

Desempenho do TruPath™ Genome com amostras de vários tipos e qualidades variáveis

Compatível com uma variedade de tipos de amostras, incluindo sangue, células isoladas, saliva, manchas de sangue seco e swabs bucais

Resultados de alta qualidade de uma variedade de qualidades de amostra, incluindo DNA de kits de extração padrão e de alto peso molecular

Desempenho robusto com entrada de DNA de 175 ng a 550 ng

Introdução

O sequenciamento de leitura curta oferece um método flexível e confiável para a execução do sequenciamento do genoma completo (WGS, whole-genome sequencing) de alta precisão. No entanto, uma pequena proporção do genoma humano permanece difícil de mapear (por exemplo, regiões com homologia de sequência alta ou sequências repetitivas e alguns tipos de variantes, como variantes estruturais (por exemplo, inversões, translocações, inserções e deleções e rearranjos complexos)). Métodos de sequenciamento de leitura longa podem ajudar a resolver essas regiões e tipos de variantes, mas são prejudicados pela necessidade de altas quantidades de entrada de DNA, requisitos rigorosos de qualidade de entrada, fluxos de trabalho complexos e resultados variáveis.¹⁻⁴

O Illumina TruPath Genome revoluciona o fluxo de trabalho de sequenciamento de última geração, fornecendo sequenciamento do genoma completo abrangente com simplicidade sem precedentes.⁵ Com tecnologia de leitura mapeada por proximidade, o TruPath Genome usa um fluxo de trabalho altamente simplificado que essencialmente elimina a etapa tradicional de preparação da biblioteca e fornece um fluxo de trabalho simplificado que vai do DNA purificado ao carregamento do sistema de sequenciamento em ~10 minutos (Figura 1).

Além de alterar o paradigma do fluxo de trabalho do WGS, o TruPath Genome usa informática avançada para combinar dados de leitura curta de alta precisão com informações de proximidade de nanoporos de modelos de DNA na lâmina de fluxo. Essas informações de proximidade permitem que os laboratórios gerem insights genômicos de longo alcance para sequências separadas por até milhões de bases. A combinação desses insights genômicos de longo alcance com os pontos fortes do sequenciamento de leitura curta permite que o TruPath Genome torne acessíveis genomas abrangentes.

Esta nota técnica demonstra os recursos altamente robustos do TruPath Genome para resolver regiões anteriormente difíceis de mapear do genoma e realizar uma detecção abrangente de variantes com diversos tipos de amostras, qualidade do DNA e entradas de DNA.

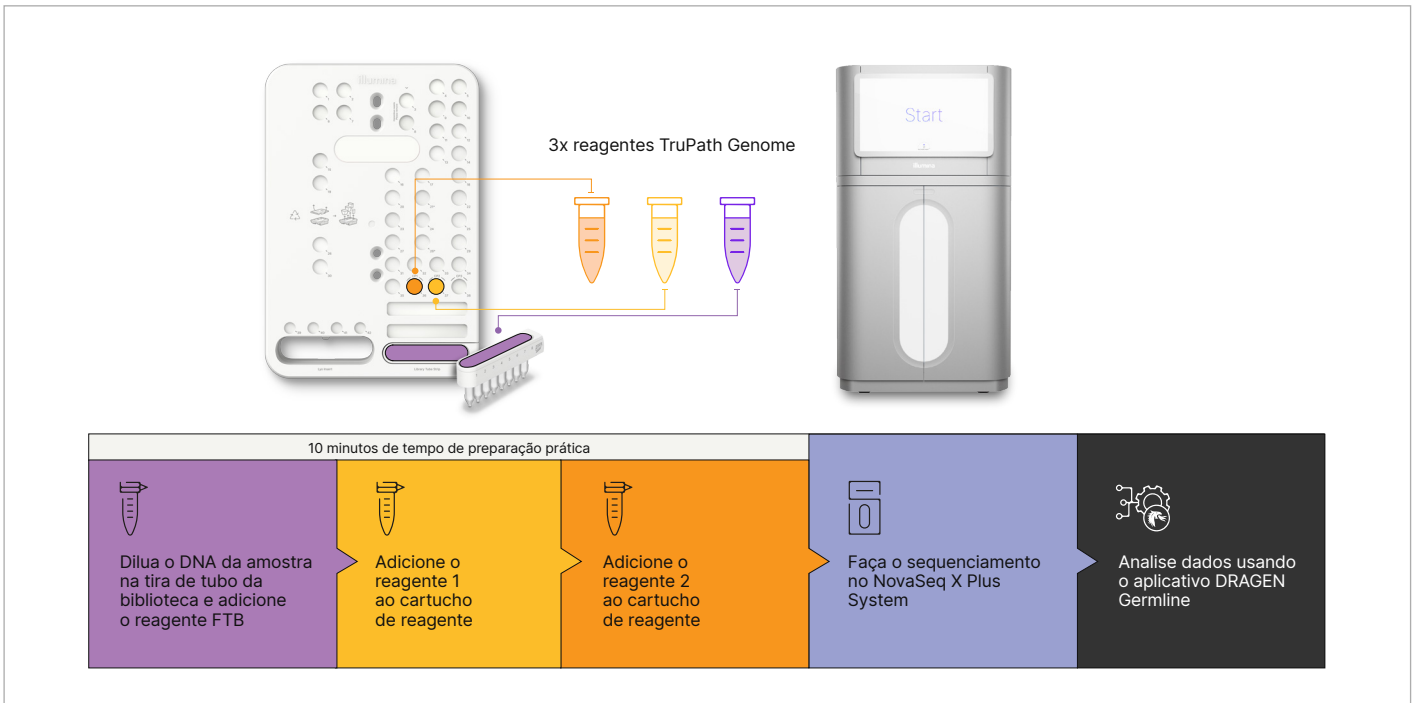


Figura 1: Fluxo de trabalho simplificado do TruPath Genome

DNA purificado é adicionado diretamente à tira de tubo da biblioteca juntamente com o reagente FTB e a água até a concentração desejada. A tira de tubo e os reagentes TruPath restantes são adicionados ao cartucho de sequenciamento. Em seguida, o cartucho e a lâmina de fluxo são carregados no NovaSeq X Series e a corrida é iniciada. O tempo de manuseio para configurar o ensaio é de 10 minutos.

Teste do tipo de amostra

Métodos

Amostras

Uma variedade de tipos de amostras, incluindo sangue, células isoladas, saliva, swabs bucais e manchas de sangue seco (DBS, dried blood spots), foi usada para avaliar o desempenho do TruPath Genome (Tabela 1). A extração de DNA foi realizada usando vários métodos de purificação (por exemplo, coluna giratória de sílica, beads magnéticos, precipitação de álcool) e incluiu métodos de extração de alto peso molecular (HMW) e padrão (Tabela 2).

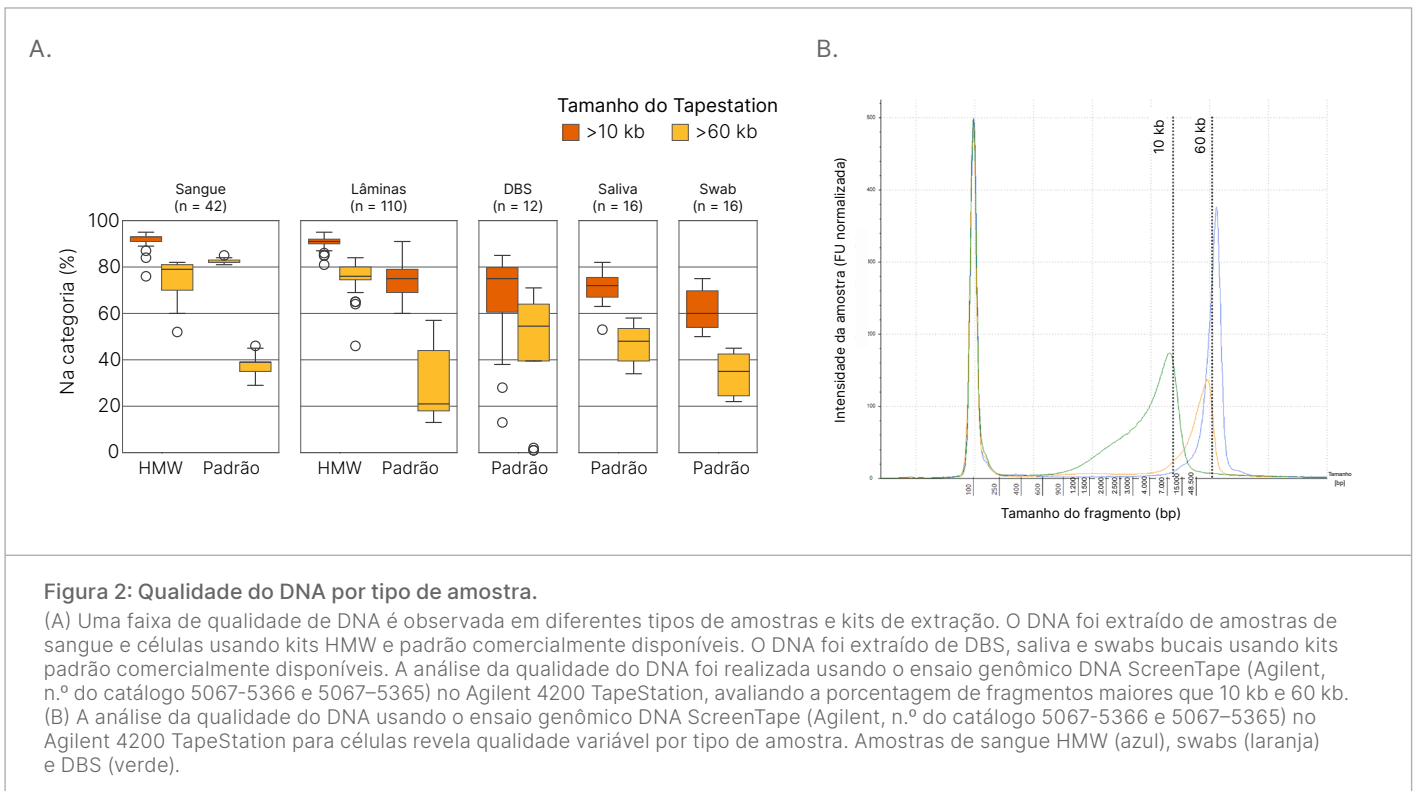
A quantidade de DNA foi medida usando o ensaio de alta sensibilidade Qubit dsDNA no Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, n.º do catálogo Q32851). A qualidade do DNA foi avaliada com um 4200 TapeStation System (Agilent, n.º do catálogo G2991BA) (Figura 2).

Tabela 1: Amostras usadas no ensaio com o TruPath Genome

Tipo de amostra	Origem
Sangue total	As amostras de sangue armazenadas em K ₂ EDTA de doadores saudáveis foram adquiridas da Research Donors (Londres, Reino Unido)
Sedimentos celulares	Várias culturas de linhagens celulares de linfoblastoides ou fibroblastos solicitadas pelo Coriell Institute for Medical Research Amostras HMW e padrão de DNA, incluindo as amostras de referência do Genome in a Bottle Consortium (GIAB) HG001, HG002, HG003, HG004, HG005, HG006 e HG007 (Corriell Institute for Medical Research; NJ, EUA)
Saliva	Amostras de saliva de doadores saudáveis foram adquiridas da Research Donors (Londres, Reino Unido)
Swabs bucais	Amostras de swabs bucais de doadores saudáveis foram adquiridas da Research Donors (Londres, Reino Unido)
DBS	As DBS foram preparadas em Whatman 903 Protein Saver Cards usando 50 µl de sangue total de K ₂ EDTA <3 dias da Research Donors (Londres, Reino Unido)

Tabela 2: Kits de extração de DNA usados no ensaio com o TruPath Genome

Tipo de amostra: método de coleta	Kits de extração
Sangue: K ₂ EDTA	Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood (NEB, n.º do catálogo T3050S)
	Wizard HMW DNA Extraction Kit (Promega, n.º do catálogo A2920)
	MagAttract HMW DNA Kit (48) (Qiagen, n.º do catálogo 67563)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n.º do catálogo CMG-718)
	Mag-Bind Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit (OmegaBiotek, n.º do catálogo M6399)
	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, n.º do catálogo 51104)
Células: sedimento seco	Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood (NEB, n.º do catálogo T3050S)
	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, n.º do catálogo 51104)
DBS: Whatman 903	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n.º do catálogo CMG-718)
	sparQ Lysis Kit (Quantabio, n.º do catálogo 95220)
	MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2,0 Kit (Thermo Fisher Scientific n.º do catálogo A36570)
Saliva: GFX-02	GeneFix Saliva-Prep 2 DNA Isolation Kit (Isohelix, n.º do catálogo GSPN)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n.º do catálogo CMG-718)
Saliva: OGD-600	prepIT•L2P DNA extraction reagent (DNAGenotek, n.º do catálogo PT-L2P)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n.º do catálogo CMG-718)
	MagMAX Saliva gDNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, n.º do catálogo A39059)
Swabs: OCR-100	prepIT•L2P DNA extraction reagent (DNAGenotek, n.º do catálogo PT-L2P)
	chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, n.º do catálogo CMG-718)
Whatman 903, Protein saver cards (Millipore Sigma, n.º do catálogo WHA10534612); GFX-02, GeneFix Saliva DNA/RNA Collector GFX-02 (Isohelix, n.º do catálogo GFX-02); Oragene•Dx saliva collection device (DNA Genotek, n.º do catálogo OGD-600); OCR100, ORAcollect•DNA (DNA Genotek, n.º do catálogo OCR-100)	



Configuração de corrida e sequenciamento

O DNA foi adicionado a uma tira de tubo da biblioteca de amostras com reagentes TruPath Genome (Illumina, n.º de catálogo 20157406) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de entrada padrão foi de 350 ng de DNA. No entanto, as amostras de DBS usaram toda a quantidade extraída. A entrada mínima de DNA foi de 175 ng. A tira de tubo da biblioteca, os reagentes TruPath Genome e uma lâmina de fluxo NovaSeq™ X C8 foram carregados no NovaSeq X Plus System (Illumina, n.º do catálogo 20084804) para sequenciamento de acordo com o manual do usuário.

Análise

Após o sequenciamento, o pipeline do DRAGEN™ Germline foi usado para combinar dados de sequenciamento de leitura curta com informações de proximidade de nanoporos. O genoma de referência GRCh38 foi usado para identificação de variantes com base em leituras em fases.

Resultados

O TruPath Genome fornece resultados de alta qualidade de amostras de qualidade variável

As métricas padrão do genoma completo, incluindo cobertura autossômica e precisão da identificação de bases, alcançadas com o TruPath Genome, não foram afetadas pela qualidade do DNA e foi observado um desempenho robusto para todos os tipos de amostras (Figura 3). A cobertura autossômica média foi de ~64x e a Q30 média foi de 92%. Para algumas amostras de saliva e swab, a redução na cobertura foi decorrente da presença natural de leituras bacterianas nas amostras, o que reduziu a porcentagem de leitura mapeada do genoma humano.

A qualidade da amostra de DNA estava altamente associada às métricas de proximidade do TruPath Genome (Figura 4). Para a maioria dos tipos de amostra, a porcentagem de fragmentos de DNA acima de 10 kb foi um forte preditor do desempenho da taxa de proximidade, com uma porcentagem de fragmento mais alta acima de 10 kb produzindo uma taxa de proximidade Q25 mais alta (ou seja, a porcentagem de leituras que têm pelo menos uma outra leitura em estreita proximidade com uma pontuação de qualidade acima de Q25*).

* A pontuação de qualidade de proximidade é a probabilidade em escala de Phred de que duas leituras da mesma região do genoma estejam na mesma vizinhança de lâmina de fluxo ao acaso, conforme calculado pelo modelo de proximidade DRAGEN. Uma pontuação mais alta de qualidade de proximidade indica uma maior confiança de que duas leituras que estão próximas no genoma e na lâmina de fluxo se originaram da mesma molécula de DNA de entrada.

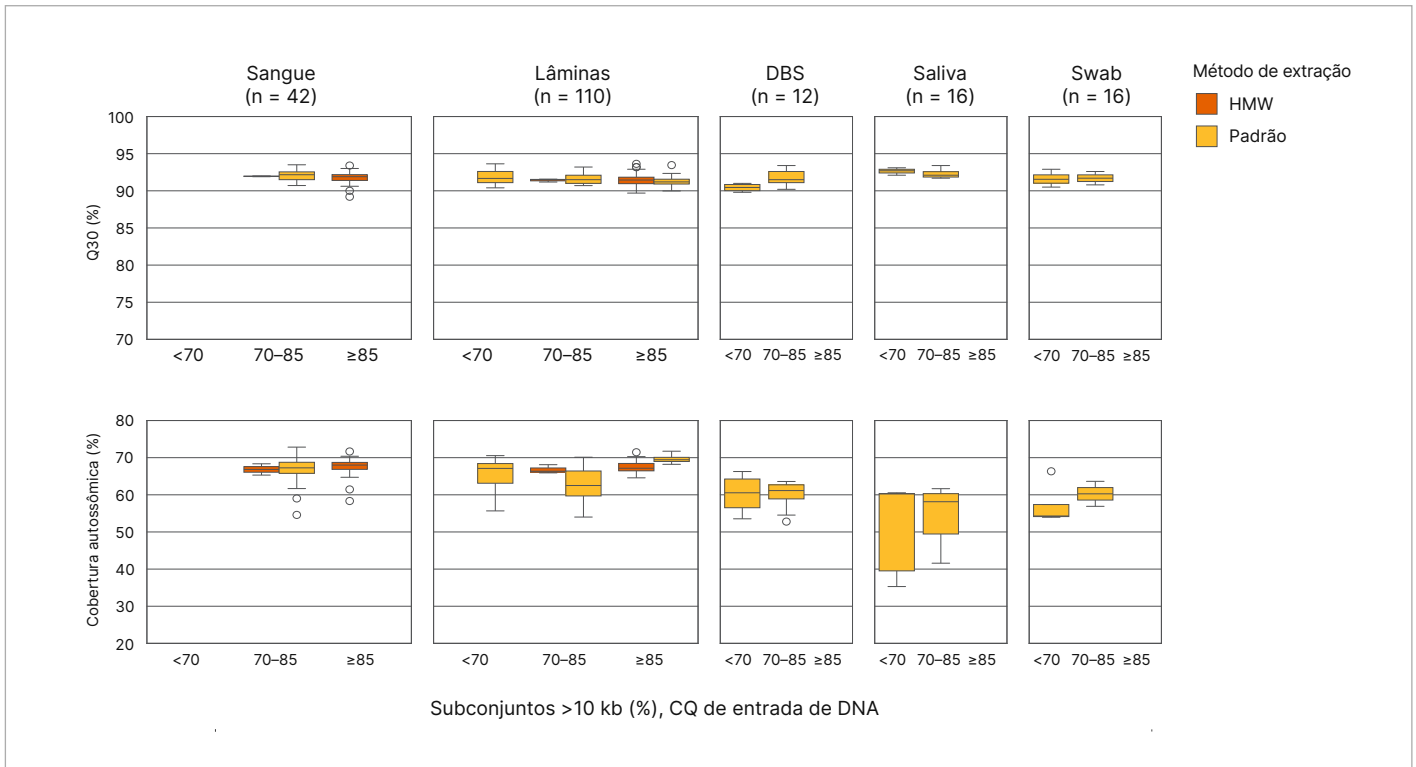


Figura 3: A cobertura autossômica e o percentual médio de Q30 não são afetados pela qualidade do DNA em diferentes tipos de amostras

O DNA foi extraído do sangue e das células usando métodos HMW e padrão. O DNA foi extraído de DBS, saliva e swabs bucais usando métodos padrão. Foi observado um forte desempenho para pontuações de cobertura e qualidade em todas as amostras, independentemente do método de purificação de DNA. A integridade do DNA foi medida no Agilent 4200 TapeStation com uma análise regional como porcentagem de fragmentos >10 kb agrupados ao longo do eixo X.

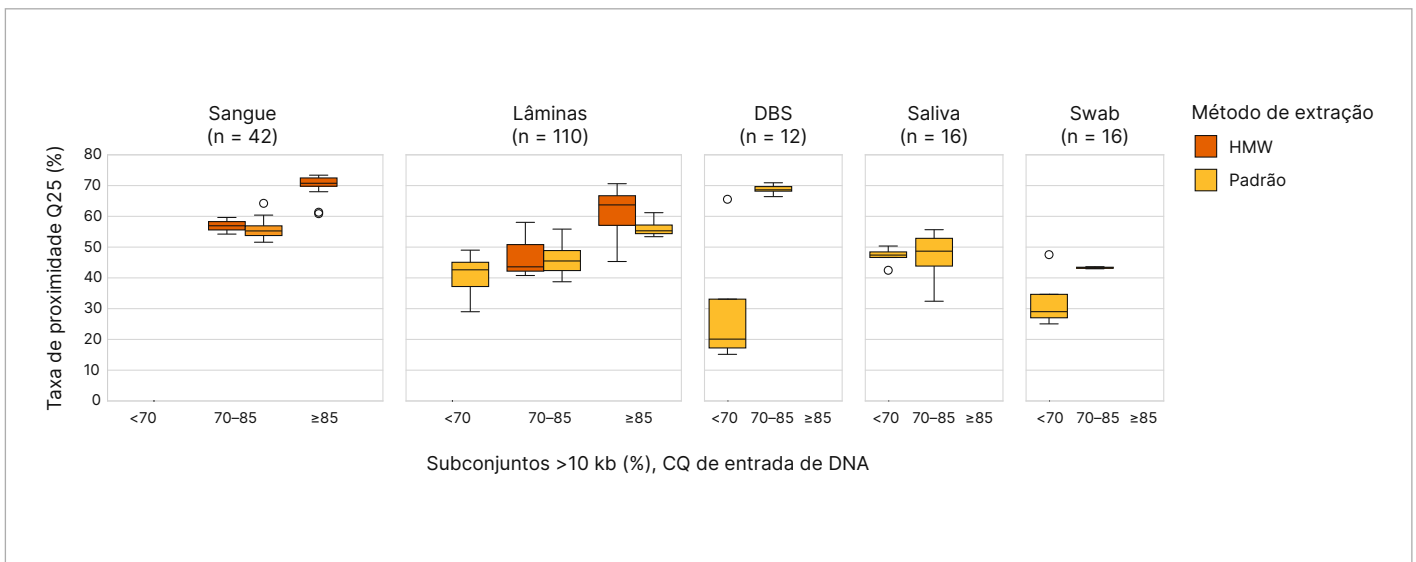


Figura 4: Impacto da qualidade do DNA na taxa de proximidade Q25

O DNA foi extraído do sangue e das células usando métodos HMW e padrão. O DNA foi extraído de DBS, saliva e swabs bucais usando métodos padrão. As taxas de proximidade Q25 estão altamente associadas à qualidade do DNA, em particular com o % de fragmentos de DNA >10 kb medido no Agilent 4200 TapeStation e posicionado ao longo do eixo X.

O TruPath Genome é compatível com sequenciamento em fases

A presença de fragmentos de DNA maiores é um forte preditor do desempenho do faseamento: quanto maior a porcentagem de fragmento de DNA acima de 60 kb, maior o tamanho do bloco de faseamento NG50[†] e maior o desempenho da identificação de variantes pequenas. O TruPath Genome permite o estudo de modelos de DNA de comprimento total, tornando-o adequado para estudos de faseamento do genoma humano (Figura 5).

O TruPath Genome tem melhor desempenho com amostras frescas de alta qualidade

Para avaliar o impacto da idade da amostra no desempenho do TruPath Genome, o DNA foi extraído de amostras de sangue e DBS em duas ocasiões específicas. Para amostras de sangue, o DNA foi extraído até três dias após a coleta de sangue e após sete dias de armazenamento a 4 °C. As amostras de DBS foram armazenadas por um mês ou um ano em temperatura ambiente.

Em amostras de sangue e DBS, o tamanho do bloco de faseamento NG50 mudou em relação à porcentagem de fragmentos de DNA acima de 60 kb (Figura 6). Ambas as métricas foram menores para as amostras mais antigas em comparação com amostras frescas. Em amostras de sangue, mais de 40% dos fragmentos >60 kb foram obtidos até mesmo para amostras em que o DNA foi isolado após uma semana quando o DNA foi extraído usando um método HMW.

O TruPath Genome tem um desempenho robusto em diversas quantidades de entrada de DNA

O desempenho do ensaio TruPath Genome foi avaliado em diversas quantidades de entrada de DNA: 175, 200, 350 e 550 ng. Os resultados do sequenciamento com a entrada de 175 ng demonstraram métricas de genoma completo padrão de alta qualidade (por exemplo, cobertura autossômica e porcentagem >Q30) e métricas de proximidade (por exemplo, taxa de proximidade Q25 e bloco de faseamento NG50). Embora a entrada recomendada seja de 350 ng, entradas mais baixas podem ser usadas (Figura 7).

† O bloco de fase NG50 é o comprimento do bloco de fase quando 50% da região-alvo (genoma ou outra) estiver em fase.

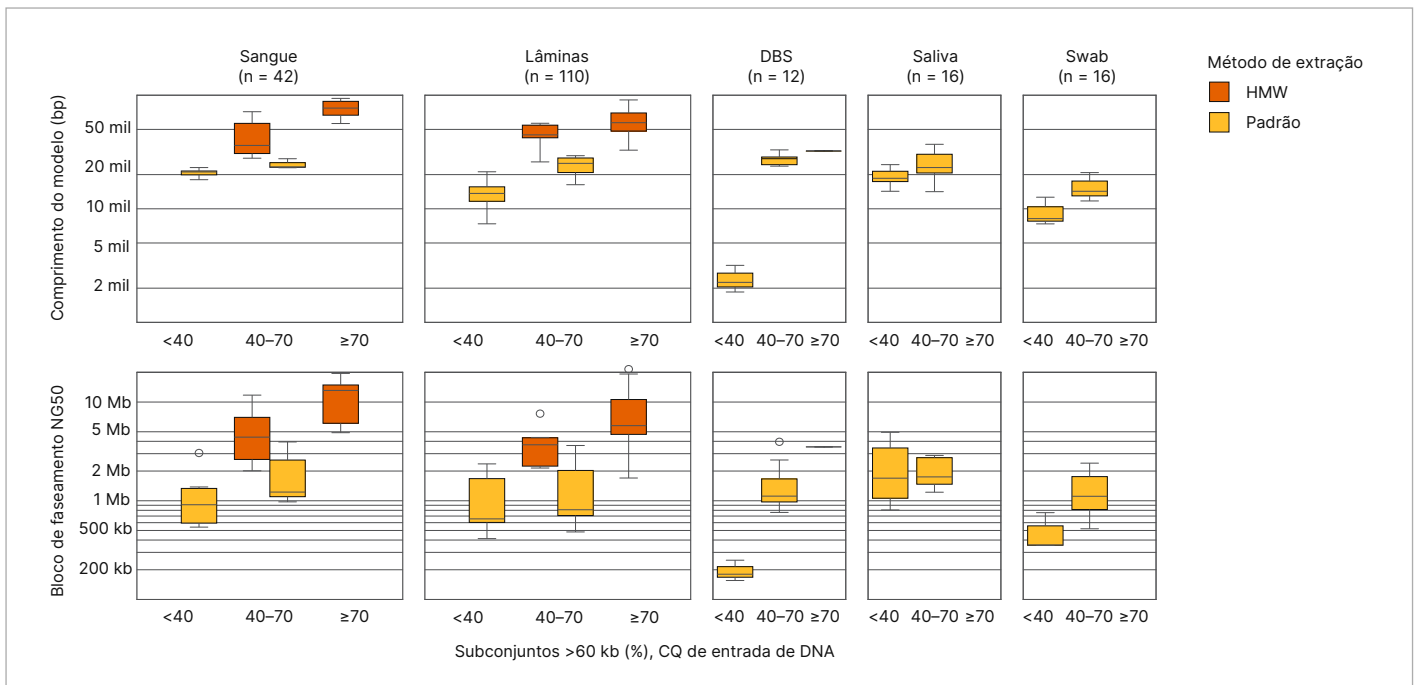


Figura 5: O desempenho de faseamento do TruPath Genome é altamente robusto com tipos de amostras variáveis

O DNA foi extraído do sangue e das células usando métodos HMW e padrão. O DNA foi extraído de DBS, saliva e swabs bucais usando métodos padrão. A integridade do DNA foi medida no Agilent 4200 TapeStation com uma análise regional e porcentagem de fragmentos >60 kb agrupados ao longo do eixo X. O comprimento do modelo no eixo Y representa o tamanho da molécula do modelo do 75.º percentil. O aumento da qualidade do DNA, com porcentagem >60Kb, se correlaciona com o aumento do comprimento do modelo e o bloco de faseamento NG50.

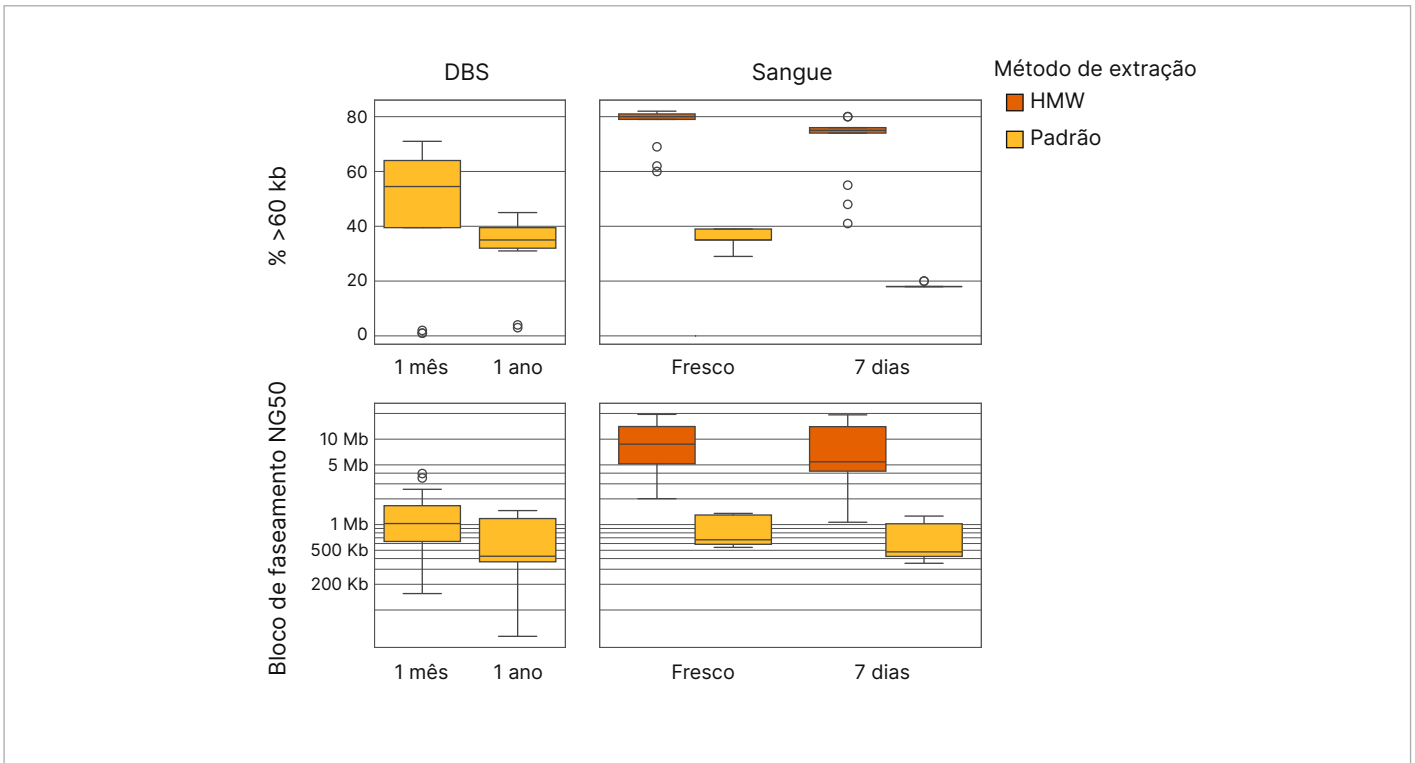


Figura 6: Impacto do armazenamento de amostras de sangue na qualidade do DNA e no bloco de faseamento NG50

As amostras de sangue foram armazenadas a 4 °C por <3 dias (frescas) ou 7 dias. As amostras de DBS foram armazenadas em temperatura ambiente por <30 dias ou ~1 ano. O DNA foi extraído do sangue usando métodos HMW e padrão. O DNA foi extraído de amostras de DBS usando métodos padrão. Impacto da idade da amostra principal na qualidade do DNA (porcentagem >60 kb) e no bloco de faseamento NG50. Percentual >60 kb é medido usando DNA genômico no ensaio ScreenTape no Agilent 4200 TapeStation. Em ambos os tipos de amostra, a porcentagem de fragmentos superiores a 60 kb e o tamanho do bloco de faseamento NG50 são menores para as amostras que foram armazenadas por mais tempo antes da extração.

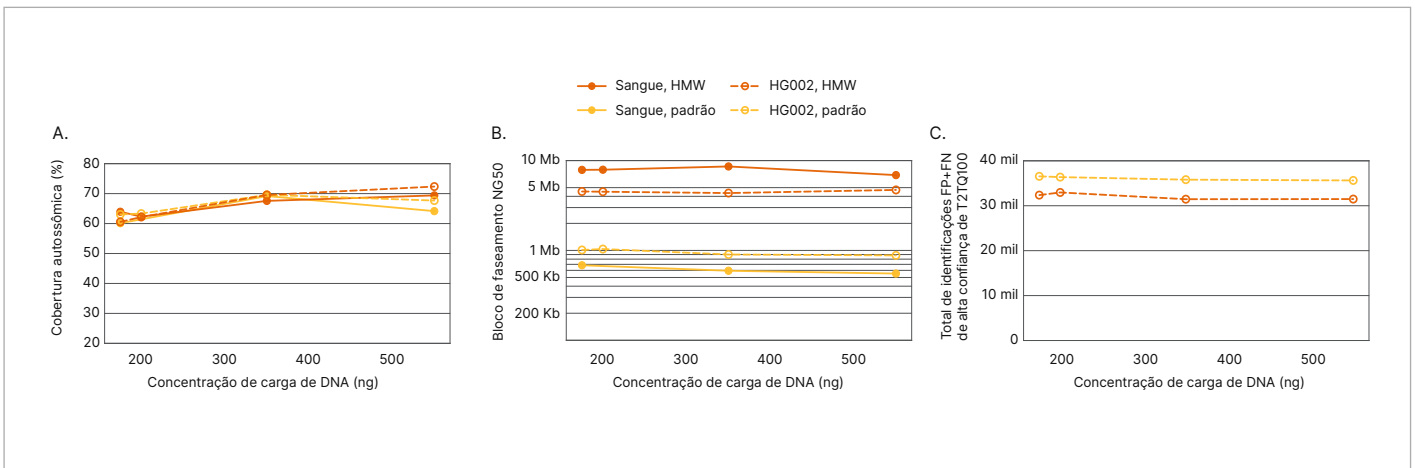


Figura 7: O TruPath Genome tem bom desempenho com diversas quantidades de entrada

Os resultados de sequenciamento do TruPath Genome preparados usando entradas de 175, 200, 350 e 550 ng geram qualidade dos dados semelhante para métricas padrão de genoma completo e de proximidade do TruPath Genome; incluindo (A) cobertura autossômica, (B) bloco de faseamento NG50 e (C) desempenho de identificação de variantes pequenas (total de identificações FP+FN). O DNA foi extraído do sangue e das células usando métodos HMW e padrão. O desempenho de identificação de variantes pequenas (SNP + Indel) foi comparado com o conjunto verdade T2T-Q100 V1.1 V0.019.

Resumo

O TruPath Genome usa tecnologia de leitura mapeada por proximidade para fornecer uma solução abrangente de sequenciamento de genoma completo com uma simplicidade sem precedentes. O fluxo de trabalho exclusivo aplica os benefícios dos métodos de sequenciamento de leitura curta combinados com informações de proximidade na lâmina de fluxo para desbloquear insights de longo alcance. Esta nota técnica demonstra o desempenho robusto e de alta qualidade obtido com o TruPath Genome com base em amostras de vários tipos, quantidade, qualidade e condições de armazenamento.

Referências

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. Publicado em 2022. Acessado em 8 de dezembro de 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. Publicado em 2022. Acessado em 8 de dezembro de 2025.
3. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit-v14.html. Acessado em 8 de dezembro de 2025.
4. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf. Publicado em 2018. Acessado em 8 de dezembro de 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. Publicado em fevereiro de 2026. Acessado em 24 de fevereiro de 2026.



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03932 PTB v1.0