

Prestazioni di TruPath™ Genome con campioni di tipi e qualità variabili

Compatibilità con diversi tipi di campione, tra cui sangue, cellule isolate, saliva, sangue secco e tamponi orali

Risultati di alta qualità con campioni di qualità variabili, compreso il DNA ottenuto da kit di estrazione standard e ad alto peso molecolare

Efficacia con input di DNA da 175 ng a 550 ng

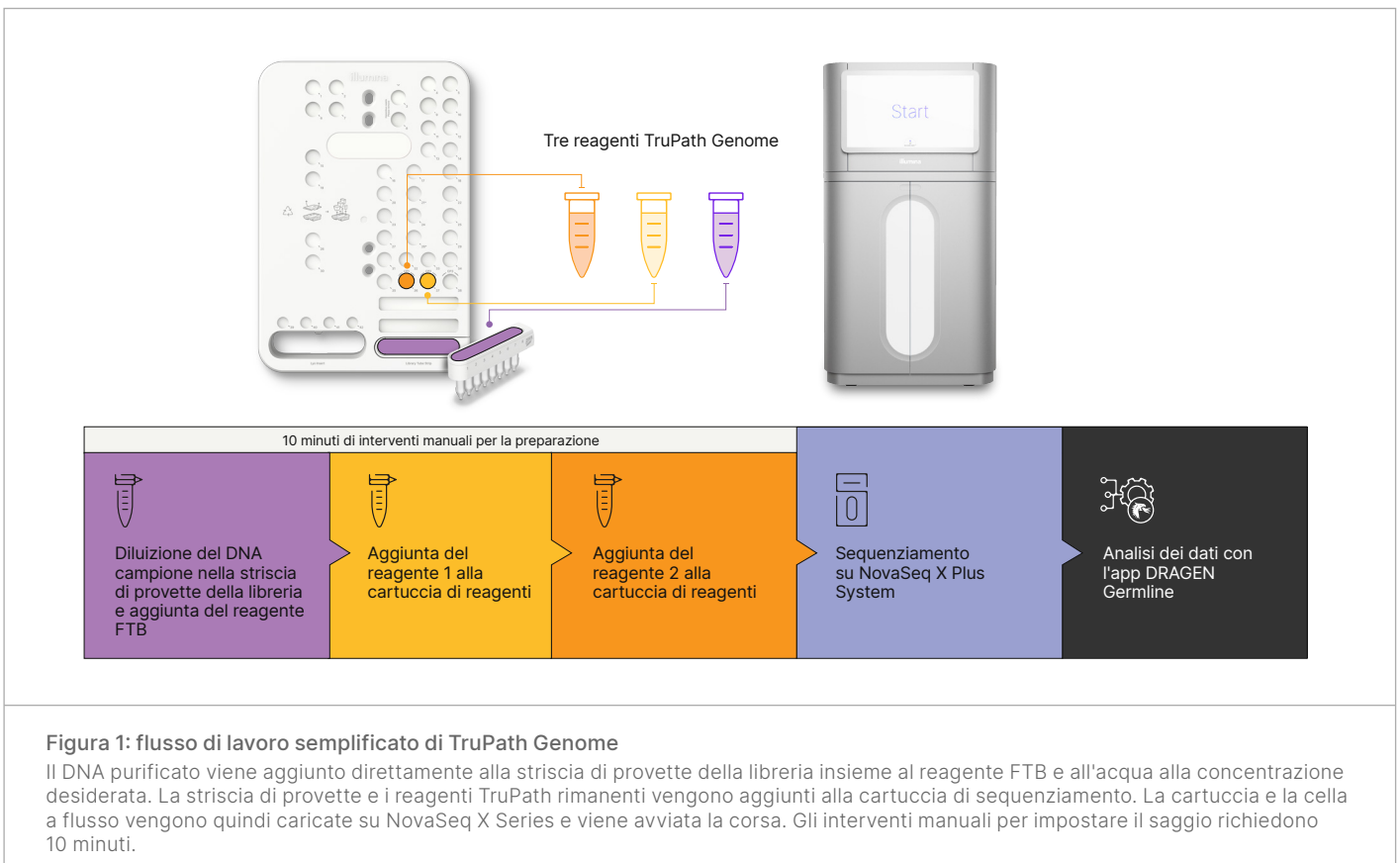
Introduzione

Il sequenziamento a lettura breve rappresenta un metodo flessibile e affidabile per il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) ad alta precisione. Tuttavia, una piccola percentuale del genoma umano rimane difficile da mappare [ad esempio, regioni con elevata omologia delle sequenze o sequenze ripetitive e alcuni tipi di varianti, come le varianti strutturali (quali, inversioni, traslocazioni, inserzioni e delezioni e riarrangiamenti complessi)]. I metodi di sequenziamento a lettura lunga possono aiutare a risolvere queste regioni e tipologie di varianti, ma sono limitati dalla necessità di quantità elevate di DNA di input, severi requisiti di qualità del campione, flussi di lavoro complessi e risultati variabili.¹⁻⁴

Illumina TruPath Genome rivoluziona il flusso di lavoro del sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) offrendo il sequenziamento completo dell'intero genoma più semplice di sempre.⁵ Basato sulla tecnologia di lettura con mappatura di prossimità, TruPath Genome utilizza un flusso di lavoro altamente semplificato, che elimina essenzialmente la tradizionale fase di preparazione delle librerie, e ottimizzato per passare dal DNA purificato al caricamento del sistema di sequenziamento in circa 10 minuti (Figura 1).

Oltre a ridefinire il paradigma del flusso di lavoro di WGS, TruPath Genome utilizza strumenti informatici avanzati per combinare dati a lettura breve molto accurati con informazioni di prossimità dei nanopozzetti ricavate dal DNA templatato sulla cella a flusso. I dati di prossimità consentono ai laboratori di generare informazioni genomiche su lunghe distanze per le sequenze separate anche da milioni di basi. Le informazioni genomiche su lunghe distanze combinate ai vantaggi del sequenziamento a lettura breve consentono a TruPath Genome di rendere accessibili i genomi completi.

Questa nota tecnica dimostra l'elevata efficacia di TruPath Genome nella risoluzione di regioni del genoma precedentemente difficili da mappare e nel rilevamento completo delle varianti con vari tipi di campione e diverse qualità e quantità di DNA.



Test sui tipi di campione

Metodi

Campioni

Per valutare le prestazioni di TruPath Genome, sono stati utilizzati diversi tipi di campione, tra cui sangue, cellule isolate, saliva, tamponi orali e sangue secco (DBS, Dried Blood Spot) (Tabella 1). Il DNA è stato estratto con diversi metodi di purificazione (ad esempio, colonne a centrifuga con silice, microsferre magnetiche, precipitazione alcolica) e mediante approcci standard e ad alto peso molecolare (HMW, High Molecular Weight) (Tabella 2).

La quantità di DNA è stata misurata con Qubit dsDNA High Sensitivity Assay su Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo Q32851). La qualità del DNA è stata valutata con 4200 TapeStation System (Agilent, n. di catalogo G2991BA) (Figura 2).

Tabella 1: campioni utilizzati nel saggio TruPath Genome

Tipo di campione	Origine
Sangue intero	I campioni di sangue conservati in K ₂ EDTA da donatori sani sono stati acquistati da Research Donors (Londra, Regno Unito)
Pellet cellulari	Colture multiple di linee cellulari linfoblastoidi o fibroblastiche ordinate dal Coriell Institute for Medical Research Campioni di DNA HMW e standard, inclusi i campioni di riferimento del consorzio Genome in a Bottle (GIAB) HG001, HG002, HG003, HG004, HG005, HG006 e HG007 (Coriell Institute for Medical Research; NJ, USA)
Saliva	I campioni di saliva da donatori sani sono stati acquistati da Research Donors (Londra, Regno Unito)
Tamponi orali	I campioni da tamponi orali di donatori sani sono stati acquistati da Research Donors (Londra, Regno Unito)
DBS	I campioni DBS sono stati preparati su Whatman 903 Protein Saver Card con 50 µl di sangue intero in K ₂ EDTA non più vecchio di tre giorni acquistato da Research Donors (Londra, Regno Unito)

Tabella 2: kit di estrazione del DNA utilizzati nel saggio TruPath Genome

Tipo di campione: metodo di raccolta	Kit di estrazione
Sangue: K ₂ EDTA	Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood (NEB, n. di catalogo T3050S)
	Wizard HMW DNA Extraction Kit (Promega, n. di catalogo A2920)
	MagAttract HMW DNA Kit (48) (Qiagen, n. di catalogo 67563)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n. di catalogo CMG-718)
	Mag-Bind Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit (OmegaBiotek, n. di catalogo M6399)
	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, n. di catalogo 51104)
Cellule: pellet secco	Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood (NEB, n. di catalogo T3050S)
	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, n. di catalogo 51104)
DBS: Whatman 903	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n. di catalogo CMG-718)
	sparQ Lysis Kit (Quantabio, n. di catalogo 95220)
	MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (n. di catalogo Thermo Fisher Scientific A36570)
Saliva: GFX-02	GeneFix Saliva-Prep 2 DNA Isolation Kit (Isohelix, n. di catalogo GSPN)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n. di catalogo CMG-718)
Saliva: OGD-600	prepIT•L2P DNA extraction reagent (DNAGenotek, n. di catalogo PT-L2P)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n. di catalogo CMG-718)
	MagMAX Saliva gDNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo A39059)
Tamponi: OCR-100	prepIT•L2P DNA extraction reagent (DNAGenotek, n. di catalogo PT-L2P)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n. di catalogo CMG-718)
Whatman 903, Protein saver cards (Millipore Sigma, n. di catalogo WHA10534612); GFX-02, GeneFix Saliva DNA/RNA Collector GFX-02 (Isohelix, n. di catalogo GFX-02); Oragene•Dx saliva collection device (DNA Genotek, n. di catalogo OGD-600); OCR100, ORAcollect•DNA (DNA Genotek, n. di catalogo OCR-100)	

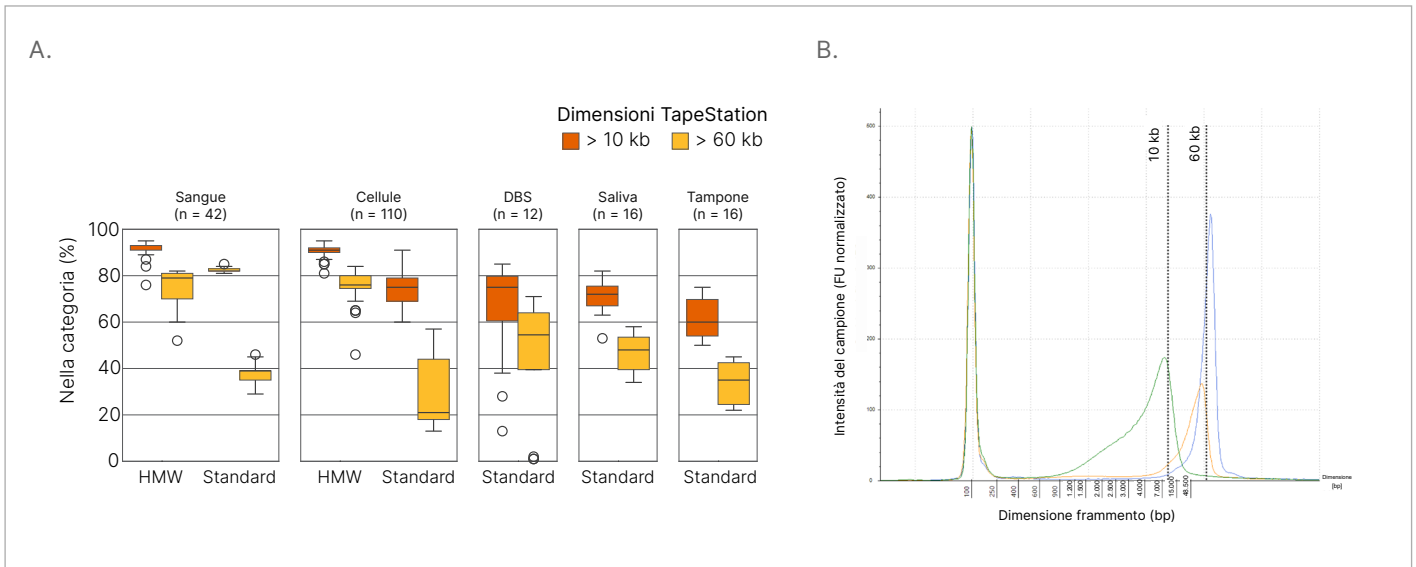


Figura 2: qualità del DNA per tipo di campione

(A) Si osservano diversi livelli di qualità del DNA con diversi tipi di campione e kit di estrazione. Il DNA è stato estratto da campioni di sangue e cellule utilizzando kit disponibili in commercio sia standard sia HMW. Il DNA è stato estratto da DBS, saliva e tamponi orali utilizzando kit standard disponibili in commercio. L'analisi della qualità del DNA è stata eseguita con il saggio per DNA genomico ScreenTape (Agilent, n. di catalogo 5067-5366 e 5067-5365) su Agilent 4200 TapeStation, valutando la percentuale di frammenti più lunghi di 10 kb e 60 kb. (B) L'analisi della qualità del DNA da cellule eseguita con il saggio per DNA genomico ScreenTape (Agilent, n. di catalogo 5067-5366 e 5067-5365) su Agilent 4200 TapeStation ha rivelato una qualità variabile in base al tipo di campione. Campioni di sangue HMW (blu), tamponi (arancione) e DBS (verde).

Impostazione e sequenziamento della corsa

Il DNA è stato aggiunto a una striscia di provette della libreria dei campioni insieme ai reagenti TruPath Genome (Illumina, n. di catalogo 20157406) in base alle istruzioni del produttore. Sebbene la quantità di input standard fosse di 350 ng di DNA, i campioni DBS hanno utilizzato l'intera quantità estratta. L'input minimo di DNA era di 175 ng. La striscia di provette della libreria, i reagenti TruPath Genome e una cella a flusso NovaSeq™ X C8 sono stati caricati su NovaSeq X Plus System (Illumina, n. di catalogo 20084804) per il sequenziamento in base al manuale dell'utente.

Analisi

Dopo il sequenziamento, è stata utilizzata la pipeline DRAGEN™ Germline per combinare i dati di sequenziamento a lettura breve con le informazioni di prossimità dei nanopozzetti. Per l'identificazione di varianti dalle letture con fasi determinate è stato usato il genoma di riferimento GRCh38.

Risultati

TruPath Genome produce risultati di alta qualità con campioni di qualità variabile

Le metriche standard dell'intero genoma ottenute con TruPath Genome, comprese copertura autosomica e accuratezza dell'identificazione delle basi, non sono state influenzate dalla qualità del DNA e le prestazioni sono risultate solide per tutti i tipi di campione (Figura 3). La copertura autosomica media è stata di circa 64x e il Q30 medio del 92%. Per alcuni campioni di saliva e tamponi, la riduzione della copertura è dipesa dalla naturale presenza di letture batteriche nei campioni, che riduceva la percentuale di letture mappate del genoma umano.

La qualità del campione di DNA è risultata fortemente associata alle metriche di prossimità di TruPath Genome (Figura 4). Per la maggior parte dei tipi di campione, la percentuale di frammenti di DNA più lunghi di 10 kb è stata un forte predittore delle prestazioni della percentuale di prossimità: una percentuale più alta di frammenti più lunghi di 10 kb ha prodotto una più elevata percentuale di prossimità Q25 [ovvero, la percentuale di letture che hanno almeno un'altra lettura vicina con punteggio qualitativo (Q-score) superiore a Q25*].

* Il punteggio qualitativo di prossimità indica la probabilità su scala Phred che due letture provenienti dalla stessa regione del genoma siano finite per caso nella medesima area della cella a flusso secondo i calcoli del modello di prossimità DRAGEN. Un punteggio qualitativo di prossimità più elevato indica una maggiore probabilità che due letture vicine nel genoma e sulla cella a flusso abbiano avuto origine dalla stessa molecola di DNA di input.

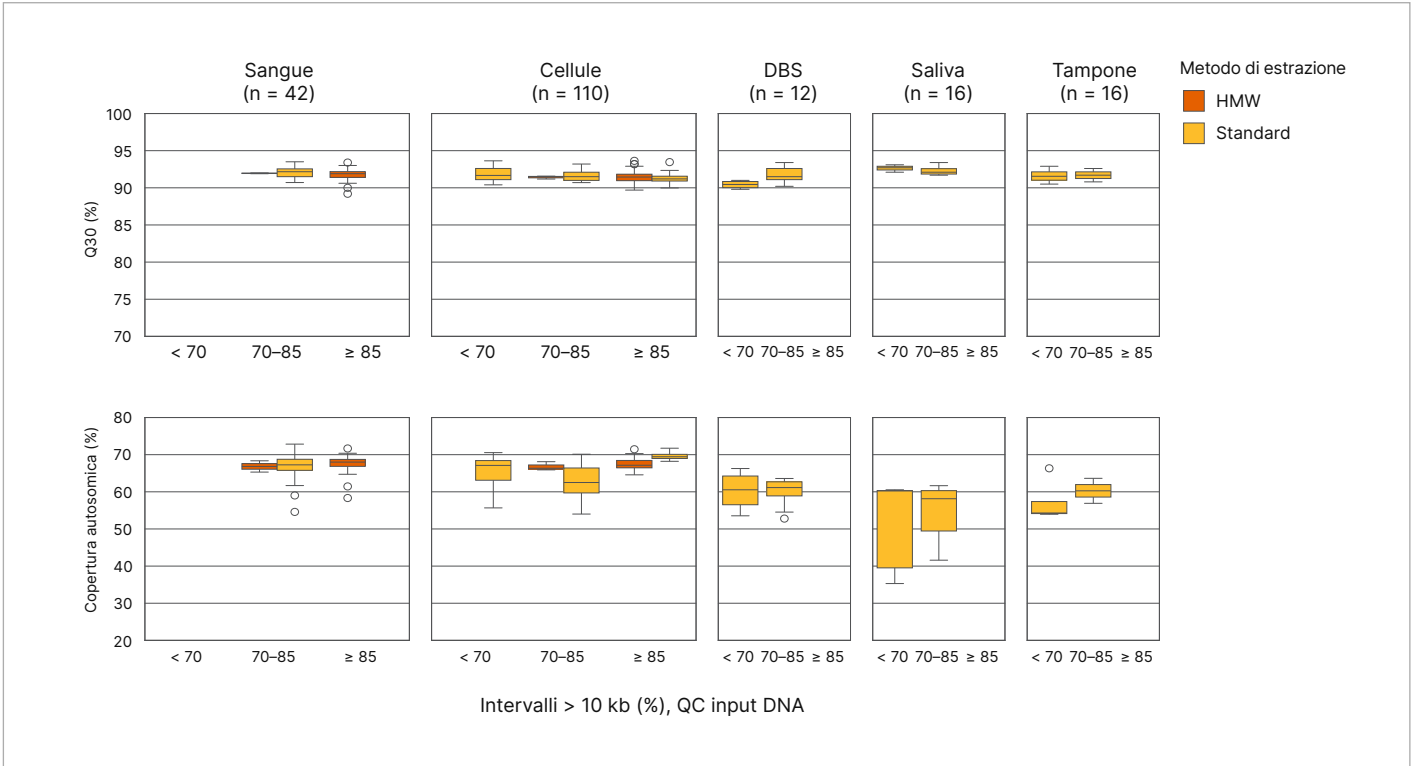


Figura 3: la copertura autosomica e la percentuale media Q30 non sono influenzate dalla qualità del DNA in diversi tipi di campione
 Il DNA è stato estratto da sangue e cellule utilizzando metodi standard e HMW. Il DNA è stato estratto da DBS, saliva e tamponi orali utilizzando metodi standard. Con tutti i campioni sono state osservate elevate prestazioni per copertura e punteggi qualitativi, indipendentemente dal metodo di purificazione del DNA. L'integrità del DNA, espressa come percentuale di frammenti più lunghi di 10 kb e suddivisa in intervalli lungo l'asse X, è stata misurata su Agilent 4200 TapeStation mediante un'analisi regionale.

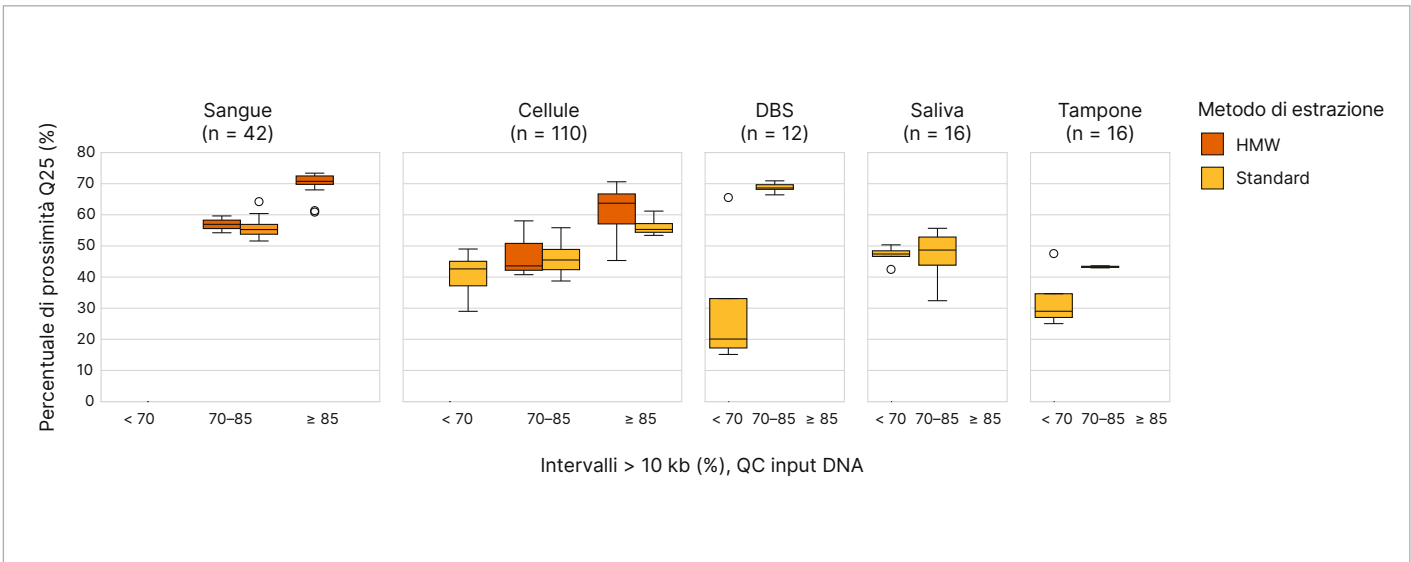


Figura 4: impatto della qualità del DNA sulla percentuale di prossimità Q25
 Il DNA è stato estratto da sangue e cellule utilizzando metodi standard e HMW. Il DNA è stato estratto da DBS, saliva e tamponi orali utilizzando metodi standard. Le percentuali di prossimità Q25 sono fortemente associate alla qualità del DNA, in particolare per quanto riguarda la percentuale di frammenti di DNA più lunghi di 10 kb misurata su Agilent 4200 TapeStation e suddivisa in intervalli lungo l'asse X.

TruPath Genome supporta il sequenziamento con determinazione delle fasi

La presenza di frammenti più grandi di DNA è un forte predittore delle prestazioni di determinazione delle fasi: maggiore è la percentuale di frammenti di DNA più lunghi di 60 kb, maggiore è l'NG50 del blocco di fase[†] e più elevate sono le prestazioni dell'identificazione di varianti piccole. TruPath Genome consente lo studio del DNA templato a lunghezza intera, risultando adatto per gli studi di determinazione delle fasi del genoma umano (Figura 5).

TruPath Genome offre le migliori prestazioni con campioni freschi di alta qualità

Per valutare l'impatto dell'età del campione sulle prestazioni di TruPath Genome, il DNA è stato estratto da campioni di sangue e DBS in due punti temporali specifici. Per i campioni di sangue, il DNA è stato estratto entro tre giorni dal prelievo di sangue e dopo sette giorni di conservazione a 4 °C. I campioni DBS sono stati conservati per un mese o per un anno a temperatura ambiente.

[†] L'NG50 del blocco di fase corrisponde alla lunghezza del blocco di fase una volta che il 50% della regione target (genoma o altro) è stato sottoposto a determinazione delle fasi.

Sia per i campioni di sangue sia per i campioni DBS, l'NG50 del blocco di fase è cambiato in relazione alla percentuale di frammenti di DNA più lunghi di 60 kb (Figura 6). Entrambe le metriche sono risultate inferiori per i campioni invecchiati rispetto ai campioni freschi. Per i campioni di sangue, oltre il 40% dei frammenti ottenuti aveva una lunghezza superiore a 60 kb, anche nei campioni con DNA isolato dopo una settimana mediante un metodo HMW.

TruPath Genome offre prestazioni solide con varie quantità di DNA di input

Le prestazioni del saggio TruPath Genome sono state valutate con diverse quantità di DNA di input: 175, 200, 350 e 550 ng. I risultati del sequenziamento con input di 175 ng hanno mostrato metriche di alta qualità sia a livello di intero genoma (ad esempio, copertura autosomica e percentuale di basi con punteggio superiore a Q30) sia a livello di prossimità (ad esempio, percentuale di prossimità Q25 ed NG50 del blocco di fase). Sebbene l'input raccomandato sia di 350 ng, è possibile utilizzare input inferiori (Figura 7).

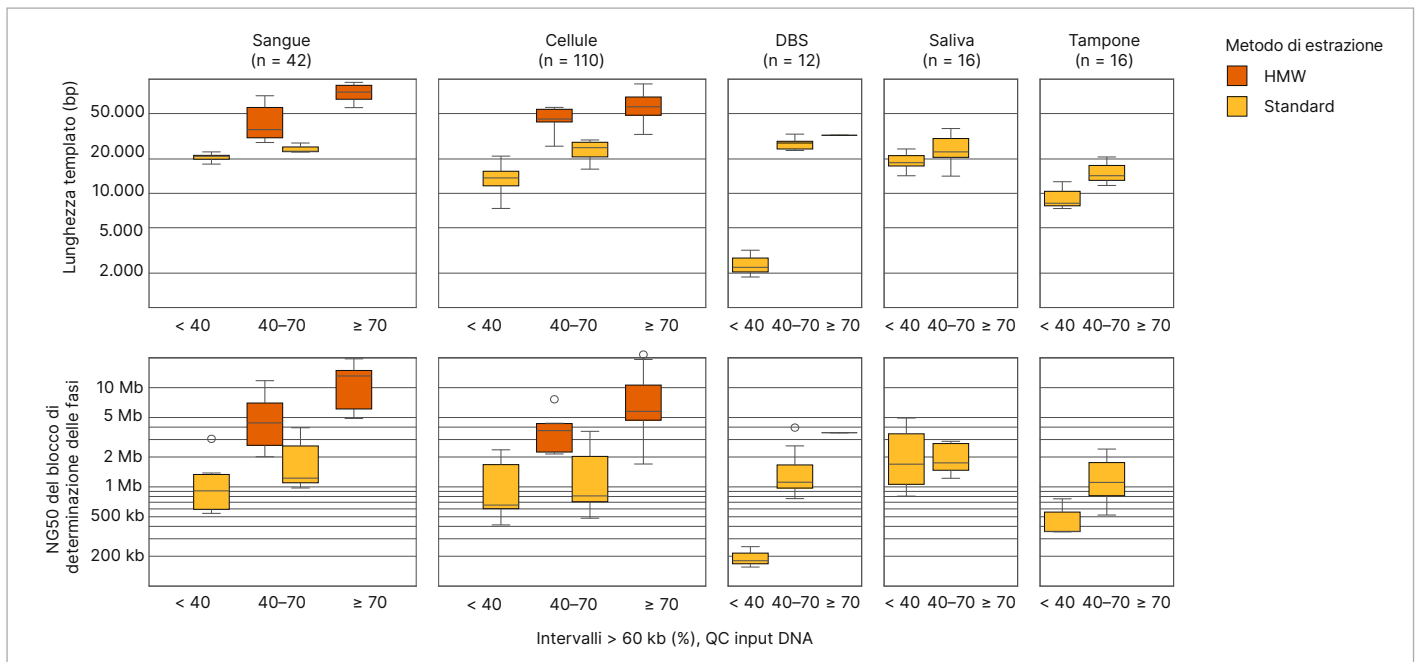


Figura 5: la determinazione delle fasi con TruPath Genome è altamente efficace con vari tipi di campione

Il DNA è stato estratto da sangue e cellule utilizzando metodi standard e HMW. Il DNA è stato estratto da DBS, saliva e tamponi orali utilizzando metodi standard. L'integrità del DNA, espressa come percentuale di frammenti più lunghi di 60 kb e suddivisa in intervalli lungo l'asse X, è stata misurata su Agilent 4200 TapeStation mediante un'analisi regionale. La lunghezza del templato sull'asse Y rappresenta la dimensione della molecola del templato al 75° percentile. Una più alta qualità del DNA, con una percentuale più elevata di frammenti più lunghi di 60 kb, è associata all'incremento della lunghezza del templato e dell'NG50 del blocco di fase.

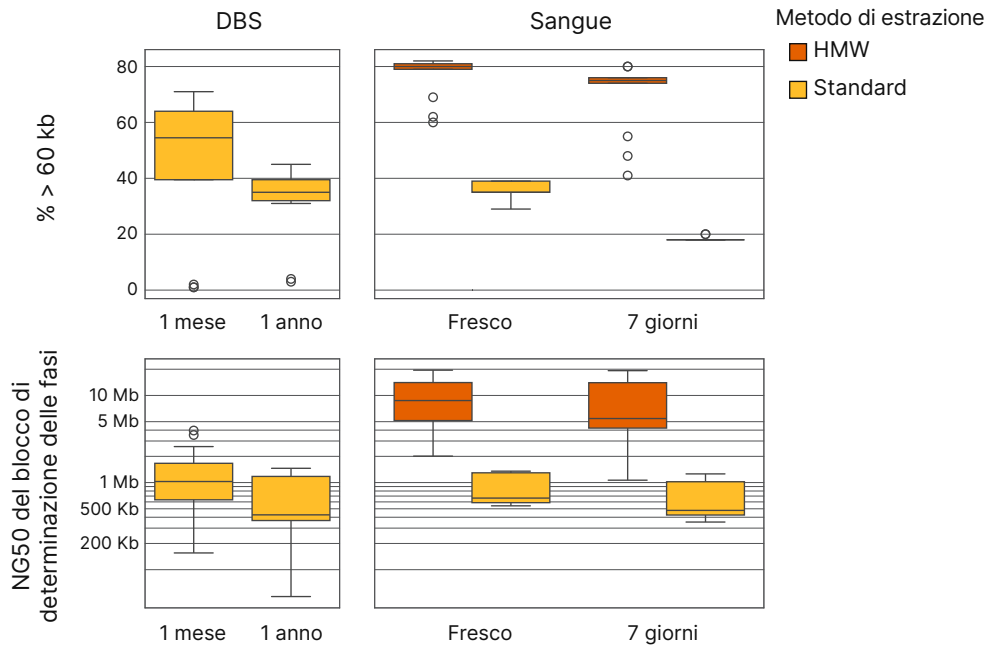


Figura 6: impatto della conservazione dei campioni di sangue sulla qualità del DNA e sull'NG50 del blocco di fase

I campioni di sangue sono stati conservati a 4 °C per meno di 3 giorni (freschi) o 7 giorni. I campioni DBS sono stati conservati a temperatura ambiente per meno di 30 giorni o circa un anno. Il DNA è stato estratto dal sangue utilizzando metodi standard e HMW. Il DNA è stato estratto da campioni DBS utilizzando metodi standard. Impatto dell'età del campione primario sulla qualità del DNA (percentuale di frammenti più lunghi di 60 kb) e sull'NG50 del blocco di fase. La percentuale di frammenti più lunghi di 60 kb è stata misurata utilizzando il DNA genomico nel saggio ScreenTape su Agilent 4200 TapeStation. Per entrambi i tipi di campione, la percentuale di frammenti più lunghi di 60 kb e l'NG50 del blocco di fase sono inferiori per i campioni conservati più a lungo prima dell'estrazione.

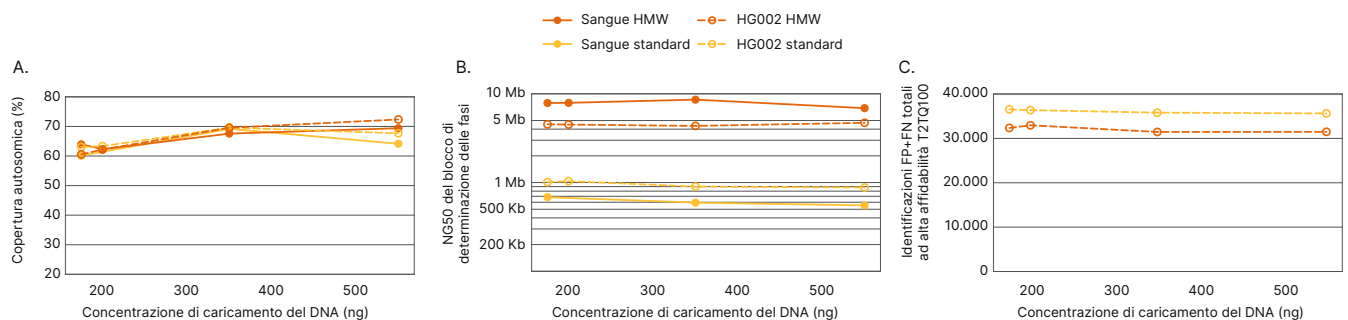


Figura 7: TruPath Genome funziona bene con diverse quantità di input

I risultati del sequenziamento con TruPath Genome preparato con input da 175, 200, 350 e 550 ng mostrano una qualità dei dati simile per le metriche standard dell'intero genoma e le metriche di prossimità di TruPath Genome, tra cui (A) copertura autosomica, (B) NG50 del blocco di fase e (C) prestazioni di identificazione di varianti piccole (identificazioni FP+FN totali). Il DNA è stato estratto da sangue e cellule utilizzando metodi standard e HMW. Le prestazioni di identificazione di varianti piccole (SNP + indel) sono state confrontate con il truth set T2T-Q100 V1.1 V0.019.

Riepilogo

Basato sulla tecnologia di lettura con mappatura di prossimità, TruPath Genome rappresenta una soluzione completa di sequenziamento dell'intero genoma caratterizzata da una semplicità senza precedenti. Il flusso di lavoro unico nel suo genere sfrutta i vantaggi dei metodi di sequenziamento a lettura breve insieme ai dati di prossimità sulla cella a flusso per ottenere informazioni su lunghe distanze. Questa nota tecnica dimostra le prestazioni di alta qualità e l'efficacia di TruPath Genome con campioni di diversi tipi, quantità, qualità e condizioni di conservazione.

Bibliografia

1. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-forPacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf. Pubblicato nel 2022. Consultato l'8 dicembre 2025.
2. Pacific Biosciences. Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genomeand-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf. Pubblicato nel 2022. Consultato l'8 dicembre 2025.
3. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit-v14.html. Consultato l'8 dicembre 2025.
4. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf. Pubblicato nel 2018. Consultato l'8 dicembre 2025.
5. Illumina. TruPath Genome data sheet. illumina.com//content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trupath-genome-data-sheet-m-gl-03931/trupath-genome-data-sheet-m-gl-03931.pdf. Pubblicata a febbraio 2026. Consultata il 24 febbraio 2026.



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

© 2026 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-03932 ITA v1.0