

Maximização do desempenho no MiSeq™ i100 Series

Etapas de otimização de carregamento de bibliotecas para garantir o sucesso da corrida

Otimize o carregamento da biblioteca

Determine a concentração de carregamento ideal para as lâminas de fluxo do MiSeq i100 Series

Maximize o desempenho

Melhore a representação do tamanho do inserto para maximizar o desempenho do sequenciamento

Suporte para diversidade baixa

Sequencie bibliotecas com diversidade baixa ajustando a complexidade da biblioteca com PhiX

Introdução

O MiSeq i100 Series oferece o sequenciamento de bancada mais simples e rápido. Avanços inovadores no design do sistema, na química XLEAP-SBS™ e na análise integrada de dados oferecem capacidade de uso aprimorada, alta exatidão dos dados e velocidade excepcional, gerando resultados até quatro vezes mais rápidos do que o MiSeq System original. Como parte de uma solução de NGS de ponta a ponta, o MiSeq i100 Series fornece resultados no mesmo dia para várias aplicações, incluindo transcriptômica, genômica microbiana e estudos direcionados de sequenciamento de genes em áreas importantes, como microbiologia, doenças infecciosas, oncologia e muito mais.

Ao fazer a transição de projetos para o MiSeq i100 Series a partir de outro sistema de sequenciamento, a otimização do carregamento da biblioteca pode ajudar a maximizar o rendimento e a qualidade dos dados. Esta nota técnica fornece recomendações para otimizar os resultados no MiSeq i100 Series, incluindo orientações sobre a concentração de carregamento da biblioteca, qualidade da biblioteca e considerações sobre diversidade de nucleotídeos.

Carregamento ideal da biblioteca

A concentração de carregamento refere-se à concentração final de uma biblioteca carregada em um instrumento para sequenciamento. Após a preparação das bibliotecas, elas são diluídas até a concentração de carregamento apropriada para o tipo de biblioteca, o sistema de sequenciamento e o kit de reagentes.

O carregamento de bibliotecas em uma concentração muito alta ou muito baixa pode levar a menor qualidade e rendimento do sequenciamento e, possivelmente, a falhas de corrida em condições extremas. O subcarregamento pode resultar em uma baixa porcentagem de ocupação de nanoporos (% ocupado) e leituras duplicadas mais altas, o que requer mais leituras para alcançar a cobertura alvo. Em contraste, o sobrecarregamento pode resultar em uma baixa porcentagem do filtro de passagem dos clusters (PF). Para determinar as concentrações de carregamento ideais no MiSeq i100 Series, as métricas de % ocupado e % de PF podem ser plotadas no Sequencing Analysis Viewer para determinar se uma corrida foi subcarregada, carregada de forma ideal ou sobrecarregada. A abordagem no experimento de exemplo a seguir pode ser usada para titular a concentração de carregamento para avaliar métricas primárias e secundárias.



Para saber mais, leia [Otimização do carregamento de bibliotecas para sistemas Illumina NGS com lâminas de fluxo padronizadas](#)

Determinação da concentração de carregamento ideal

Ao encontrar a concentração de carregamento ideal, é fundamental testar uma ampla variedade de concentrações. Use métricas primárias como % de PF e % ocupado juntamente com métricas secundárias como duplicatas, tamanho do inserto e cobertura para medir o desempenho em várias concentrações de carregamento e determinar o “rendimento utilizável” para uma determinada aplicação.

Etapa 1: Experimento de titulação de projeto

Para a transição de projetos do MiSeq System original para o MiSeq i100 Series, centralize as titulações em aprox. 10,4 × a concentração de carregamento do MiSeq Reagent Kit v2 e aprox. 6,5 × a concentração de carregamento do MiSeq Reagent Kit v3. As concentrações de ponto central recomendadas variam para diferentes kits de preparação de bibliotecas para uso com o MiSeq i100 Series ([Tabela 1](#)). Para todos os outros casos, recomenda-se usar 100 pM para a concentração de ponto central.

Neste exemplo, um pool de bibliotecas composto por amostras de genoma bacteriano de *Bacillus pacificus*, *Cereibacter sphaeroides* e *Escherichia coli*, preparado usando Illumina DNA Prep, foi testado em concentrações de carregamento de 40 pM, 80 pM e 120 pM.

Etapa 2: Avaliação da ocupação de nanoporos e da PF dos clusters

Trace as métricas de % de PF vs. % ocupado da corrida do sequenciamento para cada concentração de carregamento a fim de determinar quais concentrações resultaram em subcarregamento, sobrecarregamento ou carregamento equilibrado. Neste exemplo: todas as três concentrações testadas (40 pM, 80 pM, 120 pM) exibem formato de carregamento ideal (uma nuvem de pontos com inclinação positiva) no gráfico de % de PF vs. % ocupado, demonstrando que o MiSeq i100 Series pode obter resultados completos dentro de uma ampla faixa de concentrações de carregamento da biblioteca ([Figura 1](#)).

Etapa 3: Avaliação de duplicatas

Estreite a faixa de concentração alvo analisando a porcentagem de duplicatas. As duplicatas tendem a diminuir com o aumento da concentração de carregamento. Neste exemplo, embora todas as três concentrações testadas tenham duplicatas inferiores a 15 %, 80 pM e 120 pM tiveram a menor quantidade ([Figura 2](#)).

Etapa 4: Análise do tamanho do inserto

Revise os tamanhos do inserto. O intervalo ideal para sua biblioteca e aplicação pode variar de acordo com os requisitos de seu fluxo de trabalho. Neste exemplo, os tamanhos dos insertos para todas as três cepas bacterianas variam na faixa de concentração testada, com a maior diferença observada entre 40 pM e 80 pM ([Figura 2](#)).

Tabela 1: Concentrações de ponto central recomendadas para o projeto de titulação com o MiSeq i100 Series

Kit de preparação da biblioteca	Concentração de ponto 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—Influenza A/B	80 pM
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel (RPIP)	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. As bibliotecas de DNA de fita dupla foram quantificadas usando o ensaio fluorométrico Qubit dsDNA Quantitation High Sensitivity (Thermo Fisher, N.º do catálogo Q32851) e Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (agilent, N.º do catálogo 5067-4626) para estimativa do tamanho médio dos fragmentos. As bibliotecas de DNA de fita única foram quantificadas usando o Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher, N.º do catálogo Q10212).

b. Bibliotecas de amplicons de rRNA 16S preparadas usando o fluxo de trabalho descrito no documento 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Parte N.º 15044223 Rev.B).

Etapa 5: Revisão de outras métricas dependentes da aplicação (cobertura, mapeamento etc.)

Revise métricas adicionais de análise secundária para obter o desempenho ideal da sua aplicação. Neste exemplo, a métrica de percentual mapeado apresenta resultados completos para todas as três concentrações de carregamento testadas (Figura 2). As métricas secundárias foram geradas com a aplicação DRAGEN™ Small Whole Genome Sequencing, disponível como solução integrada no instrumento e na nuvem.

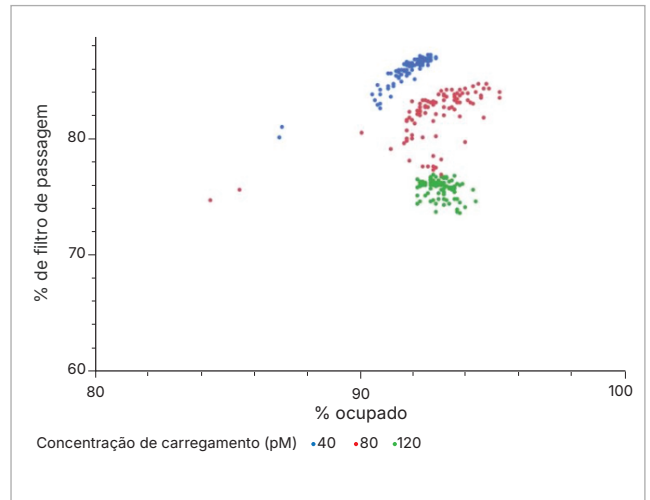


Figura 1: Ocupação ideal dos nanoporos em uma ampla faixa de concentrações de carregamento da biblioteca

O sequenciamento de bibliotecas carregadas a 40 pM, 80 pM e 120 pM exibiu um formato de carregamento ideal, demonstrando que o MiSeq i100 Series pode alcançar resultados completos em uma ampla faixa de concentrações de carregamento.

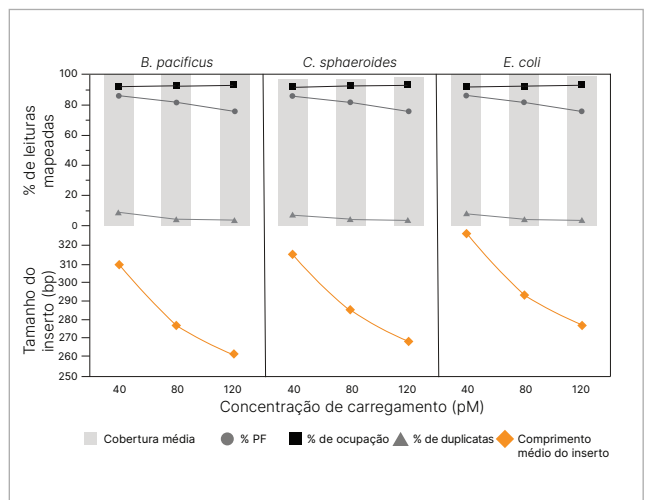


Figura 2: Otimização do desempenho do sequenciamento no MiSeq i100 Series

Exemplo de experimento de titulação que analisa duplicatas, cobertura média e tamanho do inserto.

Qualidade da biblioteca

Insertos curtos e contaminantes introduzidos durante a preparação de bibliotecas, incluindo dímeros de adaptadores, dímeros de primers e construções parciais de biblioteca, podem afetar negativamente a formação de clusters no MiSeq i100 Series. Insertos curtos formam clusters com maior eficiência do que insertos mais longos. Se o comprimento da leitura do sequenciamento for maior do que o tamanho do inserto da biblioteca, o sequenciamento prosseguirá através do inserto até a sequência adaptadora e, potencialmente, até a lâmina de fluxo. Quando o sequenciamento continua na lâmina de fluxo, a leitura fica sem modelo para a incorporação de bases, causando uma queda de intensidade que, no MiSeq i100 Series, pode resultar em um ou ambos os seguintes efeitos: um declínio acentuado nas pontuações Q30; um aumento nas chamadas de base G (semelhante a outros instrumentos de 2 canais da Illumina, como os sistemas NextSeq™ 1000 e NextSeq 2000, o NovaSeq™ 6000 System e o NovaSeq X Series).



Para saber mais, leia [How short inserts affect sequencing performance](#)

É fundamental remover esses insertos curtos e contaminantes durante as etapas de limpeza ou seleção de tamanho. Para um desempenho ideal no MiSeq i100 Series com comprimento da leitura de 2 × 500 bp, o tamanho médio do inserto da biblioteca deve variar entre 600 a 1200 bp, enquanto insertos menores que 500 bp devem constituir menos de 1 % da massa total da biblioteca. Se necessário, insertos curtos e contaminantes podem ser removidos de forma mais eficaz pela adição de uma etapa opcional de purificação por beads ao protocolo de preparação de bibliotecas. Após a conclusão da preparação da biblioteca e antes do sequenciamento, os usuários devem verificar a qualidade e a pureza de todas as bibliotecas. Use um Agilent Bioanalyzer, Fragment Analyzer system ou TapeStation para verificar a integridade da biblioteca, tamanho médio do inserto e contaminantes.

São apresentados dois exemplos de procedimentos adicionais de purificação por beads usados para melhorar o desempenho do sequenciamento no MiSeq i100 Series. No primeiro exemplo, os insertos curtos de bibliotecas enriquecidas com ampla distribuição de tamanho de inserto são removidos seletivamente para eliminar o excesso de chamadas de G e melhorar o desempenho do sequenciamento. No segundo exemplo, a remoção de contaminantes dímeros de adaptadores em uma biblioteca de amplicons de inserto longo demonstra melhorar o desempenho da corrida e os escores de qualidade para o sequenciamento de 2 × 500 bp.

A remoção de insertos curtos melhora o desempenho do sequenciamento

Neste exemplo, bibliotecas de amostras de água residual preparadas com o Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit foram tratadas com uma rodada adicional de purificação por beads usando uma proporção de beads para amostra de 0,8 ×. A rodada adicional de purificação por beads removeu efetivamente a maioria dos fragmentos < 250 bp (correspondentes a insertos de biblioteca < 100 bp sem adaptadores), com redução total no rendimento da biblioteca de aprox. 35 % (Figura 3).

As bibliotecas do Viral Surveillance Panel v2, com e sem a rodada adicional de purificação por beads, foram sequenciadas no MiSeq i100 Series com comprimento da leitura de 2 × 150 bp e analisadas com a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus. O sequenciamento de bibliotecas preparadas com a rodada adicional de purificação por beads, em comparação com o protocolo não modificado, resultou na redução do excesso de G e melhorou as métricas secundárias, incluindo comprimento médio da leitura e % de leituras pós-qualidade, além de aumento na detecção de microrganismos (Figura 4).

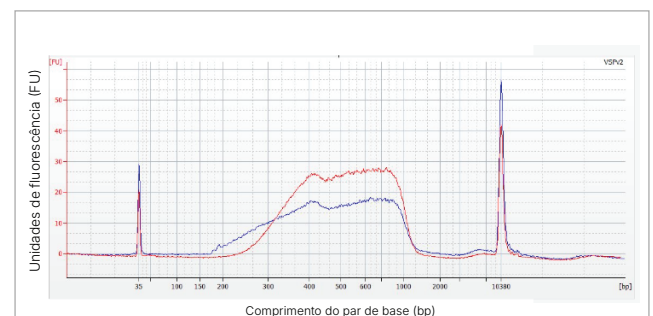


Figura 3: Aumento do tamanho do inserto com purificações adicionais por beads

Rodadas adicionais de purificação por beads (linha vermelha) removeram efetivamente a maioria dos fragmentos com menos de 250 bp, em comparação com o protocolo não modificado (linha azul).

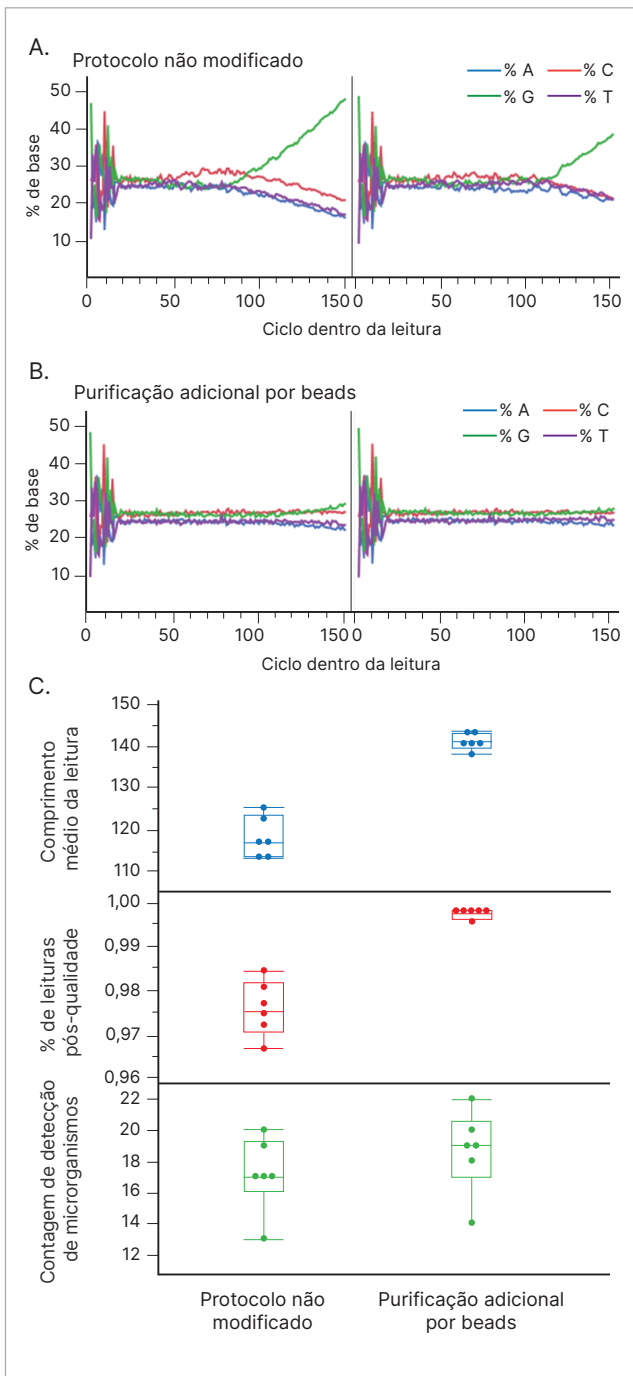


Figura 4: Desempenho aprimorado com tamanhos de insertos maiores

O sequenciamento de bibliotecas geradas seguindo um protocolo (A) não modificado e (B) modificado (com tamanhos de inserto aumentados) no MiSeq i100 Series reduziu o excesso de chamadas de G; (C) a análise com a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus mostrou desempenho aprimorado, incluindo aumento do comprimento médio da leitura (para leituras de 2 × 300 e 2 × 500 bp), maior percentual de leituras pós-qualidade e maior detecção de microrganismos.

A remoção de contaminantes dímeros de adaptadores otimiza o desempenho do sequenciamento

Neste exemplo, bibliotecas de amplicons personalizados com comprimento alvo do inserto de 950 bp são tratadas com três rodadas sucessivas adicionais de purificação por beads usando uma proporção de beads para amostra de 0,6 ×. O controle de qualidade da biblioteca na TapeStation mostra que as rodadas adicionais de purificação por beads removeram seletivamente a maioria dos contaminantes dímeros de adaptadores em comprimento de fragmento de aprox. 250 bp, mantendo a biblioteca alvo (Figura 5).

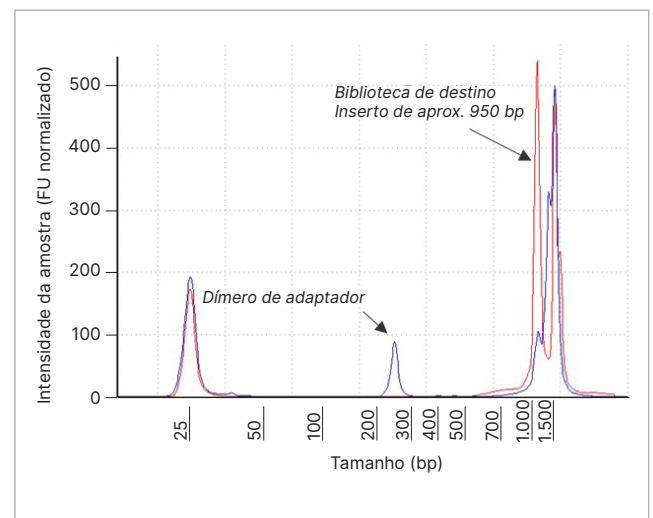


Figura 5: Remoção de dímeros de adaptadores com purificações adicionais por beads

Rodadas adicionais de purificação por beads de bibliotecas de amplicons personalizados (linha vermelha) removeram efetivamente contaminantes dímeros de adaptadores, em comparação com o protocolo não modificado (linha azul).

As bibliotecas de amplicons personalizados, com e sem a purificação adicional por beads, foram sequenciadas no MiSeq i100 Series com comprimento da leitura de 2 × 500 bp. A corrida de sequenciamento com as bibliotecas originais mostra problemas de desempenho que começam em torno do ciclo 100, atribuíveis à presença de dímeros de adaptadores, caracterizados por quedas acentuadas na intensidade do sinal, declínio das pontuações Q30 e aumento nas chamadas de bases G. O sequenciamento das bibliotecas com as purificações adicionais por beads mostra desempenho aprimorado (Figura 6).

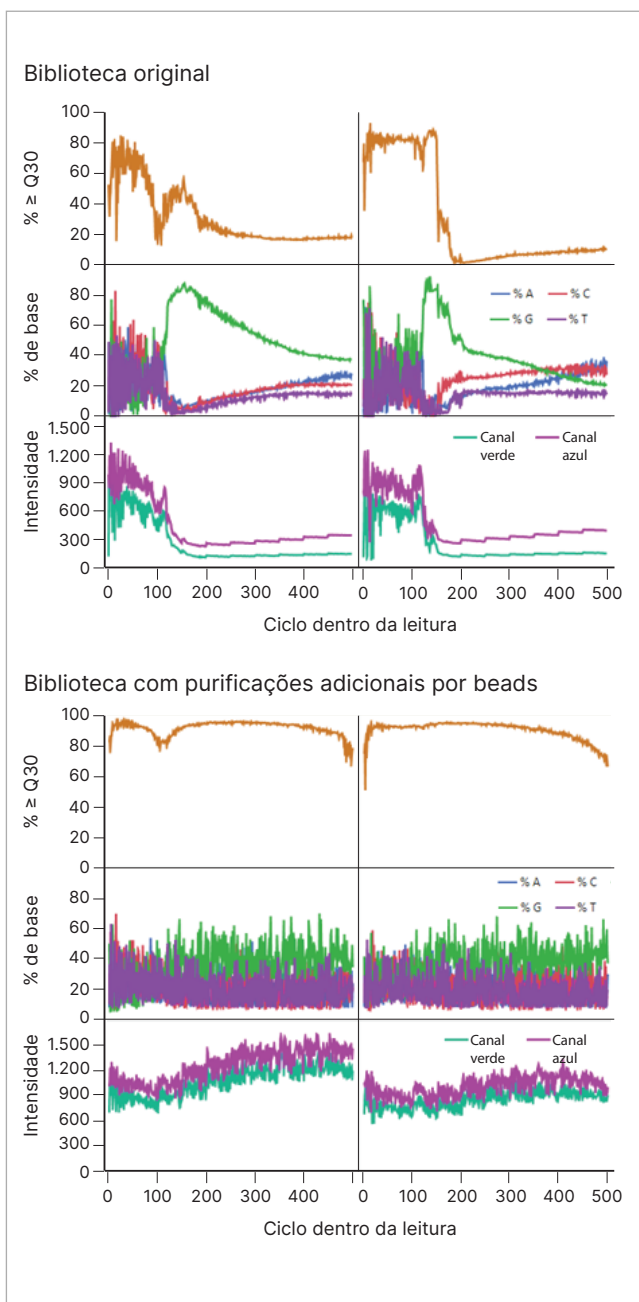


Figura 6: Desempenho de sequenciamento recuperado com a redução de dímeros de adaptadores

O sequenciamento de 2 × 500 bp no MiSeq i100 Series de bibliotecas de amplicons personalizados tratadas com purificações adicionais por beads para reduzir dímeros de adaptadores apresenta melhorias significativas de desempenho, com aumento das pontuações de qualidade e redução do excesso de chamadas de G.

Diversidade de nucleotídeos

A diversidade de nucleotídeos indica a proporção relativa de cada base (A, C, G ou T) presente em cada ciclo da corrida. O equilíbrio de nucleotídeos é importante para a correção da matriz de cores e normalização da intensidade pelo sistema de sequenciamento. O software adaptativo Real-Time Analysis integrado ao MiSeq i100 Series foi desenvolvido cuidadosamente para chamadas de bases precisas em bibliotecas com diversidade baixa. O desempenho ideal do sequenciamento de bibliotecas com diversidade baixa pode ser obtido com um spike-in mínimo de % de PhiX (≥ 5 %) para maximizar o número de leituras de alta qualidade.

Neste exemplo, bibliotecas de amplicon 16S de diversidade baixa com spike-in de PhiX de 5 % e 20 % sequenciadas no MiSeq i100 Series apresentam desempenho completo comparável ao de bibliotecas Illumina DNA Prep humanas de alta diversidade (Figura 7).

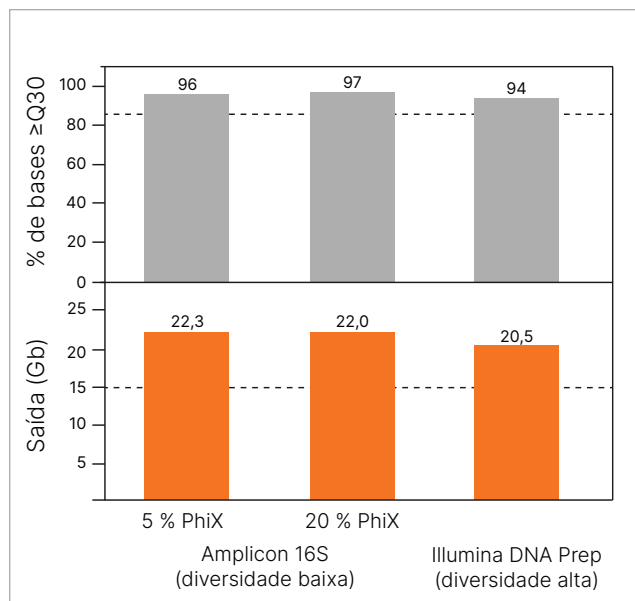


Figura 7: Suporte para bibliotecas com diversidade baixa

O software integrado ao MiSeq i100 Series otimiza o desempenho do sequenciamento para bibliotecas com diversidade baixa, conforme observado por % de bases ≥ Q30 e saída em Gb. Todas as corridas foram sequenciadas com comprimento da leitura de 2 × 301 bp usando o MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles), com linhas tracejadas representando especificações de desempenho.

Resumo

Avanços inovadores em química de sequenciamento e análise de dados integrada no MiSeq i100 Series oferecem maior usabilidade, alta exatidão dos dados e velocidade excepcional. Seguir as melhores práticas descritas nesta nota técnica para avaliar a qualidade da biblioteca, otimizar a concentração de carregamento e fazer o pool de bibliotecas pode maximizar o desempenho no MiSeq i100 Series.

Saiba mais

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



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GI-03322 PTB v2.0