

Controllo qualità delle librerie con MiSeq™ i100 Series

Valutazione della qualità delle librerie e
ottimizzazione del loro raggruppamento
in pool prima del sequenziamento su
sistemi a elevata processività



Accelerazione del controllo qualità delle librerie con risultati in giornata grazie al sequenziamento rapido e flessibile



Semplificazione del ribilanciamento delle librerie guidato da calcoli integrati automatizzati



Maggior fiducia nei risultati generati su sistemi a elevata processività grazie alla stretta correlazione della rappresentazione degli indici

Introduzione

Per massimizzare l'efficienza del sequenziamento a elevata processività, è importante conoscere la qualità della libreria di partenza. Una libreria di scarsa qualità può minare il successo dei progetti di sequenziamento su larga scala e obbligare a ripetere gli esperimenti, il che porta a costi aggiuntivi e a perdite di tempo. I metodi tradizionali per il controllo qualità (QC, Quality Control) delle librerie, come la quantificazione/qualificazione mediante fluorimetria o qPCR, non sono saggi funzionali e non valutano se la libreria di interesse è stata preparata con gli indici corretti. MiSeq i100 Series consente di verificare in modo rapido e funzionale la qualità delle librerie prima dell'esecuzione di una corsa completa su NovaSeq™ 6000 System o NovaSeq X Series, con conseguenti risparmi di tempo e denaro e migliori risultati.

Grazie a un flusso di lavoro semplice e ottimizzato, MiSeq i100 Series genera velocemente metriche di qualità dettagliate. Queste metriche possono essere utilizzate per rilevare i dropout dei campioni, derivanti dalla mancata preparazione delle librerie o dall'errata assegnazione degli indici durante la pianificazione della corsa, e forniscono calcoli automatizzati per il ribilanciamento dei pool, così da garantire una rappresentazione equilibrata degli indici per i campioni.

Questa nota sull'applicazione dimostra che il flusso di lavoro di controllo qualità delle librerie su MiSeq i100 Series è rapido, semplice ed economico; inoltre, la rappresentazione delle librerie prima del sequenziamento su NovaSeq X Series o NovaSeq 6000 System è eccellente (Figura 1).

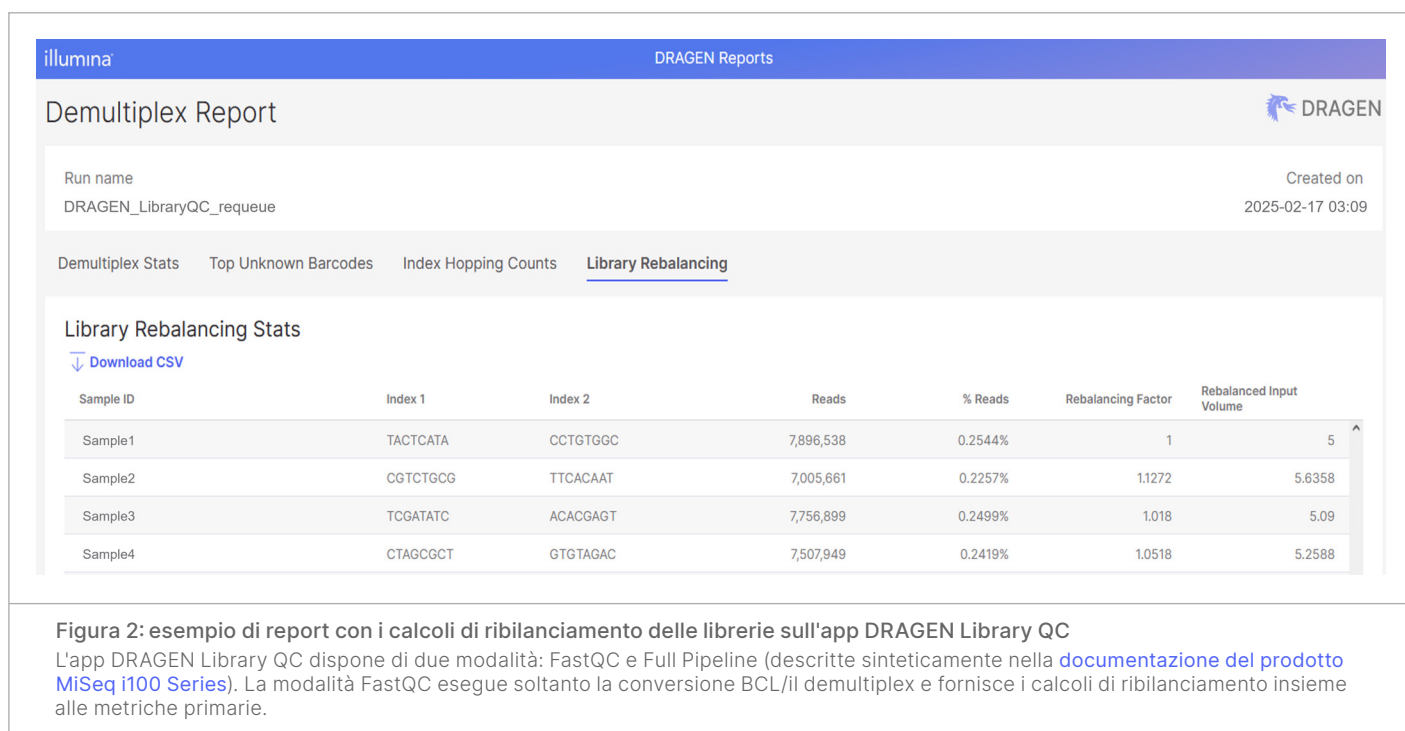
Ribilanciamento delle librerie con MiSeq i100 Series

MiSeq i100 Series può essere utilizzata come strumento di controllo qualità per il vaglio dei dropout e il ribilanciamento delle librerie, in modo da assicurare una rappresentazione più uniforme degli indici in un pool. MiSeq i100 Series include l'app DRAGEN Library QC v1.0.13, un software integrato che effettua il demultiplex delle letture di sequenziamento, esegue i calcoli e fornisce un report per guidare il ribilanciamento delle librerie prima del sequenziamento su un sistema a elevata processività, il tutto automaticamente (Figura 2). Combinando i calcoli di ribilanciamento automatizzati con il sequenziamento index-first, MiSeq i100 Series è in grado di fornire i dati delle librerie sottoposti a demultiplex in appena 3,2 ore circa.



Figura 1: flusso di lavoro di controllo qualità delle librerie

Grazie ai calcoli di ribilanciamento automatizzati eseguiti al termine del sequenziamento dall'app DRAGEN Library QC, integrata nello strumento o disponibile sul cloud, MiSeq i100 Series offre un flusso di lavoro semplice in grado di fornire in appena 3,2 ore circa le informazioni sottoposte a demultiplex relative alle librerie per il controllo qualità e il ribilanciamento delle stesse.



Metodi

Preparazione delle librerie

Le librerie sono state preparate su Biomek NGenius Next Generation Library Prep System (Beckman Coulter, n. di catalogo C62703) a partire da 300 ng di DNA genomico (gDNA, genomic DNA) di input NA12878 (Coriell Institute for Medical Research, n. di catalogo NA12878) utilizzando Illumina DNA PCR-Free Prep (Illumina, n. di catalogo 20041795) con Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (Illumina, n. di catalogo 20091654) e Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (Illumina, n. di catalogo 20091656). Le librerie sono state preparate anche manualmente a partire da 100 ng di gDNA di input utilizzando TruSeq™ DNA Nano (Illumina, n. di catalogo 20015965) con IDT for Illumina DNA UD Indexes v2 (96 indexes, 96 samples) (Illumina, n. di catalogo 20040870).

Sequenziamento e ribilanciamento

Le librerie preparate sono state raggruppate in pool con volumi uguali e sequenziate su MiSeq i100 Plus System con MiSeq i100 Series 5M Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20126566) e configurazione della corsa di 2 × 151 bp a 24 plex ([Tabella 1](#)). Per il confronto, le stesse librerie sono state sequenziate anche su iSeq™ 100 System con iSeq 100 i1 Reagent v2 Kit (300 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20031371).

I dati di sequenziamento sono stati analizzati su MiSeq i100 Plus System utilizzando l'app DRAGEN™ Library QC v1.0.13, che esegue automaticamente i calcoli per il ribilanciamento delle librerie. Dopo il ribilanciamento, i pool di librerie sono stati sequenziati su NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System con configurazione della corsa di 2 × 151 bp per esaminare il CV indice.

Risultati

Miglioramento del CV indice grazie al ribilanciamento delle librerie

Le librerie preparate con Illumina DNA PCR-Free Prep e TruSeq DNA Nano sono state sequenziate su MiSeq i100 Series. I fattori di ribilanciamento delle librerie sono stati ottenuti con l'app DRAGEN Library QC v1.0.13 integrata. Le librerie ribilanciate e non bilanciate sono state sequenziate su NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System. I risultati mostrano il miglioramento del CV indice dopo il ribilanciamento di tutti e tre i pool di librerie per entrambi i sistemi, NovaSeq X Plus System ([Figura 3A](#)) e NovaSeq 6000 System ([Figura 3B](#)).

Tabella 1: controllo qualità delle librerie su MiSeq i100 Series

Parametro	Illumina DNA PCR-Free Prep	Illumina DNA PCR-Free Prep	TruSeq DNA Nano
Automazione	Beckman Coulter Biomek NGenius	Beckman Coulter Biomek NGenius	Manuale
DNA genomico	Coriell Human NA12878	Coriell Human NA12878	Coriell Human NA12878
Input di DNA	300 ng	300 ng	100 ng
Adattatori	Illumina Set A UDI 1-24	Illumina Set B UDI 97-120	IDT per Illumina TruSeq UDI 1-24
Concentrazione di caricamento	120 pM	120 pM	120 pM
% presenza	91,59%	89,27%	91,43%
% di cluster che attraversano il filtro	80,42%	77,20%	85,02%

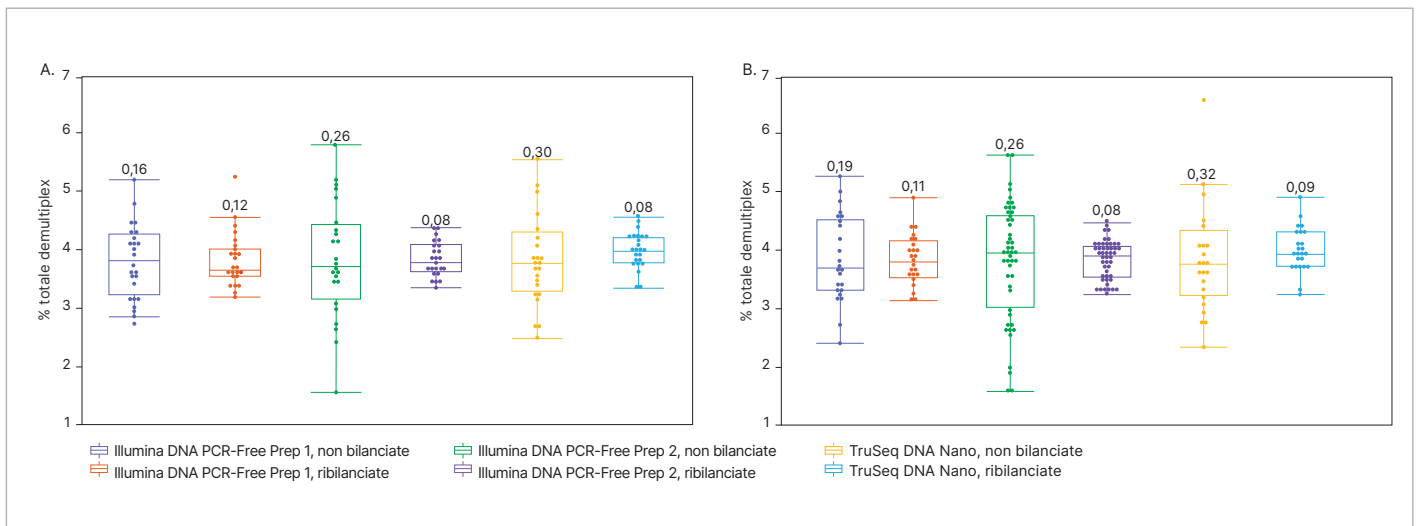


Figura 3: ribilanciamento delle librerie con MiSeq i100 Plus System

Sono stati sequenziati su MiSeq i100 Plus System tre pool di librerie umane a 24 plex: Illumina DNA PCR-Free Prep 1, Illumina DNA PCR-Free Prep 2 e TruSeq DNA Nano. I fattori di ribilanciamento delle librerie sono stati ottenuti con l'app DRAGEN Library QC v1.0.13 integrata. Le librerie ribilanciate e non bilanciate sono state poi sequenziate su NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System. Il miglioramento dell'indice CV (valore medio sopra ciascun grafico a scatola) si osserva dopo il ribilanciamento di tutti e tre i pool di librerie sia su (A) NovaSeq X Plus System sia su (B) NovaSeq 6000 System.

Correlazione della rappresentazione degli indici tra i sistemi

La correlazione al basale della rappresentazione degli indici è stata valutata per MiSeq i100 Plus System, iSeq 100 System, NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System. È stato preparato un pool di librerie Illumina DNA PCR-Free Prep a 384 plex a partire da gDNA Coriell Human NA11992 utilizzando il sistema automatizzato di gestione dei liquidi Hamilton STAR. Le librerie raggruppate in pool sono state sequenziate su MiSeq i100 Plus System, iSeq 100 System, NovaSeq X System e NovaSeq 6000 System.

Le informazioni sottoposte a demultiplex ottenute con MiSeq i100 Plus System mostrano un'elevata correlazione con le informazioni sottoposte a demultiplex ottenute con NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System, con R^2 maggiore di 0,9 (Figura 4A), e sono equivalenti alle informazioni sottoposte a demultiplex ottenute con iSeq 100 System (Figura 4B).

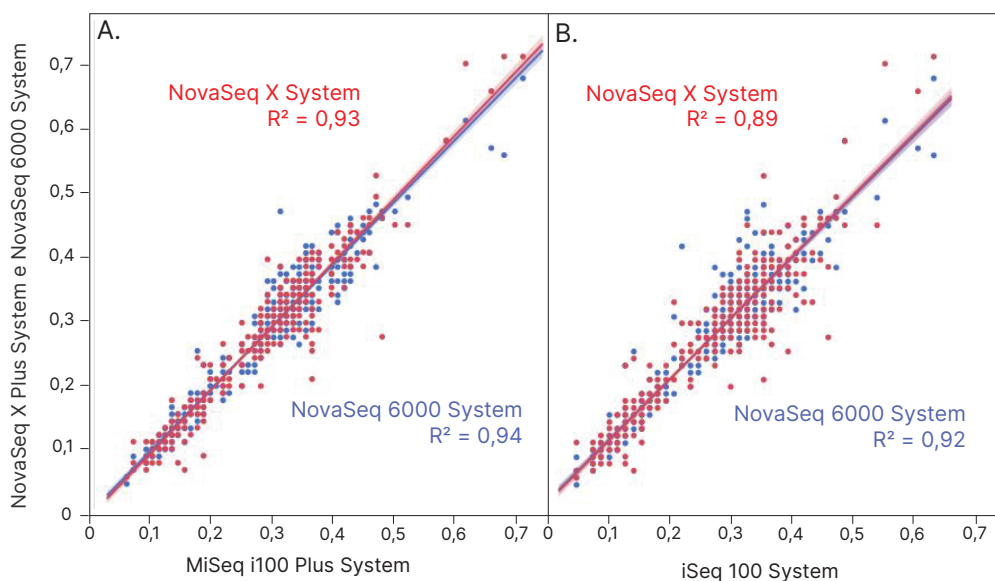


Figura 4: correlazione della rappresentazione degli indici

La rappresentazione degli indici su (A) MiSeq i100 Series mostra un'elevata correlazione con NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System, a livelli simili alla correlazione tra (B) iSeq 100 System e NovaSeq X Plus System e NovaSeq 6000 System.

Riepilogo

MiSeq i100 Series offre un flusso di lavoro per il controllo qualità delle librerie rapido, semplice ed economico, che fornisce le informazioni sottoposte a demultiplex in sole 3,2 ore. L'elevata correlazione della rappresentazione degli indici consente di prevedere tale rappresentazione su un sistema di sequenziamento a elevata processività per un determinato set di coppie di indici. Grazie a questa funzione di controllo qualità delle librerie, gli utenti possono contare sulle massime prestazioni su NovaSeq X Series e NovaSeq 6000 System.

Maggiori informazioni →

[MiSeq i100 Series](#)

[NovaSeq X Series](#)

[NovaSeq 6000 System](#)

illumina[®]

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-GL-02871 ITA v2.0