

illumina 5-Base DNA Prep

Rilevamento di eventi di metilazione
e varianti genomiche in un unico
saggio per l'intero genoma



Nuovi metodi chimici e analitici
per dati di alta qualità



Saggio due in uno con flusso di
lavoro e analisi semplici



Scoperta conveniente
mediante informazioni
multiomiche

Scoperta multiomica completa

Il DNA è intrinsecamente multiomico e contiene informazioni molecolari sia genetiche che epigenetiche. Oltre alla sequenza di adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C), esistono basi modificate, come la 5-metilcitosina (5mC), che contribuiscono all'espressione genica diretta (Figura 1). Il rilevamento sia della variazione genomica che della metilazione del DNA può rivelare meccanismi nascosti associati a salute e malattie. Lo studio del genoma e del metiloma richiede in genere saggi di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) e fasi di analisi dei dati da effettuare separatamente. Inoltre, la maggior parte dei metodi di profilazione della metilazione basati su NGS è caratterizzata da flussi di lavoro noiosi e complessi.

Illumina 5-Base DNA Prep sfrutta una chimica esclusiva e algoritmi di analisi ottimizzati per offrire un approccio radicalmente diverso all'interrogazione e all'analisi del genoma e del metiloma. Un nuovo metodo enzimatico consente il rilevamento di cinque basi (A, T, G, C e 5mC) a partire da un unico campione, con una sola preparazione di librerie, una singola corsa di sequenziamento e un solo flusso di lavoro di analisi. Illumina 5-Base DNA Prep è un saggio di alta qualità, facile da usare e conveniente, che permette la scoperta simultanea di varianti genomiche ed eventi di metilazione sull'intero genoma.

Flusso di lavoro semplice e veloce

Illumina 5-Base DNA Prep combina il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) e il sequenziamento della metilazione in un unico flusso di lavoro di facile utilizzo (Figura 2). Questa soluzione, offerta da un unico fornitore, vanta un flusso di lavoro semplificato dalle librerie all'interpretazione, con un tempo di risposta inferiore a tre giorni (fino a tre volte più veloce rispetto ad altri metodi di NGS)¹⁻⁵ Illumina 5-Base DNA Prep è compatibile con il DNA libero circolante (cfDNA, cell-free DNA) e il DNA genomico (gDNA, genomic DNA) da sangue, linee cellulari o tessuto fresco congelato (Tabella 1). La preparazione ottimizzata delle librerie, che comprende la rapida conversione monofase della base 5mC in T, richiede interventi manuali minimi e può essere completata in un solo giorno (Tabella 1, Figura 3, Figura 4).^{*} Flessibile e scalabile, la soluzione a cinque basi supporta un'ampia gamma di studi di ricerca su NovaSeq™ X Series, NovaSeq 6000 System o NovaSeq 6000Dx Instrument (modalità RUO) (Tabella 2, Tabella 3). Utilizzando l'analisi secondaria semplificata con pipeline DRAGEN™ a cinque basi, basta un'ora per ottenere una doppia lettura[†] per un genoma con copertura di 30× (Figura 5, Figura 6). Illumina Connected Multiomics approfondisce l'analisi con metodi statistici collaudati nel settore e visualizzazioni chiare e ricche di informazioni (Figura 7).

^{*} Meno di sei ore per il flusso di lavoro di preparazione delle librerie di cfDNA, meno di otto ore per il flusso di lavoro di preparazione delle librerie di gDNA (compreso il tempo di frammentazione). Non è incluso il tempo necessario per il controllo qualità (QC, Quality Control) o l'impostazione del sequenziamento.
[†] Pipeline DRAGEN Germline monocampione su server DRAGEN.

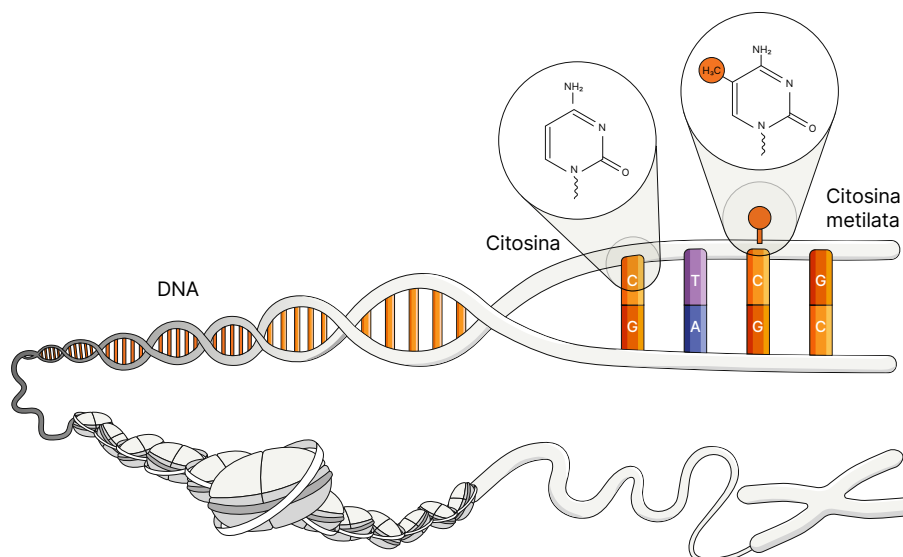


Figura 1: la metilazione del DNA da C a 5mC è un marcatore epigenetico ampiamente studiato nella regolazione genica
Illumina 5-Base DNA Prep rileva la 5mC insieme alle basi A, T, G e C non modificate, ricavando informazioni genomiche ed epigenomiche da un unico saggio di NGS.



Figura 2: flusso di lavoro di Illumina 5-Base DNA Prep

Illumina 5-Base DNA Prep offre un flusso di lavoro semplificato dalle librerie all'interpretazione per il rilevamento simultaneo di varianti genomiche ed eventi di metilazione. La preparazione delle librerie richiede meno di un giorno, grazie a un protocollo semplice che include una nuova chimica di conversione monofase delle basi, e il sequenziamento è basato su un sistema Illumina ad alta processività. L'analisi secondaria DRAGEN genera in meno di un'ora annotazioni sia genomiche che epigenomiche in una sola lettura per un genoma con copertura di 30x. Illumina Connected Multiomics offre visualizzazioni e strumenti di analisi chiari per semplificare l'interpretazione dei dati.

Tabella 1: parametri di preparazione delle librerie di DNA a cinque basi Illumina

Tipo di campione	Quantità di input	Durata della preparazione delle librerie
DNA genomico	50-100 ng	< 8 ore ^a
DNA libero circolante	1-20 ng	< 6 ore

a. Include il tempo di frammentazione.

Tabella 2: processività dei campioni per le applicazioni di metilazione e identificazione di varianti della linea germinale

Cella a flusso NovaSeq X	25B	10B	1.5B
N. di campioni per cella a flusso ^a	48	18	3

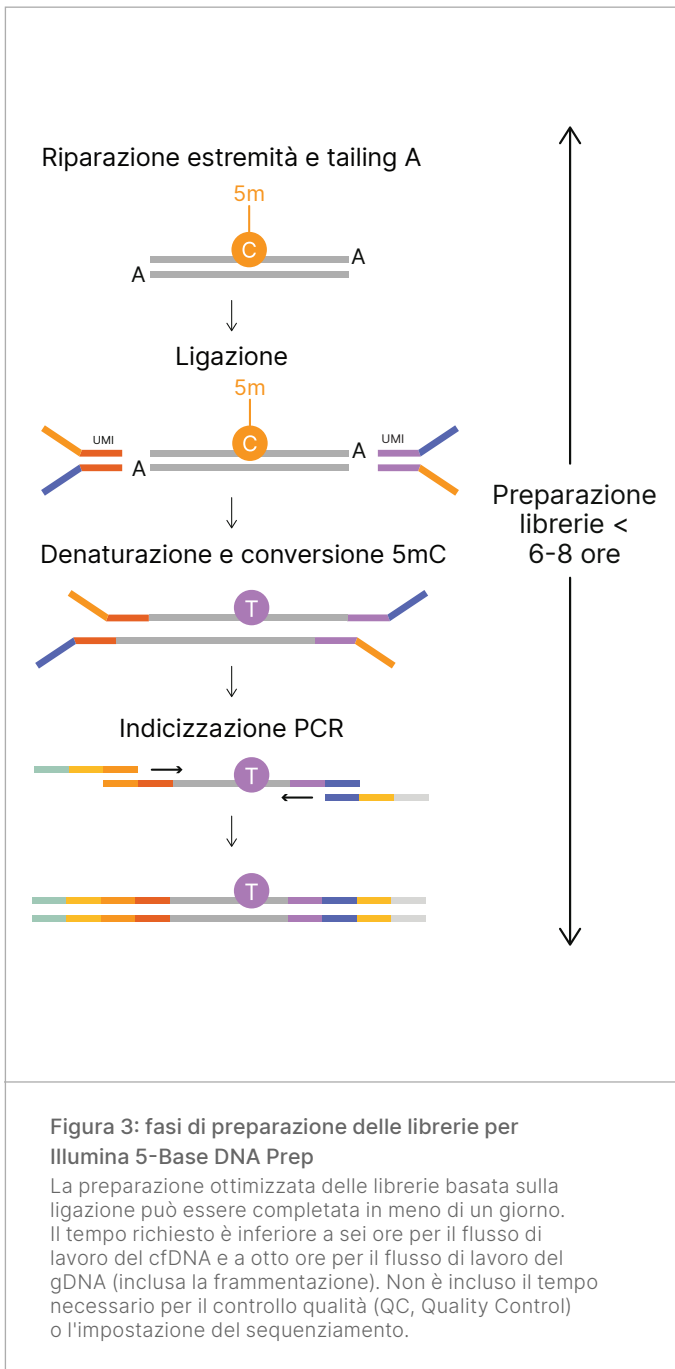
a. Due corse a 151 bp e un numero MAGGIORE O UGUALE A 500 milioni di cluster per l'identificazione ad alta precisione di varianti della linea germinale (SNV e indel).

Tabella 3: copertura del sequenziamento consigliata per diverse applicazioni con Illumina 5-Base DNA Prep

Caso d'uso	Copertura del sequenziamento	Pipeline di analisi secondaria DRAGEN
Genoma germinale a 5 basi	35-40x	Germline
Sequenziamento dell'intero metiloma	10-35x	Germline
Metiloma + identificazione di varianti somatiche tumor-only	≥ 100x	Somatic
Metiloma + identificazione di varianti somatiche tumor-normal ^a	≥ 100x/≥ 50x	Somatic
Metiloma + identificazione di CNV germinali ^b	30x	Germline
Metiloma + identificazione di CNV somatiche ^b	≥ 80x	Somatic
Profilazione della frammentazione/del metiloma del cfDNA	≥ 30x	Somatic

a. La copertura normale dovrebbe essere pari alla metà di quella tumorale, con target di almeno 100x di copertura del tumore.

b. CNV (Copy Number Variant), variante del numero di copie.



Nuova chimica per la conversione diretta della 5-metilcitosina in timina

I metodi tradizionali per il rilevamento della metilazione del DNA utilizzano il trattamento con bisolfito o enzimi per convertire la citosina non metilata in timina (Figura 4). Poiché la maggior parte delle citosine presenti nel genoma non è modificata, questo approccio riduce notevolmente la diversità dei nucleotidi, rendendo le letture più difficili da sequenziare e allineare. Il trattamento con bisolfito può anche danneggiare il DNA, creando lacune nei dati. Illumina 5-Base DNA Prep utilizza un nuovo enzima ingegnerizzato per convertire direttamente solo la 5mC in T in un'unica fase di incubazione (Figura 4). Il metodo Illumina a cinque basi non danneggia il DNA e preserva la diversità dei nucleotidi a quattro basi per un allineamento più efficiente, massimizzando i dati di ogni lettura (Tabella 4).

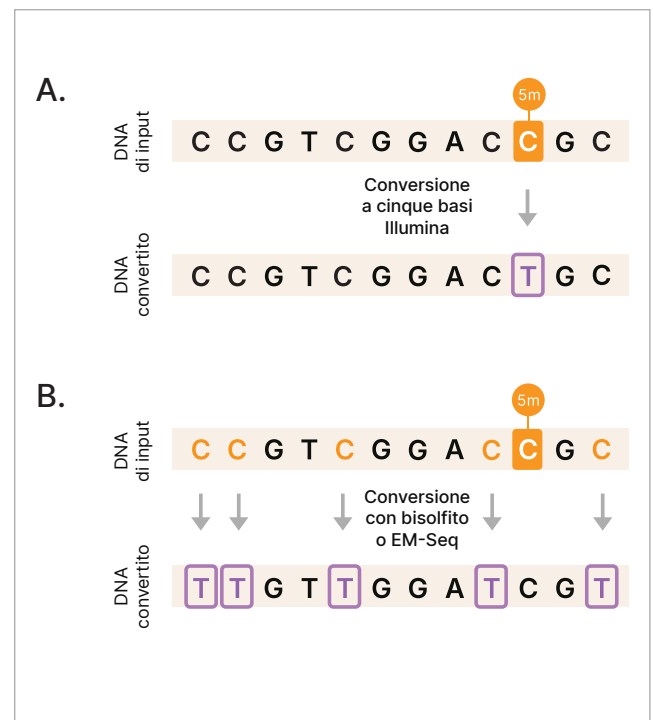


Figura 4: la nuova chimica converte direttamente la 5mC in T in una sola fase enzimatica

(A) Illumina 5-Base DNA Prep utilizza un processo enzimatico monofase per convertire solo la 5mC in T; in questo modo, si ottiene maggiore diversità nucleotidica rispetto al (B) tradizionale trattamento con bisolfito o al sequenziamento enzimatico della metilazione (EM-Seq, Enzymatic Methylation Sequencing), in cui la C non metilata viene convertita in T.

Tabella 4: vantaggi di Illumina 5-Base DNA Prep

Metodi tradizionali di sequenziamento della metilazione	Soluzione Illumina a cinque basi
Difficoltà	Vantaggi
<ul style="list-style-type: none"> • Efficienza limitata della mappatura • Rilevamento di varianti poco accurato • Conversione chimica che danneggia il DNA^a • Conversione in più fasi 	<ul style="list-style-type: none"> • Mappatura altamente efficiente • Rilevamento di varianti ad alta precisione • Conversione enzimatica che non danneggia il DNA • Conversione monofase
a. Per i metodi di NGS basati sulla conversione con bisolfito.	

Un'unica lettura con dati combinati relativi al genoma e al metiloma

L'analisi secondaria DRAGEN integrata consente di annotare accuratamente sia la metilazione sia le varianti genomiche in un unico set di dati (Figura 5). I nuovi algoritmi DRAGEN a cinque basi sensibili alla metilazione tengono conto dell'orientamento dei filamenti per distinguere una timina indicante un evento di metilazione da una timina che rappresenta una variante a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) (Figura 6). La metilazione e la variazione genomica vengono catturate con una risoluzione che raggiunge il livello di singola molecola, il che consente di studiare i meccanismi biologici in maniera approfondita.

Le funzioni di refertazione della metilazione a cinque basi disponibili nelle pipeline DRAGEN Germline e Somatic si attivano con una semplice casella di controllo. L'analisi secondaria può essere eseguita tramite BaseSpace™ Sequence Hub, sulle piattaforme cloud Illumina Connected Analytics o su un server DRAGEN.

Analisi a cinque basi con pipeline DRAGEN Germline o Somatic

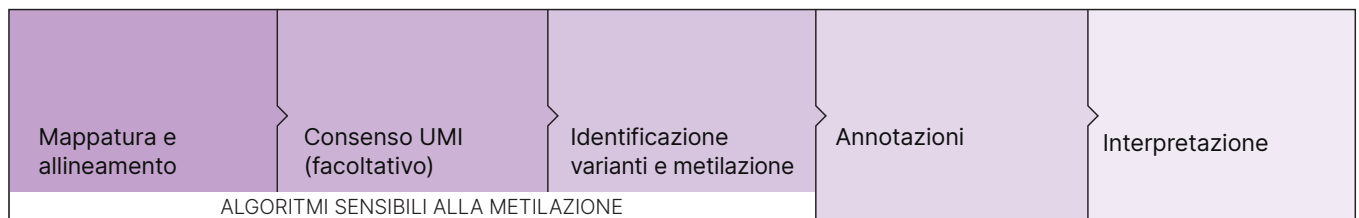


Figura 5: nuovi algoritmi sensibili alla metilazione nelle pipeline DRAGEN Germline o DRAGEN Somatic

L'analisi secondaria a cinque basi Illumina integra nelle pipeline DRAGEN Germline e Somatic la funzione di refertazione della metilazione, la quale si attiva con una semplice casella di controllo. L'analisi secondaria a cinque basi semplificata con le pipeline DRAGEN genera una doppia lettura in appena un'ora per un genoma con copertura di 30× (pipeline DRAGEN Germline con un solo campione su server DRAGEN). UMI (Unique Molecular Identifier), identificatore molecolare univoco.

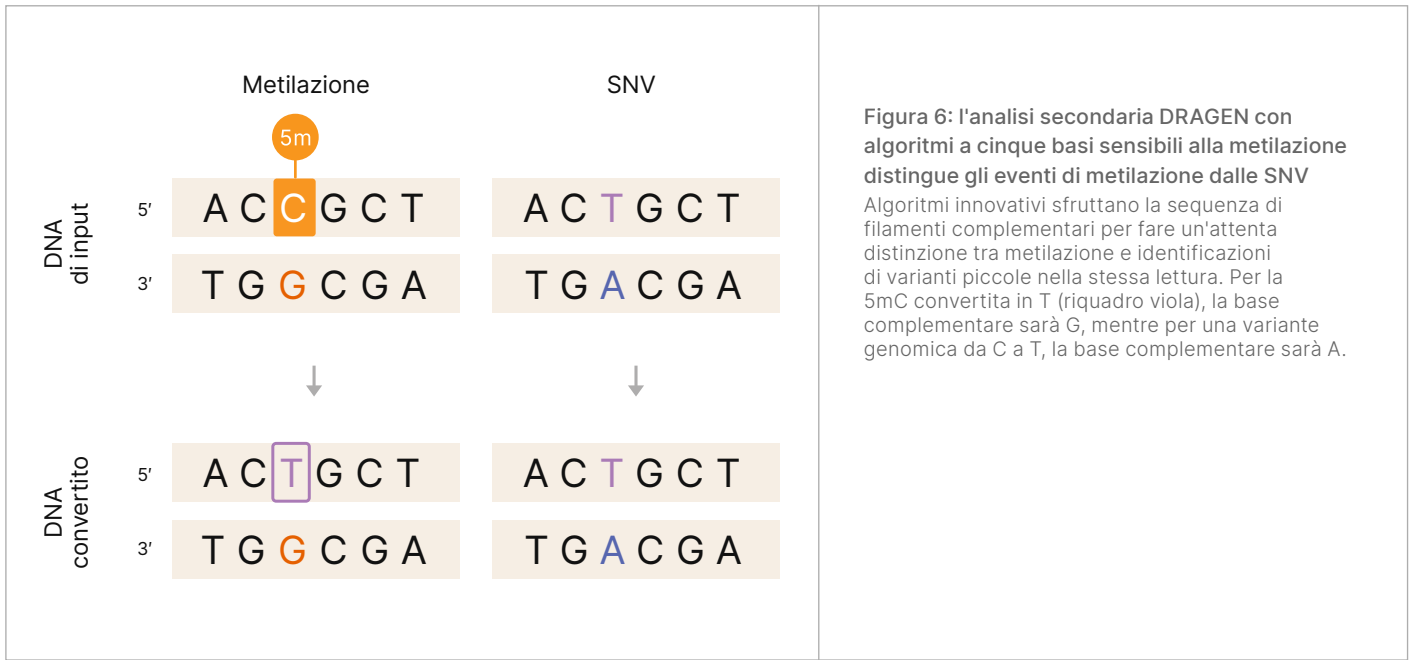


Figura 6: l'analisi secondaria DRAGEN con algoritmi a cinque basi sensibili alla metilazione distingue gli eventi di metilazione dalle SNV. Algoritmi innovativi sfruttano la sequenza di filamenti complementari per fare un'attenta distinzione tra metilazione e identificazioni di varianti piccole nella stessa lettura. Per la 5mC convertita in T (riquadro viola), la base complementare sarà G, mentre per una variante genomica da C a T, la base complementare sarà A.

Analisi più approfondite con Illumina Connected Multiomics

I file DRAGEN generati possono essere importati direttamente in Illumina Connected Multiomics per l'esplorazione e la visualizzazione intuitive dei dati, anche sotto forma di varie analisi differenziali (Figura 7). Ciò permette l'individuazione dei pattern di metilazione, il raggruppamento dei campioni, la riduzione della dimensionalità dei dati, il rilevamento e l'annotazione dei biomarcatori e il collegamento dei risultati alle funzioni biologiche.

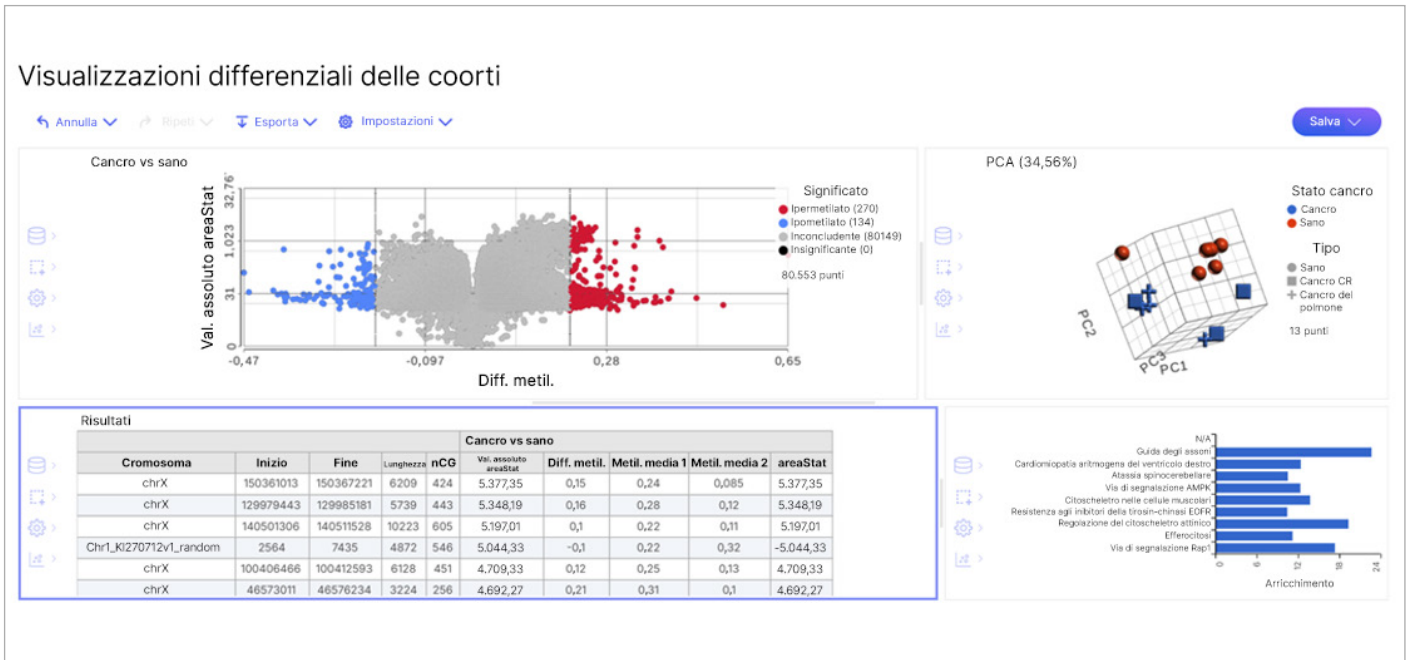


Figura 7: interpretazione dei risultati con Illumina Connected Multiomics

Illumina Connected Multiomics consente di eseguire pipeline predefinite e creare flussi di lavoro personalizzati per approfondire gli elementi rilevati. Le versatili schermate del pannello di controllo offrono informazioni approfondite, oltre a opzioni che permettono di annotare le regioni genomiche, identificare le regioni metilate in modo differenziale, esplorare i raggruppamenti biologici con clustering non supervisionato e catturare i percorsi associati alle variazioni della metilazione.

Duplice livello di informazioni di alta qualità

Le prestazioni di sequenziamento di Illumina 5-Base DNA Prep mostrano elevata copertura CpG e copertura uniforme su una varietà di contenuti GC nel genoma umano (Figura 8). Le librerie Illumina 5-Base DNA Prep mostrano inoltre elevata resa con un numero minimo di cicli di PCR ed eccezionale efficienza di mappatura (Figura 9). I livelli di metilazione misurati per ciascun campione sono riproducibili con diversi input (Figura 10) e replicati tecnici (Figura 11). La conversione della 5mC risulta altamente selettiva su un'ampia gamma di input, come dimostrato mediante spike-in di controllo costituiti da piccoli genomi (Figura 12). L'identificazione altamente accurata di varianti della linea germinale, quali SNV (Single Nucleotide Variant), inserzioni-delezioni (indel) e varianti del numero di copie (CNV, Copy Number Variant), consente di ottenere, in un unico flusso di lavoro, informazioni complete da saggi paralleli di WGS e metilazione (Figura 13). Il rilevamento della 5mC e delle basi genetiche nelle stesse molecole consente la risoluzione allele-specifica degli eventi di metilazione e delle varianti genetiche nei dati sottoposti a determinazione delle fasi (Figura 14).

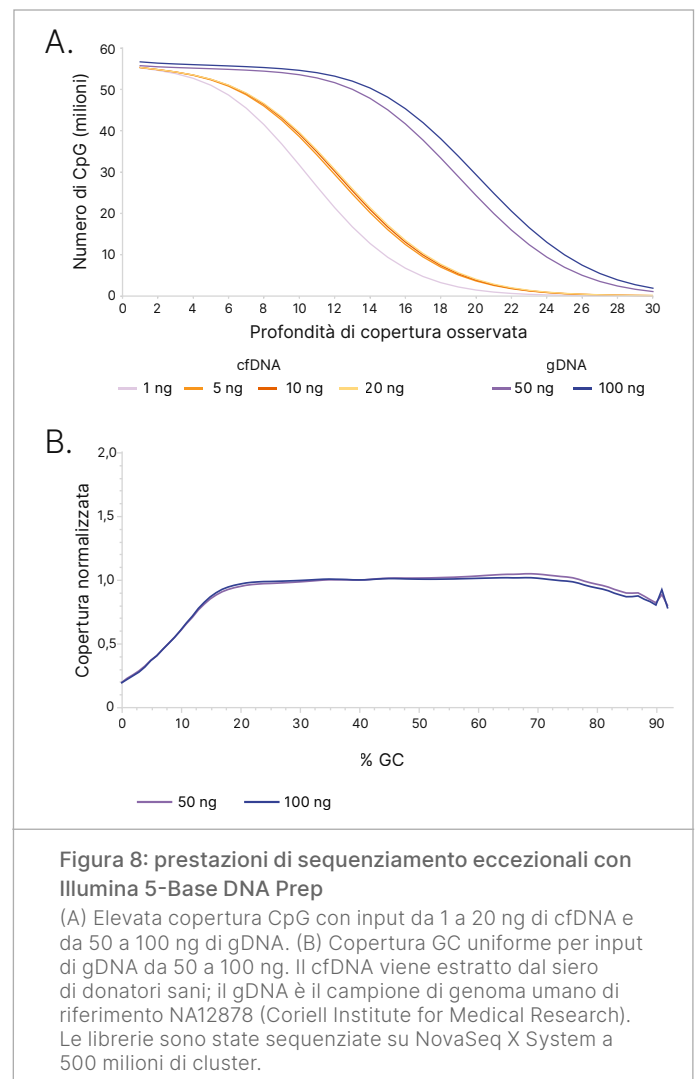


Figura 8: prestazioni di sequenziamento eccezionali con Illumina 5-Base DNA Prep

(A) Elevata copertura CpG con input da 1 a 20 ng di cfDNA e da 50 a 100 ng di gDNA. (B) Copertura GC uniforme per input di gDNA da 50 a 100 ng. Il cfDNA viene estratto dal siero di donatori sani; il gDNA è il campione di genoma umano di riferimento NA12878 (Coriell Institute for Medical Research). Le librerie sono state sequenziate su NovaSeq X System a 500 milioni di cluster.

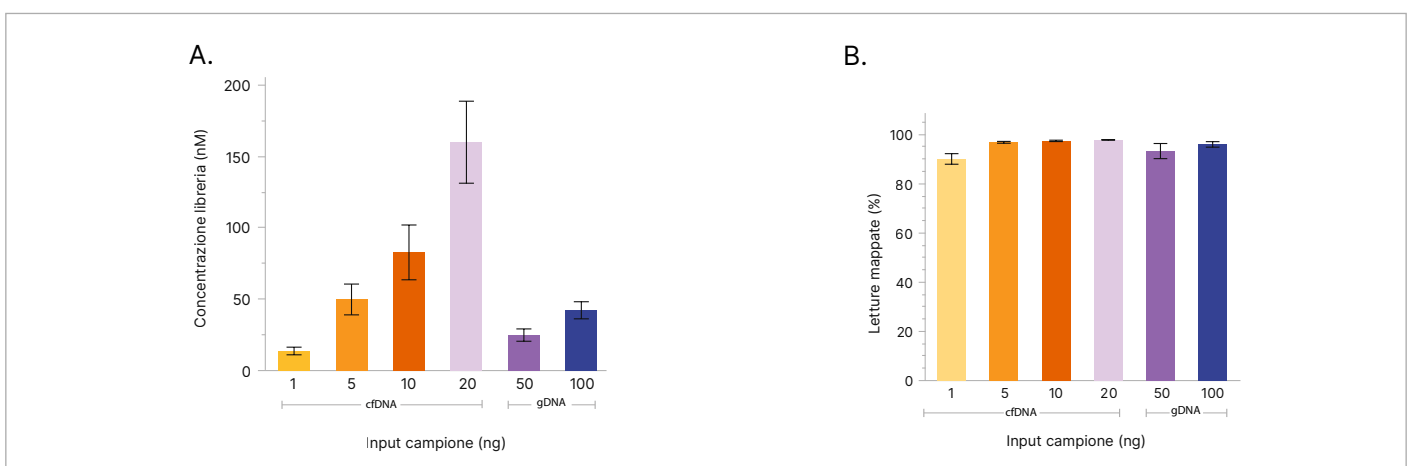


Figura 9: resa e tassi di allineamento elevati con Illumina 5-Base DNA Prep

(A) Resa delle librerie e (B) tassi di allineamento (percentuale di letture mappate) con Illumina 5-Base DNA Prep e input da 1 a 20 ng di cfDNA e da 50 a 100 ng di gDNA. Il cfDNA viene estratto dal siero di donatori sani; il gDNA è il campione di genoma umano di riferimento NA12878. Le librerie sono state sequenziate su NovaSeq X System.

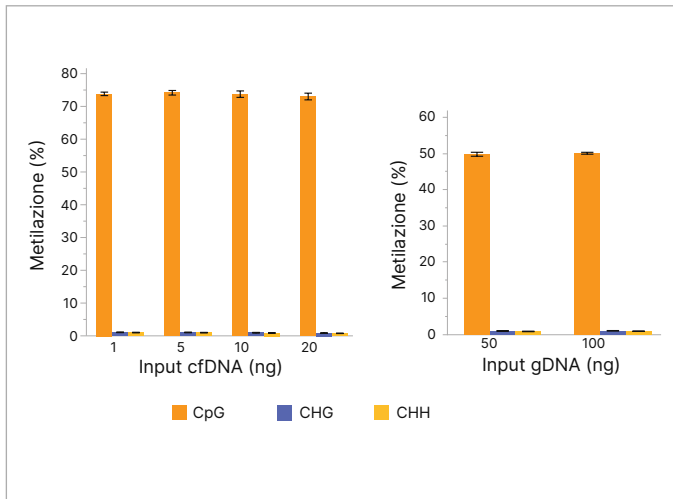


Figura 10: rilevamento della metilazione con Illumina 5-Base DNA Prep e diversi tipi di campioni e input di DNA
 Percentuale di metilazione delle citosine nel contesto di CpG, CHG e CHH. cfDNA estratto dal siero di donatori sani, in cui è prevista una metilazione CpG globale dal 70% all'80%. Come previsto, i livelli osservati di metilazione per CHG e CHH risultano molto bassi. gDNA da linea cellulare del campione di genoma umano di riferimento NA12878, in cui è prevista una metilazione CpG globale pari a circa il 50%. Le librerie sono state sequenziate su NovaSeq X System. L'analisi secondaria dei dati è stata eseguita con DRAGEN Germline v4.4.4.

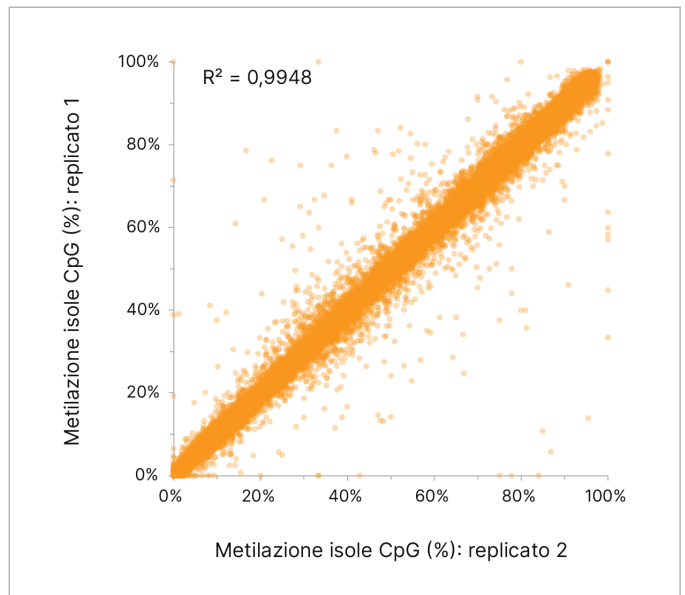


Figura 11: misurazione riproducibile della metilazione a tutti i livelli sulle isole CpG con Illumina 5-Base DNA Prep
 Correlazione del livello medio di metilazione tra due replicati del campione di genoma umano di riferimento NA12878 per tutte le regioni delle isole CpG. Le librerie sono state sequenziate su NovaSeq X System. L'analisi secondaria dei dati è stata eseguita con DRAGEN Germline v4.4.4.

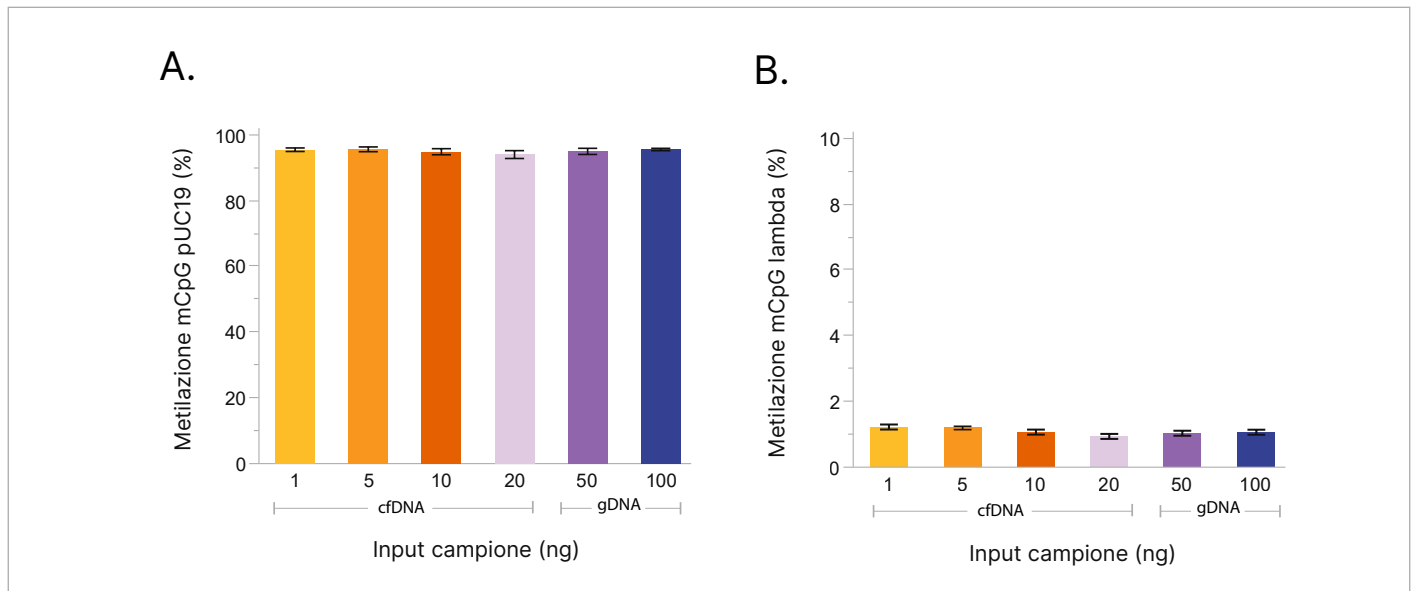


Figura 12: conversione selettiva della metilazione con Illumina 5-Base DNA Prep
 L'elevata selettività e la conversione coerente della metilazione per diverse quantità di campione di input e diversi tipi di campioni assicurano la compatibilità con un'ampia gamma di applicazioni. I controlli per genomi piccoli (A) pUC metilato e (B) lambda non metilato sono inclusi nel kit e possono essere aggiunti insieme al campione di interesse per il controllo qualità della conversione della metilazione. Le quantità di input vanno da 1 a 20 ng di cfDNA da donatori sani e da 50 a 100 ng di gDNA da campione di riferimento umano NA12878.

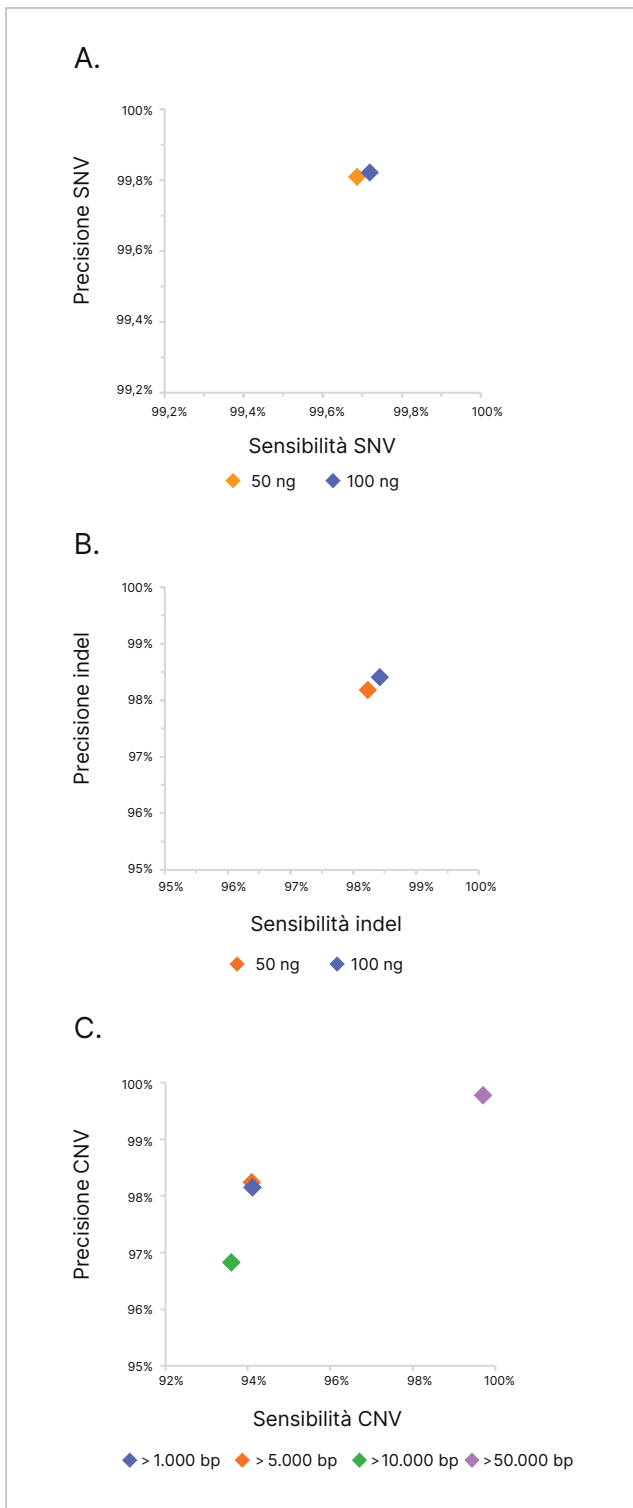


Figura 13: identificazione di varianti della linea germinale ad alta precisione con Illumina 5-Base DNA Prep
 Identificazione di varianti quali (A) SNV e (B) indel con 50 ng e 100 ng di input di gDNA preparato a partire dal campione di genoma umano di riferimento NA12878. Accuratezza del rilevamento delle (C) delezioni di CNV germinali, suddivisa in base alle dimensioni delle varianti, utilizzando il campione del genoma umano di riferimento HG002 (Genome in a Bottle). Le librerie sono state sequenziate su NovaSeq X System e sottocampionate a 500 milioni di letture.

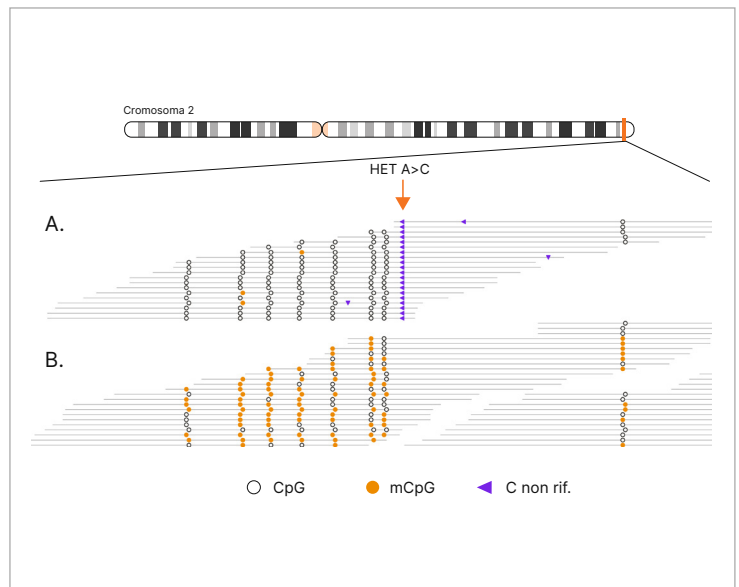


Figura 14: risoluzione di varianti genetiche e metilazione sullo stesso allele

Illumina 5-Base DNA Prep rivela i pattern di metilazione allele-specifici. La pipeline DRAGEN Germline con l'analisi della metilazione a cinque basi può allineare sia i dati delle varianti genetiche sia quelli della metilazione a partire dalle stesse letture. Visualizzazione dettagliata che mostra un introne del gene *RAMP1* sul cromosoma 2. (A) Allele non metilato e (B) allele metilato. Le librerie sono state preparate a partire dal campione di genoma umano di riferimento NA12878.

Convenienza dell'analisi dell'intero genoma

Illumina 5-base DNA Prep offre il più basso costo totale del flusso di lavoro rispetto ad altri metodi di NGS.⁶ Per le applicazioni incentrate sulla metilazione, la soluzione Illumina a cinque basi riduce il sequenziamento rispetto ai saggi di metilazione standard, grazie alla mappatura più efficiente e alla più ampia copertura CpG per corsa. Per generare un duplice livello di informazioni, Illumina 5-Base DNA Prep consente la profilazione della metilazione e l'identificazione di varianti genomiche con un aumento minimo dei costi di sequenziamento rispetto al solo WGS standard.[‡] L'analisi secondaria DRAGEN a due livelli omici e ad alta efficienza riduce inoltre i costi di analisi dei dati di NGS.

[‡] In base a 500 milioni di coppie di letture (un miliardo di letture paired-end) per Illumina 5-Base DNA Prep e 400 milioni di coppie di letture per WGS standard.

Riepilogo

La combinazione dell'analisi della variazione genetica e della metilazione del DNA aiuta a massimizzare le informazioni ottenute da ogni campione. Illumina 5-Base DNA Prep rappresenta una soluzione completa, dalle librerie all'interpretazione, per la profilazione simultanea del genoma e del metiloma in un flusso di lavoro ottimizzato e integrato. Grazie alla chimica e agli algoritmi innovativi, offre risoluzione a base singola ed elevata accuratezza, riducendo al minimo il sequenziamento richiesto. I report completi a due livelli omici, basati sull'analisi DRAGEN integrata e su Illumina Connected Multiomics, aiutano ad accelerare le scoperte biologiche.

Maggiori informazioni →

[Illumina 5-Base DNA Prep](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Preparazione delle librerie	
Illumina 5-Base DNA Prep (24 samples)	20140364
Illumina 5-Base DNA Prep (96 samples)	Presto disponibile
Indici	
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
Analisi	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina Analytics - 1 iCredit	20042038
Illumina Analytics Starter Package - 1000 iCredits	20042039
Illumina Analytics - 5000 iCredits	20042040
Illumina Analytics - 50,000 iCredits	20042041
Illumina Analytics - 100,000 iCredits	20042042
Illumina Connected Multiomics	Richiedere una dimostrazione

Bibliografia

1. Füllgrabe J, Gosal WS, Creed P, et al. [Simultaneous sequencing of genetic and epigenetic bases in DNA](#). *Nat Biotechnol*. 2023;41(10):1457-1464. doi:10.1038/s41587-022-01652-0
2. Vaisvila R, Ponnaluri VKC, Sun Z, et al. [Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA](#). *Genome Res*. 2021;31(7):1280-1289. doi:10.1101/gr.266551.120
3. Babraham Bioinformatics. Bismark Bisulfite Mapper User Guide v0.15.0. bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/Bismark_User_Guide.pdf. Pubblicato il 16 gennaio 2016. Consultato il 12 agosto 2025.
4. Integrated DNA Technologies. xGen Methyl-Seq DNA Library Prep Kit protocol. sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/protocol/xgen-methyl-seq-dna-library-prep-kit-protocol.pdf?sfvrsn=9fa7e007_11. Pubblicato a giugno 2023. Consultato il 12 agosto 2025.
5. Illumina. Scheda tecnica di Illumina DNA Prep. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-dna-prep-data-sheet-m-gl-01373/illumina-dna-prep-data-sheet-m-gl-01373.pdf. Pubblicata nel 2023. Consultata il 12 agosto 2025.
6. Biomodal. Duet multiomics solution +modC. biomodal.com/products/duet-modc/. Consultato il 12 agosto 2025.



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

© 2025 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.
M-GL-03689 ITA v1.0