

Mejora del rendimiento en MiSeq™ i100 Series

Pasos de optimización de la carga de librerías para garantizar el éxito del experimento

Optimización de la carga de librerías

Determine la concentración de la carga óptima para las celdas de flujo de MiSeq i100 Series.

Maximización del rendimiento

Mejore la representación del tamaño de los fragmentos para mejorar el rendimiento de la secuenciación.

Compatibilidad con baja diversidad

Secuencie librerías de baja diversidad ajustando su complejidad con PhiX.

Introducción

MiSeq i100 Series ofrece la secuenciación de sobremesa más sencilla y rápida. Los avances innovadores en el diseño del sistema, la química XLEAP-SBS™ y el análisis de datos integrado ofrecen un uso más sencillo, alta precisión de datos y una velocidad excepcional, lo que genera resultados hasta cuatro veces más rápido que el MiSeq System original. Como parte de una solución de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) integral, MiSeq i100 Series proporciona resultados en el mismo día para diversas aplicaciones, incluidos estudios de transcriptómica, genómica microbiana y secuenciación genética selectiva en distintas áreas clave, como la microbiología, enfermedades infecciosas, oncología y otras disciplinas.

Al realizar la transición de proyectos a MiSeq i100 Series desde otro sistema de secuenciación, la optimización de la carga de librerías puede ayudar a mejorar el rendimiento y la calidad de los datos. Esta nota técnica proporciona recomendaciones para optimizar los resultados en MiSeq i100 Series, incluida la orientación sobre la concentración de la carga de las librerías, la calidad de las librerías y las consideraciones sobre la diversidad de nucleótidos.

Carga óptima de librerías

Por "concentración de la carga" se entiende la concentración final de una librería cargada en un instrumento para la secuenciación. Una vez preparadas, las librerías se diluyen en la concentración de la carga adecuada para el tipo de librería, el sistema de secuenciación y el kit de reactivos.

La carga de librerías a una concentración excesivamente elevada o reducida puede mermar la calidad y el rendimiento de la secuenciación e incluso provocar fallos del experimento en condiciones extremas. La carga insuficiente puede dar como resultado un porcentaje bajo de ocupación de nanopocillos (% de ocupación) y lecturas duplicadas más altas, lo que requiere más lecturas para lograr la cobertura del objetivo. Por el contrario, la sobrecarga puede provocar un bajo porcentaje de grupos que superan el filtro (PF). Para determinar las concentraciones de la carga óptimas en MiSeq i100 Series, los criterios de medición del porcentaje de ocupación y el porcentaje de PF se pueden representar gráficamente en Sequencing Analysis Viewer para determinar si un experimento presentaba una carga insuficiente, una carga óptima o una sobrecarga. El método del siguiente experimento de ejemplo se puede utilizar para ajustar la concentración de la carga a fin de evaluar los criterios de medición principales y secundarios.



Para obtener más información, lea [Optimización de la carga de librerías para los sistemas de NGS de Illumina con celdas de flujo de tramas \(en inglés\)](#).

Determinación de la concentración de la carga óptima

A la hora de buscar la concentración de la carga óptima, es fundamental probar una amplia gama de concentraciones. Utilice criterios de medición principales, como el porcentaje de PF y el porcentaje de ocupación, con criterios de medición secundarios, como los duplicados, el tamaño del fragmento y la cobertura, para medir el rendimiento en diversas concentraciones de la carga con el fin de determinar el "rendimiento útil" para una aplicación determinada.

Paso 1: Diseñar el experimento de valoración

Para la transición de proyectos del MiSeq System original a MiSeq i100 Series, centre las valoraciones a una concentración de la carga de aproximadamente 10,4 veces la de MiSeq Reagent Kit v2 y en torno a 6,5 veces la de MiSeq Reagent Kit v3. Las concentraciones del punto central recomendadas varían para los diferentes kits de preparación de librerías para su uso con MiSeq i100 Series ([tabla 1](#)). En todos los demás casos, se recomienda utilizar 100 pM para la concentración del punto central.

En este ejemplo, se analizó una agrupación de librerías compuesta por muestras de genoma bacteriano de *Bacillus pacificus*, *Cereibacter sphaeroides* y *Escherichia coli* preparadas con Illumina DNA Prep a concentraciones de la carga de 40 pM, 80 pM y 120 pM.

Paso 2: Evaluar la ocupación de nanopocillos y los grupos que superan el filtro

Trace los criterios de medición de porcentaje de grupos que pasan el filtro frente al porcentaje de ocupación del experimento de secuenciación con cada concentración de la carga para determinar qué concentraciones provocaron una carga insuficiente, una sobrecarga o una carga equilibrada. En este ejemplo, las tres concentraciones analizadas (40 pM, 80 pM y 120 pM) muestran una forma de carga óptima (una nube de puntos con una pendiente positiva) en el gráfico del porcentaje de PF frente al porcentaje de ocupación, lo que demuestra que MiSeq i100 Series puede lograr resultados sólidos dentro de un amplio rango de concentración de la carga de las librerías ([figura 1](#)).

Paso 3: Evaluar los duplicados

Reduzca el rango de concentración objetivo analizando el porcentaje de duplicados. Los duplicados tienden a disminuir cuando aumenta la concentración de la carga. En este ejemplo, aunque las tres concentraciones analizadas tienen duplicados inferiores al 15 %, las de 80 pM y 120 pM tuvieron la cantidad más baja ([figura 2](#)).

Paso 4: Analizar el tamaño del fragmento

Revise los tamaños de los fragmentos. El rango óptimo para su librería y su aplicación puede variar según los requisitos del flujo de trabajo. En este ejemplo, los tamaños de los fragmentos de las tres cepas bacterianas varían en el rango de concentración analizado, con la mayor diferencia observada entre 40 pM y 80 pM ([figura 2](#)).

Tabla 1: Concentraciones del punto central recomendadas para el diseño de valoración con MiSeq i100 Series

Kit de preparación de librerías	Concentración del punto central
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: gripe 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
Amplicón de ARNr 16S	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 + CNV Panel	80 pM
PhiX Control v3	120 pM
PhiX Indexed Control (1000 cycles)	120 pM

a. Las librerías de ADN de cadena doble se cuantificaron con el ensayo fluorométrico Qubit dsDNA Quantitation High Sensitivity (Thermo Fisher, n.º de catálogo Q32851) y Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent, n.º de catálogo 5067-4626) para la estimación del tamaño medio de los fragmentos. Las librerías de ADN de una sola cadena se cuantificaron con el kit de ensayo de ADNmc de Qubit (Thermo Fisher, n.º de catálogo Q10212).

b. Librerías de amplicones de ARNr 16S preparadas con el flujo de trabajo descrito en el documento Preparación de librerías de secuenciación metagenómica 16S (n.º de referencia 15044223 Rev. B).

Paso 5: Revisar otros criterios de medición dependientes de la aplicación (cobertura, asignación, etc.)

Revise los criterios de medición de análisis secundarios adicionales para obtener un rendimiento óptimo de su aplicación. En este ejemplo, el criterio de medición de porcentaje asignado presenta resultados sólidos para las tres concentraciones de la carga analizadas (figura 2). Los criterios de medición secundarios se generaron con la aplicación DRAGEN™ Small Whole Genome Sequencing, disponible como solución integrada en el instrumento y en la nube.

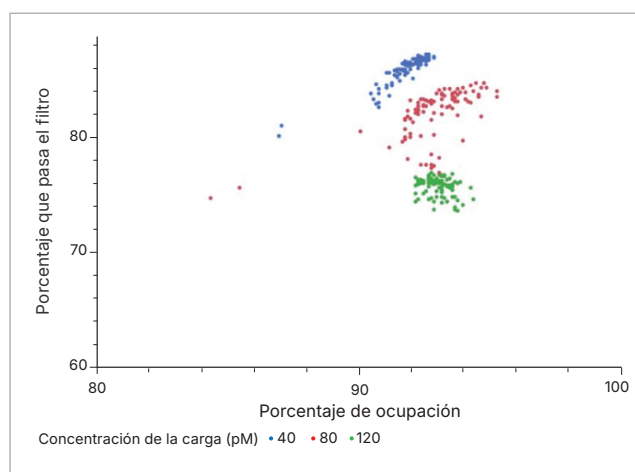


Figura 1: Ocupación óptima de nanopocillos en un amplio rango de concentración de la carga de librerías

La secuenciación de librerías cargadas a 40 pM, 80 pM y 120 pM mostró una forma de carga óptima, lo que demuestra que MiSeq i100 Series puede lograr resultados sólidos en un amplio rango de concentraciones de la carga.

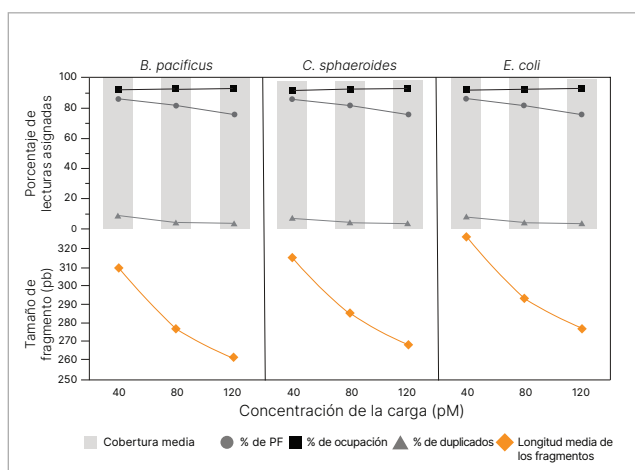



Figura 2: Optimización del rendimiento de secuenciación en MiSeq i100 Series

Ejemplo de experimento de titulación que analiza duplicados, cobertura promedio y tamaño de los fragmentos.

Calidad de la librería

Los fragmentos cortos y los contaminantes introducidos durante la preparación de librerías, incluidos los dímeros de los adaptadores, los dímeros de los cebadores y las construcciones de librerías parciales, pueden afectar negativamente a la generación de grupos en MiSeq i100 Series. Los fragmentos cortos se agrupan de forma más eficiente que los fragmentos más largos. Si la longitud de lectura de secuenciación es mayor que el tamaño del fragmento de la librería, la secuenciación continuará a través del fragmento en la secuencia del adaptador y, posiblemente, en la celda de flujo. Cuando la secuenciación continúa hacia la celda de flujo, la lectura se queda sin cadena molde para la incorporación de bases, lo que provoca una caída de intensidad que en MiSeq i100 Series puede provocar uno o ambos de los siguientes efectos: una disminución pronunciada en las puntuaciones Q30 o un aumento en las llamadas de bases G (similar a otros instrumentos de 2 canales de Illumina, como NextSeq™ 1000 System y NextSeq 2000 System, NovaSeq™ 6000 System y NovaSeq X Series).

 Para obtener más información, lea [Cómo afectan los fragmentos cortos al rendimiento de secuenciación \(en inglés\)](#).

Es fundamental eliminar estos fragmentos cortos y contaminantes durante los pasos de limpieza o selección de tamaño. Para lograr un rendimiento óptimo en MiSeq i100 Series con una longitud de lectura de 2×500 pb, el tamaño medio de los fragmentos de la librería debe oscilar entre 600 y 1200 pb, mientras que los fragmentos inferiores a 500 pb deben constituir menos del 1 % de la masa total de la librería. Si fuera necesario, los fragmentos cortos y los contaminantes se pueden eliminar de forma más eficaz añadiendo un paso de purificación de bolas opcional al protocolo de preparación de librerías. Una vez finalizada la preparación de librerías y antes de la secuenciación, los usuarios deben verificar la calidad y pureza de todas las librerías. Utilice un bioanalizador Agilent, un sistema Fragment Analyzer o TapeStation para comprobar la integridad de la librería, el tamaño medio del fragmento y los contaminantes.

Se proporcionan dos ejemplos de procedimientos de purificación de bolas adicionales utilizados para mejorar el rendimiento de secuenciación en MiSeq i100 Series. En el primer ejemplo, los fragmentos cortos de librerías enriquecidas con una amplia distribución del tamaño de los fragmentos se eliminaron selectivamente para eliminar el exceso de G y mejorar el rendimiento de secuenciación. En el segundo ejemplo, se ha demostrado que la eliminación de contaminantes del dímero del adaptador en la librería de amplicones de fragmento largo mejora el rendimiento del experimento y las puntuaciones de calidad para la secuenciación de 2×500 pb.

La eliminación de fragmentos cortos mejora el rendimiento de secuenciación

En este ejemplo, las librerías de muestras de aguas residuales preparadas con Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit se trataron con una ronda adicional de purificación de bolas utilizando una relación de bolas a muestras de 0,8x. La ronda adicional de purificación de bolas eliminó de forma eficaz la mayoría de los fragmentos de <250 pb (correspondiente a fragmentos de librerías de <100 pb sin adaptadores), con una reducción total en el rendimiento de librerías de aproximadamente el 35 % (figura 3).

Las librerías de Viral Surveillance Panel v2, con y sin la ronda adicional de purificación de bolas, se secuenciaron en MiSeq i100 Series con una longitud de lectura de 2×150 pb y se analizaron con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus. La secuenciación de las librerías preparadas con la ronda adicional de purificación de bolas, en comparación con el protocolo no modificado, dio como resultado una reducción del exceso de G y una mejora de los criterios de medición secundarios, incluida la longitud media de lectura y el porcentaje de lecturas posteriores a la calidad, así como una mayor detección de microorganismos (figura 4).

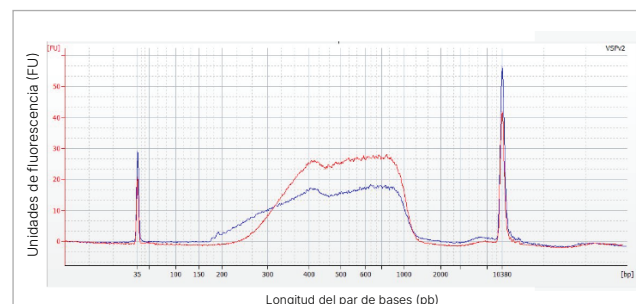


Figura 3: Aumento del tamaño del fragmento con purificaciones con bolas adicionales

Las rondas adicionales de purificación con bolas (línea roja) eliminaron eficazmente la mayoría de los fragmentos de menos de 250 pb, en comparación con el protocolo no modificado (línea azul).

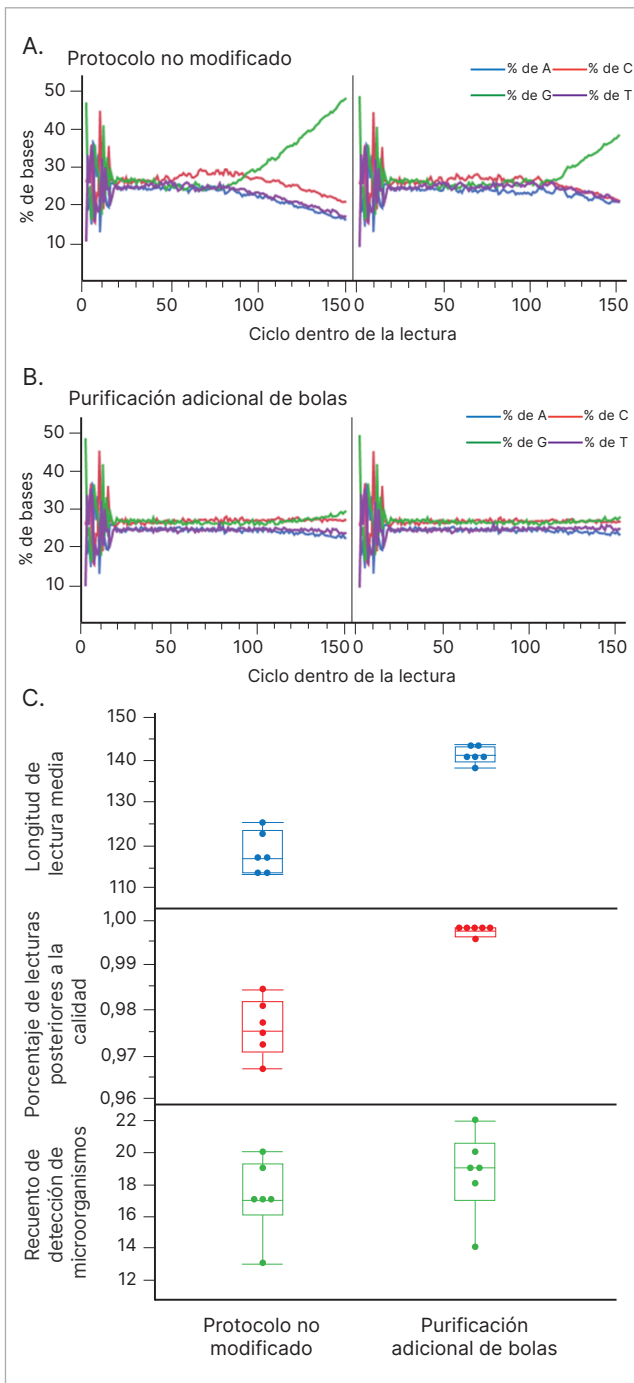


Figura 4: Rendimiento mejorado con mayores tamaños de fragmentos

La secuenciación de librerías generadas siguiendo un protocolo (A) sin modificar y (B) modificado (con mayores tamaños de fragmentos) en MiSeq i100 Series redujo el exceso de G; (C) el análisis con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus mostró un rendimiento mejorado, incluido un aumento de la longitud de lectura media (para lecturas de 2×300 y 2×500 pb), el porcentaje de lecturas de calidad posterior y la detección de microorganismos.

La eliminación de contaminantes del dímero del adaptador optimiza el rendimiento de la secuenciación

En este ejemplo, las librerías de amplicones personalizadas con una longitud de fragmento objetivo de 950 pb se trataron con tres rondas sucesivas adicionales de purificación de bolas utilizando una relación de bolas a muestras de 0,6x. El control de calidad de librerías en TapeStation muestra que las rondas adicionales de purificación con bolas eliminaron del dímero del adaptador la mayoría de los contaminantes del dímero del adaptador a una longitud de fragmento de aproximadamente 250 pb conservando al mismo tiempo la librería objetivo (figura 5).

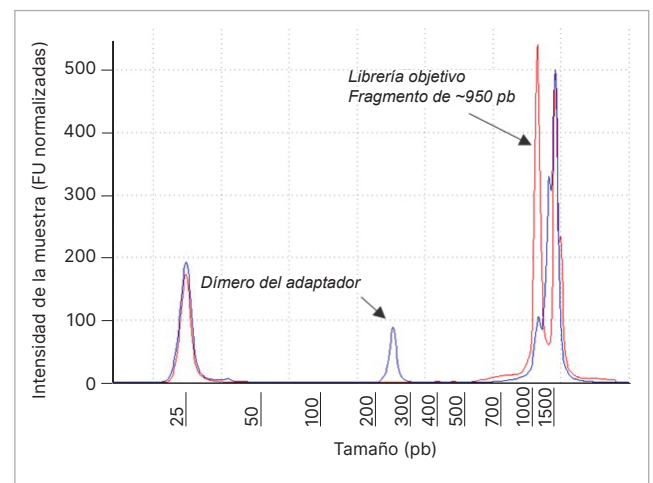


Figura 5: Extracción del dímero del adaptador con purificaciones con bolas adicionales

Las rondas adicionales de purificación con bolas de librerías de amplicones personalizadas (línea roja) eliminaron eficazmente los contaminantes del dímero del adaptador, en comparación con el protocolo no modificado (línea azul).

Las librerías de amplicones personalizadas, con y sin purificación adicional con bolas, se secuenciaron en MiSeq i100 Series con una longitud de lectura de 2×500 pb. El experimento de secuenciación con las librerías originales muestra problemas de rendimiento a partir de aproximadamente el ciclo 100 que se atribuyen a la presencia de los dímeros de los adaptadores, caracterizados por fuertes caídas en la intensidad de la señal, una disminución de las puntuaciones Q30 y un aumento en la llamada de bases G. La secuenciación de las librerías con las purificaciones con bolas adicionales muestra una mejora en el rendimiento (figura 6).

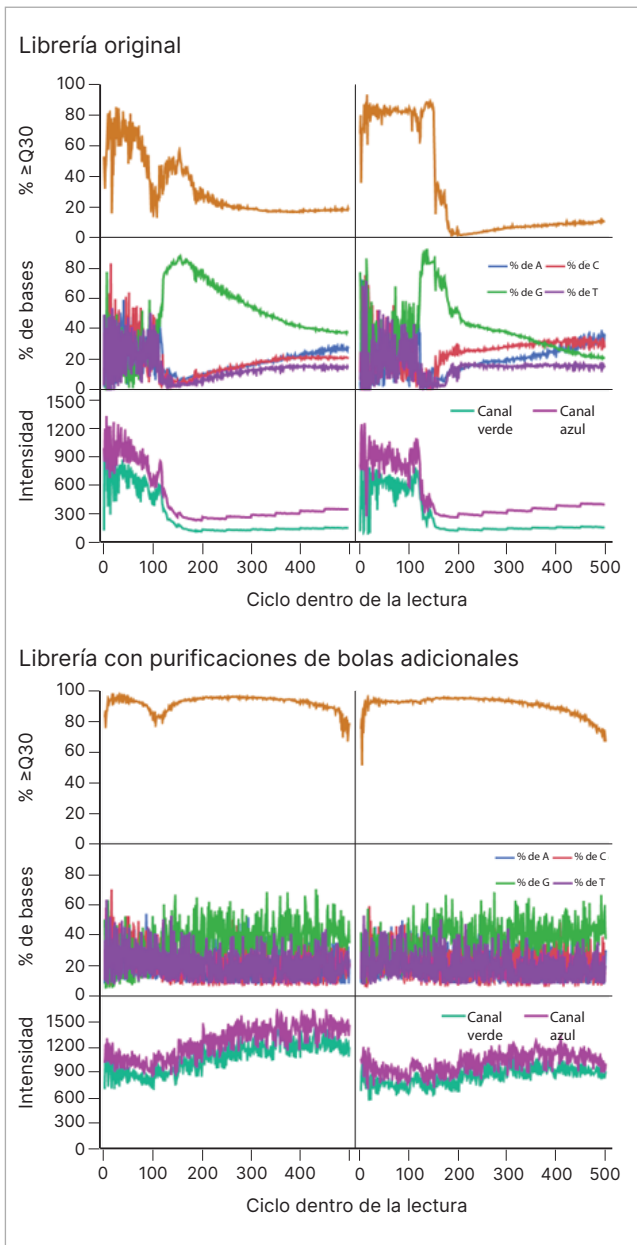


Figura 6: Rendimiento de secuenciación rescatada con reducción de dímero del adaptador
 La secuenciación de MiSeq i100 Series 2 × 500 pb de librerías de amplicones personalizadas tratadas con purificaciones con bolas adicionales para reducir los dímeros de los adaptadores mostró mejoras significativas en el rendimiento, con mayores puntuaciones de calidad y una disminución del exceso de G.

Diversidad de nucleótidos

La diversidad de nucleótidos indica la proporción relativa de cada base (A, C, G o T) presente en cada ciclo del experimento. El equilibrio de nucleótidos es importante para la corrección de la matriz de color y la normalización de la intensidad por parte del sistema de secuenciación. El software adaptativo Real-Time Analysis integrado en MiSeq i100 Series se ha desarrollado cuidadosamente para una llamada de bases precisa de librerías de baja diversidad. El rendimiento óptimo de la secuenciación de librerías de baja diversidad se puede lograr con un mínimo del porcentaje de adición de PhiX (≥5 %) para maximizar el número de lecturas de alta calidad.

En este ejemplo, las librerías de amplicones 16S de baja diversidad con adición de PhiX al 5 % y al 20 % secuenciadas en MiSeq i100 Series muestran un rendimiento sólido similar al de las librerías humanas de alta diversidad de Illumina DNA Prep (figura 7).

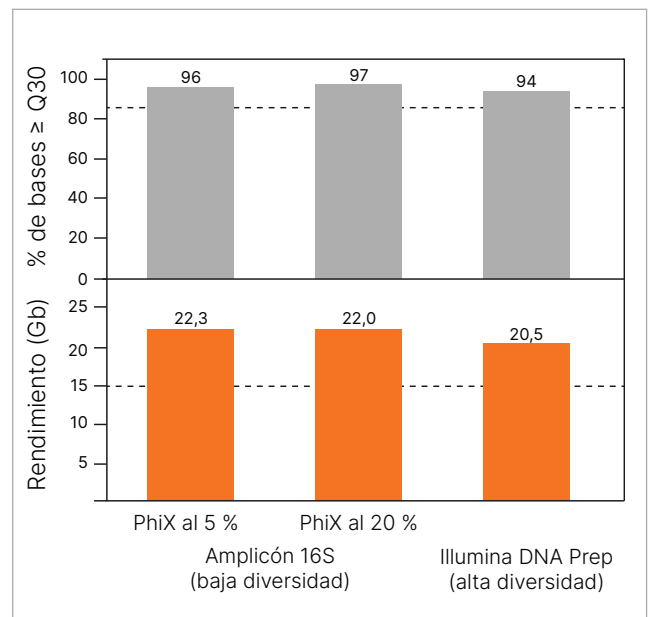


Figura 7: Compatibilidad con librerías de baja diversidad

El software integrado en MiSeq i100 Series optimiza el rendimiento de secuenciación para librerías de baja diversidad, como se observa en el porcentaje de bases ≥ Q30 y resultados de Gb. Todos los experimentos se secuenciaron a una longitud de lectura de 2 × 301 pb con MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 ciclos), con líneas discontinuas que representan las especificaciones de rendimiento.

Resumen

Los avances innovadores en química de secuenciación y el análisis de datos integrado en MiSeq i100 Series ofrecen una mayor facilidad de uso, alta precisión de datos y una velocidad excepcional. Seguir las prácticas recomendadas descritas en esta nota técnica para evaluar la calidad de las librerías, optimizar la concentración de la carga y agrupar librerías puede mejorar el rendimiento en MiSeq i100 Series.

Más información

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



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 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-GI-03322 ESP v2.0