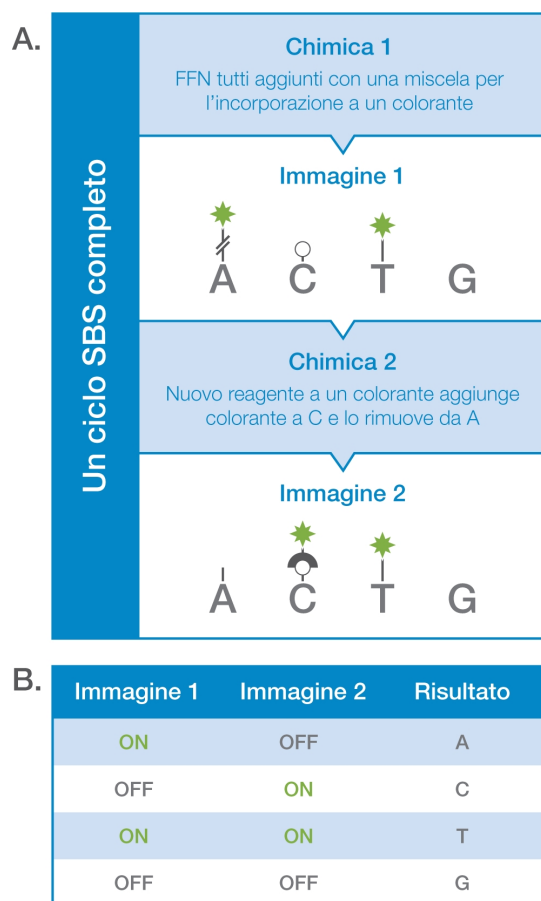


Figura 5: Chimica SBS a un canale: (A) la chimica SBS a un canale prevede due fasi di chimica e due di imaging per ciclo di sequenziamento usando nucleotidi che possono essere etichettati o non etichettati in base alla fase chimica. (B) L'identificazione delle basi è determinata dallo schema di segnale tra entrambe le immagini.

Questo metodo basato su terminatori reversibili rileva le singole basi mano a mano che vengono incorporate in filamenti crescenti di DNA e consente il sequenziamento in parallelo di milioni di frammenti di DNA. La chimica SBS Illumina utilizza la competizione naturale tra tutti i quattro nucleotidi etichettati, il che riduce le distorsioni dovute all'incorporazione e consente un sequenziamento più preciso di regioni ripetitive e omopolimeri.⁵ Rispetto al sequenziamento Sanger basato sull'elettroforesi capillare, la tecnologia NGS è in grado di rilevare un'ampia gamma di varianti del DNA, incluse quelle a bassa frequenza e quelle adiacenti sottoposte a determinazione delle fasi (phasing), e permette di ottenere risultati più rapidi e con meno fasi di interventi manuali.^{1,2}

Chimica SBS a un canale, estremamente innovativa

Il sistema iSeq 100 combina la comprovata chimica SBS Illumina con la tecnologia CMOS per una chimica di sequenziamento a un canale. Il sistema iSeq 100 impiega una cella a flusso preconfigurata (patterned) con nano-pozzetti prodotti su chip CMOS. Nei nano-pozzetti, che sono allineati direttamente su ogni fotodiodo CMOS (pixel), si verifica un'attività di clustering e sequenziamento. La chimica proprietaria ExAmp garantisce che per ogni nano-pozzetto si formi un solo cluster. L'impiego di un sensore integrato nel materiale di consumo è un metodo di rilevazione semplice e rapido.

Diversamente dalla chimica SBS a quattro canali, in cui i sequenziatori utilizzano quattro diversi coloranti per nucleotide, una fase chimica e quattro immagini per ciclo di sequenziamento, il sistema iSeq 100 utilizza un colorante, due fasi chimiche e due immagini per ciclo di sequenziamento (Figura 5). Nella chimica a un canale, l'adenina ha un'etichetta rimovibile ed è etichettata solo nella prima immagine. La citosina ha un gruppo legante che si lega a un'etichetta ed è etichettata solo nella seconda immagine. La timina ha un'etichetta fluorescente ed è dunque etichettata in entrambe le immagini, mentre la guanina è sempre scura (non etichettata). I nucleotidi vengono identificati tramite l'analisi dei diversi schemi di emissione per ogni base attraverso le due immagini.

Analisi dei dati semplice e flessibile

Il sistema iSeq 100 offre numerosi opzioni per l'analisi dei dati, comprese quelle basate su cloud e sullo strumento. Local Run Manager, un software completamente integrato per l'analisi sullo strumento, presenta un'architettura modulare per supportare saggi correnti e futuri. Il software Local Run Manager supporta la pianificazione delle corse di sequenziamento, il monitoraggio delle librerie e le corse mediante audit trail nonché l'integrazione grazie a moduli di analisi dei dati sullo strumento. Mentre Local Run Manager viene eseguito sul computer dello strumento, l'utente può monitorare il progredire della corsa e visualizzare i risultati dell'analisi da altri computer collegati alla medesima rete. Al termine di una corsa di sequenziamento, Local Run Manager avvia automaticamente l'analisi dei dati utilizzando uno dei moduli di analisi specifico per l'applicazione. I moduli possono produrre dati di allineamento,

individuare varianti a singolo nucleotide (SNV, single-nucleotide variant) e varianti strutturali, eseguire analisi di espressione e di piccolo RNA e altro ancora (Tabella 2).

In alternativa, i dati di sequenza possono essere immediatamente trasferiti, analizzati e archiviati in BaseSpace™ Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico Illumina. A causa di formati di dati standard del settore, sviluppatori terzi hanno creato un ricco ecosistema di app a pagamento e open source in BaseSpace Sequence Hub per l'analisi a valle dei dati. Tali app forniscono algoritmi automatizzati per l'intero genoma, l'esoma e il trascrittoma, e dati di risequenziamento mirato per l'allineamento, la rilevazione di varianti, l'annotazione, la visualizzazione e altro ancora.

Versatile per supportare un'ampia gamma di applicazioni

Con un output massimo di 1,2 Gb, il sistema iSeq 100 offre un sequenziamento rapido in multiplex per un'ampia gamma di applicazioni.

- Sequenziamento dell'intero genoma piccolo
- Risequenziamento mirato
 - AmpliSeq per Illumina Targeted Resequencing (risequenziamento mirato)
 - oppure PCR long-range
- Sequenziamento *De novo*
- Validazione della mutagenesi
- Metagenomica (sequenziamento dell'rRNA 16S)
- Sequenziamento mirato di mRNA
- Sequenziamento di RNA piccolo
- Valutazione multigenomica
- Tipizzazione basata su sequenza dell'antigene leucocitario umano (HLA, Human leukocyte antigen)

Tabella 2: Esempio di applicazioni del sistema iSeq 100 e configurazioni della corse

Applicazione	Campione/corsa	Durata della corsa
Sequenziamento piccolo genoma		
Genomi 5-10 Mb, copertura 30x 2 x 150 bp	1-8	17,5 ore
Profilo dell'espressione genica mirata		
Fino a 500 target 1 x 50 bp	1-48	9 ore
Sequenziamento mirato dell'amplicone		
Fino a 3.000 ampliconi 2 x 150 bp	1-48	17,5 ore

Informazioni per gli ordini

Sistema	N. di catalogo
Sistema di sequenziamento iSeq 100	20021532
Kit di reagenti per il sequenziamento	N. di catalogo
iSeq 100 i1 Reagent (kit singolo, 300 cicli)	20021533
iSeq 100 i1 Reagent 4 Pack (kit quadruplo, 300 cicli)	20021534

Riepilogo

Pur essendo lo strumento più piccolo della gamma Illumina, il sistema iSeq 100 garantisce grossi vantaggi. Rispetto a sistemi di sequenziamento più grandi o all'esternalizzazione, il sistema iSeq 100 consente corse su piccola scala più rapide e più convenienti in termini economici, l'indipendenza dall'esternalizzazione e il controllo del processo di sequenziamento dall'inizio alla fine. Inoltre, facendo parte di una soluzione completa che comprende una serie di kit di preparazione delle librerie, il sequenziamento e una semplice analisi dei dati, il sistema iSeq 100 consente un flusso di lavoro completamente supportato e integrato. Grazie al prezzo accessibile e l'ingombro ridotto, il sistema iSeq 100 porta la forza della tecnologia NGS praticamente in tutti i laboratori, con qualsiasi budget.

Bibliografia

1. Precone V, Monaco VD, Esposito MV, et al. [Cracking the Code of Human Diseases Using Next-Generation Sequencing: Applications, Challenges, and Perspectives](#). *Biomed Res Int*. 2015;161648.
2. Shokralla S, Porter TM, Gibson JF, et al. [Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform](#). *Sci Rep*. 2015;5:9687.
3. Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc., 2015.
4. Illumina (2011) [Quality Scores for Next-Generation Sequencing](#). Consultato il 1 dicembre 2017.
5. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry](#). *Nature*. 2008;456(7218):53-59.

Specifiche del sistema iSeq 100

Parametro	Specifiche
Configurazione dello strumento	Monitoraggio RFID dei materiali di consumo
Computer di controllo dello strumento (interno) ^a	Unità di base: Celeron J1900, 2 GHz, Quad Core CPU Memoria: 8 GB RAM Disco rigido: 240 GB SSD Sistema operativo: Windows 10 IoT Enterprise
Ambiente operativo	Temperatura: da 15 °C a 30 °C (22,5 °C ± 7,5 °C) Umidità: 20%-80% senza condensa, umidità relativa Altitudine: inferiore a 2.000 m Qualità dell'aria: Grado di inquinamento 2 Ventilazione: fino a 2.048 BTU/ora @ 600 W Per uso esclusivo in interni
Diodo a emissione luminosa (LED)	520 nm, 460 nm; 1,5 W/cm ² al piano dell'immagine
Dimensioni	L×P×A: 30,5 cm × 33 cm × 28 cm Peso: 16 kg Peso con imballaggio: 21 kg
Requisiti di alimentazione	90-264 V c.a. 47-63 Hz 80 W
Identificazione a radio frequenza (RFID)	Frequenza: 13,56 MHz Potenza: corrente fornita 120 mA, potenza di output RF 200 mW
Sicurezza e conformità del prodotto	Certificato secondo IEC da un NRTL (Nationally Recognized Testing Laboratory) Marcatura 61010-1 CE Approvato FCC/IC

a. Specifiche del computer soggette a cambiamento.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni sul sistema iSeq 100, visitate la pagina Web www.illumina.com/iseq

Per maggiori informazioni sulla tecnologia CMOS e la SBS a un canale, scaricate la nota tecnica [Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry](#)

Per maggiori informazioni sul sequenziamento microbico e mitocondriale con il sistema iSeq 100, leggete la nota applicativa [Microbial WGS with the iSeq 100 System](#) oppure [Mitochondrial DNA Sequencing on the iSeq 100 System](#)

Per consultare le FAQ, visitate la pagina [iSeq 100 System FAQs Page](#)