

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human

Leituras longas flexíveis,
econômicas e precisas em seu
sistema de sequenciamento
Illumina

- Leituras longas direcionadas, juntamente com leituras curtas para insights complementares e aprimorados do genoma humano
- Preparação de biblioteca robusta e expansível com resultados confiáveis de baixa entrada de DNA
- Fluxo de trabalho de preparação de biblioteca de dois dias compatível com automação sem a necessidade de equipamento especializado

illumina[®]

Introdução

A comprovada química de sequenciamento por síntese (SBS) da Illumina combinada com a premiada análise secundária do DRAGEN™ fornece dados de sequenciamento de genoma completo (WGS) com precisão excepcional.^{1,2} Ainda assim, pequenas porções do genoma, incluindo regiões altamente homólogas ou repetitivas, são difíceis de mapear com leituras curtas isoladamente. Nesses casos, o sequenciamento de leitura longa pode complementar os dados WGS de leitura curta padrão. Usar leituras curtas e longas de alta precisão juntas pode ajudar a fornecer resolução e mapeamento aprimorados de regiões historicamente desafiadoras.

No passado, o sequenciamento de leitura longa era incompatível com muitos tipos de amostras devido à qualidade rigorosa do DNA e aos altos requisitos de entrada.³⁻⁶ A tecnologia Illumina Complete Long Reads agora torna o sequenciamento de leitura longa acessível para laboratórios de genômica, permitindo leituras curtas e leituras longas complementares no mesmo sistema com um único pipeline de análise. Esse ensaio de alto desempenho usa um fluxo de trabalho padrão de sequenciamento de última geração (NGS) da Illumina para gerar sequências de leitura longa contíguas e requer apenas 10 ng de entrada de DNA sem extrações especializadas, cisalhamento ou seleção de tamanho (Figura 1).

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human cria uma solução econômica e flexível para sequenciamento direcionado de leitura longa. A preparação eficiente de biblioteca de dois dias com enriquecimento é fácil de automatizar e escalar para estudos de alto rendimento.

Leituras longas direcionadas podem ser usadas para abordar regiões conhecidas por terem baixa mapeabilidade com sequenciamento de leitura curta padrão. Como alternativa, leituras longas direcionadas podem ser aplicadas em genes ou regiões inteiras para permitir o sequenciamento em fases de até centenas de quilobases para resolver haplótipos. Use o Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human para aumentar os conjuntos de dados WGS existentes como uma ferramenta reflexa para detecção mais ampla de variantes.

Leituras longas direcionadas e de alta qualidade da sua plataforma NovaSeq™

O Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human é validado com os sistemas de sequenciamento NovaSeq X Plus, NovaSeq X, NovaSeq 6000 e NovaSeq 6000Dx (modo RUO). O ensaio flexível fornece resultados consistentes em amostras de qualidade variável, exigindo 90% menos entrada de DNA do que outras soluções de sequenciamento de leitura longa. A Illumina recomenda 50 ng de DNA de entrada, mas resultados robustos são possíveis com apenas 10 ng. A tecnologia Illumina Complete Long Read é resistente a inibidores e contaminantes comuns e funciona bem com DNA de sangue, saliva ou tecido.^{7,8} Isso permite insights abrangentes de mais tipos de amostras do que com outras soluções de leitura longa.

O Illumina Complete Long Reads combina um ensaio de preparação de biblioteca proprietário, química comprovada do Illumina SBS e análise secundária DRAGEN poderosa para gerar dados de leitura longa altamente precisos (Figura 2).



Figura 1: Illumina Complete Long Reads with Enrichment workflow: acesse dados WGS de leitura longa direcionados e econômicos usando uma preparação de biblioteca escalável e otimizada com protocolo de enriquecimento, química comprovada de sequenciamento Illumina e análise secundária DRAGEN. Requer $\geq 30\times$ dados padrão de leitura curta de WGS da mesma amostra para análise. Os arquivos FASTQ da amostra de uma corrida anterior podem ser usados.

Fragmentos longos de DNA de molécula única são marcados com padrões exclusivos (ou “marcas de referência”), depois amplificados, enriquecidos e sequenciados. Adicionar uma etapa de enriquecimento de captura híbrida com painéis de sonda direcionados permite que o sequenciamento se concentre em regiões que se beneficiam mais de informações de leitura longa. As marcações permitem a diferenciação de regiões repetitivas ou difíceis de mapear para gerar leituras longas com um N50 de 5 a 7 kb.⁷ Os dados de leitura longa são combinados com uma biblioteca WGS padrão não marcada para produzir leituras longas e contíguas que são uma representação completa e precisa dos fragmentos originais de molécula única direcionados.

Leituras longas onde você precisa

Leituras longas direcionadas em camadas em dados WGS de leitura curta de alta precisão ajudam os pesquisadores a concentrar os dólares de sequenciamento na resolução de regiões desafiadoras conhecidas do genoma. Leituras longas direcionadas oferecem alta flexibilidade com a escolha de vários painéis pré-projetados ou painéis personalizados habilitados pelo software Illumina DesignStudio™, uma ferramenta de design de ensaio gratuita e fácil de usar (Tabela 1, Tabela 2). Escolha o painel de sonda de enriquecimento que melhor atenda às suas necessidades de pesquisa: para melhorar regiões de baixa cobertura ou regiões de fase do genoma.

Illumina Human Comprehensive Panel

O grande Illumina Human Comprehensive Panel aborda a pequena porção de regiões gênicas que se beneficiariam de leituras longas, visando pontos de baixa cobertura em > 6.500 genes codificadores de proteína.⁹ No desenvolvimento desse painel, a Illumina avaliou o conjunto completo de mais de 20.000 genes codificadores de proteína para segmentar regiões de baixa mapeabilidade. Os genes que são amplamente cobertos por leituras curtas isoladamente foram excluídos. O Human Comprehensive Panel oferece cobertura aprimorada e capacidades de identificação de variantes em todas as regiões-alvo (Figura 3A). Este painel é otimizado para uso com o Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human e disponível pré-fabricado ou como um painel pré-projetado que pode ser personalizado na ferramenta DesignStudio.

Painéis pré-projetados com o software DesignStudio

Por uma opção de menor custo e maior produtividade, os pesquisadores podem escolher painéis focados para enriquecimento de leitura longa (Tabela 1). Vários painéis pré-projetados estão disponíveis no software DesignStudio e podem ser personalizados (Tabela 2).

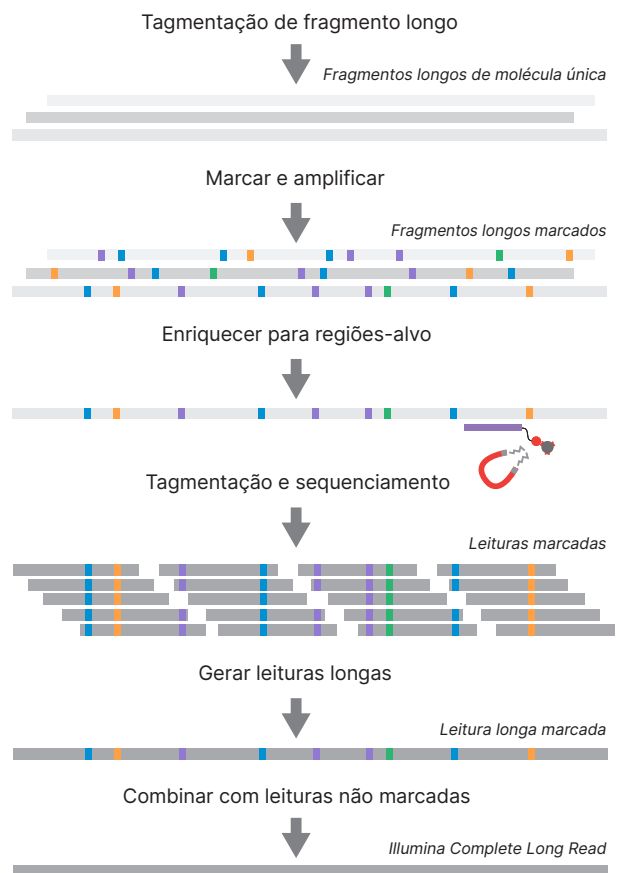


Figura 2: Como funciona o ensaio Illumina Complete Long Reads: o ensaio usa tagmentação para produzir fragmentos longos de DNA (> 10 kb), eliminando a necessidade de cisalhamento ou seleção de tamanho. Fragmentos longos são “marcados” na escala de molécula única para capturar e preservar informações de leitura longa dentro do fragmento (sem códigos de barras ou adaptadores complexos). Fragmentos longos marcados são enriquecidos para regiões-alvo usando um painel de sonda de captura híbrida. Em seguida, os fragmentos longos enriquecidos são marcados mais uma vez em uma biblioteca pronta para sequenciamento. A análise gera leituras longas e combina os dados com uma biblioteca WGS padrão não marcada (da mesma amostra, sequenciada separadamente) para produzir leituras longas completas da Illumina de alta precisão.

Tabela 1: Rendimento recomendado da amostra para gerar cobertura final de 30× para o Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human^{a,b,c}

	Illumina Human Comprehensive Panel	Painel grande	Painel médio	Painel pequeno		
Tamanho da região alvo ^d	> 95 Mb	~20 Mb	~10 Mb	~5 Mb		
Dados recomendados por amostra ^a	90–120 Gb	30–60 Gb	15–30 Gb	7,5–15 Gb		
Kits de reagentes de 300 ciclos	Nº de amostras por lâmina de fluxo ^a				Saída por lâmina de fluxo	Tempo de corrida
NovaSeq 6000 SP Reagents	2	8	16	32	~250 Gb	~25 h
NovaSeq 6000 S1 Reagents	4	16	32	66	~500 Gb	~25 h
NovaSeq 6000 S2 Reagents	10	40	82	166	~1,25 Tb	~36 h
NovaSeq 6000 S4 Reagents	24	100	200	400 ^f	~3 Tb	~44 h
NovaSeq X Series 1.5B Reagents	4	16	32	66	~500 Gb	~21 h
NovaSeq X Series 10B Reagents	24	100	200	400 ^f	~3 Tb	~25 h
NovaSeq X Series 25B Reagents	64	266	532 ^f	1066 ^f	~8 Tb	~48 h

a. Requer uma corrida de sequenciamento de 2 × 150 bp e leituras tipo paired-end de 5MA10M (~1,5A3 Gb de dados) por região alvo de Mb, gerando aproximadamente 30× a cobertura final do Illumina Complete Long Reads. Os requisitos de dados personalizados do painel por amostra são apenas um ponto de partida recomendado. Os usuários podem otimizar os dados alocados com base no desempenho do painel.

b. Requer ≥ 30× dados padrão de leitura curta do genoma completo humano da mesma amostra para análise. Recomenda-se o [Illumina DNA PCR-Free Prep](#). Kits WGS de terceiros também são compatíveis. A biblioteca não marcada não precisa ser preparada nem sequenciada em paralelo; podem ser usados arquivos FASTQ da amostra de uma corrida anterior.

c. O sequenciamento de bibliotecas do Illumina Complete Long Reads nas plataformas NovaSeq pode fazer com que a pontuação Q30 relatada de uma corrida fique abaixo da especificação NovaSeq. Isso não indica um problema de desempenho com a corrida do sequenciamento nem com a biblioteca.

d. O tamanho da região-alvo é a soma dos comprimentos de localização da sonda "padded", mesclados onde se sobrepõem.

e. Exemplos de números de rendimento de amostras calculados para leituras do tipo paired-end de 5M (dados de 1,5 Gb) por região alvo de Mb.

f. Estão disponíveis no máximo 384 índices duplos exclusivos. Para o NovaSeq X Series, o carregamento independente de cavidade permite a multiplexação de mais amostras. Use o fluxo de trabalho do NovaSeq 6000 Xp para carregamento de cavidade independente no sistema NovaSeq 6000.

Esses painéis têm como alvo genes desafiadores clinicamente relevantes (CMRG),¹⁰ genes comumente direcionados por ensaios de testes farmacogenéticos (PGx),^{11–13} genes na lista de achados secundários do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (ACMG SF v3.1),¹⁴ ou na região completa do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).¹⁵

Painéis personalizados

Os usuários podem aproveitar seus próprios conhecimentos para criar um painel exclusivo focado em um subconjunto de genes. A ferramenta DesignStudio é compatível com design de painel personalizado com um algoritmo ajustado para enriquecimento de fragmento longo. Painéis oligo de terceiros também são compatíveis com o Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human.

Fluxo de trabalho escalável e de alto rendimento

O fluxo de trabalho do Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human é fácil de automatizar, requer apenas equipamentos de laboratório padrão e é altamente escalável para suportar WGS abrangente para mais amostras ([Figura 1](#)). O protocolo simples de preparação da biblioteca leva aproximadamente 6,5 horas no primeiro dia (com ~3 horas de tempo de manuseio), seguido por uma reação de hibridização durante a noite e 5,5 horas no segundo dia (com ~3 horas de tempo de manuseio).

Use as lâminas de fluxo NovaSeq X Series 10B ou 25B para maior rendimento para cortes maiores e melhor custo para painéis maiores ([Tabela 1](#)). Com o NovaSeq X Plus System, os usuários podem gerar até 15.000 genomas de alta precisão por ano. Use materiais de consumo de menor rendimento, como a lâmina de fluxo NovaSeq X Series 1.5B para painéis pequenos e para reduzir os requisitos de lotes.

Tabela 2: Painéis de sonda de captura híbrida projetados para Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human

Painel	Genes ou regiões-alvo	Tamanho do painel
Illumina Human Comprehensive Panel ^a	Pontos de baixa cobertura em > 6.500 genes codificadores de proteína ⁹	> 95 Mb
Painel CMRG ^b	391 genes clinicamente relevantes conhecidos por serem difíceis de resolver com leituras curtas ¹⁰	22,5 Mb
Painel PGx ^b	98 genes comumente direcionados por ensaios de testes farmacogenéticos ¹¹⁻¹³	8,1 Mb
Painel ACMG ^b	78 genes exclusivos da lista de achados secundários do ACMG (ACMG SF v3.1) ¹⁴	7 Mb
Painel do MHC ^b	A região completa do MHC (> 140 genes) no conjunto GRCh38.p14 ¹⁵	4,9 Mb

a. Painel pré-fabricado e otimizado.

b. Painéis pré-projetados e personalizados disponíveis no software DesignStudio. CMRG, genes clinicamente relevantes desafiadores; PGx, farmacogenômica; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; MHC, complexo principal de histocompatibilidade.

Análise simplificada e abrangente

A análise de dados do Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human está disponível como um aplicativo BaseSpace™ Sequence Hub ou por meio do Illumina Connected Analytics. O pipeline único do DRAGEN analisa leituras curtas e longas para fornecer resultados abrangentes do WGS. Os resultados são mesclados em um único conjunto de arquivos de saída, incluindo chamadores direcionados ao DRAGEN.¹⁶

Acesse o WGS altamente preciso com dados de leitura longa enriquecidos

Os dados do Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human demonstram melhorias de cobertura e precisão em regiões desafiadoras direcionadas em comparação com WGS de leitura curta padrão isoladamente (Figura 3, Figura 4). Leituras do Illumina Complete Long Reads direcionadas também resolvem com sucesso haplótipos de genes completos e podem formar grandes blocos de fase de regiões altamente polimórficas, como o MHC (Figura 5).

Resumo

O Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human é uma solução flexível e econômica que complementa o comprovado Illumina WGS e se concentra em leituras longas, onde elas oferecem maior valor. O Illumina Complete Long Reads torna o WGS abrangente facilmente acessível para laboratórios de genômica, permitindo leituras longas e curtas no mesmo instrumento com um único pipeline de análise DRAGEN. O fluxo de trabalho simplificado e familiar oferece o ensaio de genoma completo mais escalável e preciso do mercado.

Saiba mais

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

[Human Comprehensive Panel](#)

[Tecnologia de sequenciamento de leitura longa](#)

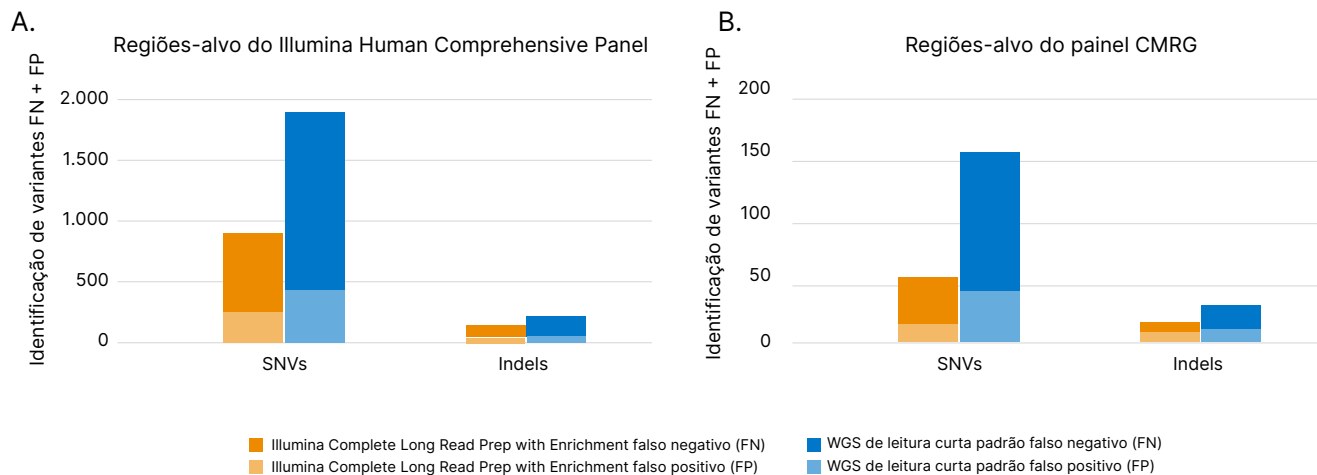


Figura 3: Leituras longas direcionadas para melhorar a precisão da identificação de variantes em regiões desafiadoras: a variante falso negativa (FN) mais falso positiva (FP) exige SNVs e indels em regiões gênicas HG002 direcionadas pelo (A) Illumina Human Comprehensive Panel ou (B) painel CMRG, usando o Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment (laranja) em comparação com WGS de leitura curta padrão (azul).

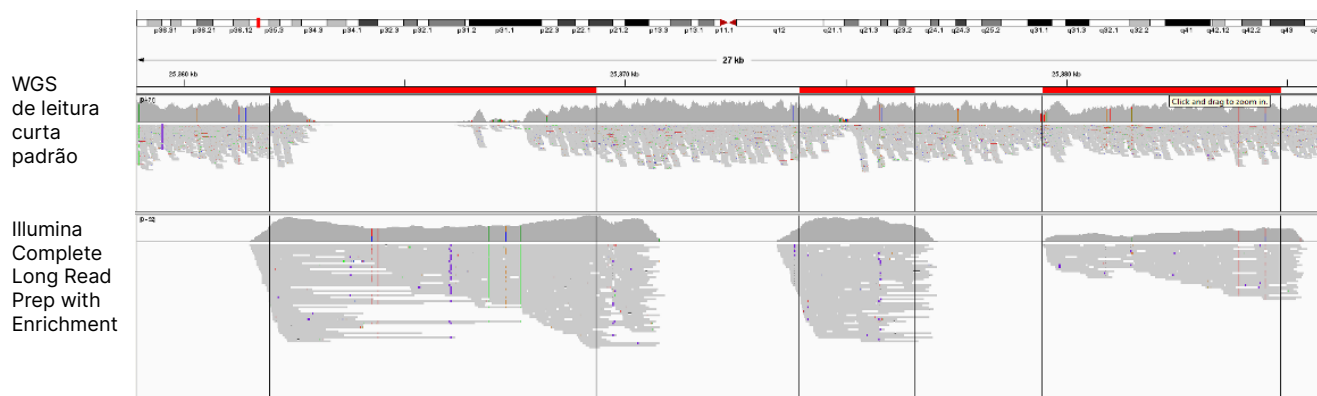
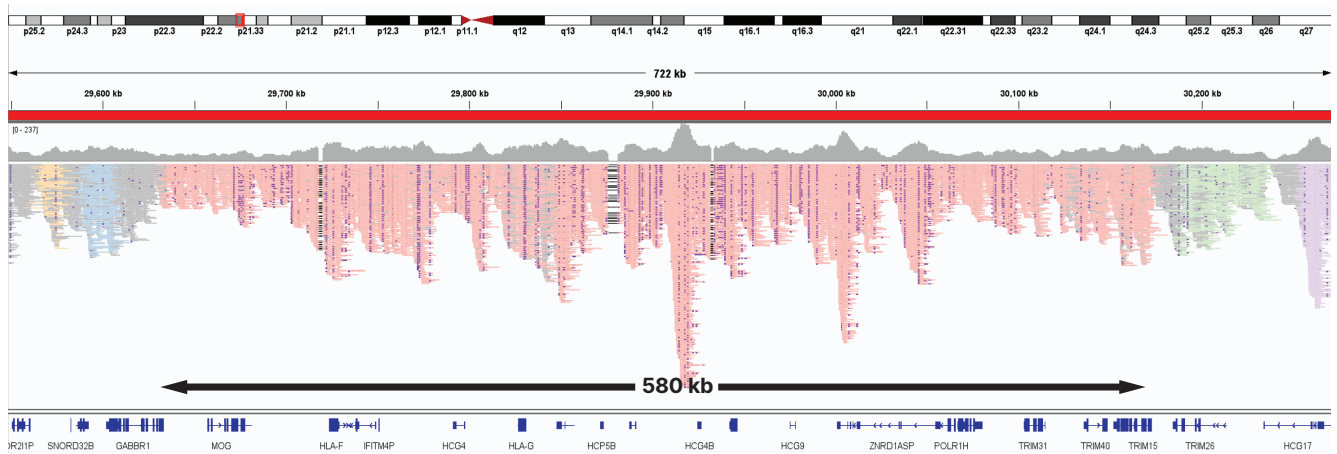


Figura 4: Obtenha uma cobertura econômica do genoma completo humano de regiões desafiadoras: o Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human ajuda a melhorar a cobertura em regiões gênicas desafiadoras, como as do gene *RHCE*, para complementar o WGS humano de leitura curta padrão. Gráfico Integrative Genomics Viewer (IGV) de *RHCE* sequenciado usando WGS de leitura curta padrão (superior) e Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment (parte inferior). Regiões-alvo observadas em vermelho.

A.



B.

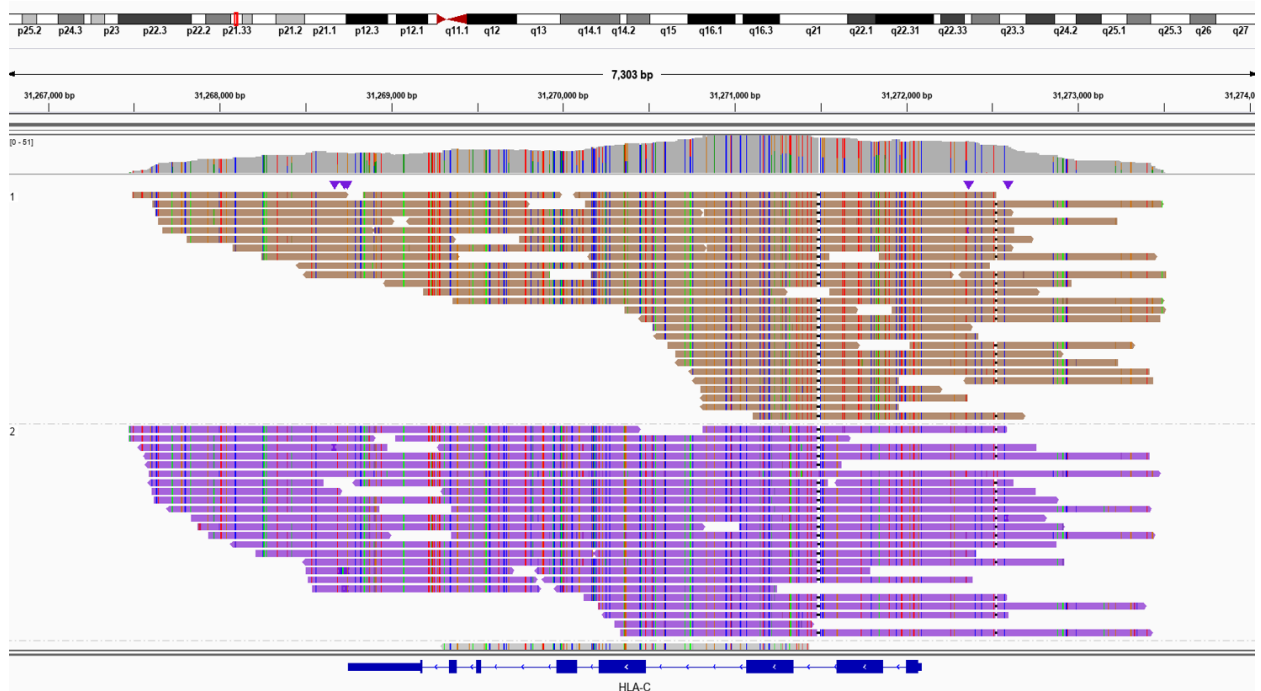


Figura 5: Leituras longas direcionadas ajudam a resolver haplótipos em genes polimórficos: gráficos do IGV de sequenciamento de leitura longa usando Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human. (A) Faseamento sobre uma região de 722 kb no loco de MHC. Uma região de 580 kb (rosa) é encapsulada em um bloco de fase. (B) O gene *HLA-C* está totalmente em fase. As leituras são separadas por haplótipo.

Referências

- 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](https://www.illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html). Publicado em 2020. Acessado em 12 de janeiro de 2023.
- 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](https://www.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). Publicado em 2022. Acessado em 1 de fevereiro de 2023.
- Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. [pacb.com/literature/technical-note-preparing-dna-for-pacbio-hifi-sequencing-extraction-and-quality-control/](https://www.pacb.com/literature/technical-note-preparing-dna-for-pacbio-hifi-sequencing-extraction-and-quality-control/). Publicado em 2022. Acessado em 12 de janeiro de 2023.
- 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](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genome-and-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf). Publicado em 2022. Acessado em 5 de outubro de 2023.
- Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. <https://store.nanoporetech.com/us/productDetail/?id=ligation-sequencing-kit-v14>. Acessado em 5 de outubro de 2023.
- Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. [pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf). Publicado em 2018. Acessado em 12 de janeiro de 2023.
- Illumina. Illumina Complete Long Read Prep, Human data sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-data-sheet-m-gl-01420/illumina-long-read-prep-data-sheet-m-gl-01420.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-data-sheet-m-gl-01420/illumina-long-read-prep-data-sheet-m-gl-01420.pdf). Publicado em 2022. Acessado em 22 de setembro de 2023.
- Illumina. Comprehensive whole-genome sequencing with Illumina Complete Long Read Prep, Human technical note. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-tech-note-m-gl-01421/ilmn-long-read-hu-tech-note-m-gl-01421.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-tech-note-m-gl-01421/ilmn-long-read-hu-tech-note-m-gl-01421.pdf). Publicado em 2022. Acessado em 22 de setembro de 2023.
- Bekritsky MA, Colombo C, Eberle MA. Identifying genomic regions with high quality single nucleotide variant calling. [illumina.com/science/genomics-research/articles/identifying-genomic-regions-with-high-quality-single-nucleotide-.html](https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/identifying-genomic-regions-with-high-quality-single-nucleotide-.html). Publicado em 2021. Acessado em 30 de agosto de 2023.
- Wagner J, Olson ND, Harris L, et al. Curated variation benchmarks for challenging medically relevant autosomal genes. *Nat Biotechnol.* 2022;40(5):672-680. doi:10.1038/s41587-021-01158-1
- PharmGKB. VIPs: Very Important Pharmacogenes. [pharmgkb.org/vips](https://www.pharmgkb.org/vips). Acessado em 22 de setembro de 2023.
- National Library of Medicine. GTR: Genetic Testing Registry. Precision HealthPGx Panel (25 Genes). [ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/). Atualizado em 29 de novembro de 2022. Acessado em 22 de setembro de 2023.
- Pratt VM, Everts RE, Aggarwal P, et al. Characterization of 137 Genomic DNA Reference Materials for 28 Pharmacogenetic Genes: A GeT-RM Collaborative Project. *J Mol Diagn.* 2016;18(1):109-123. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.08.005
- Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2022;24(7):1407-1414. doi:10.1016/j.gim.2022.04.006
- Kulski JK, Suzuki S, Shiina T. Human leukocyte antigen super-locus: nexus of genomic supergenes, SNPs, indels, transcripts, and haplotypes. *Hum Genome Var.* 2022;9(1):49. doi:10.1038/s41439-022-00226-5
- Roessler K. Illumina Complete Long Reads software analysis workflow for human WGS. [illumina.com/science/genomics-research/articles/complete-long-read-software-analysis.html](https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/complete-long-read-software-analysis.html). Publicado em 2023. Acessado em 22 de setembro de 2023.

Informações para pedido

Produto	Nº do catálogo
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human (24 samples)	20113832
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human (96 samples)	20113833
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Comprehensive Panel (24 samples)	20113834
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Comprehensive Panel (96 samples)	20113835
Illumina Human Comprehensive Panel (24 samples)	20113836
Illumina Human Comprehensive Panel (96 samples)	20113837
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (32 µl, 120 bp)	20073953
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (384 µl, 120 bp)	20073952
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (1536 µl, 120 bp)	20111339

Informações para pedido

Produto	Nº do catálogo
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
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 Analytics - 1 iCredit	20042038



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

© 2024 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-02188 PTB v1.0