

GUIDA AL MONDO
NGS 4.1





NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Il Next Generation Sequencing è una tecnologia di sequenziamento high-throughput per l'analisi di un altissimo numero di frammenti in parallelo. Esistono diverse piattaforme per la tecnologia NGS, ma con un comune workflow:

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E DELLA LIBRARY DI SEQUENZIAMENTO

Il campione di DNA o RNA, dopo frammentazione meccanica o enzimatica, viene ligato a sequenze adapter per ancorare i frammenti al supporto di sequenziamento. I frammenti ligati costituiscono la "Sequencing Library" (libreria di sequenziamento). È possibile sequenziare interi genomi o frazioni, selezionando le regioni di interesse (Target Enrichment). I geni target possono essere selezionati con diversi metodi:

- **Capture Probes:** specifiche sonde "catturano" i frammenti target, che potranno così essere isolati per il sequenziamento.
- **Amplicon Enrichment:** le sequenze di interesse vengono amplificate con specifici primer in PCR, per arricchire il campione delle regioni target.
- **Capture Library Prep:** è un sistema misto, che prevede la cattura con probe marcate delle regioni target e la successiva amplificazione in PCR.

AMPLIFICAZIONE

La libreria viene amplificata in PCR e la qualità verificata mediante elettroforesi, seguita da selezione e purificazione dei frammenti delle dimensioni adatte per il sequenziamento. Il QC della size selection è fondamentale per garantire la buona riuscita dell'esperimento.

SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento avviene su appositi chip su cui vengono immobilizzate le library. Tutti i frammenti sono sequenziati in parallelo e i dati vengono poi elaborati mediante analisi bioinformatica (alignment, variant calling, filtering e annotation). La tecnologia NGS consente di identificare anche sequenze non annotate, nuovi trascritti e/o miRNA (Discovery).



RNA-SEQ

Il **sequenziamento whole-transcriptome** è possibile dopo deplezione degli RNA ribosomali, che rappresentano l'85-90% dell'RNA totale e possono quindi interferire con l'analisi. Il sequenziamento dei soli mRNA può essere ottenuto con la pre-selezione dei poly-A-RNA.

smallRNA-Seq/miRNA-Seq: il sequenziamento NGS di smallRNA e microRNA consente di ottenere un profilo di espressione qualitativo e/o quantitativo.

Single-Cell/Low Input RNA-Seq: Il sequenziamento di RNA da singole cellule (10-30 pg di RNA totale; 1-5% mRNA) richiede metodi dedicati per la preparazione delle library, idealmente a partire da lisati cellulari senza purificazione dell'RNA.

DNA-SEQ

La tecnologia NGS consente di sequenziare rapidamente interi genomi (**Whole-Genome-Sequencing o WGS**).

L'approccio WGS è tipicamente impiegato per identificare mutazioni/varianti correlate con un determinato fenotipo. È possibile restringere il sequenziamento a Exome Sequencing (analisi delle sole regioni codificanti del genoma) o Target Sequencing (sequenziamento di subset di geni o regioni genomiche).

ChIP-SEQ

Metodo di studio delle interazioni DNA-proteine (fattori di trascrizione, proteine istoniche e modificazioni cromatiniche), per indagarne l'effetto sull'espressione genica. L'immunoprecipitazione della cromatina, con anticorpi contro la proteina di interesse, è seguita dalla Library Prep sui frammenti di DNA immunoprecipitati. È possibile studiare interazioni DNA-Proteina anche con la nuova tecnologia CUT&RUN (**Cleavage Under Target & Release Using Nuclease**) e sottoporre il DNA isolato a Library Prep.

METHYL-SEQ

Il **sequenziamento del metiloma (WGBS)** prevede il trattamento del DNA genomico con bisulfito, che converte le citosine non metilate in uracile: il DNA convertito può essere impiegato come input per la preparazione della library e il successivo sequenziamento (**WGBS**). Un nuovissimo metodo di tipo enzimatico, molto più efficiente, è ora disponibile al posto del classico sistema basato sulla conversione con bisulfito.

04.

SIZE SELECTION

05.

QUANTIFICAZIONE
E QC

06.

NGS E ANALISI
BIOINFORMATICA

01. PREPARAZIONE ACIDI NUCLEICI

BIOFLUIDI ED ESOSOMI

Zymo Research offre una tecnologia basata su spin-columns per l'isolamento di DNA e RNA Cell-Free (cfDNA e cfRNA) circolante. **System Biosciences (SBI)** propone un kit per l'isolamento e la caratterizzazione di esosomi da biofluidi in meno di 2 ore senza ultracentrifugazione. Inoltre, **SBI** offre un kit per l'estrazione simultanea di cfDNA e DNA esosomiale. I kit Sera-Xtracta Cell-Free DNA e Sera-Xtracta Genomic DNA di **Cytiva** utilizzano biglie magnetiche e consentono di purificare cfDNA da plasma e gDNA da sangue intero con sensibilità e rese elevate.

TESSUTI FISSATI E INCLUSI IN PARAFFINA (FFPE)

Zymo Research propone sistemi per l'estrazione di DNA, RNA e smallRNA. Invece, **New England Biolabs (NEB)** supporta il ricercatore con reagenti impiegati per la riparazione di DNA danneggiato (NEBNext® FFPE DNA Repair Mix). I Kit TruXTRAC FFPE sono utilizzati per la rimozione della paraffina ed estrazione di DNA e RNA e sono da abbinare agli ultra-sonicatori di casa **Covaris**.

CELLULE, TESSUTI, PIANTE, AMBIENTE

Un'ampia varietà di kit offerti da **NEB (Monarch)**, **Zymo Research** ed **Euroclone** per l'isolamento di DNA/RNA da diverse matrici (tessuti, cellule, piante, insetti, suolo, ecc.). **NEB** offre diversi kit per l'estrazione di DNA/RNA e Clean-up. I kit Monarch® permettono di estrarre RNA fino a 100 µg ad elevata purezza. Invece, per il Clean-up consentono di recuperare oltre il 70% dell'RNA. Il kit **Zymo Research** Quick-DNA HMW MagBead purifica in modo efficiente DNA ad elevato peso molecolare da ogni tipo di campione. Il DNA purificato è compatibile con il sequenziamento long-read che caratterizza le piattaforme Oxford Nanopore Technologies e PacBio SMRT. **MGI, Euroclone** e **Zymo Research** offrono diversi kit per l'estrazione (manuale o automatizzata) di RNA virale.

Euroclone offre diversi kit per l'estrazione degli acidi nucleici:

EUROCLONE SpinNAker PLASMID DNA MINIPREP KIT

Sistema in formato spin-column per l'isolamento efficiente e veloce di DNA plasmidico da colture batteriche.

EUROCLONE SpinNAker UNIVERSAL GENOMIC DNA MINI KIT

Sistema in formato spin-column per l'estrazione di DNA genomico di altissima qualità da una grande varietà di matrici come colture cellulari, tessuti solidi, fluidi biologici, sangue fresco o congelato, etc.

EUROGOLD TRIFAST NUCLEIC ACIDS ISOLATION REAGENT

Reagente in soluzione liquida e pronto all'uso per l'estrazione di RNA, DNA e proteine dallo stesso campione, utilizzabile su una grande varietà di matrici di partenza.

EUROCLONE SPINNAKER GEL&PCR DNA PURIFICATION KIT

Sistema in formato spin-column per la purificazione rapida di frammenti di DNA da gel di agarosio o da mix di reazione.

MICROBIOMA

NEB offre un sistema per l'arricchimento di DNA microbico da campioni contenenti DNA ospite metilato (compreso l'uomo) che mantiene inalterata la biodiversità microbica. **Zymo Research** presenta la linea dei prodotti ZymoBIOMICS™ per la purificazione di DNA/RNA e un pacchetto di standard microbici unici.

mRNA

I Kit NEBNext® per la purificazione di mRNA poly (A) mediante biglie magnetiche.

rRNA DEPLETION

NEB offre kit per la rimozione di RNA ribosomale (80% dell'RNA totale) in esperimenti di RNA-Seq anche in presenza di RNA scarso o degradato. Per la deplezione di rRNA **Zymo Research** propone il kit **Zymo-Seq RiboFree**, kit in grado di produrre cDNA a singolo filamento utilizzando varie tipologia di RNA e partendo da qualsiasi tipo di campione.

ChIP E CUT&RUN

Cell Signaling Technology (CST) fornisce kit SimpleChIP® per la digestione enzimatica o sonicazione della cromatina, anticorpi validati per la ChIP e relativi primer di controllo. In alternativa **CST** offre il kit CUT&RUN. Il kit consente di isolare complessi DNA-proteina di interesse utilizzando un anticorpo primario specifico per il target e una Protien A protein G Micrococcal Nuclease (pAG-MNase). I vantaggi di questa metodica sono: possibilità di usare bassa quantità del campione (10⁵ cellule), un workflow veloce (1-2 giorni), bassi costi di sequenziamento (3-5 milioni di read ad elevata qualità).

PHI29 WHOLE GENOME AMPLIFICATION

Cytiva fornisce un sistema per amplificare piccole quantità di gDNA full-length fino a produrre µg di DNA, utilizzabili per NGS ed altre applicazioni.

IMPLEN NANOPHOTOMETER®

Gli spettrofotometri UV-Vis Implen misurano in modo semplice e veloce campioni di DNA/RNA in microvolumi e presentano una serie di innovazioni: lettura dei campioni in formato di microgoccia (fino a 0,3 µl) grazie alla tecnologia brevettata **Thru Path Technology™**; elevata velocità di lettura (1,7 sec); sistema di allerta bolle Sample Control™; sistema Blank Control™; nessuna necessità di ricalibrazione; software conforme alle normative 21 CFR part 11; possibilità di condurre studi cinetici su microvolumi. Gli spettrofotometri Implen sono disponibili in diversi modelli: N120 (12 campioni), NP80 (con cuvetta), N60 e N50.



02. FRAMMENTAZIONE

NEBNext® dsDNA FRAGMENTASE®

Frammentazione di dsDNA, tempo-dipendente per generare frammenti con overhang 5'-P e 3'-OH di 50-1.000 bp. Efficienza comparabile con i "sistemi meccanici" e possibilità di automazione.

NEBNext® ULTRA™ II FS DNA LIBRARY PREP

Questi kit, di casa **NEB** includono un innovativo modulo di frammentazione tollerante agli inibitori.

ULTRASONICATORI

Covaris, azienda leader del settore, offre una gamma completa di strumenti per la frammentazione del DNA. 1-96 campioni processabili con la tecnologia brevettata AFA™ (Adaptive Focused Acoustics) implementabile in automazione sui modelli di alta gamma (Serie E e LE).



03. LIBRARY PREP

NEW ENGLAND BIOLABS, MGI, ZYMO RESEARCH E PARAGON GENOMICS

NEB propone kit NEBNext® per NGS Library Prep (Illumina® e Ion Torrent™), per DNA-Seq, RNA-Seq (direzionale e non), smallRNA-Seq, ChIP-Seq, da minime quantità (500 pg di DNA, 5 ng di RNA), Enzymatic Methyl-Seq (10-200 ng di gDNA) compatibili con automazione. **Zymo Research** offre kit per Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) e 5-hmC genome-wide a partire rispettivamente da 10 pg e 100 ng di DNA. Sono inoltre disponibili kit per preparazione di library dell'rRNA 16S da ≤ 20 ng/μl e per RRBSseq da 10-500 ng di gDNA. **MGI** propone soluzioni complete per tecnologia DNBSEQ™ (CoolIMPS), inclusi i kit per Whole Exome Sequencing (Capture Probe Set V4 e V5). I kit sono compatibili con un'ampia gamma di campioni: RNA a bassa qualità, FFPE RNA e campioni di plasma. La nuova tecnologia di New England Biolabs basata sul metodo **ARTIC** è basata sul multiplexing di ampliconi ed è in grado di coprire e sequenziare l'intero genoma virale del SARS-CoV-2: I kit sono pronti all'uso; compatibili con piattaforme Illumina® e Oxford Nanopore Technologies®; kit ad elevata sensibilità (è possibile partire da 5 ng di RNA); primer bilanciati e possibilità di frammentazione meccanica ed enzimatica. Il kit è adatto ad analisi di metatrascrittomica (epidemiologia, diagnostica e analisi di metagenomica).

Paragon Genomics offre Pannelli NGS custom e pre-disegnati per tantissime applicazioni (BRCA1/2, SARS-CoV-2, ecc) e per tutte le piattaforme di sequenziamento.

SINGLE CELL/LOW INPUT LIBRARY PREP

I kit/moduli NEBNext® sono utilizzabili a partire da cellule isolate o da RNA totale (2 pg - 200 ng), utilizzando il metodo "template-switching" in grado di generare abbondanti quantità di trascritti full-length. Le rese tipiche di cDNA sono di 5-15 ng.

TARGET ENRICHMENT

NEBNext Direct®: pannelli pre-disegnati (Cancer HotSpot, BRCA1/2, CFTR) e custom, basati su un sistema misto di cattura delle sequenze target con sonde biotinilate e successiva amplificazione in PCR (input 10 ng - 1 μg DNA). Il coverage è ottimizzato, indipendente dalla % GC e adatto anche per campioni critici (es. FFPE). Le sequenze UMI identificano i falsi positivi per Copy Number Variation (CNV) o mutazioni. Il kit NEBNext Direct® Genotyping Solution (25-100 ng di DNA) utilizza il metodo "hybridization-based enrichment", seguito da amplificazione e aggiunta di pool di index per produrre il filamento per il sequenziamento finale.

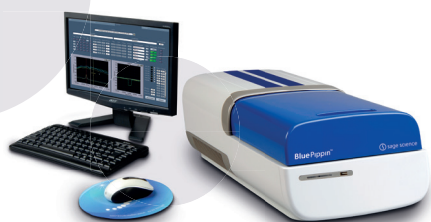
04. SIZE SELECTION

SERA-MAG™ SELECT

Cytiva offre le biglie magnetiche Sera-Mag™ Select: una soluzione flessibile per il clean-up del DNA e per la size-selection in un unico reagente pronto all'uso. Si basano sulla nota tecnologia SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) e assicurano risultati ottimali in tutti i protocolli, sia manuali che automatizzati.

SAGE SCIENCE PIPPIN PREP, BLUE PIPPIN E HT

Sistemi automatizzati per size selection da 90 bp a 1,5 kb e 90 bp - 50 kb. Raccomandato da Agilent, Illumina®/Ion Torrent™ e da PacBio/Oxford Nanopore Technologies per NGS di terza generazione. Disponibile anche in versione HT.



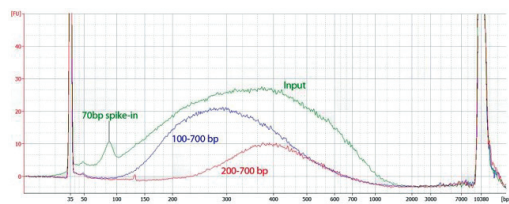
LONZA FLASH GEL SYSTEM



Sistema elettroforetico per la purificazione di frammenti di DNA senza necessità di excisione delle bande in 5-10 min. Recupero: 80-100%.

SELECT-A-SIZE:

Metodo facile e veloce (7 min) per la purificazione di frammenti di DNA di dimensioni ≥ 300 bp, ≥ 200 bp, ≥ 150 bp, ≥ 100 bp, ≥ 50 bp, fornito da **Zymo Research**.



La tecnologia **Select-A-Size** di **Zymo Research** è in grado di selezionare diversi range di frammenti: 50-700; 100-700; 150-700 e 200-700 bp. Nel grafico, l'intervallo di DNA è stato selezionato in base al protocollo e i risultati sono stati analizzati impiegando un analizzatore di frammenti (dil 1:20). Campione (DNA da sperma di salmone) = 700 ng. Un Input Standard (amplicone di 70 bp) è stato usato per valutare l'efficienza e il cutoff della size-selection.

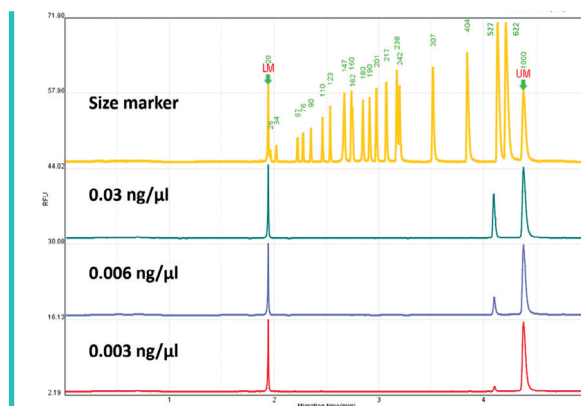
05. QUANTIFICAZIONE E QC

BIOPTIC Qsep FRAGMENT ANALYZER

Bioptic propone sistemi per analisi rapida e accurata di smear di library NGS, frammenti di DNA, gDNA/gRNA e proteine. La tecnologia innovativa CGE, basata su cartucce facilmente intercambiabili, garantisce la massima flessibilità operativa (1-96 campioni). Disponibile in 3 versioni con diverso throughput (Qsep₁, Qsep₁₀₀, Qsep₄₀₀).



Diversi tipi di cartucce, facilmente intercambiabili, disponibili per tutte le applicazioni: DNA, RNA e proteine.



Elevata sensibilità. Cartuccia: S1; Campione: Size Marker BOPC109200 + prodotto PCR da 500 bp.

NEBNext® LIBRARY QUANT KIT

Sistema ad alta sensibilità per la quantificazione di library NGS Illumina mediante qPCR. Il Kit contiene primer per gli adaptor Illumina P5 e P7 e standard per la quantificazione tra 150 e 1000 bp (NEBioCalculator.neb.com)

LETTORI A FLUORESCENZA BMG LABTECH

Strumenti in grado di quantificare fluorofori intercalanti nel dsDNA (50-100 ng/μl) in piastre da 96 pozzetti.



SEQUENZIATORI NGS MGI TECH

L'innovativa gamma di strumenti **MGI** per Next Generation Sequencing è basata sulla tecnologia **DNBSEQ™**, caratterizzata da 3 passaggi che la rendono unica:

- **DNA Nanoball (DNB):** un *sscirDNA* è amplificato, mediante **rolling cycle amplification (RCA)** che consente di ridurre gli errori causati dalla PCR e il fenomeno dell'Index Hopping (<0.0004%);
- **Patterned Array:** le DNB sono caricate su apposite Flow Cell;
- **CPAS (combinatorial Probe Anchor Synthesis):** le DNB vengono sequenziate mediante tecnologia brevettata CoolMPS™ basata su anticorpi fluorescenti in grado di riconoscere i terminatori A, G, C, T che consente migliore rapporto **Signal to Noise**.

I sequenziatori MGI sono disponibili nei seguenti modelli:

DNBSEQ™-T7

Sequenziatore ultra-high throughput per il sequenziamento genomico su larga scala:

- Output: 1-6 Tbasi di dati ad elevata qualità in sole 24 ore (PE150): 60 genomi, 256-400 esomi, 400 trascrittomi
- Read massime/Flow Cell: 5000M

DNBSEQ™-G400

Sequenziatore veloce ad elevata flessibilità:

- Output: 55-1440 Gbasi per corsa
- Read massime/Flow Cell: 1500-1800M
- Alloggia 2 Flow Cell indipendenti (FCL - 4 lane; FCS - 2 lane)
- 330 Gbasi (PE150) in 37 ore; 1080 Gbasi (PE150) in 78 ore.

DNBSEQ™-G50

Sequenziatore di routine:

- Output: 15-150 Gbasi per corsa
- Read massime/Flow Cell: 100-500M
- 2 Flow Cell disponibili (FCL; FCS)
- 20 Gbasi (PE100) in 28 ore; 100 Gbasi (PE100) in 45 ore.

Tutti i sistemi MGI sono disponibili anche in versione CE-IVD e compatibili con la tecnologia Single tube Long Fragment Read (stLFR), per analisi di frammenti lunghi. MGI offre anche workstation per la preparazione dei campioni in automazione (MGISP-100 e MGISP-960).

Il software **MGI Pathogeny Fast Identification (PFI)** ha i seguenti vantaggi:

- Database di 25.000 genomi microbici per screening massivo (incluso hCOV-2)
- Rilevazione di patogeni co-infettanti
- Informazioni sul genoma Full-length

I prodotti e gli strumenti MGI sono stati utilizzati per sequenziare il SARS-CoV-2 [Prof Roujian Lu, Xiang Zhao, et al Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding The Lancet, Volume 395, issue 10224, 565 - 574 February 22,2020].

Zymo Research offre diversi servizi di sequenziamento:

- Analisi genome-wide della metilazione e idrossimetilazione del DNA (Methyl-MiniSeq, Methyl-MaxiSeq, Classic RRBS, RRHP)
- Analisi della metilazione del DNA in regioni target (MethylCheck™), ChIP-Seq, ATAC-Seq
- Sequenziamento di RNA (RNA-Seq, miRNA-Seq)
- Analisi del microbioma (16S rRNA gene sequencing)

Euroclone offre su richiesta Servizi di Analisi Bioinformatica per

- RNA-Seq (QC, mappaggio, annotazione)
- Single Cell RNA-Seq (QC, cluster, marcatori)
- Genomica funzionale

Contattaci per maggiori informazioni.



DNBSEQ™-T7



DNBSEQ™-G400



DNBSEQ™-G50

	CODICE	DESCRIZIONE	FORMATO
Exoquick e Exoquick - TC System Biosciences Purificazione di esosomi da fluidi biologici (250 µl di siero, 5 ml di urine)	SBEXOQ5A1 SBEXOQ20A1	ExoQuick serum exosome precipitation solution	5/20 ml
	SBEXOTC10A1 SBEXOTC50A1	ExoQuick-TC	10/50 ml
Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Zymo Research Kit Specifico per isolamento di cell free DNA da biofluidi	ZYD4076	Quick-cfDNA™ Serum & Plasma	50 preps
Sera-Xtracta Cell-Free DNA Kit Cytiva Kit per l'estrazione e la purificazione di cfDNA dal plasma	GEH29437807	Sera-Xtracta Cell-Free DNA Kit	96 preps
SpinNAker Euroclone Kit per l'estrazione di acidi nucleici	EMR600050/250	Euroclone SpinNAker Plasmid DNA Miniprep Kit	50/250 preps
	EMR603050/250	Euroclone SpinNAker Universal Genomic DNA Mini Kit	50/250 preps
	EMR602050/250	Euroclone SpinNAker Gel&Pcr DNA Purification Kit	50/250 preps
	EMR507100/200	Eurogold Trifast Nucleic Acids Isolation Reagent	100/200 ml
ZR FFPE DNA MiniPrep™ Zymo Research Isolamento di DNA di alta qualità da un massimo di -25 µg/prep. Tecnologia "cutoff" per recupero di DNA >50 bp o >500 bp	ZYD3065/66	ZR FFPE DNA MiniPrep™	50/200 preps
Sera-Mag Select Cytiva Biglie magnetiche per il clean-up del DNA e per la size-selection in un unico reagente pronto all'uso	GEH29343045	Sera-Mag Select	5 ml
	GEH29343052		60 ml
Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ Kit (Select-a-Size DCC™) Zymo Research Sistema versatile per la separazione manuale di frammenti di DNA	ZYD4080	Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™	25 preps
NEB Monarch® New England Biolabs Kit per l'estrazione di acidi nucleici	BT20105	Monarch® Total RNA Mini Kit	50 preps
	BT2030S/L	Monarch® RNA Clean up Kit (10 µg)	10/100 preps
	BT2040S/L	Monarch® RNA Clean up Kit (50 µg)	10/100 preps
	BT2050S/L	Monarch® RNA Clean up Kit (500 µg)	10/100 preps
Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Zymo Research Isolamento di cell free RNA da biofluidi	ZYR1059	Quick-cfRNA™ Serum & Plasma	50 preps
NEBNext® FFPE DNA Repair Mix New England Biolabs	M6630S/L	NEBNext® FFPE DNA Repair Mix	24/96 rxns
NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit New England Biolabs	BE2612S	NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit	6 rxns
NEBNext® rRNA Depletion Kit New England Biolabs	BE6310S/L/X	NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat)	6/24/96 rxns
NEBNext® Quant Kit New England Biolabs Kit per quantificazione Library	E7630S/L	NEBNext® Library Quant Kit for Illumina	100/500 rxns
CUT&RUN Cell Signaling Technology Metodo in vivo (non necessita di fissazione) per isolare i complessi proteina-DNA d'interesse	BK86652S	CUT&RUN Assay Kit	1 Kit
Kit SimpleChIP® Plus di Cell Signaling Technology Kit per la digestione enzimatica o sonicazione della cromatina	BK56383S	SimpleChIP® Plus Sonication Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	1 Kit
	BK9005S	SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	1 Kit