

Pannello di sequenziamento TruSeq® Neurodegeneration

Soluzione per il sequenziamento mirato per lo studio di geni candidati associati alle principali malattie neurodegenerative.

Punti principali

- Pannello selezionato da esperti che mira a regioni genomiche di interesse**
 Il pannello mira a 118 geni con più di 8,7 Mb di contenuto inclusi esoni, introni, regioni non tradotte (Untranslated Regions, UTR) e regioni del promotore
- Ampia copertura di malattie neurodegenerative**
 Il pannello copre la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi amiotrofica laterale e altre malattie
- Flusso di lavoro integrato e ottimizzato**
 Include la preparazione delle librerie con interventi manuali minimi, il sequenziamento affidabile e l'analisi dei dati di facile utilizzo

Introduzione

Il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration permette lo studio sistematico di malattie neurodegenerative associate ai geni. Questo pannello mirato unisce le tecniche di preparazione delle librerie Nextera® e di arricchimento mirato mediante la comprovata tecnologia di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) Illumina e l'analisi dei dati di facile utilizzo per ottenere un flusso di lavoro di sequenziamento integrato e ottimizzato (Figura 1).

Il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration facilita la convalida dettagliata e l'identificazione di alleli funzionali rari e putativi e di ulteriori alleli a rischio. Offre la possibilità di indagare sia la proteina codificante che le regioni regolatorie non codificanti di geni candidati per lo studio efficiente ed efficace in termini di costi delle principali malattie neurodegenerative.

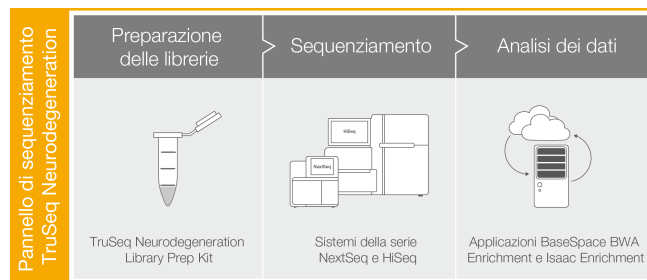


Figura 1: Panoramica del flusso di lavoro del pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration: il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration fa parte di un flusso di lavoro integrato e ottimizzato che include preparazione delle librerie, sequenziamento e analisi dei dati.

Contenuto del pannello selezionato da esperti

Il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration copre 118 geni associati alle principali malattie neurodegenerative. Queste malattie includono: malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, sclerosi amiotrofica laterale, demenza frontotemporale, demenza a corpi di Lewy, distonia e demenza a insorgenza precoce. I geni target inclusi nel pannello sono stati selezionati grazie a input ottenuti dalla comunità scientifica basati su risultati scientifici recenti, come geni convalidati sul rischio o geni in loci individuati mediante studi di associazione dell'intero genoma (Genome-Wide Association Studies, GWAS).

Il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration offre un set di sonde altamente ottimizzate comprendente circa 43.600 sonde da 80-mer, ciascuna costruita sul genoma di riferimento umano NCBI37/hg19. Il set di sonde copre 8,7 Mb di contenuto genomico, incluse regioni esoniche, introniche, regioni non tradotte e regioni del promotore entro 1.300 bp a monte del sito di avvio della trascrizione (Transcriptional Start Site, TSS) dei geni candidati (Tabella 1). Le sonde incluse nel pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration sono state create utilizzando procedure di progettazione interattive e test funzionali per assicurare prestazioni e uniformità eccellenti.

Tabella 1: Dettagli della copertura

Parametro	Valore
Dimensione cumulativa della regione target	8,7 Mb
N. di geni nel pannello	118
Dimensione della sonda	80 bp
N. di sonde	circa 43.600
Contenuto target	Esoni, introni, UTR e regioni del promotore (1.300 bp)
Uniformità di copertura (0,2x media)	Più dell'85%
Campioni raggruppati in pool prima dell'arricchimento	Fino a 12
Input di campione	50 ng
Dimensione dell'inserito delle librerie	230 bp
Corsa di sequenziamento raccomandata	2 x da 150 bp
Marker per il controllo qualità (Quality Control, QC)	57 sul cromosoma Y e 7 sul cromosoma X

Preparazione delle librerie ottimizzata

Il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration sfrutta il saggio Nextera Rapid Capture per la preparazione semplice e ottimizzata di librerie pronte per il sequenziamento.

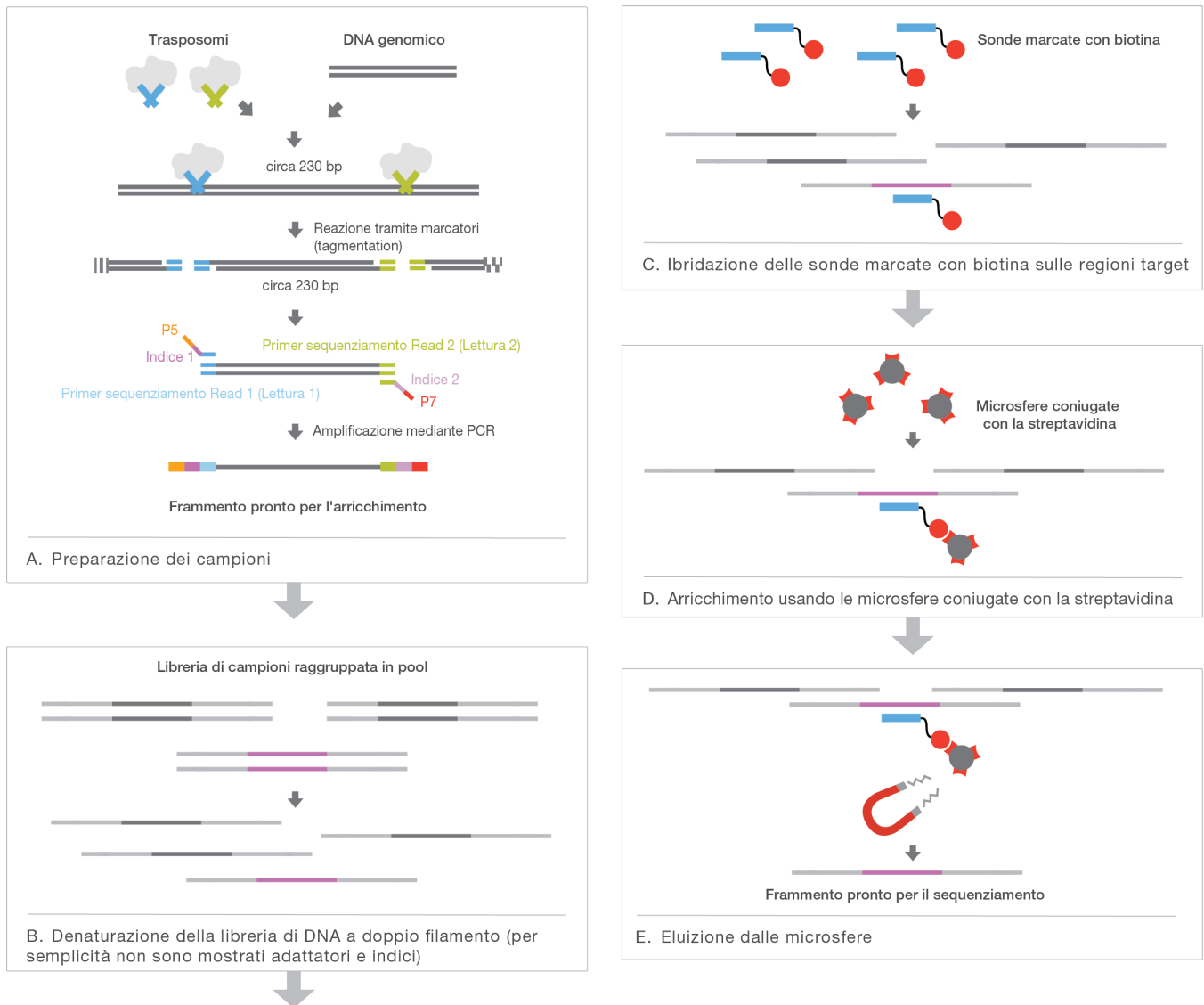


Figura 2: Chimica Nextera Rapid Capture: il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration sfrutta la tecnologia di reazione tramite marcatori (tagmentation) Nextera che unisce le fasi di preparazione delle librerie e di arricchimento per fornire un flusso di lavoro ottimizzato che può essere completato in 1,5 giorni con cinque ore di interventi manuali.

La procedura di preparazione delle librerie parte dalla reazione tramite marcatori (tagmentation) Nextera, che simultaneamente frammenta e aggiunge marcatori al DNA per generare librerie con marcatori senza richiedere la frammentazione (shearing) meccanica (Figura 2A). Quindi, le librerie vengono denaturate (Figura 2B) e le sonde marcate con biotina specifiche per la regione target vengono utilizzate per l'ibridazione (Figura 2C). Il pool viene arricchito per le regioni desiderate aggiungendo microsferi coniugate con la streptavidina che si legano alle sonde biotinilate (Figura 2D). I frammenti di DNA biotinilati legati alle microsferi coniugate con la streptavidina sono sottoposti a pull-down magneticamente dalla soluzione (Figura 2E).

I marcatori integrati dei campioni permettono la cattura simultanea da 3 a 12 campioni in una singola provetta. I frammenti di DNA arricchito sono quindi eluiti dalle microsferi e ibridati per una seconda cattura. Questo metodo richiede 50 ng di DNA input e meno di tre ore per una piastra da 3 a 12 campioni.

Sequenziamento comprovato Illumina

Le librerie preparate sono caricate direttamente su una piattaforma di sequenziamento NGS Illumina. Questi strumenti di sequenziamento sfruttano la chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina leader nel settore.

Più del 90% dei dati di sequenziamento al mondo sono generati mediante la chimica SBS Illumina.* I sistemi di sequenziamento Illumina offrono massima flessibilità per un'ampia gamma di applicazioni e processività scalabile per supportare diverse dimensioni di studi.

Analisi dei dati intuitiva

I dati del sequenziamento possono essere trasferiti, archiviati e analizzati istantaneamente in modo sicuro in BaseSpace® Sequence Hub, l'ambiente di calcolo genomico sul cloud Illumina. BaseSpace Sequence Hub fornisce una vasta raccolta di applicazioni BaseSpace che includono strumenti commerciali e open-source per supportare un'ampia gamma di esigenze per l'analisi dei dati come l'allineamento, l'identificazione delle varianti e molto altro.

Queste applicazioni dispongono di interfacce utenti intuitive ed estremamente semplici che non richiedono esperienza in campo bioinformatico.

I dati ottenuti dal pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration sono analizzati mediante due applicazioni Enrichment Core. L'applicazione BWA Enrichment App v2.0 fornisce gli strumenti standard nel settore per l'identificazione delle varianti Burrows-Wheeler Alignment (BWA) e Genome Analysis Toolkit (GATK). L'applicazione Isaac™ Enrichment App v2.0 è lo strumento Illumina ottimizzato per l'analisi veloce e l'identificazione delle varianti.

Elevata qualità dei dati

Sei librerie, preparate con TruSeq Neurodegeneration Library Prep Kit come raggruppamenti in pool di 6 plex, sono state sequenziate sul sistema NextSeq® 500 e analizzate in BaseSpace Sequence Hub in base al flusso di lavoro descritto (Figura 1). La copertura media per la corsa di sequenziamento è stata 155x. La percentuale di basi target coperte a più di 31x mostrano che più del 90% delle basi sono state coperte per tutti i campioni (Figura 3).

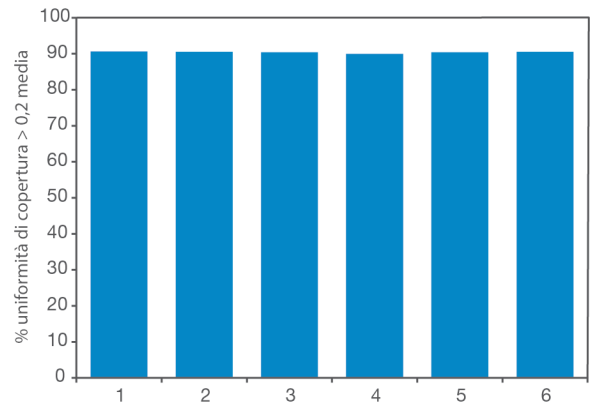


Figura 3: Uniformità di copertura sui raggruppamenti in pool di 6 plex: sono state preparate sei librerie con TruSeq Neurodegeneration Library Prep Kit. Le librerie sono state sequenziate sul sistema NextSeq 500 con una copertura media di 155x per la corsa di sequenziamento. Per ciascun campione è mostrata la percentuale di basi target coperte a più di 31x.

Riepilogo

Il pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration offre una soluzione di flusso di lavoro integrato per la ricerca di alleli rari funzionali e putativi e alleli a rischio elevato associati alle principali malattie neurodegenerative. Sviluppato grazie a input ottenuti dalla comunità scientifica, inclusi risultati scientifici recenti, il pannello consente lo studio sistematico di 118 geni associati alle malattie neurodegenerative, incluse le regioni regolatorie e codificanti la proteina. Le librerie con regioni target sono preparate in modo efficiente con interventi manuali minimi grazie all'uso della tecnologia Nextera. Il sequenziamento sui sistemi Illumina unito all'analisi dei dati mediante le applicazioni intuitive BaseSpace forniscono una soluzione ottimizzata per la ricerca nel campo delle malattie neurodegenerative.

Informazioni per gli ordini

Per maggiori informazioni sul pannello di sequenziamento TruSeq Neurodegeneration o per ordinare il prodotto, contattate il rappresentante locale:

Nord America: 800.809.4566

Europa, Medio oriente, Africa: +44.1799.534000

Altre regioni: www.illumina.com/company/contact-us.html

* Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc. 2015.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni sulle soluzioni per il risequenziamento mirato, visitate la pagina Web

www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing.html.

Bibliografia

1. Karch CM, Cruchaga C, Goate A. Alzheimer's Disease Genetics: From the bench to the clinic. *Neuron*. 2014;83(1):11–26.
2. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*. 2015;77(1):43–51.
3. Turner MR, Hardiman O, Benatar M, et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2013;12(3):310–322.
4. Bras J, Guerreiro R, Hardy J. Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(7):453–464.
5. Renton AE, Chio A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci*. 2014;17(1):17–23.
6. Ferrari R, Grassi M, Salvi E, et al. A genome-wide screening and SNPs-to-genes approach to identify novel genetic risk factors associated with frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging*. 2015;36(10):2904.e13–26.
7. Kouri N, Ross OA, Dombroski B, et al. Genome-wide association study of corticobasal degeneration identifies risk variants shared with progressive supranuclear palsy. *Nat Commun*. 2015;6:7247.
8. Scholz SW, Bras J. Genetics Underlying Atypical Parkinsonism and Related Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):24629–24655.
9. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2014;46(9):989–993.