

illumina Complete Long Read Prep, Human

Una solución flexible y de alto rendimiento para la secuenciación del genoma completo humano de lectura larga

- WGS humano completo con lecturas largas y cortas hechas con el mismo instrumento
- Preparación de librerías y análisis de rendimiento optimizados para obtener resultados precisos y fiables
- Flujo de trabajo de un día, compatible con la automatización y con bajos requisitos de aporte de ADN

illumina[®]

Introducción

La secuenciación de nueva generación (NGS, Next-Generation Sequencing) permite a los científicos descodificar el genoma para comprender mejor las características biológicas. Los procesos químicos demostrados de secuenciación por síntesis (SBS, Sequencing By Synthesis) de Illumina, en combinación con el análisis secundario DRAGEN™ mundialmente reconocido, proporciona datos de secuenciación del genoma completo (WGS, Whole-Genome Sequencing) con una precisión excepcional.¹ Los últimos avances en el análisis de DRAGEN están eliminando las deficiencias que todavía existen en los genes más difíciles de asignar.^{2,3} Sin embargo, una fracción muy pequeña de las regiones genómicas se puede beneficiar de longitudes de lectura más largas para permitir una resolución y asignación precisas de estas regiones difíciles. Sin embargo, muchas soluciones de secuenciación de lectura larga se han visto afectadas por elevados requisitos de aporte de ADN, complejos flujos de trabajo con baja productividad y resultados muy variables, lo que ha limitado su utilidad y adopción.⁴⁻⁷

Illumina Complete Long Read hace que la secuenciación de lectura larga sea accesible y optimizada para los laboratorios de genómica. Illumina Complete Long Prep, Human es el primer producto que se basa en esta novedosa tecnología de lectura larga. El ensayo de WGS de alto rendimiento emplea un flujo de trabajo de NGS estándar para generar secuencias contiguas de lectura larga en NovaSeq™ 6000 System y NovaSeq X Series (Figura 1). El eficiente protocolo de preparación de librerías en un solo día es fácil de escalar en el caso de los estudios de alta productividad y requiere únicamente 50 ng de aporte de ADN sin extracciones especializadas, cizallamiento o selección de tamaño.

Generación de lecturas largas de alta calidad en plataformas NovaSeq

Illumina Complete Long Read Prep, Human es compatible con NovaSeq X Plus Sequencing System, NovaSeq X Sequencing System y NovaSeq 6000 Sequencing System, lo que permite a los usuarios acceder a datos de lectura larga y corta en el mismo instrumento (Tabla 1). El ensayo flexible ofrece resultados coherentes en muestras de calidad variable, al tiempo que requiere un 90 % menos de aporte de ADN que otras soluciones de lectura larga (Figura 2). Dado que el ensayo es resistente a los inhibidores y contaminantes habituales, funciona bien con ADN procedente de sangre, saliva o tejidos.

Illumina Complete Long Read combina un ensayo de preparación de librerías exclusivo, los procesos químicos demostrados de SBS de Illumina y el potente análisis secundario de DRAGEN para generar datos de lectura larga de gran precisión (Figura 3). Los fragmentos largos de ADN de una sola molécula se marcan enzimáticamente con patrones únicos (o «marcas de referencia») y, a continuación, se amplifican y secuencian. Las marcas de referencia permiten que el software distinga las regiones repetitivas o difíciles de asignar y genere lecturas largas con una N50 de 5-7 kb (Figura 2). Los datos de lectura larga se combinan con una librería de WGS no marcada para producir lecturas contiguas largas que son una representación completa y precisa del fragmento original de una sola molécula.



Figura 1: Flujo de trabajo de Illumina Complete Long Read. Acceso a datos de WGS completa de lectura larga mediante un protocolo de preparación de librerías flexible y optimizado, secuenciación en NovaSeq 6000 System o NovaSeq X Series y el análisis secundario de DRAGEN. Se debe preparar, secuenciar y analizar una librería de WGS estándar de 30x con la librería de Illumina Complete Long Read.

a. Aunque son posibles aportes de hasta 10 ng, Illumina recomienda 50 ng de aporte de ADN

Tabla 1: Productividad de muestras recomendada para el ensayo Illumina Complete Long Read^{a,b,c}

Kits de reactivos de 300 ciclos	Muestras por celda de flujo	Rendimiento por celda de flujo	Duración del experimento
NovaSeq 6000 S4 Reagents	4	~3 Tb	~44 h
NovaSeq X Series 10B Reagents	4	~3 Tb	~24 h
NovaSeq X Series 25B Reagents	10–11	~8 Tb	~48 h

- a. Requiere un experimento de secuenciación de 2 × 150 pb, lo que genera una cobertura de aproximadamente 30× de Illumina Complete Long Reads.
- b. Requiere datos de genoma completo humano de lectura corta estándar 30× de la misma muestra para el análisis. Se recomienda [Illumina DNA PCR-Free Prep](#). Los kits de WGS de terceros también son compatibles. No es necesario preparar o secuenciar en paralelo una librería no marcada; se pueden usar archivos FASTQ de una muestra realizada previamente.
- c. La secuenciación de librerías de Illumina Complete Long Read en las plataformas NovaSeq puede hacer que la puntuación Q30 notificada de un experimento se encuentre por debajo de la especificación de NovaSeq. Esto no indica un problema de rendimiento ni con el experimento de secuenciación ni con la librería.

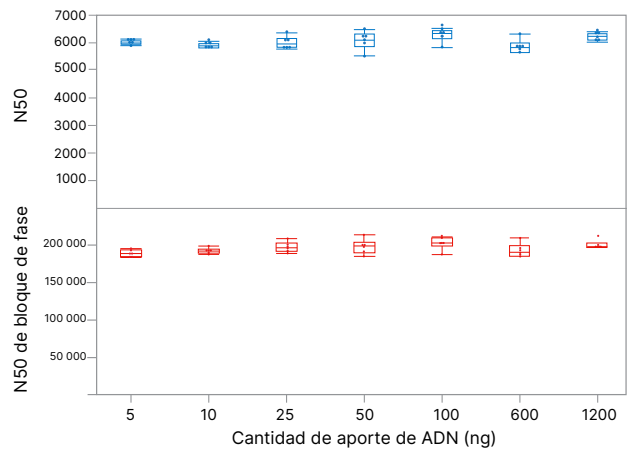


Figura 2: El ensayo Illumina Complete Long Read ofrece resultados coherentes en todas las cantidades de aporte de ADN. Los aportes de ADN de 5 ng a 1200 ng generan datos de calidad similar para N50 y N50 de bloque de fase. N50 se define como la longitud de secuencia del cóntigo más corto al 50 % de la longitud total del conjunto. También se puede usar como medida del tamaño de los bloques de fase de hebra retrasada.

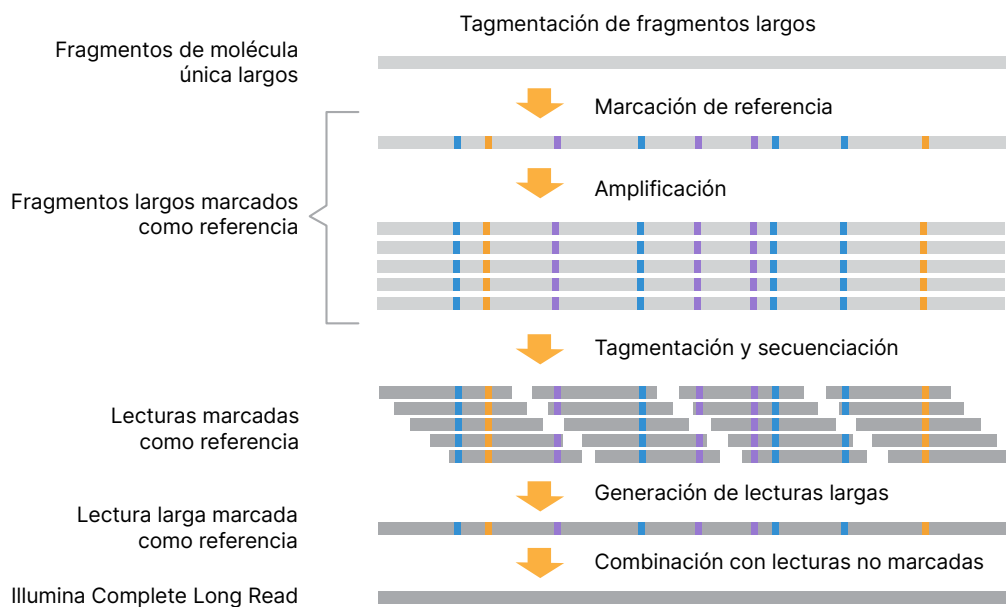


Figura 3: Funcionamiento del ensayo Illumina Complete Long Reads. El ensayo usa tagmentación⁸ para crear fragmentos de ADN largos (>10 kb), eliminando la necesidad de cizallamiento o selección de tamaño. Los fragmentos largos se «marcan como referencia» a escala de molécula única para capturar y conservar la información de lectura larga dentro del fragmento (sin códigos de barras ni adaptadores complejos). Los fragmentos largos marcados como referencia se amplifican y, a continuación, una segunda etapa de tagmentación prepara las librerías para la secuenciación. Durante el análisis, el potente software DRAGEN genera lecturas largas y combina los datos con una librería de WGS estándar no marcada (de la misma muestra, secuenciada por separado) para producir lecturas largas completas de alta precisión.

Acceso a WGS de alta precisión

Los datos de Illumina Complete Long Read complementan los datos de WGS estándar de lectura corta y proporcionan genomas completos más exhaustivos mediante:

- Llamada de variantes en regiones problemáticas difíciles de asignar, con alta homología o repetitivas
- La resolución de variantes estructurales complejas, seudogenes y grandes inserciones-delecciones (indels)
- Fase de hebra retrasada de variantes y llamada de haplotipos

Los datos de Illumina Complete Long Read demuestran una mayor precisión en la llamada de variantes en todos los tipos de variantes en comparación con los datos de WGS humano de alta precisión generados usando Illumina DNA PCR-Free Prep para la preparación de librerías y el análisis secundario de DRAGEN³ (Figura 4). Con los conjuntos de datos de PrecisionFDA Truth Challenge v2, la puntuación F1 que refleja la precisión y la recuperación para WGS usando el ensayo Illumina Complete Long Read fue del 99,87 % (Figura 5).^{9,10}

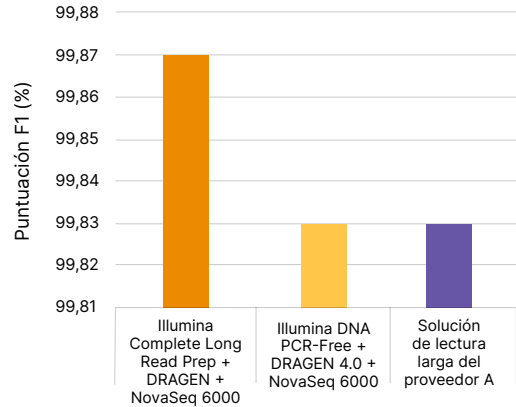


Figura 5: Un nuevo estándar de precisión. Illumina Complete Long Read Prep, Human ofrece una precisión sin precedentes para la llamada de variantes, medida por la puntuación F1 (%), que refleja la precisión y la recuperación para la WGS.

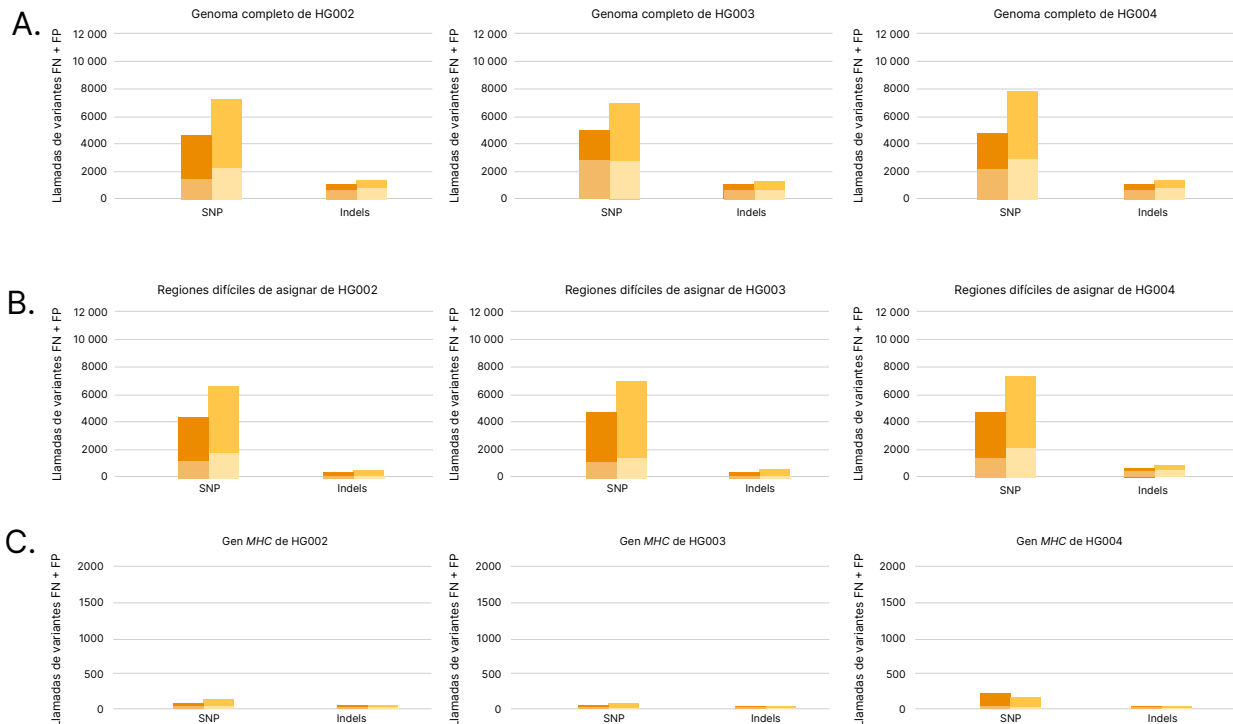


Figura 4: El ensayo Illumina Complete Long Read realiza una llamada de variantes de gran precisión para regiones genéticas problemáticas. Precisión de llamada de variantes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) e indel, medida como falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) para las muestras de referencia humanas HG002, HG003 y HG004 de Genome in a Bottle.¹¹ Comparación de los datos de WGS del ensayo Illumina Complete Long Read (naranja) y de Illumina DNA PCR-Free Prep (amarillo) en (A) el genoma completo, (B) regiones difíciles de asignar y (C) gen *MHC*.

Flujo de trabajo flexible y optimizado para estudios de alta productividad

El flujo de trabajo de Illumina Complete Long Read Prep es muy flexible para admitir una WGS completa para más muestras. El sencillo protocolo de preparación de librerías dura aproximadamente 8 horas (con 4 horas de tiempo de participación activa), únicamente requiere un equipo de laboratorio estándar y es fácil de automatizar. Gracias a NovaSeq X Plus System, los usuarios pueden generar hasta 3000 genomas de alta precisión al año.* Illumina Complete Long Read se puede usar para aumentar los conjuntos de datos de WGS existentes o como herramienta alternativa para un diagnóstico de variantes más profundo.

Resumen

La información de lectura larga puede ayudar a resolver las regiones más problemáticas del genoma. Illumina Complete Long Read Prep, Human facilita el acceso de los laboratorios de genómica a la WGS completa al permitir tanto las lecturas largas como las cortas en el mismo instrumento. El flujo de trabajo optimizado y familiar y la sinergia con los procesos químicos demostrados de SBS de Illumina y el análisis de DRAGEN ofrecen el genoma completo más flexible y preciso del mercado. Las futuras ofertas de productos ampliarán la utilidad de Illumina Complete Long Reads.

Información adicional

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

[Tecnología de secuenciación de lectura larga](#)

Bibliografía

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. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
2. Illumina. Hoja de datos de DRAGEN Bio-IT Platform. 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 1 de febrero de 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 1 de febrero de 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 12 de enero de 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
6. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
7. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf. Año de publicación: 2018. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
8. Illumina. Tagmentation. illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
9. Illumina. Datos en archivo. 2022.
10. PrecisionFDA. Truth Challenge V2: Calling Variants from Short and Long Reads in Difficult-to-Map Regions. precision.fda.gov/challenges/10. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
11. Genome in a Bottle. National Institute of Standards and Technology. nist.gov/programs-projects/genome-bottle. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.

* Productividad potencial cuando se usa Illumina Complete Long Read Prep, Human con NovaSeq X Plus System y experimentos de celda de flujo doble con celdas de flujo 25B.

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
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



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-01420 ESP v1.1