

NGS 4.0

**EuroClone<sup>®</sup>**  
ACADEMY

# GUIDA AL MONDO NGS 4.0

**BiOptic**  
Inc.

 **Cell Signaling**  
TECHNOLOGY

 sage science

**magtivio**

 **MGI**  
华大智造

 **cytiva**

**Covaris<sup>®</sup>**

**Lonza**

 **ZYMO RESEARCH**  
The Beauty of Science is to Make Things Simple

 **NEW ENGLAND**  
**BioLabs<sup>®</sup> Inc.** | be INSPIRED  
drive DISCOVERY  
stay GENUINE

 **BMG LABTECH**  
The Microplate Reader Company

**IMPLEN**

 **SBI**  
System Biosciences



## 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. E' 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 (10<sup>5</sup> 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 **True 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

### NEB, MGI E ZYMO RESEARCH

**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.

### 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 biotilate 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.



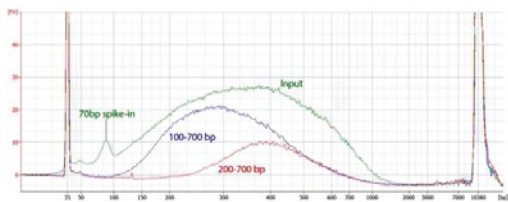
### LONZA FLASH GEL SYSTEM



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  $\geq 300$  bp,  $\geq 200$  bp,  $\geq 150$  bp,  $\geq 100$  bp,  $\geq 50$  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.

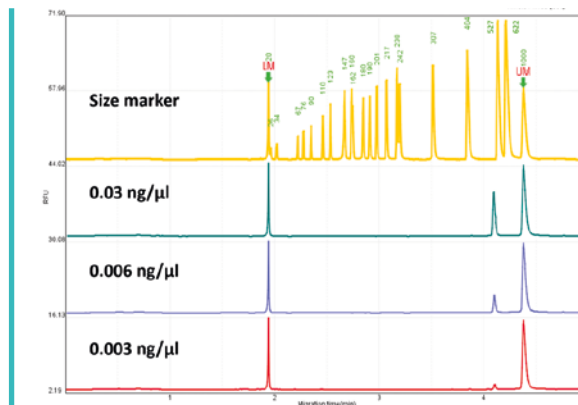
## 05. QUANTIFICAZIONE E QC

### BIOPTIC Qsep FRAGMENT ANALYZER

**Biopptic** 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 (Qsep<sub>1</sub>, Qsep<sub>100</sub>, Qsep<sub>400</sub>).



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
<b>Exoquick e Exoquick - TC System Biosciences</b> 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
<b>Quick-cfDNA™ Serum &amp; Plasma Zymo Research</b> Kit Specifico per isolamento di cell free DNA da biofluidi	ZYD4076	Quick-cfDNA™ Serum & Plasma	50 preps
<b>Sera-Xtracta Cell-Free DNA Kit Cytiva</b> Kit per l'estrazione e la purificazione di cfDNA dal plasma	GEH29437807	Sera-Xtracta Cell-Free DNA Kit	96 preps
<b>SpinNAker Euroclone</b> 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
<b>ZR FFPE DNA MiniPrep™ Zymo Research</b> 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
<b>Sera-Mag Select Cytiva</b> 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
<b>Select-a-Size DNA Clean &amp; Concentrator™ Kit (Select-a-Size DCC™) Zymo Research</b> Sistema versatile per la separazione manuale di frammenti di DNA	ZYD4080	Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™	25 preps
<b>NEB Monarch® New England Biolabs</b> 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
<b>Quick-cfRNA™ Serum &amp; Plasma Zymo Research</b> Isolamento di cell free RNA da biofluidi	ZYR1059	Quick-cfRNA™ Serum & Plasma	50 preps
<b>NEBNext® FFPE DNA Repair Mix New England Biolabs</b>	M6630S/L	NEBNext® FFPE DNA Repair Mix	24/96 rxns
<b>NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit New England Biolabs</b>	BE2612S	NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit	6 rxns
<b>NEBNext® rRNA Depletion Kit New England Biolabs</b>	BE6310S/L/X	NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat)	6/24/96 rxns
<b>NEBNext® Quant Kit New England Biolabs</b> Kit per quantificazione Library	E7630S/L	NEBNext® Library Quant Kit for Illumina	100/500 rxns
<b>CUT&amp;RUN Cell Signaling Technology</b> Metodo in vivo (non necessita di fissazione) per isolare i complessi proteina-DNA d'interesse	BK86652S	CUT&RUN Assay Kit	1 Kit
<b>Kit SimpleChIP® Plus di Cell Signaling Technology</b> 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