

# iSeq™ 100 Sequencing System

Il sistema di sequenziamento  
Illumina più piccolo e  
conveniente

- Sistema economico per operazioni indipendenti
- Generazione rapida dei dati con tempi di elaborazione veloci
- Eccezionale accuratezza dei dati per un'elevata sensibilità
- Conveniente valutazione della qualità della libreria e test "proof of principle"

**illumina**®

## Introduzione

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) è più facile e accessibile con l'Illumina iSeq 100 System (Figura 1). L'iSeq 100 System unisce la tecnologia CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) con la comprovata accuratezza della chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) Illumina per offrire dati altamente accurati con rapidi tempi di elaborazione. L'iSeq 100 System genera un output minimo di 1,2 Gb di dati per corsa in 19 ore e offre l'elevata risoluzione e la sensibilità analitica necessarie per il rilevamento di varianti e trascritti rari.<sup>1,2</sup>

Pur essendo di ingombro ridotto, l'iSeq 100 System offre grossi vantaggi. Consente corse rapide e su scala ridotta, a costi contenuti, senza la necessità di sistemi più grandi. Con un iSeq 100 System in laboratorio, i ricercatori possono eseguire corse quando vogliono, senza dover aspettare di raggiungere lotti di dimensioni ottimali per sistemi a maggiore processività e senza il bisogno di esternalizzare. Inoltre, i ricercatori possono gestire il processo di sequenziamento dall'inizio alla fine, con maggiore sicurezza sull'integrità del campione e sui risultati dell'analisi dei dati. Con un prezzo di listino accessibile praticamente a qualsiasi laboratorio, l'iSeq 100 System offre una soluzione conveniente per l'NGS indipendente e su scala ridotta.

## Flusso di lavoro ottimizzato in tre fasi

L'iSeq 100 System fa parte di un flusso di lavoro ottimizzato in tre fasi che comprende la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati (Figura 2).



Figura 1: iSeq 100 System. Sfrutta l'efficacia dell'NGS nel più compatto ed economico sistema di sequenziamento da banco della gamma Illumina.

## Preparazione rapida delle librerie

L'iSeq 100 System è compatibile con tutta la serie dei kit di preparazione delle librerie Illumina. Con il Nextera™ XT Kit e l'Illumina DNA Prep Library Kit, i ricercatori possono preparare librerie in multiplex in 3-4 ore per il sequenziamento di piccoli genomi e il sequenziamento diretto di ampliconi long-range. Inoltre, AmpliSeq™ for Illumina Targeted Resequencing Solution offre contenuti progettati da esperti in pannelli fissi pronti all'uso, pannelli progettati dalla comunità o pannelli personalizzati per soddisfare specifiche esigenze di ricerca. A seconda del kit, i kit di preparazione delle librerie Illumina richiedono appena 1 ng di DNA o RNA (cDNA) di input e hanno la flessibilità necessaria per adattarsi al DNA estratto da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin Fixed, Paraffin Embedded), quali tessuti tumorali conservati.



Figura 2: l'iSeq 100 System fa parte di un flusso di lavoro ottimizzato da DNA a dati.

## Sequenziamento sull'iSeq 100 System

Dopo la preparazione delle librerie, le librerie a doppio filamento vengono caricate in una cartuccia di reagenti scongelata e preimpilata e caricata nell'iSeq 100 System. L'avvio di una corsa richiede lo scongelamento, il caricamento e l'avvio e solo cinque minuti in totale di interventi manuali. L'iSeq 100 System integra in un unico strumento le fasi di denaturazione delle librerie, l'amplificazione clonale, il sequenziamento e l'analisi dei dati, eliminando così la necessità di acquistare apparecchiature accessorie. L'intuitiva interfaccia utente mostra istruzioni per ogni fase dell'impostazione della corsa e dei processi di avvio corsa, consentendo ai ricercatori di eseguire varie applicazioni di sequenziamento con una minima formazione e tempi di impostazione ridotti.

### Sensibilità analitica e accuratezza elevate grazie alla tecnologia SBS

L'iSeq 100 System utilizza la comprovata tecnologia SBS di Illumina per fornire dati di alta qualità con più dell'80% delle basi a Q30 o superiore (Tabella 1, Figura 3). Questo metodo basato su terminatori reversibili rileva le singole basi a mano a mano che vengono incorporate in filamenti di DNA in estensione e consente il sequenziamento in parallelo di milioni di frammenti di DNA. La chimica SBS di Illumina utilizza la competizione naturale su tutti i quattro nucleotidi marcati, il che riduce le distorsioni dovute all'incorporazione e consente un sequenziamento più accurato di regioni ripetitive e omopolimeri.<sup>4</sup> Rispetto al sequenziamento Sanger basato sull'elettroforesi capillare, la tecnologia NGS è in grado di rilevare una gamma più ampia di varianti del DNA, incluse le varianti di bassa frequenza e le varianti adiacenti sottoposte a determinazione delle fasi (phasing), il che permette di ottenere risultati più veloci e di eseguire meno fasi manuali.

Tabella 1: parametri delle prestazioni dell'iSeq 100 System<sup>a</sup>

Configurazione corsa <sup>b</sup>	Lecture PF/corsa	Output	Punteggi qualitativi <sup>c</sup>	Durata <sup>d</sup>
1 × 36 bp	4 milioni	144 Mb	>85%	Circa 9,5 ore
1 × 50 bp	4 milioni	200 Mb	>85%	Circa 10 ore
1 × 75 bp	4 milioni	300 Mb	>80%	Circa 11 ore
2 × 75 bp	4 milioni	600 Mb	>80%	Circa 14 ore
2 × 150 bp	4 milioni	1,2 Gb	>80%	Circa 19 ore

a. I parametri delle prestazioni possono variare in base al tipo di campione, alla qualità del campione e ai cluster che attraversano il filtro (PF, passing filter).

b. Queste sono le configurazioni comuni dell'iSeq 100 i1 Reagents v2 (300 cycle) Kit.

c. La percentuale di basi con punteggio qualitativo superiore a Q30 rappresenta la media su un'intera corsa.

d. La durata comprende generazione di cluster, sequenziamento, identificazione delle basi e punteggio qualitativo.

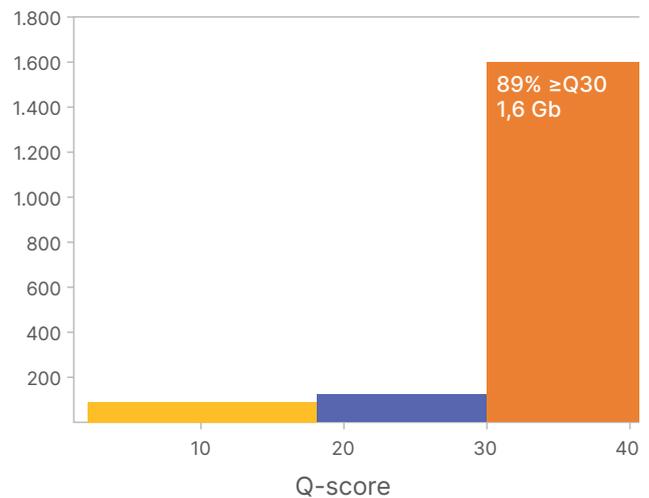


Figura 3: punteggi qualitativi dell'iSeq 100 System. Un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione delle probabilità di errore nell'identificazione delle basi. Un punteggio Q-score di 30 (Q30) è ampiamente considerato un benchmark per i dati di alta qualità.<sup>3</sup> Una corsa del pool microbico sull'iSeq 100 System a 2 × 151 bp fornisce oltre l'89% di basi a un valore superiore o pari a Q30.

### Chimica SBS a un canale, estremamente innovativa

L'iSeq 100 System utilizza la comprovata chimica SBS Illumina su una cella a flusso preconfigurata (patterned) con nanocelle prefabbricate su un chip CMOS per offrire la chimica di sequenziamento a un canale. Nei nano-pozzetti, allineati direttamente su ogni fotodiodo CMOS (pixel), si verificano la generazione di cluster e il sequenziamento. La chimica brevettata ExAmp verifica che per ogni nano-pozzetto si formi un solo cluster. L'impiego di un sensore CMOS integrato nel materiale di consumo è un metodo di rilevamento semplice e rapido.

La chimica SBS a un canale utilizza un colorante, due fasi della chimica e due immagini per sequenziare un ciclo (Figura 4). I nucleotidi vengono identificati tramite l'analisi dei diversi schemi di emissione per ogni base attraverso le due immagini. L'adenina presenta una marcatura rimovibile ed è marcata solo nella prima immagine. La citosina presenta un gruppo legante che si lega a una marcatura ed è marcata solo nella seconda immagine. La timina presenta una marcatura fluorescente ed è dunque marcata in entrambe le immagini, mentre la guanina è sempre scura (non marcata).



Per maggiori informazioni sulla chimica SBS a un canale consultare la [nota tecnica Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry](#).

### Analisi dei dati semplice e flessibile

L'iSeq 100 System offre numerose opzioni per l'analisi dei dati, comprese le soluzioni basate su cloud e sullo strumento. Local Run Manager è un software di analisi completamente integrato nello strumento che presenta un'architettura modulare per supportare saggi attuali e futuri. Local Run Manager supporta la pianificazione delle corse di sequenziamento, il monitoraggio delle librerie e delle corse mediante audit trail, nonché l'integrazione grazie a moduli di analisi dei dati integrati sullo strumento. Mentre Local Run Manager viene eseguito sul computer dello strumento, l'utente può monitorare l'avanzamento della corsa e visualizzare i risultati dell'analisi da computer remoti collegati alla medesima rete. Al termine di una corsa di sequenziamento, Local Run Manager avvia automaticamente l'analisi dei dati utilizzando uno dei moduli di analisi specifico per l'applicazione. I moduli possono generare dati di allineamento e individuare varianti di singolo nucleotide (SNV, Single-Nucleotide Variant), varianti strutturali, eseguire analisi di espressione e di piccolo RNA e altro ancora (Tabella 2).

In alternativa, i dati del sequenziamento possono essere immediatamente trasferiti, analizzati e archiviati in BaseSpace™ Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico su cloud di Illumina. Visti i formati di dati standard nel settore, sviluppatori terzi hanno creato un ricco ecosistema di applicazioni commerciali e open source in BaseSpace Sequence Hub per l'analisi dei dati a valle. Tali applicazioni forniscono algoritmi automatizzati per l'intero genoma, l'esoma e il trascrittoma, e dati di rifequenziamento mirato per l'allineamento, il rilevamento di varianti, l'annotazione, la visualizzazione e altro ancora.

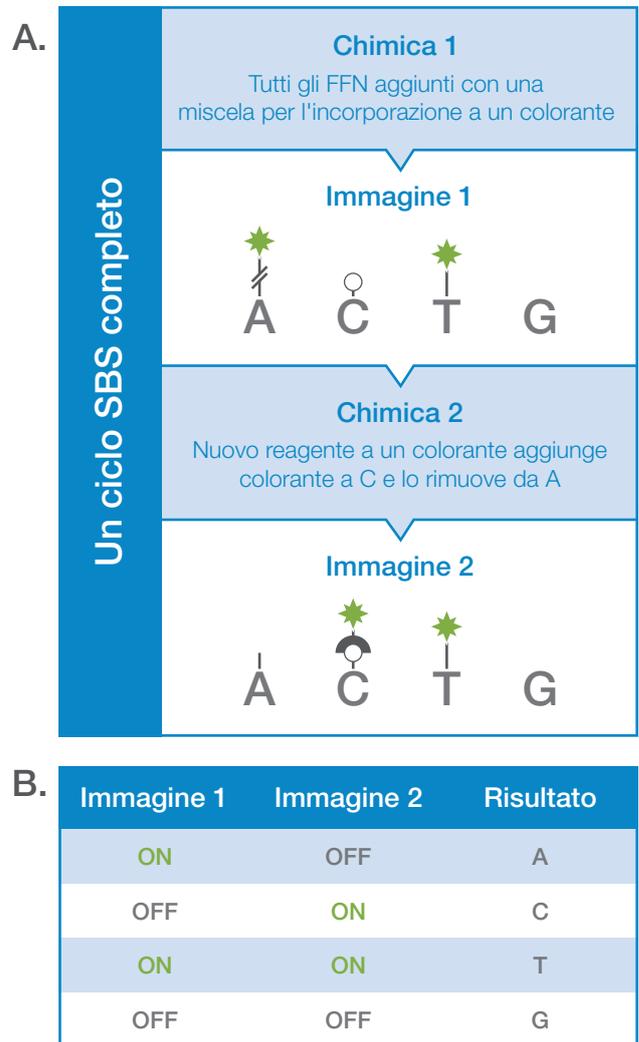


Figura 4: chimica SBS a un canale. (A) La chimica SBS a un canale prevede due fasi di chimica e due di imaging per ciclo di sequenziamento usando nucleotidi che possono essere etichettati o non etichettati in base alla fase chimica. (B) L'identificazione delle basi è determinata dallo schema di segnale tra entrambe le immagini.

## Ampia gamma di applicazioni

Con un output minimo di 1,2 Gb per la massima lunghezza di lettura supportata, l'iSeq 100 System offre un sequenziamento rapido in multiplex per un'ampia gamma di applicazioni:

- Sequenziamento dell'intero genoma piccolo
- Risequenziamento mirato
  - Risequenziamento mirato AmpliSeq for Illumina
  - PCR long-range
- Sequenziamento *de novo*
- Validazione della mutagenica
- Metagenomica (sequenziamento dell'rRNA 16S)
- Sequenziamento mirato di mRNA
- Sequenziamento di RNA piccolo
- Valutazione multigenomica
- Tipizzazione basata su sequenza dell'antigene leucocitario umano (HLA, Human Leukocyte Antigen)

Tabella 2: esempi di applicazioni e configurazioni della corsa

Applicazione	Campioni/corsa	Durata corsa
<b>Sequenziamento genoma piccolo</b> Genomi da 5-10 Mb, copertura 30x, 2 × 150 bp	1-8	Circa 19 ore
<b>Profilo dell'espressione genica mirata</b> Fino a 500 target 1 × 50 bp	1-48	Circa 9,5 ore
<b>Sequenziamento mirato dell'amplicone</b> Fino a 3.000 ampliconi 2 × 150 bp	1-48	Circa 19 ore

## Riepilogo

Pur essendo lo strumento più piccolo della gamma Illumina, l'iSeq 100 System garantisce grossi vantaggi. Rispetto a sistemi di sequenziamento più grandi o all'esternalizzazione, l'iSeq 100 System consente corse su scala ridotta più rapide e più convenienti in termini economici, l'indipendenza dall'esternalizzazione e il controllo del processo di sequenziamento dall'inizio alla fine. Inoltre, facendo parte di una soluzione completa che comprende una serie di kit di preparazione delle librerie, il sequenziamento e una semplice analisi dei dati, l'iSeq 100 System consente un flusso di lavoro completamente supportato e integrato. Grazie al prezzo accessibile e all'ingombro ridotto, l'iSeq 100 System offre le potenzialità della tecnologia NGS praticamente in tutti i laboratori, praticamente con qualsiasi budget.

## Maggiori informazioni

[iSeq 100 Sequencing System](#)

[Applicazioni per iSeq System](#)

## Bibliografia

1. Precone V, Monaco VD, Esposito MV, et al. [Cracking the Code of Human Diseases Using Next-Generation Sequencing: Applications, Challenges, and Perspectives](#). *Biomed Res Int*. 2015;161648. doi:10.1155/2015/161648.
2. Shokralla S, Porter TM, Gibson JF, et al. [Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform](#). *Sci Rep*. 2015;5:9687. doi:10.1038/srep09687.
3. Illumina. [Quality Scores for Next-Generation Sequencing](#). [illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](#). Pubblicato nel 2011. Consultato il 2 febbraio 2023.
4. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456(7218):53–59. doi:10.1038/nature07517.

## Specifiche dell'iSeq 100 System

Parametro	Specifica
Configurazione dello strumento	Monitoraggio RFID dei materiali di consumo
Computer di controllo dello strumento (interno)	Unità base: Celeron J1900, 2 GHz, CPU Quad Core Memoria: 8 GB di RAM Disco rigido: SSD da 240 GB Sistema operativo: Windows 10 IoT Enterprise
Ambiente operativo	Temperatura: da 15 °C a 30 °C (22,5 °C ±7,5 °C) Umidità: 20%-80% di umidità relativa senza condensa Altitudine: inferiore a 2.000 m Qualità dell'aria: grado di inquinamento II Ventilazione: fino a 2.048 BTU/ora a 600 W Per uso esclusivo in interni
Diodo a emissione luminosa (LED)	520-530 nm, 1,5 W/cm <sup>2</sup> al piano dell'immagine
Dimensioni	L × P × A (monitor sollevato): 30,5 cm × 33 cm × 42,5 cm Peso: 16 kg Peso con imballaggio: 21 kg
Requisiti di alimentazione	100-240 V c.a. a 50/60 Hz 80 W
Identificazione a radio frequenza (RFID)	Frequenza: 13,56 MHz Potenza: corrente fornita 120 mA, potenza di output RF 200 mW
Sicurezza e conformità del prodotto	Certificato secondo IEC da un NRTL (Nationally Recognized Testing Laboratory) Marcatura 61010-1 CE Approvato FCC/IC

a. Specifiche del computer soggette a modifica.

## Informazioni per gli ordini

Sistema	N. di catalogo
iSeq 100 Sequencing System	20021535
Kit di reagenti per il sequenziamento	N. di catalogo
iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle)	20031371
iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle) 4 pack	20031374
iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle) 8 pack	20040760



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00456 ITA v2.0