

Massimizzazione delle prestazioni su MiSeq™ i100 Series

Fasi di ottimizzazione del caricamento delle librerie per garantire il successo della corsa

Ottimizzazione del caricamento delle librerie

Determinare la concentrazione di caricamento ottimale per le celle a flusso MiSeq i100 Series

Massimizzazione delle prestazioni

Migliorare la rappresentazione delle dimensioni delle inserzioni per massimizzare le prestazioni di sequenziamento

Supporto per la bassa diversità

Sequenziare le librerie a bassa diversità regolando la complessità delle librerie con PhiX

Introduzione

MiSeq i100 Series offre il sequenziamento da banco più semplice e più veloce. I progressi rivoluzionari compiuti nella progettazione dei sistemi, nella chimica XLEAP-SBS™ e nell'analisi integrata dei dati offrono migliore fruibilità, elevata accuratezza dei dati e velocità eccezionale: i risultati, infatti, vengono generati fino a quattro volte più velocemente rispetto a MiSeq System originale. Come parte di una soluzione NGS completa, MiSeq i100 Series fornisce i risultati in giornata per varie applicazioni, tra cui studi di trascrittomico, genomica microbica e sequenziamento genico mirato in aree chiave quali microbiologia, malattie infettive, oncologia e altro ancora.

Durante la transizione dei progetti a MiSeq i100 Series da un altro sistema di sequenziamento, l'ottimizzazione del caricamento delle librerie può contribuire a massimizzare la resa e la qualità dei dati. Questa nota tecnica fornisce raccomandazioni per ottimizzare i risultati su MiSeq i100 Series, fra cui linee guida sulla concentrazione di carico della libreria, sulla qualità della libreria e considerazioni sulla diversità nucleotidica.

Caricamento ottimale delle librerie

La concentrazione di caricamento si riferisce alla concentrazione finale di una libreria caricata su uno strumento per il sequenziamento. Dopo la preparazione, le librerie vengono diluite alla concentrazione di caricamento appropriata per il tipo di libreria, il sistema di sequenziamento e il kit di reagenti.

Il caricamento delle librerie a una concentrazione troppo alta o troppo bassa può portare a una qualità e a una resa inferiori del sequenziamento e, probabilmente, a errori della corsa in condizioni estreme. Un carico insufficiente può comportare una bassa percentuale di presenza dei nanopozzetti (percentuale occupata) e letture duplicate più elevate, condizione che richiede quindi più letture per ottenere la copertura target. Al contrario, un carico eccessivo può comportare una bassa percentuale di cluster che attraversano il filtro (PF, passing filter). Per determinare le concentrazioni di caricamento ottimali su MiSeq i100 Series, le metriche relative alla percentuale occupata e alla percentuale PF possono essere tracciate in Sequencing Analysis Viewer per determinare se una corsa è stata caricata in modo insufficiente, ottimale o eccessivo. L'approccio adottato nell'esperimento campione seguente può essere utilizzato per titolare la concentrazione di caricamento per valutare le metriche primarie e secondarie.



Per saperne di più, leggere l'articolo [Optimizing library loading for Illumina NGS systems with patterned flow cells](#)

Determinazione della concentrazione di caricamento ottimale

È fondamentale testare un'ampia gamma di concentrazioni per individuare quella ottimale. Utilizzare metriche primarie come la percentuale PF e la percentuale occupata con metriche secondarie come duplicati, dimensione dell'inserzione e copertura per misurare le prestazioni a varie concentrazioni di caricamento e determinare così la resa utilizzabile per una determinata applicazione.

Fase 1: progettazione dell'esperimento di titolazione

Per la transizione dei progetti da MiSeq System originale a MiSeq i100 Series, centrare le titolazioni a circa 10,4 volte la concentrazione di caricamento di MiSeq Reagent Kit v2 e a circa 6,5 volte la concentrazione di caricamento di MiSeq Reagent Kit v3. Le concentrazioni raccomandate del punto medio variano per i diversi kit di preparazione delle librerie da utilizzare con MiSeq i100 Series ([Tabella 1](#)). Per tutti gli altri casi, si raccomanda di utilizzare 100 pM per la concentrazione del punto medio.

In questo esempio, un pool della libreria costituito da campioni di genoma batterico provenienti da *Bacillus pacificus*, *Cereibacter sphaeroides* ed *Escherichia coli* preparati utilizzando Illumina DNA Prep è stato testato a concentrazioni di caricamento di 40 pM, 80 pM e 120 pM.

Fase 2: valutazione della presenza nei nanopozzetti e dei cluster PF

Tracciare le metriche della percentuale PF rispetto a quella occupata dalla corsa di sequenziamento per ciascuna concentrazione di caricamento per determinare quali concentrazioni hanno comportato il caricamento insufficiente, eccessivo o bilanciato. In questo esempio: tutte e tre le concentrazioni testate (40 pM, 80 pM, 120 pM) mostrano una forma di caricamento ottimale (un insieme di punti con una pendenza positiva) nel grafico di percentuale PF rispetto a quella occupata, dimostrando che MiSeq i100 Series può ottenere risultati validi entro un ampio intervallo di concentrazione di caricamento delle librerie ([Figura 1](#)).

Fase 3: valutazione dei duplicati

Restringere l'intervallo di concentrazione target analizzando la percentuale di duplicati. I duplicati tendono a diminuire con l'aumento della concentrazione di caricamento. In questo esempio, mentre tutte e tre le concentrazioni analizzate hanno registrato duplicati inferiori al 15%, le concentrazioni pari a 80 pM e 120 pM hanno restituito la quantità minima di duplicati ([Figura 2](#)).

Fase 4: analisi della dimensione dell'inserzione

Revisionare le dimensioni delle inserzioni. L'intervallo ottimale per la libreria e l'applicazione può variare in base ai requisiti del flusso di lavoro. In questo esempio, le dimensioni delle inserzioni per tutti e tre i ceppi batterici variano nell'intervallo di concentrazione analizzato, con la differenza maggiore osservata tra 40 pM e 80 pM ([Figura 2](#)).

Tabella 1: concentrazioni del punto medio raccomandate per la progettazione della titolazione con MiSeq i100 Series

Kit per la preparazione delle librerie	Concentrazione del punto medio
Illumina DNA Prep	80 pM
Illumina DNA Prep with Enrichment	60 pM
Illumina RNA Prep with Enrichment	80 pM
Illumina DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA Nano	120 pM
Illumina Viral Surveillance Panel v2	80 pM
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B	80 pM
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel	80 pM
Urinary Pathogen ID/AMR Panel	80 pM
TruSight RNA Pan Cancer	80 pM
16S rRNA Amplicon	80 pM
Pillar oncoReveal Myeloid Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Essential MPN Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel	80 pM
Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA 2 plus CNV Panel	80 pM
PhiX Control v3	120 pM
PhiX Indexed Control (1000 cycles)	120 pM

a. Le librerie di DNA a doppio filamento sono state quantificate utilizzando il saggio fluorometrico Qubit dsDNA Quantitation High Sensitivity (Thermo Fisher, n. di catalogo. Q32851) e Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (agilent, n. di catalogo 5067-4626) per la stima della dimensione media del frammento. Le librerie di DNA a singolo filamento sono state quantificate utilizzando Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher, n. di catalogo Q10212).

b. Librerie di ampliconi 16S rRNA preparate utilizzando il flusso di lavoro descritto nel documento 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (codice 15044223 Rev. B).

Fase 5: revisione di altre metriche dipendenti dall'applicazione (copertura, mappatura, ecc.)

Revisionare ulteriori metriche di analisi secondaria per ottenere prestazioni ottimali dell'applicazione. In questo esempio, la metrica mappata in percentuale mostra risultati solidi per tutte e tre le concentrazioni di caricamento analizzate (Figura 2). Le metriche secondarie sono state generate con l'app DRAGEN™ Small Whole Genome Sequencing disponibile come soluzione integrata sullo strumento e sul cloud.

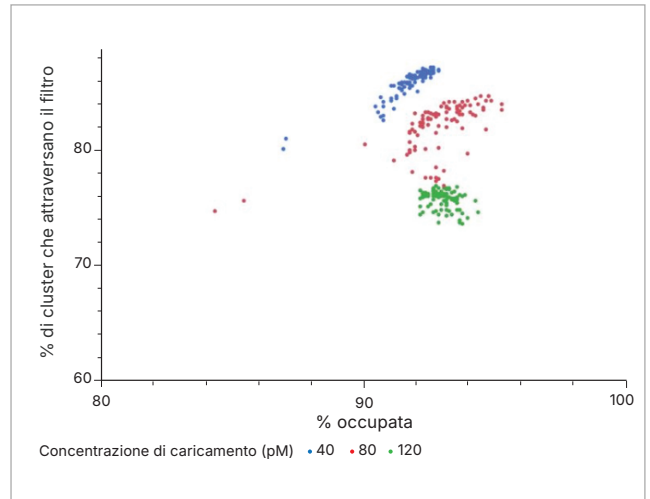


Figura 1: presenza ottimale nei nanopozzetti su un ampio intervallo di concentrazione di caricamento delle librerie

Il sequenziamento delle librerie caricate a 40 pM, 80 pM e 120 pM ha mostrato una forma di caricamento ottimale, dimostrando che MiSeq i100 Series è in grado di ottenere risultati affidabili in un'ampia gamma di concentrazioni di caricamento.

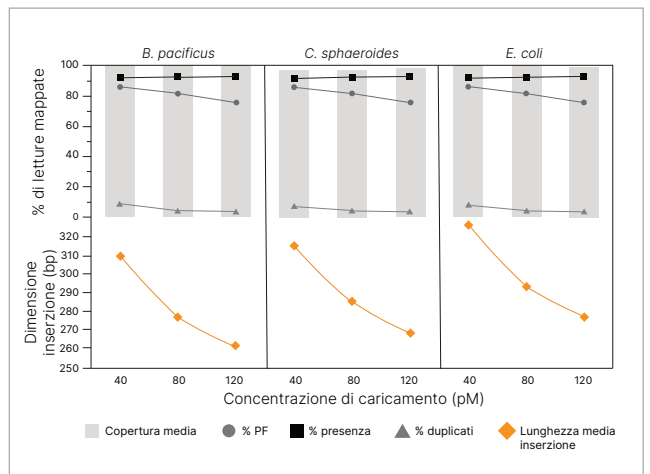


Figura 2: ottimizzazione delle prestazioni di sequenziamento su MiSeq i100 Series

Esempio di esperimento di titolazione che esamina duplicati, copertura media e dimensione dell'inserzione.

Qualità delle librerie

Le inserzioni corte e i contaminanti introdotti durante la preparazione delle librerie, inclusi i dimeri adattatori, i dimeri primer e i costrutti delle librerie parziali, possono influire negativamente sul clustering su MiSeq i100 Series. Le inserzioni corte si raggruppano in cluster in modo più efficiente rispetto alle inserzioni più lunghe. Se la lunghezza della lettura del sequenziamento è superiore alla dimensione dell'inserzione della libreria, il sequenziamento procederà attraverso l'inserzione nella sequenza dell'adattatore e potenzialmente nella cella a flusso. Quando il sequenziamento continua nella cella a flusso, la lettura esaurisce il template per l'incorporazione delle basi, causando un calo dell'intensità che su MiSeq i100 Series può causare uno dei seguenti effetti o entrambi: un netto calo dei punteggi Q30, un aumento delle identificazioni delle basi G (simile ad altri strumenti a due canali Illumina come NextSeq™ 1000 System e NextSeq 2000 System, NovaSeq™ 6000 System e NovaSeq X Series).

 Per maggiori informazioni, leggere l'articolo [How short inserts affect sequencing performance](#)

È fondamentale rimuovere queste inserzioni corte e contaminanti durante le fasi di pulizia o selezione delle dimensioni. Per prestazioni ottimali su MiSeq i100 Series a una lunghezza di lettura di 2×500 bp, la dimensione media dell'inserzione della libreria deve essere compresa tra 600 e 1.200 bp, mentre le inserzioni inferiori a 500 bp devono costituire meno dell'1% della massa totale della libreria. Se necessario, le inserzioni corte e i contaminanti possono essere rimossi in modo più efficace aggiungendo una fase di purificazione delle microsfere facoltativa al protocollo di preparazione delle librerie. Al termine della preparazione delle librerie e prima del sequenziamento, gli utenti devono verificare la qualità e la purezza di tutte le librerie. Utilizzare Agilent Bioanalyzer, Agilent Fragment Analyzer System o Agilent TapeStation per verificare l'integrità della libreria, la dimensione media dell'inserzione e i contaminanti.

Sono forniti due esempi di ulteriori procedure di purificazione delle microsfere utilizzate per migliorare le prestazioni di sequenziamento su MiSeq i100 Series. Nel primo esempio, le inserzioni corte di librerie arricchite con un'ampia distribuzione delle dimensioni delle inserzioni sono state rimosse selettivamente per eliminare l'identificazione eccessiva G e migliorare le prestazioni di sequenziamento. Nel secondo esempio, è stato dimostrato che la rimozione dei contaminanti del dimero adattatore nella libreria degli ampliconi a inserzione lunga migliora le prestazioni della corsa e i punteggi qualitativi per il sequenziamento 2×500 bp.

Miglioramento delle prestazioni di sequenziamento grazie alla rimozione delle inserzioni corte

In questo esempio, le librerie di campioni di acque reflue preparate con Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit sono state trattate con un ulteriore ciclo di purificazione delle microsfere utilizzando un rapporto tra microsfere e campione pari a 0,8 volte. Il ciclo aggiuntivo di purificazione delle microsfere ha rimosso efficacemente la maggior parte dei frammenti inferiori a 250 bp (corrispondenti alle inserzioni delle librerie minori di 100 bp senza adattatori), con una riduzione totale della resa delle librerie di circa il 35% (Figura 3).

Le librerie Viral Surveillance Panel v2, con e senza l'ulteriore ciclo di purificazione delle microsfere, sono state sequenziate su MiSeq i100 Series a una lunghezza di lettura pari a 2×150 bp e analizzate con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Il sequenziamento delle librerie preparate con l'ulteriore ciclo di purificazione delle microsfere, rispetto al protocollo non modificato, ha comportato una riduzione dell'identificazione eccessiva G e un miglioramento delle metriche secondarie, tra cui la lunghezza media delle letture e la percentuale di letture post-qualità e un aumento del rilevamento dei microrganismi (Figura 4).

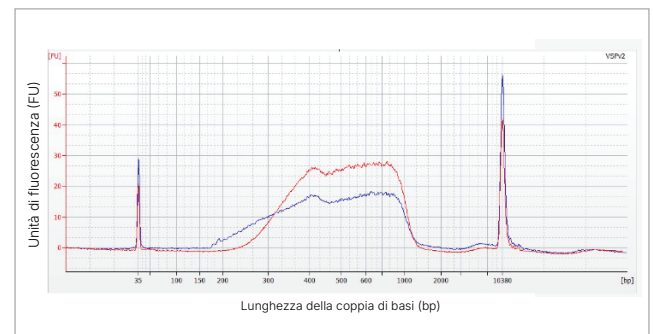


Figura 3: aumento delle dimensioni dell'inserzione con ulteriori purificazioni delle microsfere

Ulteriori cicli di purificazione delle microsfere (linea rossa) hanno rimosso efficacemente la maggior parte dei frammenti inferiori a 250 bp, rispetto al protocollo non modificato (linea blu).

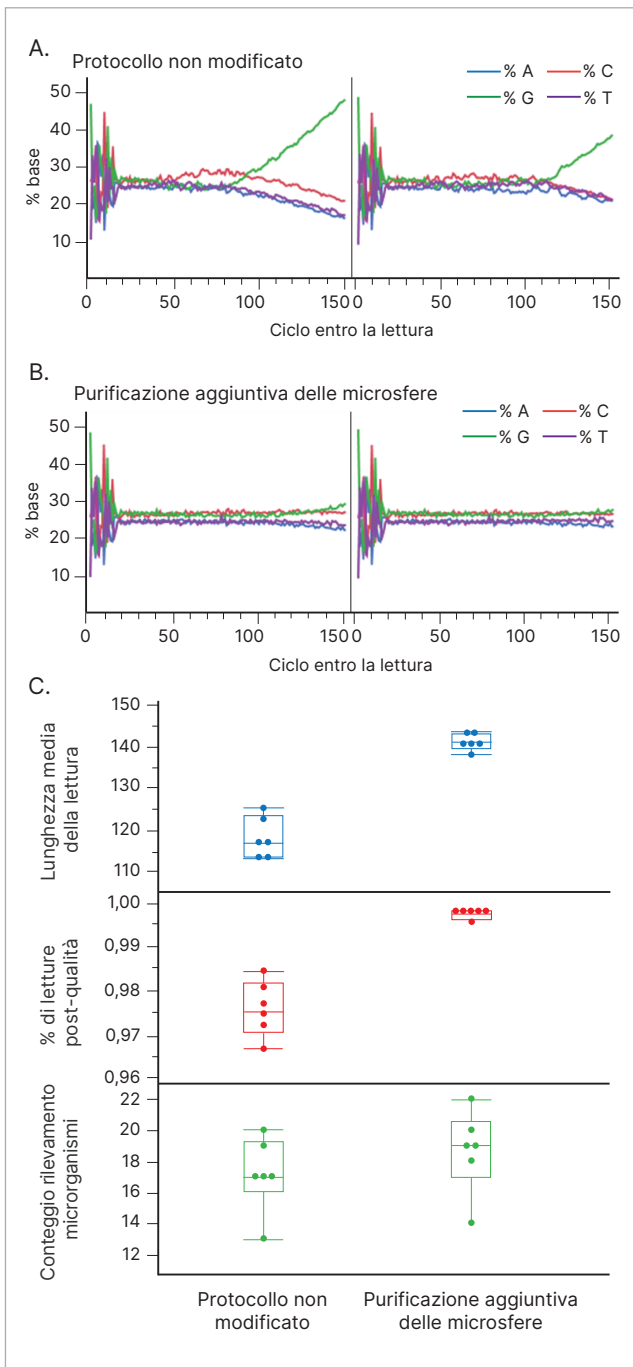


Figura 4: prestazioni migliorate con maggiori dimensioni delle inserzioni
 Il sequenziamento delle librerie generate in seguito a un protocollo (A) non modificato e (B) modificato (con dimensioni delle inserzioni aumentate) su MiSeq i100 Series ha ridotto l'identificazione eccessiva G; (C) l'analisi con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus ha mostrato prestazioni migliori, tra cui una maggiore lunghezza media di lettura (per letture da 2 × 300 e 2 × 500 bp), percentuale di letture post-qualità e rilevamento di microrganismi.

Ottimizzazione delle prestazioni di sequenziamento grazie alla rimozione dei contaminanti del dimero dell'adattatore

In questo esempio, le librerie di ampliconi personalizzate con una lunghezza dell'inserzione target di 950 bp sono state trattate con altri tre cicli successivi di purificazione delle microsferi utilizzando un rapporto tra microsferi e campione pari a 0,6 volte. Il controllo qualità su TapeStation mostra che i cicli aggiuntivi di purificazione delle microsferi hanno rimosso selettivamente la maggior parte dei contaminanti del dimero dell'adattatore a una lunghezza del frammento di circa 250 bp mantenendo la libreria target (Figura 5).

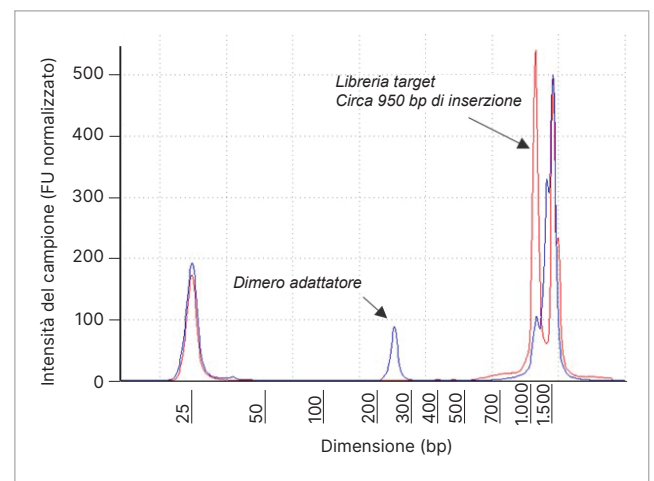


Figura 5: rimozione del dimero adattatore con ulteriori purificazioni delle microsferi

Ulteriori cicli di purificazione delle microsferi delle librerie di ampliconi personalizzate (linea rossa) hanno rimosso efficacemente i contaminanti di dimeri adattatore, rispetto al protocollo non modificato (linea blu).

Le librerie di ampliconi personalizzate, con e senza la purificazione aggiuntiva delle microsferi, sono state sequenziate su MiSeq i100 Series a una lunghezza di lettura pari a 2 × 500 bp. La corsa di sequenziamento con le librerie originali mostra problemi di prestazioni a partire dal ciclo 100 circa, attribuibili alla presenza dei dimeri adattatore, caratterizzati da bruschi cali di intensità del segnale, diminuzione dei punteggi Q30 e aumento dell'identificazione delle basi G. Il sequenziamento delle librerie con ulteriori purificazioni delle microsferi mostra prestazioni migliorate (Figura 6).

Diversità dei nucleotidi

La diversità dei nucleotidi indica la proporzione relativa di ciascuna base (A, C, G o T) presente in ogni ciclo della corsa. L'equilibrio dei nucleotidi è importante per la correzione della matrice di colore e la normalizzazione dell'intensità da parte del sistema di sequenziamento. Il software adattivo Real-Time Analysis integrato in MiSeq i100 Series è stato attentamente sviluppato per un'accurata identificazione delle basi delle librerie a bassa diversità. Le prestazioni ottimali del sequenziamento delle librerie a bassa diversità possono essere ottenute con una percentuale minima di PhiX aggiunto (di almeno il 5%) per massimizzare il numero di letture di alta qualità.

In questo esempio, le librerie di ampliconi 16S a bassa diversità con il 5% e il 20% di PhiX aggiunto sequenziate su MiSeq i100 Series mostrano solide prestazioni paragonabili alle prestazioni delle librerie Illumina DNA Prep umane ad alta diversità (Figura 7).

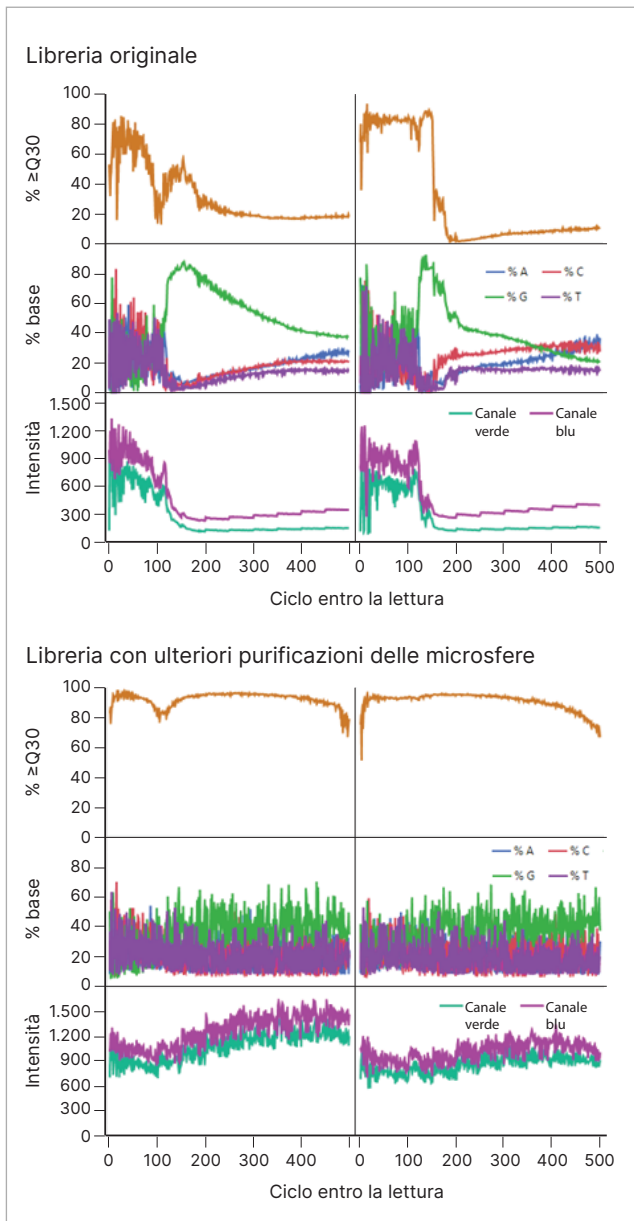


Figura 6: prestazioni di sequenziamento recuperate con riduzione del dimero adattatore

Il sequenziamento 2 × 500 bp di MiSeq i100 Series delle librerie di ampliconi personalizzate trattate con ulteriori purificazioni delle microsferi per ridurre i dimeri adattatori ha mostrato miglioramenti significativi delle prestazioni, con punteggi qualitativi aumentati e una riduzione dell'identificazione eccessiva G.

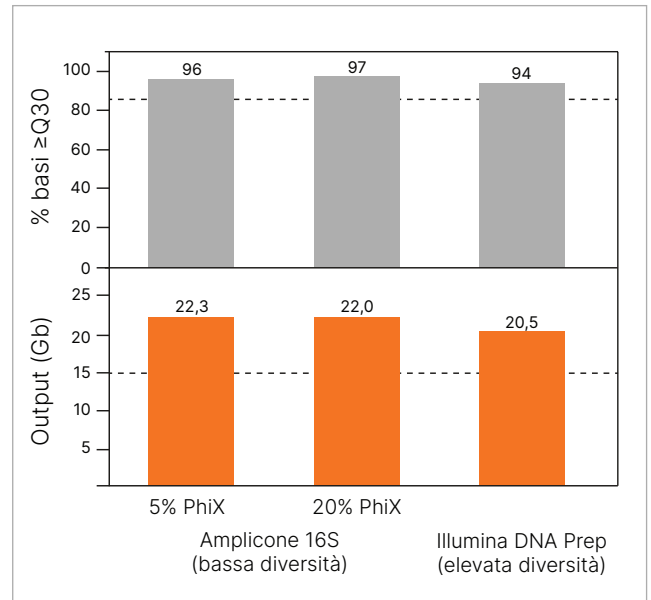


Figura 7: supporto per librerie a bassa diversità

Il software integrato in MiSeq i100 Series ottimizza le prestazioni di sequenziamento per le librerie a bassa diversità, come mostrato dalla percentuale di basi di almeno Q30 e output Gb. Tutte le corse sono state sequenziate a una lunghezza di lettura pari a 2 × 301 bp utilizzando MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles), con le linee tratteggiate che rappresentano le specifiche delle prestazioni.

Riepilogo

I progressi rivoluzionari compiuti nel campo della chimica del sequenziamento e dell'analisi dei dati integrata su MiSeq i100 Series offrono una maggiore fruibilità, un'elevata accuratezza dei dati e una velocità eccezionale. Rispettando le best practice descritte in questa nota tecnica per valutare la qualità delle librerie, ottimizzare la concentrazione di caricamento e raggruppare le librerie in pool è possibile massimizzare le prestazioni su MiSeq i100 Series.

Maggiori informazioni

[MiSeq i100 Sequencing System e MiSeq i100 Plus Sequencing System](#)



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-GI-03322 ITA v2.0