

illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human

Lecturas largas flexibles, rentables y precisas en su sistema de secuenciación de Illumina

- Lecturas largas selectivas junto con lecturas cortas para obtener información complementaria y mejorada del genoma humano.
- Preparación de librerías flexible y sólida con resultados fiables a partir de una entrada reducida de ADN.
- Flujo de trabajo de preparación de librerías de dos días compatible con automatización sin necesidad de equipos especializados.

illumina[®]

Introducción

Los procesos químicos demostrados de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis) de Illumina, en combinación con el ampliamente reconocido análisis secundario DRAGEN™, proporciona datos de secuenciación del genoma completo (WGS, whole-genome sequencing) con una precisión excepcional.^{1,2} Sin embargo, es difícil asignar pequeñas partes del genoma, incluidas regiones altamente homólogas o repetitivas, solo con lecturas cortas. En estos casos, la secuenciación de lectura larga puede complementar los datos estándar de lectura corta de WGS. El uso de lecturas cortas y largas de alta precisión puede ayudar a ofrecer una resolución y asignación mejoradas de regiones históricamente difíciles.

En el pasado, la secuenciación de lectura larga era incompatible con muchos tipos de muestras debido a la estricta calidad del ADN y a los altos requisitos de entrada.³⁻⁶ En la actualidad, la tecnología Illumina Complete Long Reads hace que la secuenciación de lectura larga sea accesible para los laboratorios de genómica al permitir tanto lecturas cortas como lecturas largas complementarias en el mismo sistema con un único proceso de análisis. Este ensayo de alto rendimiento utiliza un flujo de trabajo de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) estándar de Illumina para generar secuencias de lectura larga contiguas y requiere una entrada de tan solo 10 ng de ADN sin extracciones especializadas, fragmentación ni selección de tamaño (figura 1).

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human crea una solución rentable y flexible para la secuenciación de lectura larga selectiva. La eficiente preparación de librerías en dos días con enriquecimiento es fácil de automatizar y de escalar para estudios de alta productividad.

Las lecturas largas selectivas se pueden utilizar para abordar regiones que se sabe que son difíciles de asignar mediante la secuenciación de lectura corta estándar. Como alternativa, se pueden aplicar lecturas largas selectivas en genes o regiones completas para permitir la secuenciación por fase de hebra retrasada de hasta cientos de kilobases para resolver haplotipos. Utilice Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human para aumentar los conjuntos de datos de WGS existentes como una herramienta alternativa para una detección de variantes más amplia.

Lecturas largas selectivas y de alta calidad en su plataforma NovaSeq™

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human está validado con los sistemas de secuenciación NovaSeq X Plus, NovaSeq X, NovaSeq 6000 y NovaSeq 6000Dx (modo de uso exclusivo para investigación). El ensayo flexible ofrece resultados coherentes en muestras de calidad variable, al tiempo que requiere un 90 % menos de entrada de ADN que otras soluciones de lectura larga. Illumina recomienda una entrada de 50 ng de ADN, pero es posible obtener resultados sólidos con tan solo 10 ng. La tecnología de Illumina Complete Long Read es resistente a los inhibidores y contaminantes comunes, y funciona bien con ADN obtenido de sangre, saliva o tejido.^{7,8} Esto permite obtener información completa de más tipos de muestras que con otras soluciones de lectura larga.

Illumina Complete Long Read combina un ensayo de preparación de librerías exclusivo, los procesos químicos demostrados de SBS de Illumina y el potente análisis



Figura 1: Flujo de trabajo de Illumina Complete Long Reads with Enrichment. Acceda a datos de WGS de lectura larga selectivos y rentables mediante un protocolo de preparación de librerías flexible y optimizado, la química de secuenciación de Illumina probada y el análisis secundario DRAGEN. Requiere datos de WGS de lectura corta estándar con una cobertura de al menos 30× de la misma muestra para el análisis. Se pueden utilizar archivos FASTQ de una muestra procesada previamente.

secundario DRAGEN para generar datos de lectura larga de gran precisión (figura 2). Los fragmentos largos de ADN de molécula única se marcan con patrones exclusivos (o «marcas de referencia») y, a continuación, se amplifican, enriquecen y secuencian. La adición de un paso de enriquecimiento de captura híbrida con paneles de sondas selectivas permite que la secuenciación se centre en las regiones que se benefician más de la información de lectura larga. Las marcas de referencia permiten la diferenciación de regiones repetitivas o difíciles de asignar para generar lecturas largas con un N50 de 5-7 kb.⁷ Los datos de lectura larga se combinan con una librería de WGS estándar sin marcar para producir lecturas contiguas largas que son una representación completa y precisa de los fragmentos de molécula única originales objetivo.

Lecturas largas donde las necesita

Las lecturas largas selectivas en capas sobre los datos de WGS de lectura corta de alta precisión ayudan a los investigadores a centrar el dinero invertido en la secuenciación en la resolución de regiones difíciles del genoma. Las lecturas largas selectivas ofrecen una alta flexibilidad con la opción de múltiples paneles prediseñados o paneles personalizados habilitados por el software DesignStudio™ de Illumina, una herramienta de diseño de ensayos gratuita y fácil de usar (tabla 1, tabla 2). Elija el panel de sondas de enriquecimiento que mejor se adapte a sus necesidades de investigación: para mejorar regiones de baja cobertura o regiones de fase de hebra retrasada del genoma.

Illumina Human Comprehensive Panel

El extenso panel Illumina Human Comprehensive Panel aborda la pequeña parte de regiones génicas que se beneficiarían de lecturas largas, selectivas de puntos de baja cobertura en >6500 genes codificantes de proteínas.⁹ Para el desarrollo de este panel, Illumina evaluó el conjunto completo de más de 20 000 genes codificantes de proteínas para actuar sobre regiones difíciles de asignar. Se excluyeron los genes que están cubiertos exhaustivamente solo por lecturas cortas. Illumina Human Comprehensive Panel ofrece una cobertura mejorada y capacidades de llamada de variantes en todas las regiones objetivo (figura 3A). Este panel está optimizado para su uso con Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human y disponible prefabricado o como panel prediseñado que se puede personalizar en la herramienta DesignStudio.

Paneles prediseñados con el software DesignStudio

Para una opción de menor coste y mayor productividad, los investigadores pueden elegir paneles específicos para el enriquecimiento de lectura larga (tabla 1).

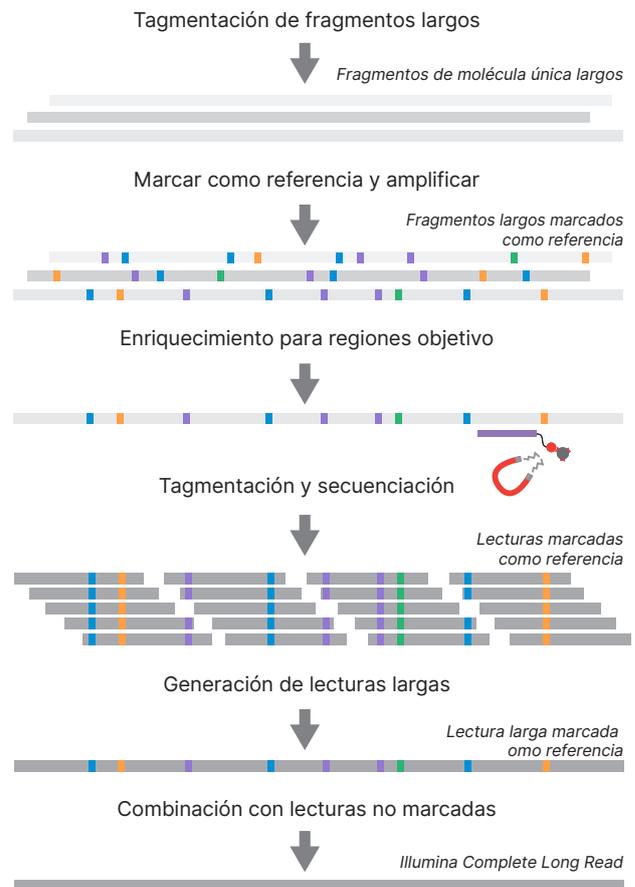


Figura 2: Funcionamiento del ensayo Illumina Complete Long Reads. El ensayo usa tagmentación para crear fragmentos de ADN largos (>10 kb), eliminando la necesidad de fragmentación o de selección de tamaño. Los fragmentos largos se «marcan como referencia» a escala de molécula única para capturar y conservar la información de lectura larga dentro del fragmento (sin códigos de barras ni adaptadores complejos). Los fragmentos largos con marcas de referencia se enriquecen para regiones objetivo mediante un panel de sonda de captura híbrida. A continuación, los fragmentos largos enriquecidos se etiquetan una vez más en una librería lista para la secuenciación. El análisis genera lecturas largas y combina los datos con una librería de WGS estándar no marcada (de la misma muestra, secuenciada por separado) para producir Illumina Complete Long Reads.

Tabla 1: Productividad de muestras recomendada para generar una cobertura final de 30× para Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human^{a,b,c}

	Illumina Human Comprehensive Panel	Panel de gran tamaño	Panel de tamaño mediano	Panel de tamaño pequeño		
Tamaño de la región objetivo ^d	>95 Mb	~20 Mb	~10 Mb	~5 Mb		
Datos recomendados por muestra ^a	De 90 A 120 Gb	De 30 A 60 Gb	De 15 A 30 Gb	De 7,5 A 15 Gb		
Kits de reactivos de 300 ciclos	N.º de muestras por celda de flujo ^e				Rendimiento por celda de flujo	Duración del experimento
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. Requiere un experimento de secuenciación de 2 × 150 pb y de 5 A 10 M de lecturas «paired-end» (~1,5–3 Gb de datos) por Mb de región objetivo, lo que genera una cobertura final de aproximadamente 30× de Illumina Complete Long Reads. Los requisitos de datos de paneles personalizados por muestra son solo un punto de partida recomendado. Los usuarios pueden optimizar los datos asignados en función del rendimiento del panel.

b. Requiere datos de genoma completo humano de lectura corta estándar con una cobertura de 30× de la misma muestra para el análisis. Se recomienda [Illumina DNA PCR-Free Prep](#). Los kits de WGS de terceros también son compatibles. No es necesario preparar o secuenciar en paralelo una librería no marcada; se pueden usar archivos FASTQ de una muestra analizada previamente.

c. La secuenciación de librerías de Illumina Complete Long Reads en plataformas NovaSeq puede hacer que la puntuación Q30 notificada de un experimento caiga por debajo de la especificación de NovaSeq. Esto no indica un problema de rendimiento ni con el experimento de secuenciación ni con la librería.

d. El tamaño de la región objetivo es la suma de las longitudes de ubicación de la sonda completada, fusionadas donde se superponen.

e. Ejemplo de cifras de productividad de muestras calculadas para 5 millones de lecturas «paired-end» (datos de 1,5 Gb) por Mb de región objetivo.

f. Se dispone de un máximo de 384 índices dobles únicos. En el caso de NovaSeq X Series, la carga de carril independiente permite la multiplexación de más muestras. Utilice el flujo de trabajo de NovaSeq 6000 Xp para la carga independiente de carriles en NovaSeq 6000 System.

En el software DesignStudio hay diversos paneles prediseñados disponibles y también se pueden personalizar (tabla 2). Estos paneles son selectivos de genes complejos de relevancia médica (CMRG, challenging medically-relevant genes),¹⁰ que suelen ser el centro de interés de ensayos farmacogenéticos (PGx),^{11–13} genes en la lista de hallazgos secundarios del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics) (ACMG SF v3.1),¹⁴ o la región completa del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, major histocompatibility complex).¹⁵

Paneles personalizados

Los usuarios pueden aprovechar sus propios conocimientos para crear un panel único centrado en un subconjunto de genes. La herramienta DesignStudio permite el diseño de paneles personalizados con un algoritmo perfeccionado para el enriquecimiento de fragmentos largos. Los paneles de oligonucleótidos de terceros también son compatibles con Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human.

Flujo de trabajo flexible y de alta productividad

El flujo de trabajo de Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human es fácil de automatizar; tan solo requiere equipos de laboratorio estándar y su gran flexibilidad permite llevar a cabo procesos exhaustivos de WGS con más muestras (figura 1). El sencillo protocolo de preparación de librerías dura aproximadamente 6,5 horas el primer día (con aproximadamente 3 horas de tiempo de participación activa), seguido de una reacción de hibridación durante la noche, y 5,5 horas el segundo día (con aproximadamente 3 horas de tiempo de participación activa).

Utilice las celdas de flujo NovaSeq X Series 10B o 25B para obtener una mayor productividad para cohortes más grandes y un mejor coste para paneles más amplios (tabla 1). Gracias a NovaSeq X Plus System, los usuarios pueden generar hasta 15 000 genomas mejorados y de alta precisión al año.

Tabla 2: Paneles de sonda de captura híbrida diseñados para Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human

Panel	Genes o regiones objetivo	Tamaño del panel
Illumina Human Comprehensive Panel ^a	Puntos de baja cobertura en >6500 genes codificantes de proteínas ⁹	>95 Mb
Panel de CMRG ^b	391 genes médicamente relevantes que se sabe que son difíciles de resolver con lecturas cortas ¹⁰	22,5 Mb
Panel de PGx ^b	98 genes a los que suelen dirigirse los ensayos de pruebas farmacogenéticas ¹¹⁻¹³	8,1 Mb
Panel de ACMG ^b	78 genes únicos de la lista de hallazgos secundarios del ACMG (ACMG SF v3.1) ¹⁴	7 Mb
Panel de MHC ^b	La región completa del MHC (>140 genes) en el conjunto GRCh38.p14 ¹⁵	4,9 Mb

a. Panel prefabricado y optimizado.

b. Paneles prediseñados y personalizados disponibles en el software DesignStudio. CMRG, genes complejos de relevancia médica; PGx, farmacogenómica; ACMG, Colegio Americano de Genética Médica y Genómica; MHC, complejo principal de histocompatibilidad.

Utilice consumibles de menor productividad, como la celda de flujo NovaSeq X Series 1.5B, para paneles pequeños y para reducir los requisitos de preparación de lotes.

Análisis optimizado y exhaustivo

El análisis de datos de Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human está disponible como aplicación en BaseSpace™ Sequence Hub o a través de Illumina Connected Analytics. El proceso único de DRAGEN analiza lecturas cortas y largas para proporcionar resultados completos de WGS. Los resultados se combinan en un único conjunto de archivos de resultados, incluidos los llamadores selectivos de DRAGEN.¹⁶

Acceda a WGS de alta precisión con datos enriquecidos de lectura larga

Los datos de Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human demuestran mejoras de cobertura y precisión en las regiones complejas objetivo, en comparación con la WGS de lectura corta estándar por sí sola (figura 3, figura 4). El uso de Illumina Complete Long Reads selectivas también resuelve con éxito los haplotipos de genes completos y puede poner en fase de hebra retrasada amplios bloques de regiones altamente polimórficas, como el MHC (figura 5).

Resumen

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human es una solución flexible y rentable que complementa la WGS probada de Illumina y se centra en lecturas largas en las que proporcionan el mayor valor. Illumina Complete Long Read facilita el acceso de los laboratorios de genómica a la WGS completa al permitir tanto las lecturas largas como las cortas en el mismo instrumento, con un único proceso de análisis DRAGEN. El flujo de trabajo optimizado y familiar ofrece el ensayo del genoma completo más flexible y preciso del mercado.

Información adicional

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

[Human Comprehensive Panel](#)

[Tecnología de secuenciación de lectura larga](#)

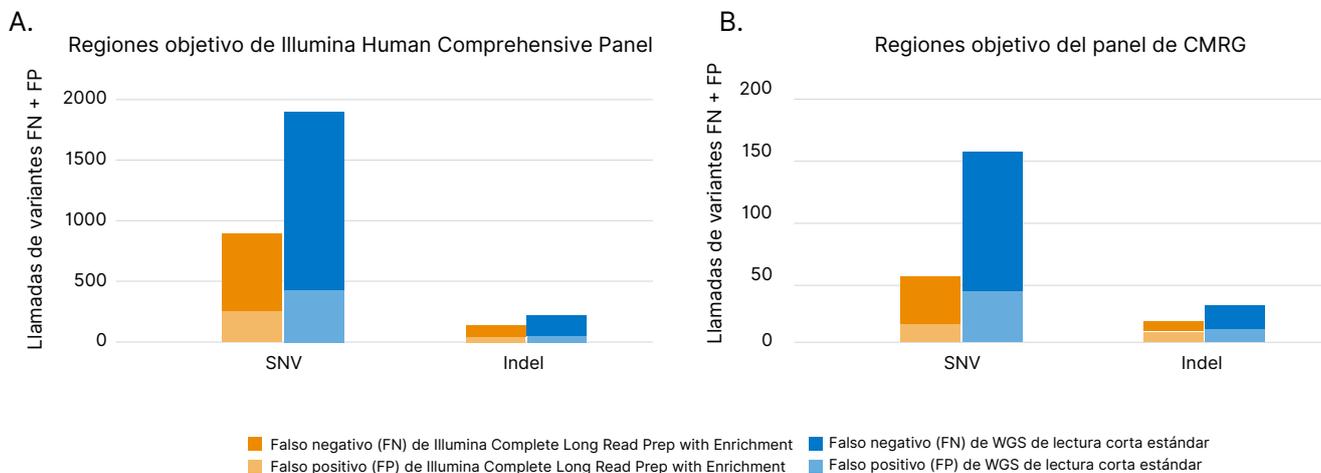


Figura 3: Lecturas largas selectivas para mejorar la precisión de la llamada de variantes en regiones complejas. Llamadas de variantes falsas negativas (FN) más falsas positivas (FP) para variantes de nucleótido único (SNV, single nucleotide variants) e inserciones/delecciones (indel) en regiones génicas HG002 a las que se dirigen (A) Illumina Human Comprehensive Panel o (B) el panel de CMRG, utilizando Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment (naranja) en comparación con la WGS de lectura corta estándar (azul).

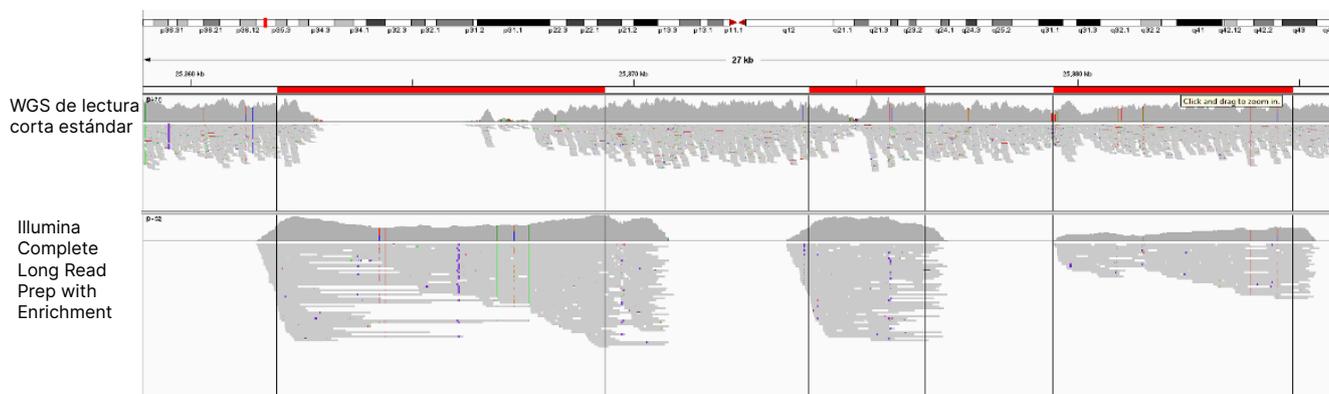
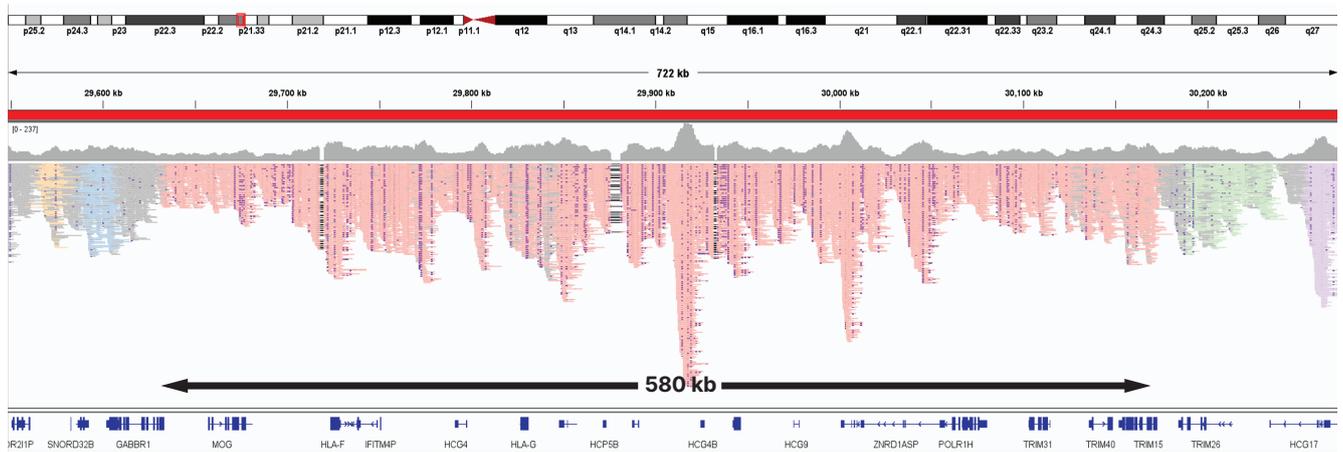


Figura 4: Consiga una cobertura rentable de regiones complejas del genoma completo humano. Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human ayuda a mejorar la cobertura en regiones génicas complejas, como las del gen *RHCE*, para complementar la WGS estándar de lectura corta en material de origen humano. (Arriba) Gráfico de *RHCE* secuenciado con WGS de lectura corta estándar de Integrative Genomics Viewer (IGV). (Abajo) Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment. Las regiones objetivo se indican en rojo.

A.



B.

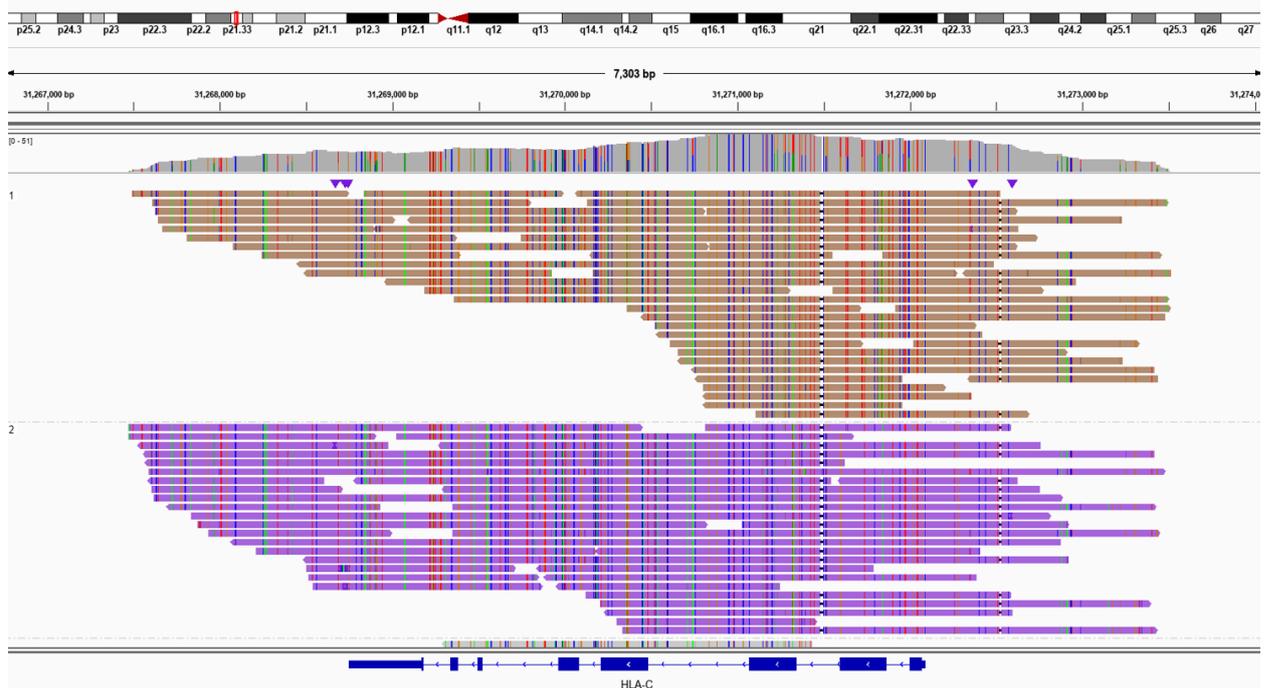


Figura 5: Las lecturas largas selectivas ayudan a resolver haplotipos en genes polimórficos. Gráficos de IGV de secuenciación de lectura larga utilizando Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human. (A) Fase de hebra retrasada sobre una región de 722 kb en el locus del MHC. Hay una región de 580 kb (rosa) encapsulada en un bloque de fase de hebra retrasada. (B) Fase de hebra retrasada completa en el gen *HLA-C*. Las lecturas están separadas por haplotipo.

Bibliografía

1. 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. Año de publicación: 2020. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
2. 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 1 de febrero de 2023.
3. 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/. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
4. 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 5 de octubre de 2023.
5. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. <https://store.nanoporetech.com/us/productDetail/?id=ligation-sequencing-kit-v14>. Fecha de consulta: 5 de octubre de 2023.
6. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf. Año de publicación: 2018. Fecha de consulta: 12 de enero de 2023.
7. 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2023.
8. 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. Año de publicación: 2022. Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2023.
9. 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. Año de publicación: 2021. Fecha de consulta: 30 de agosto de 2023.
10. 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
11. PharmGKB VIPs: Very Important Pharmacogenes. pharmgkb.org/vips. Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2023.
12. National Library of Medicine. GTR: Genetic Testing Registry. Precision HealthPGx Panel (25 Genes). ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/. Fecha de actualización: 29 de noviembre de 2022. Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2023.
13. 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
14. 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
15. 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
16. Roessler K. Illumina Complete Long Reads software analysis workflow for human WGS. illumina.com/science/genomics-research/articles/complete-long-read-software-analysis.html. Año de publicación: 2023. Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2023.

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de 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

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de 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 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-02188 ESP v1.0