

Solución de resecuenciación selectiva AmpliSeq™ for Illumina

Una solución flexible y optimizada de secuenciación de amplicones para producir datos extremadamente fiables a partir de muestras de ADN y de ARN con poca cantidad de entrada.

Puntos destacados

- Datos precisos en diversos tipos de muestras**
 Los procesos químicos AmpliSeq y la tecnología de secuenciación de Illumina probadas se combinan para lograr una elevada calidad de los datos, aun cuando se parta de materiales de calidad deficiente, como tejidos FFPE.
- Completa cartera de contenidos**
 Cuenta con una amplia gama de contenidos comprobados y listos para usar, además de con opciones de diseños personalizados.
- Flujo de trabajo sencillo y rápido**
 Disfrute de una eficiencia mayor del laboratorio con un rápido flujo de trabajo de preparación de bibliotecas para el que hace falta un tiempo de participación activa inferior a una hora y media.
- Solución flexible**
 Tenga a su disposición varias opciones para las plataformas de secuenciación y el análisis de datos, y atienda prácticamente cualquier necesidad de rendimiento.

(Figura 1, Tabla 1). Los resultados obtenidos presentan la elevada cobertura uniforme y en objetivos que resulta necesaria para detectar variantes de baja frecuencia con coherencia y fiabilidad.

Gracias a los procesos químicos AmpliSeq de gran rendimiento, los investigadores pueden usar el ensayo AmpliSeq for Illumina para centrar sus estudios en genes, regiones o variantes de interés específicos con un elevado grado de precisión. Los usuarios pueden aprovechar un contenido seleccionado con un criterio experto, incluido en paneles de la comunidad o prediseñados listos para usar, u optar por personalizar su propio panel para atender necesidades específicas. El ensayo de preparación de bibliotecas basado en PCR se sirve de oligonucleótidos para amplificar regiones de interés con el fin de investigar variantes de nucleótido único (SNV), inserciones y deleciones, variaciones en el número de copias (CNV) y fusiones genéticas. Los procesos químicos de AmpliSeq pueden multiplexar de 12 a más de 24 000 amplicones, lo que permite la captura simultánea de varios objetivos en una sola reacción. AmpliSeq for Illumina funciona con muestras de ARN y ADN, para cuyo procesamiento solo hace falta 1 ng cuando estas son de gran calidad, y cuenta con la flexibilidad suficiente como para admitir muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE), como tejidos tumorales preservados.

Introducción

AmpliSeq for Illumina ofrece una resecuenciación selectiva rápida y precisa que permite a los investigadores pasar del ADN o el ARN a llamadas de variantes en dos días y medio. La solución, complementada con opciones de asistencia, incluye contenido de paneles cuidadosamente seleccionado, un ensayo de preparación de bibliotecas basado en PCR, la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) probada de Illumina y un análisis de datos sencillo

La solución AmpliSeq for Illumina está optimizada para su uso con la química de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina. Las librerías preparadas se pueden secuenciar en cualquier sistema de secuenciación de Illumina, incluidos los modelos iSeq™ 100, MiniSeq™, MiSeq™ y NextSeq™.

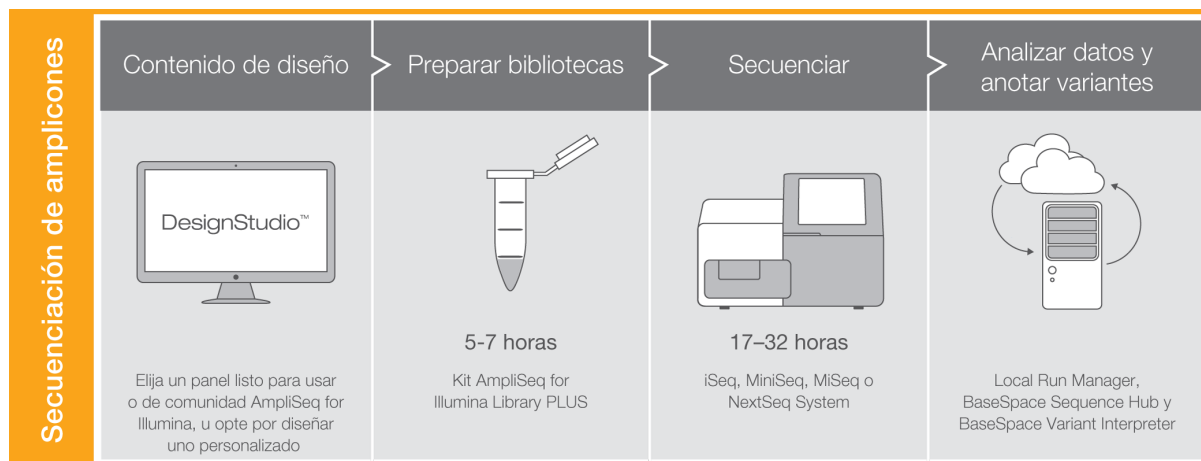


Figura 1: Solución de resecuenciación selectiva AmpliSeq for Illumina

Tabla 1: Resumen de AmpliSeq for Illumina

Parámetro	Especificación
Ensayo	Flujo de trabajo basado en PCR
Secuenciación	Procesos químicos de SBS
Tipo de muestra	Tejido FFPE y sangre
Tipo de entrada	ADN y ARN
Cantidad de entrada	1–100 ng (se recomiendan 10 ng por grupo)
Tipos de variante	SNV, inserciones y deleciones, CNV y fusiones genéticas ^a
Tiempo de participación activa (ensayo)	<1,5 horas ^b
Tiempo total (ensayo)	5–7,5 horas (en función del panel)
Opciones de contenido	
Panel listo para usar	Paneles prediseñados que tienen como objetivo áreas de interés específicas.
Panel de comunidad	Diseños basados en las aportaciones de investigadores líderes en las áreas de aplicación pertinentes.
Panel personalizado	Paneles que tienen como objetivo regiones de interés concretas para atender necesidades de aplicaciones específicas; la mayoría de los diseños se ajustan a un número de entre uno y cuatro grupos, con 3072 amplicones por cada uno de ellos y hasta 12 288 amplicones por panel.
Tiempo de pedido	Preparados por encargo (paneles personalizados y de comunidad): 3–4 semanas. Elementos con existencias (paneles listos para usar, Library PLUS e índices): disponibles en inventario.
Sistemas de secuenciación compatibles	Todos los sistemas de secuenciación de Illumina.
<p>a. SNV: variantes de nucleótido único; CNV: variaciones en el número de copias</p> <p>b. El tiempo de participación activa corresponde únicamente a la preparación de bibliotecas, sin incluir su cuantificación, normalización o agrupación.</p>	
<p>Puede solicitar AmpliSeq for Illumina en línea en www.illumina.com.</p>	

Flujo de trabajo sencillo y rápido

La solución AmpliSeq for Illumina ofrece un método rápido y eficiente para analizar posibles variantes en estudios de enfermedades oncológicas y genéticas. La preparación de bibliotecas tan solo lleva cinco horas (cuando se inicia con ADN) y tiene un tiempo de participación activa inferior a una hora y media. Los periodos de secuenciación y de análisis de datos varían en función del panel y del número de muestras. No tiene más que solicitar un panel y seguir el flujo de trabajo basado en PCR para preparar, secuenciar y analizar bibliotecas (Figura 1).

Diseño de paneles

Los investigadores tienen a su disposición una creciente gama de diseños de contenido para elegir: paneles listos para usar, de comunidad y personalizados.

Paneles listos para usar

Los paneles listos para usar ofrecen un contenido prediseñado que tiene como objetivo las variantes más habituales en un área concreta de interés. Dichas variantes se eligen en función de las aportaciones

de expertos del ámbito en cuestión, bases de datos cuidadosamente seleccionadas y publicaciones revisadas por expertos. Gracias a estos paneles, se ahorra el tiempo y el esfuerzo requeridos para la selección de objetivos y la optimización del rendimiento. Actualmente, hay paneles disponibles para enfermedades genéticas y oncológicas. La gama de paneles no cesa de aumentar. Los investigadores tienen a su disposición paneles listos para usar presentados en cómodos paquetes de pequeño tamaño (normalmente, 24 reacciones) para los estudios flexibles.



Obtenga más información acerca de los paneles listos para usar AmpliSeq for Illumina en www.illumina.com/products/by-brand/ampliseq/ready-to-use-panels.html.

Paneles de comunidad

Los paneles de comunidad ofrecen un contenido seleccionado y diseñado a partir de las aportaciones de investigadores líderes. Constituyen una forma sencilla y rápida de emprender estudios de resecuenciación selectivos en un área específica de enfermedad. Para ofrecer la máxima flexibilidad, los paneles son totalmente personalizables. Los paneles de comunidad se preparan por encargo y se encuentran disponibles en paquetes de gran tamaño.



Obtenga más información acerca de la comunidad de AmpliSeq for Illumina en www.illumina.com/products/by-brand/ampliseq/community-panels.html.

Paneles personalizados

En el caso de que el contenido disponible en los paneles listos para usar o de comunidad no satisfaga sus necesidades, es posible diseñar y solicitar en línea y con total facilidad contenido personalizado mediante el software DesignStudio™. El software DesignStudio es una herramienta en línea gratuita y fácil de usar que permite crear paneles optimizados para los objetivos o el contenido genómico específico de interés. Los objetivos pueden seleccionarse a partir de diversos genomas de referencia precargados. Tras iniciar sesión en una cuenta personalizada, los investigadores pueden seleccionar coordenadas para la selección de regiones genómicas de interés. Un algoritmo optimizado que contempla diversos factores, como la especificidad, la cobertura y el contenido de GC, diseña los amplicones de forma automática. Los amplicones candidatos se visualizan y evalúan mediante puntuaciones de satisfacción estimada. Los amplicones pueden filtrarse y, seguidamente, incorporarse al diseño o retirarse de este. Tras la visualización y el control de calidad, puede solicitarse el panel. El software DesignStudio también puede emplearse para personalizar contenidos.



Puede ver una demostración de cómo diseñar paneles personalizados en www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-custom-dna-panel.html.

Ensayo de amplicones y preparación de bibliotecas

La preparación de bibliotecas en la solución AmpliSeq for Illumina resulta sencilla y rápida. Gracias a un flujo de trabajo basado en PCR multiplexado y de alta especificidad, se obtienen bibliotecas con una

alineación en objetivo y una uniformidad de cobertura elevadas (Figura 2). Es posible multiplexar hasta 24 000 amplicones en un solo ensayo, lo que permite la evaluación simultánea de varios genes y, con ello, ahorrar tiempo.

La preparación de bibliotecas comienza con la amplificación de regiones específicas de ADN o ADNc de la entrada inicial. Las secuencias restantes del cebador se someten a digestión y se añaden adaptadores de secuenciación a los amplicones resultantes. La biblioteca se amplifica y queda lista para cuantificarse, normalizarse y agruparse antes de la secuenciación. Con este método, es posible preparar varias bibliotecas en tan solo cinco horas.

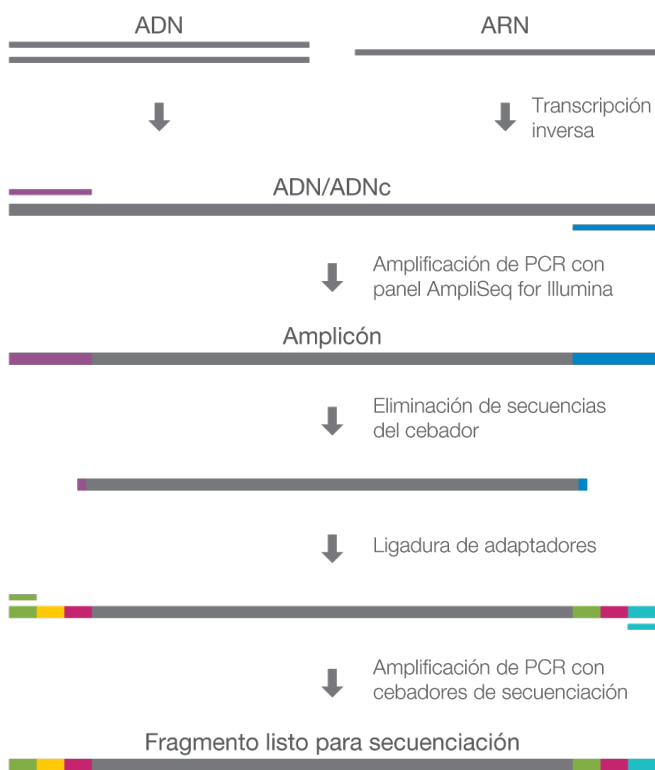


Figura 2: Preparación de bibliotecas AmpliSeq for Illumina: El flujo de trabajo basado en PCR y altamente multiplexado amplifica hasta 24 000 amplicones en un solo ensayo.

Secuenciación

Más del 90 % de los datos de secuenciación de todo el mundo se genera mediante los procesos químicos de SBS de Illumina.* Gracias a la secuenciación paralela en gran escala con un método exclusivo basado en terminadores reversibles, la tecnología de SBS permite detectar bases individuales cuando se incorporan a cadenas de ADN en crecimiento. Se adquieren imágenes de un terminador con marcador fluorescente a medida que se incorpora cada dNTP y, a continuación, se elimina para permitir la adición de la siguiente base. Como los cuatro dNTP unidos al terminador reversible están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza la tendencia a la incorporación. El resultado de ello es una secuenciación base por base que permite la obtención de datos muy precisos, incluso en regiones complicadas, como en el caso de los homopolímeros.

* Cálculos de datos en archivo. Illumina, Inc. 2015.



Vea el vídeo en el que aparece la tecnología de SBS en acción en www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html.

Varios sistemas para un rendimiento flexible

Los sistemas de secuenciación de Illumina ofrecen interfaces intuitivas y sencillas para configurar y ejecutar experimentos sin complicaciones en todas las escalas de la secuenciación (Figura 3).

Análisis de datos

El análisis de los datos generados con AmpliSeq for Illumina resulta sencillo, y para este análisis no hace falta el apoyo de profesionales bioinformáticos con una formación determinada ni una infraestructura informática específica. Tiene a su disposición soluciones informáticas para paneles de amplicones de ADN y de ARN destinadas a traducir los datos de secuenciación sin procesar en resultados significativos. Con los paneles de amplicones de ADN, el flujo de trabajo de análisis secundario alinea lecturas con respecto a genomas de referencia y efectúa llamadas de variantes pequeñas. Es posible realizar más análisis de llamadas de variantes a partir de datos humanos con el fin de hacer anotaciones y generar informes. En el caso de los paneles de amplicones de ARN, el flujo de trabajo de análisis secundario acomete un análisis de expresión diferencial y una llamada de fusión de genes. Ambos flujos de trabajo generan archivos que pueden emplearse en más análisis sucesivos y en procesamientos realizados con herramientas de terceros.

Paquete informático BaseSpace™

Una vez transmitida la información de secuenciación directamente desde el sistema de secuenciación a BaseSpace Sequence Hub, la plataforma de informática basada en la nube para genómica de Illumina, los datos de secuenciación sin procesar se analizan mediante las aplicaciones de BaseSpace para amplicones de ADN o de ARN. Los resultados de los análisis pueden almacenarse o compartirse con facilidad con otros investigadores. Pueden efectuarse análisis ulteriores en cualquier llamada de variantes por medio de BaseSpace Variant Interpreter, una plataforma de interpretación y generación de informes diseñada con el fin de reducir el tiempo y el esfuerzo necesarios para extraer información biológica útil a partir de datos genómicos, y maximizar al mismo tiempo la eficiencia operativa.

Análisis integrado en el instrumento

Los investigadores que no sean usuarios de BaseSpace Sequence Hub pueden utilizar los mismos flujos de trabajo de análisis secundario en el entorno local a través del software Local Run Manager. Local Run Manager es un software integrado en el instrumento que se utiliza para crear un experimento, supervisar estados y analizar datos de secuenciación. Local Run Manager se encuentra disponible como elemento integrado en determinados sistemas de secuenciación, además de como elemento independiente del instrumento que puede instalarse en un ordenador aparte.



Obtenga más información acerca de BaseSpace Sequence Hub en www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub.html.



	iSeq 100 System	MiniSeq System	MiSeq System	NextSeq 550 System
Máximo de resultados	1,2 Gb	8 Gb	15 Gb	120 Gb
Número máximo de lecturas	4 millones	25 millones	25 millones	400 millones
N.º estimado de muestras por experimento ^a	3	6–20	12–20	104–320

a. Información basada en un panel con 1000 amplicones y una cobertura media de 1000x

Figura 3: Sistemas de secuenciación de Illumina: Soluciones para todas las aplicaciones, tipos de muestras y escalas de secuenciación. Obtenga más información en www.illumina.com/systems.

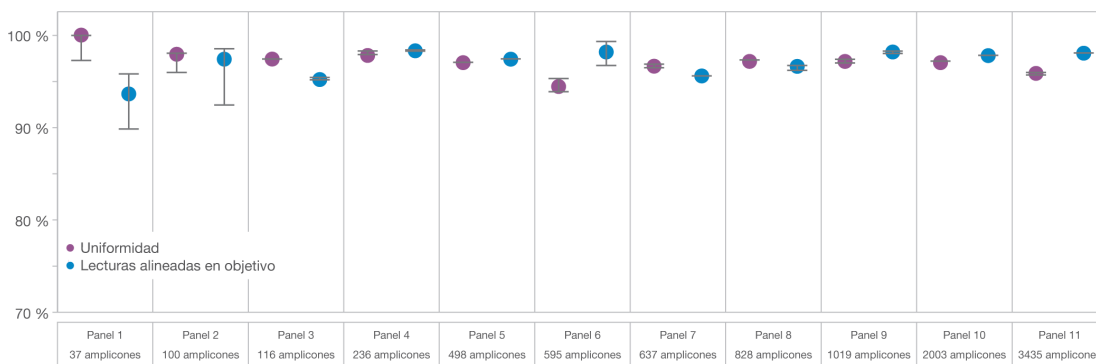


Figura 4: Gran uniformidad de cobertura y alineación en objetivo en paneles personalizados AmpliSeq for Illumina: Se emplearon muestras de ADN de Coriell y Horizon Discovery con el fin de evaluar el rendimiento de 11 paneles personalizados AmpliSeq for Illumina para tamaños distintos (número de amplicones). Las bibliotecas se secuenciaron en MiSeq System. Las barras de error indican la variabilidad de los duplicados técnicos.

Obtenga más información sobre las soluciones informáticas en www.illumina.com/products/by-brand/ampliseq/informatics.html.

altamente multiplexado, la secuenciación probada de Illumina y opciones simplificadas de bioinformática para ayudar a los investigadores a descubrir un nutrido conjunto de datos genómicos.

Información adicional

Para obtener más información acerca de AmpliSeq for Illumina, visite www.illumina.com/products/by-brand/ampliseq.html.

Datos de alta calidad

Para demostrar la capacidad de la solución de resecuenciación selectiva AmpliSeq for Illumina, se generaron y se evaluaron 11 bibliotecas personalizadas AmpliSeq for Illumina utilizando, para ello, muestras de Coriell y Horizon Discovery (HD). Se diseñaron paneles de distinto tamaño (número de amplicones) mediante el software en línea DesignStudio. Se preparan bibliotecas listas para la secuenciación con las muestras de Coriell y HD siguiendo el protocolo de AmpliSeq for Illumina Library PLUS. Tras ello, se secuenciaron en MiSeq System. El análisis de los datos se efectuó con el flujo de trabajo de análisis de amplicones de ADN. Los resultados revelaron una gran uniformidad de cobertura y un elevado porcentaje en objetivo de lecturas alineadas con todos los niveles de plexicidad (Figura 4).

Resumen

La solución AmpliSeq for Illumina proporciona una generación rápida y precisa de informes de distintas variantes en diversos tipos de muestras, incluidos los tejidos FFPE. Esta completa solución combina la sencillez del diseño y la amplitud de la gama de paneles AmpliSeq, un ensayo de preparación de bibliotecas basado en PCR

Datos para realizar pedidos

Para solicitar paneles personalizados AmpliSeq for Illumina, visite www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-custom-dna-panel.html.

Solución con todas las opciones de asistencia necesarias

Illumina ofrece un amplio abanico de opciones de asistencia, desde la ayuda con el diseño y el análisis de datos hasta aspectos de bioinformática y formación, para contribuir a que los investigadores alcancen sus objetivos. Illumina Concierge procura un diseño avanzado de contenidos para ayudar a mejorar la cobertura y permitir la utilización de diseños complementarios o de especies no humanas. También se pone a disposición de los interesados un servicio de evaluación de AmpliSeq for Illumina para un sistema de secuenciación de Illumina concreto antes de realizar la inversión. Asimismo, puede recurrir a expertos de bioinformática que lo asistirán con el diseño de aplicaciones y procesos personalizados, además de a científicos cualificados y certificados que pueden desplazarse a las instalaciones del cliente para impartir cursos sobre la preparación de bibliotecas.

Illumina, Inc. • 1.800.809.4566 (llamada gratuita, EE. UU.) • Tel.: +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2017 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, visite www.illumina.com/company/legal.html. Publicación n.º 770-2017-022-A ESPQB 5430

illumina[®]