

EuroClone: guida al Next-Generation Sequencing

Next Generation Sequencing (NGS)

Il Next Generation Sequencing è una tecnologia high-throughput che consente di analizzare un altissimo numero di frammenti in parallelo. Esistono diverse piattaforme dedicate alla tecnologia NGS, che condividono tre passaggi fondamentali:

Preparazione del campione e della library di sequenziamento

Il campione di DNA o RNA purificato viene frammentato meccanicamente o con specifici enzimi, e successivamente ligato a sequenze adapter, necessarie per ancorare e immobilizzare i frammenti al supporto di sequenziamento. I frammenti ligati costituiscono la cosiddetta "sequencing library" (libreria di sequenziamento).

Amplificazione

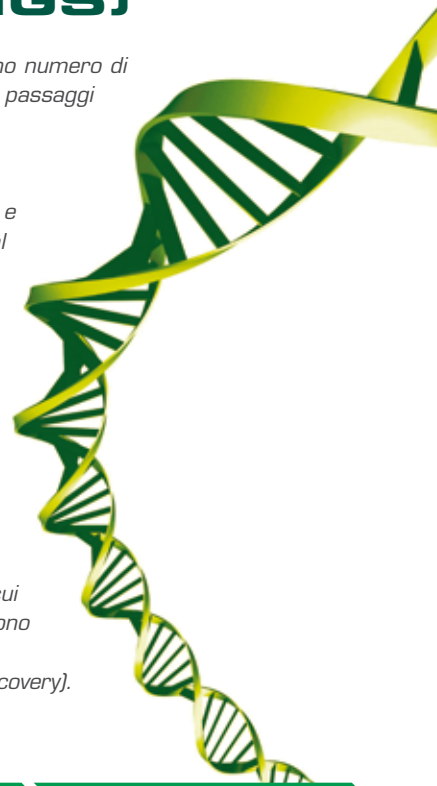
La library viene amplificata mediante PCR e la qualità viene verificata mediante corsa elettroforetica, seguita dalla selezione e purificazione dei frammenti delle dimensioni corrette per procedere al sequenziamento. Il QC della size selection è estremamente importante per garantire la buona riuscita dell'esperimento.

Sequenziamento

Il sequenziamento avviene grazie a sistemi fluidici su cui vengono immobilizzate le library.

Tutti i frammenti vengono analizzati in parallelo (a differenza del sequenziamento Sanger tradizionale, in cui si può analizzare un solo frammento per volta). Una volta completata la reazione di sequencing, i dati vengono processati 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).



Isolamento e QC acidi nucleici

Biofluidi

Sistemi Exiqon dedicati all'estrazione di smallRNA da biofluidi (siero, plasma, urine, CSF). Tecnologia Zymo Research per l'isolamento di DNA cell-free circolante.

Tessuti fissati e inclusi in paraffina (FFPE)

Sistemi di estrazione di DNA (Zymo Research), RNA e smallRNA (Exiqon) e reagenti per la riparazione di DNA danneggiato (NEBNext FFPE DNA Repair Mix).

Esosomi

Isolamento e caratterizzazione di esosomi da biofluidi in meno di 2 ore senza ultracentrifugazione (Exiqon e System Biosciences).

Cellule, tessuti, piante, ambiente

Un'ampia varietà di kit offerti da Zymo Research, Exiqon ed EuroClone per isolamento di DNA/RNA da una infinita varietà di matrici (tessuti, cellule, piante, insetti, suolo, ecc...).

Microbioma

New England Biolabs offre un sistema di arricchimento di DNA microbico da campioni misti contenenti DNA ospite metilato (compreso l'uomo), mantenendo inalterata la biodiversità microbica.

mRNA

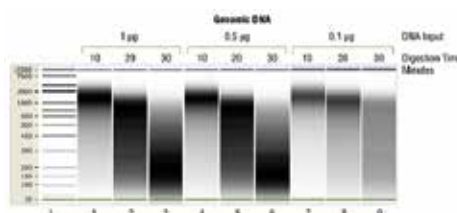
Kit NEBNext® per la purificazione di mRNA poly(A)+ mediante biglie magnetiche.



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.



Library Prep

NEB e Zymo Research

La linea di prodotti NEBNext® per Illumina® e Ion Torrent™ rappresenta un pacchetto completo di kit e moduli per preparazione di library NGS per DNA-Seq, RNA-Seq (direzionale e non), smallRNA-Seq, ChIP-Seq a partire da piccole quantità di acidi nucleici (5 ng per DNA, 10 ng per RNA). Gli index primer per il barcoding sono disponibili in formato single-index (fino a 24) o dual-barcode (fino a 96). I protocolli possono essere automatizzati e integrati con le più comuni piattaforme di liquid handling.

Zymo Research offre prodotti innovativi per l'analisi NGS Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) e genome-wide di 5-hmC a partire rispettivamente da 10 pg e 100 ng di DNA.



RNA-Seq

Il sequenziamento high-throughput di mRNA può essere effettuato mediante la selezione degli RNA poli-adenilati con bead oligo-dT. In alternativa è possibile effettuare sequenziamento whole-transcriptome mediante la deplezione degli RNA ribosomali, che costituiscono fino all'85-90% dell'RNA totale di una cellula e possono quindi interferire con l'analisi.

smallRNA-Seq: il sequenziamento NGS di smallRNA e microRNA consente di ottenere un profilo di espressione qualitativo e/o quantitativo con la possibilità di identificare sequenze corrispondenti a miRNA non annotati.

DNA-Seq

La tecnologia NGS consente di sequenziare rapidamente interi genomi (Whole-Genome-Sequencing o WGS). L'approccio WGS è tipicamente utilizzato per identificare mutazioni/varianti correlate con un determinato fenotipo. Per organismi complessi è possibile ricorrere a Exome Sequencing (analisi delle sole regioni codificanti del genoma) o Target Sequencing (sequenziamento di subset di geni o regioni genomiche), alternative più economiche del WGS.

ChIP-seq

Metodologia in grado di determinare le interazioni tra DNA e proteine (fattori di trascrizione, proteine istoniche e modificazioni cromatiniche), per studiare l'effetto che queste hanno sull'espressione genica. L'immunoprecipitazione della cromatina con gli anticorpi contro la proteina di interesse, è seguita dalla preparazione della library sui frammenti di DNA immunoprecipitati.

Methyl-Seq

Il sequenziamento del metiloma (WGBS) prevede il trattamento del DNA genomico con bisulfite, che converte le citosine non metilate in uracile: il DNA convertito può essere impiegato come input per la preparazione della library e la successiva analisi di sequenza.

Size Selection

Sage Science Pippin Prep e Blue Pippin

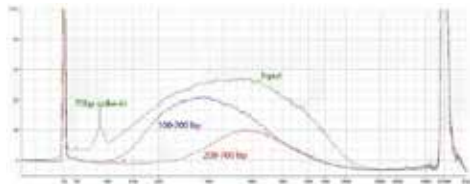
Sistemi automatizzati per NGS size selection da 90 bp a 1,5 kb e 90 bp - 50 kb. Raccomandato da Illumina e Ion Torrent.

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%.

Zymo Research 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.



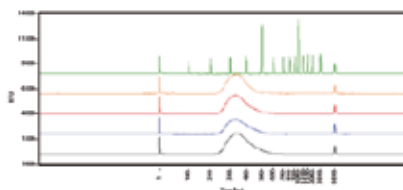
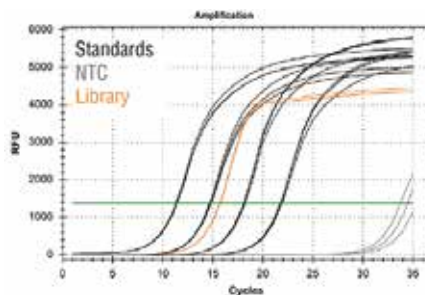
Quantificazione e QC

NEBNext® Library Quant Kit

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

Fragment Analyzer

Sistema automatizzato, basato su elettroforesi capillare, per analisi accurata e high-throughput di frammenti e smear di library NGS, gDNA/gRNA, analisi di mutazioni. Disponibile in versione da 12, 48 e 96 capillari. Raccomandato da Illumina.

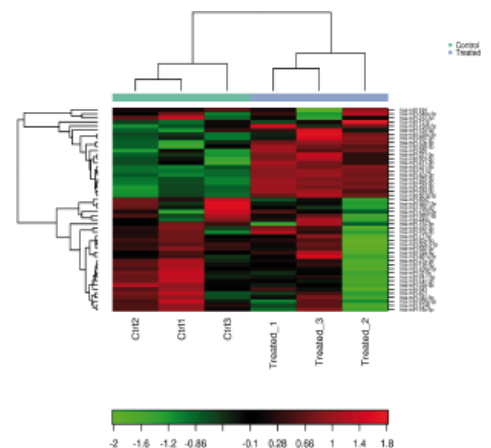


Sequenziamento

Servizi di sequenziamento

EuroClone offre servizi di sequenziamento NGS a partire da campioni standard e siero/plasma per le seguenti metodiche (Illumina):

- **microRNA-Seq.** A partire da 250 ng di RNA totale e da 200 ul di fluidi biologici (Exiqon).
- **RNA-Seq.** A partire da 100 ng di RNA totale (Exiqon).
- **Exo-NGS.** Purificazione, caratterizzazione e sequenziamento smallRNA-Seq e RNA-Seq da esosomi (System Biosciences).
- **Methyl-Seq.** Per la preparazione di librerie WGBS (Zymo Research).
- **Coming soon:** DNA-Seq, ChIP,Seq, Target sequencing.



miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids – Exiqon

Estrazione di miRNA da siero, plasma e altri fluidi biologici.

EX300113/EX300112 | miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids | 10/50 spin column

Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit - Zymo Research

Preparazione rapida di DNA cell-free circolante ≥ 100 bp da siero, plasma, fluido amniotico e cerebrospinale (CSF).

ZYD4076 | Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit | 50 Prep

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.

ZYD3065/3066 | ZR FFPE DNA MiniPrep™ | 50/200 Prep

miRCURY™ RNA Isolation Kit – FFPE – Exiqon

Alta resa di RNA purificato senza l'utilizzo di reagenti tossici per la rimozione della paraffina.

EX300115 | miRCURY RNA Isolation Kit - FFPE | 50 spin column

NEBNext® FFPE DNA Repair Mix – New England Biolabs

Cocktail di enzimi ottimizzato e validato per la riparazione del DNA da campioni FFPE.

M6630S/L | NEBNext® FFPE DNA Repair Mix | 24/96 reaz.

miRCURY Exosome Isolation Kit – Exiqon

EX300101	miRCURY Exosome Isolation Kit - Serum and Plasma	16 x 1,5 o 50 x 0,25 ml
EX300102	miRCURY Exosome Isolation Kit - Cells, urine and CSF	24 x 5, 12 x 10, 100 x 1 ml

ExoQuick e ExoQuick-TC – System Biosciences

Purificazione di esosomi da fluidi biologici (250 μl di siero, 5 ml di urine).

SBEX005A1/SBEX0020A1	ExoQuick serum exosome precipitation solution	5/20 ml
SBEX0TC10A1/SBEX0TC50A1	ExoQuick-TC	10/50 ml
SBEX0LP5A1	ExoQuick-LP Lipoprotein Pre-Clear & Exosome Precipitation	Kit 5 reaz.

NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit - New England Biolabs

BE2612S | NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit | 6 reaz.

NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module - New England Biolabs

BE7490S/L | NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module | 24/96 prep.

NEBNext® dsDNA Fragmentase® - New England Biolabs

Frammentazione del dsDNA tempo-dipendente per generare frammenti di 50-1.000 bp

M0348S/L | NEBNext® dsDNA Fragmentase® | 50/250 reaz.

NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) – New England Biolabs

BE6310S/L/X | NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) | 6/24/96 reaz.

NEBNext® Library Prep Kit - New England Biolabs

Kit per la preparazione di library ad alta sensibilità in formato master mix.

BE7370S/L	NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®	24/96 reaz.
BE7420S/L	NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®	24/96 reaz.
BE7300S/L	NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set 1)	24/96 reaz.
BE6285S/L	NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™	10/50 reaz.

Elenco completo di kit e moduli: www.neb.com

Pico Methyl-Seq™ e RRHP™ 5-hmC Library Prep Kit – Zymo Research

ZYD5455/ZYD5456	Pico Methyl-Seq™ Library Prep Kit	10/25 prep.
ZYD5450/ZYD5451	RRHP™ 5-hmC Library Prep Kit	10/25 prep.

Pippin Prep e Blue Pippin – Sage Science

Strumenti per la separazione di frammenti in automazione.

Flash Gel System – Lonza

Sistema completo per il recupero di frammenti della dimensione di interesse senza taglio di bande.

LO57062	FlashGel™ Device Pack (FlashGel™ Dock, FlashGel™ Power Supply, e FlashGel™ Camera)	
LO57064	FlashGel Recovery Kit	1 Kit

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 Prep.

NEBNext® Library Quant Kit for Illumina®

BE7630S | NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® | 100/500 reaz.

Fragment Analyzer – Advanced Analytical Technology

Automazione e precisione per QC delle library NGS. Kit Standard Sensitivity (5 ng/ μL) e High Sensitivity (50 pg/ μL) per frammenti e smear da 25 a 5000 bp.

EuroClone S.p.A.

Via Figino, 20/22 • 20016 Pero (MI) Italy • ☎ +39 02 38195.1 • 📠 +39 02 38101465 • ✉ info@euroclone.it • www.euroclone.it

Quality Management Systems certified according to ISO 9001 and ISO 13485 international standards

Ed0/0715/PR 1009_NGS