

Sistema iSeq™ 100

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

Punti principali

- **Rapida generazione dei dati**
Esegue progetti più piccoli su uno strumento dedicato 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
- **Accuratezza dei dati eccellente**
Trae vantaggio dalla più elevata sensibilità analitica nel rilevamento di varianti e trascritti rari rispetto al sequenziamento con qPCR o con sequenziamento Sanger



Introduzione

Il sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) è più facile e accessibile con il sistema compatto iSeq 100 Illumina (Figura 1). Il sistema iSeq 100 Illumina unisce la tecnologia metallo ossido semiconduttore con accoppiamento complementare (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS) con la comprovata accuratezza della chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina per offrire dati altamente accurati con rapidi tempi di elaborazione. Il sistema iSeq 100 genera fino a 1,2 Gb di dati per corsa in 19 ore e offre l'elevata risoluzione e sensibilità analitica necessarie per il rilevamento 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 in 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

Figura 1: Sistema iSeq 100: il sistema iSeq 100 sfrutta l'efficacia della tecnologia NGS nel più compatto ed economico sistema di sequenziamento da banco della gamma Illumina.

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 il sequenziamento di nuova generazione indipendente 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 delle librerie, sequenziamento e analisi dei dati (Figura 2).



Figura 2: Flusso di lavoro del sistema iSeq 100: il sistema iSeq 100 fa parte di un flusso di lavoro ottimizzato dal DNA ai dati.

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

Configurazione corsa	Letture che attraversano il filtro (PF)/corse	Output	Punteggi qualitativi ^b	Durata della corsa ^c
1 × 36 bp	4 milioni	144 Mb	> 85%	circa 9 ore
1 × 50 bp	4 milioni	200 Mb	> 85%	circa 9 ore
1 × 75 bp	4 milioni	300 Mb	> 80%	circa 10 ore
2 × 75 bp	4 milioni	600 Mb	> 80%	circa 13 ore
2 × 150 bp	4 milioni	1,2 Gb	> 80%	circa 19 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 dell'intera corsa.

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

Rapida preparazione delle librerie

Il sistema iSeq 100 è compatibile con tutta la serie dei kit di preparazione delle librerie Illumina. Con i kit di preparazione delle librerie Nextera™ XT e DNA Prep Library Kit Illumina, i ricercatori possono preparare librerie in multiplex in 3-4 ore per il sequenziamento di piccoli genomi e il sequenziamento diretto di ampliconi long-range. Inoltre, la soluzione di rifequenziamento mirato AmpliSeq™ for Illumina offre contenuti sapientemente progettati. I pannelli mirati AmpliSeq for Illumina sono disponibili in pannelli fissi e pronti all'uso, in pannelli progettati dalla comunità scientifica oppure possono essere personalizzati per soddisfare specifiche necessità di ricerca. In base al kit, i kit di preparazione delle librerie Illumina richiedono appena 1 ng di DNA o RNA (cDNA) input e hanno la flessibilità necessaria per adattarsi al DNA estratto da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin Fixed, Paraffin Embedded, FFPE), quali tessuti tumorali conservati.

Sequenziamento sul sistema iSeq 100

Dopo la preparazione delle librerie, queste vengono caricate in una cartuccia di reagenti scongelata e preriempita per il sistema iSeq 100. L'avvio di una corsa richiede lo scongelamento, il caricamento e l'avvio 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 accuratezza elevate grazie alla tecnologia SBS

Il sistema iSeq 100 utilizza la comprovata tecnologia SBS Illumina, utilizzata per generare più del 90% dei dati di sequenziamento al mondo,³ per fornire dati di elevata qualità con più dell'80% di basi con punteggio qualitativo pari o superiore a Q30 (Tabella 1, Figura 3). 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 marcati, 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 le varianti di bassa frequenza e le varianti adiacenti sottoposte a determinazione delle fasi (phasing), che permette di ottenere risultati in tempi più veloci e minori fasi di interventi manuali.^{1,2}

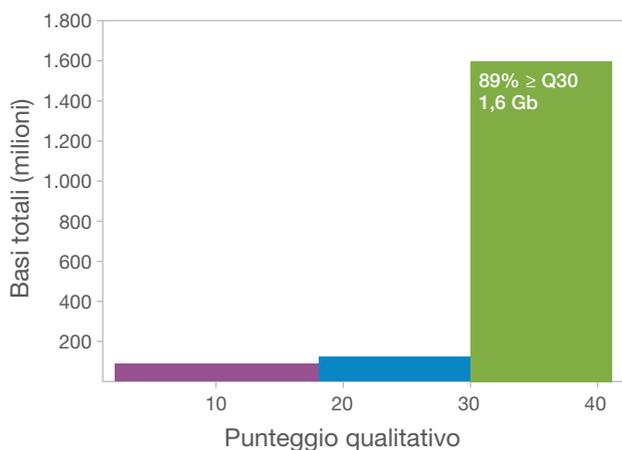


Figura 3: Punteggi qualitativi del sistema iSeq 100: un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione delle probabilità di errore nell'identificazione delle basi. Un punteggio qualitativo di 30 (Q30) è ampiamente considerato il termine di paragone per dati di elevata qualità.⁴ La corsa di un pool microbico sul sistema iSeq 100 configurata su 2 × 151 bp garantisce che l'89% delle basi presenti un punteggio qualitativo pari o superiore a Q30.

Chimica SBS a un canale, estremamente innovativa

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

La chimica SBS a un canale utilizza un colorante, due fasi della chimica e due immagini per sequenziare un ciclo (Figura 4). I nucleotidi vengono identificati tramite l'analisi dei diversi schemi di emissione per ogni base attraverso le due immagini. L'adenina presenta una marcatura rimovibile ed è marcata solo nella prima immagine. La citosina presenta un gruppo legante che si lega a una marcatura ed è marcata solo nella seconda immagine. La timina presenta una marcatura fluorescente ed è dunque marcata in entrambe le immagini, mentre la guanina è sempre scura (non marcata).

Per maggiori informazioni sulla chimica SBS a un canale consultate la [nota tecnica Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry \(Chip CMOS e chimica SBS a un canale Illumina\)](#).

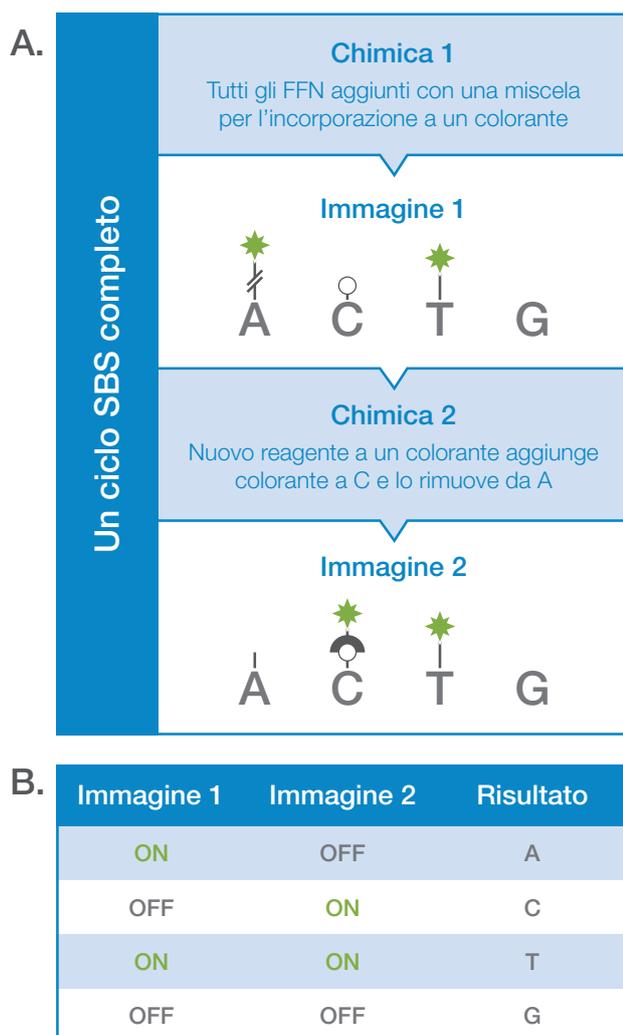


Figura 4: Chimica SBS a un canale: (A) la chimica SBS a un canale prevede due fasi di chimica e due di imaging per ciclo di sequenziamento usando nucleotidi che possono essere marcati o non marcati in base alla fase chimica. (B) L'identificazione delle basi è determinata dallo schema di segnale tra entrambe le immagini.

Analisi dei dati semplice e flessibile

Il sistema iSeq 100 offre numerosi opzioni per l'analisi dei dati, comprese le soluzioni basate su cloud e sullo strumento. Local Run Manager è un software di analisi completamente integrato sullo strumento che presenta un'architettura modulare per supportare saggi attuali e futuri. Local Run Manager supporta la pianificazione delle corse di sequenziamento, il monitoraggio delle librerie e delle corse mediante audit trail nonché l'integrazione grazie a moduli di analisi dei dati integrati 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 computer a distanza 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 generare dati di allineamento e individuare varianti di singolo nucleotide (Single-Nucleotide Variant, SNV), 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 applicazioni a pagamento e open source in BaseSpace Sequence Hub per l'analisi a valle dei dati. Tali applicazioni forniscono algoritmi automatizzati per l'intero genoma, l'esoma e il trascrittoma, e dati di risequenziamento mirato per l'allineamento, il rilevamento di varianti, l'annotazione, la visualizzazione e altro ancora.

Versatile per supportare un'ampia gamma di applicazioni

Con un output massimo di 2,0 Gb, il sistema iSeq 100 offre un sequenziamento rapido in multiplex per un'ampia gamma di applicazioni:

- Sequenziamento dell'intero genoma piccolo
- Rissequenziamento mirato
 - Rissequenziamento mirato AmpliSeq for Illumina
 - PCR long-range
- Sequenziamento de novo
- Validazione della mutagenica
- Metagenomica (sequenziamento dell'rRNA 16S)
- Sequenziamento mirato di mRNA
- Sequenziamento di RNA piccolo
- Valutazione multigenomica
- Tipizzazione basata su sequenza dell'antigene leucocitario umano (Human Leukocyte Antigen, HLA)

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

Applicazione	Campioni/corsa	Durata della corsa
Sequenziamento genoma piccolo		
Genomi 5-10 Mb, copertura 30x 2 × 150 bp	1-8	circa 19 ore
Profilo dell'espressione genica mirata		
Fino a 500 target 1 × 50 bp	1-48	circa 9 ore
Sequenziamento mirato dell'amplicone		
Fino a 3.000 ampliconi 2 × 250 bp	1-48	circa 19 ore

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.

Maggiori informazioni

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

Per maggiori informazioni sulle applicazioni per il sistema iSeq 100, visitate la pagina Web www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/iseq/learn.

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

Informazioni per gli ordini

Sistema	N. di catalogo
Sistema di sequenziamento iSeq 100	20021535
Kit di reagenti per il sequenziamento	N. di catalogo
iSeq 100i1 Reagent v2 (300 cicli)	20031371
iSeq 100i1 Reagent v2 (300 cicli) confezione da quattro	20031374
iSeq 100i1 Reagent v2 (300 cicli) confezione da otto	20040760

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. 2017.
4. Illumina (2011) *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. Consultato l'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	Specifica
Configurazione dello strumento	Monitoraggio RFID dei materiali di consumo
Computer di controllo dello strumento (interno) ^a	Unità di base: Celeron J1900, 2 GHz, CPU Quad Core Memoria: 8 GB di RAM Disco rigido: 240 GB SSD Sistema operativo: Windows 10 IoT Enterprise
Ambiente operativo	Temperatura: da 15 °C a 30 °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
Diode a emissione luminosa (LED)	520 nm, 1,5 W/cm ² al piano dell'immagine
Dimensioni	LxPxA (monitor sollevato): 30,5 cm x 33 cm x 42,5 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
Specifiche WLAN	Frequenza: 2,4 GHz e 5 GHz standard: IEEE 802.11a IEEE 802.11b IEEE 802.11g IEEE 802.11n IEEE 802.11ac Alimentazione: 3,3 V c.d., corrente fornita 780 mA
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.

Piattaforme NGS innovative

Illumina offre una gamma completa di sistemi di sequenziamento NGS efficaci, fornendo dati di elevata qualità e accuratezza creati per soddisfare le esigenze di diverse applicazioni. Per le tabelle sui confronti tra i sistemi da banco rispetto ai sistemi su scala di produzione e gli strumenti che contribuiscono alla scelta della piattaforma che soddisfi le vostre esigenze, visitate la pagina Web

www.illumina.com/systems