



# GUIDA AL MONDO NGS 3.0





## 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).

01.

PREPARAZIONE  
ACIDI NUCLEICI

02.

FRAMMENTAZIONE

03.

LIBRARY PREP

## 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.

## 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.

SEQUENZIAMENTO

## 01. PREPARAZIONE ACIDI NUCLEICI

### BIOFLUIDI ED ESOSOMI

**Zymo Research** offre una tecnologia per l'isolamento di DNA Cell-Free (cfDNA) 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 da esosomi.

### 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.

**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.

### CHIP

I kit SimpleChip® per digestione enzimatica o sonicazione della cromatina, anticorpi validati e primer di controllo forniti da **Cell Signaling Technology (CST)**.

### PHI29 WHOLE GENOME AMPLIFICATION

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

### NANODROP™ ONE

**Thermo Fisher Scientific™** propone uno spettrofotometro per microvolumi, in grado di misurare l'intero spettro di assorbimento (190-850 nm). Il NanoDrop™ ONE è particolarmente indicato per la misurazione di DNA e RNA (260 nm), ed è dotato della tecnologia Acclaro, che consente di: identificare i contaminanti e correggere eventuali misurazioni errate; utilizzare sensori e digital imaging del campione (per presenza di bolle d'aria); fornire Alert system e Learning Center integrato (tech support, tutorial, ecc.). Inoltre è caratterizzato da un ampio range dinamico (2 - 25.000 ng/µl), non richiede l'utilizzo del PC per il funzionamento ed è in grado di utilizzare WI-FI, USB, Ethernet e Bluetooth® per il trasferimento dei dati.



## 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 E ZYMO RESEARCH

**NEB** propone il 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.

### 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.

### FLUIDIGM JUNO

Sistema microfluidico high-throughput per automazione di library prep (Target Enrichment) per NGS Illumina.

### ADVANTA SOLID TUMOR NGS LIBRARY PREP ASSAY

Copertura: 53 geni (234 kb) per hot spots, indels e CNVs più 20 geni per full-length coding DNA.

Applicazioni: tumori solidi (seno, colon, fegato, polmone, melanoma, ovario, pancreas, ...). 19.000 varianti patogeniche, 35.000 varianti totali.

### ADVANTA RNASEQ KIT

Coming soon

### FLUIDIGM C1

Sistema microfluidico per analisi di singole cellule. Il sistema consente di visualizzare, isolare e processare cDNA da 96-800 singole cellule per DNA-Seq, RNA-Seq (full length e 3') e HT-qPCR. Compatibile con protocolli custom (Script Hub) e kit NEBNext® low input.



## 04. SIZE SELECTION

### MAGTIVIO BEADS

Le bead magnetiche MagSi-NGSPREP Plus per Size Selection, compatibili con l'automazione, hanno rese e protocollo sovrapponibili alle beads comunemente utilizzate.

### SERA-MAG™ SELECT

**GE Healthcare** 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.



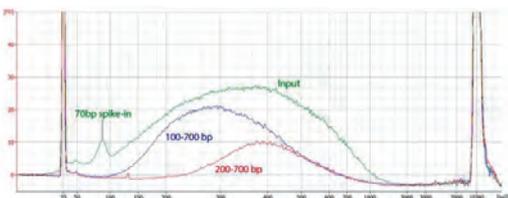
### LONZA FLASH GEL SYSTEM



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.

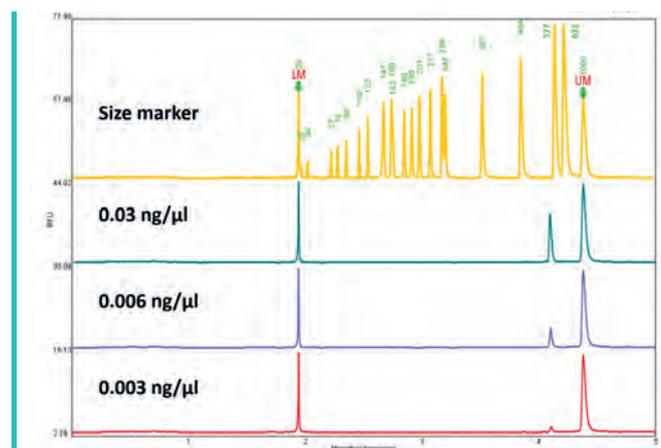
## 05. QUANTIFICAZIONE E QC

### BIOPTIC Qsep FRAGMENT ANALYZER

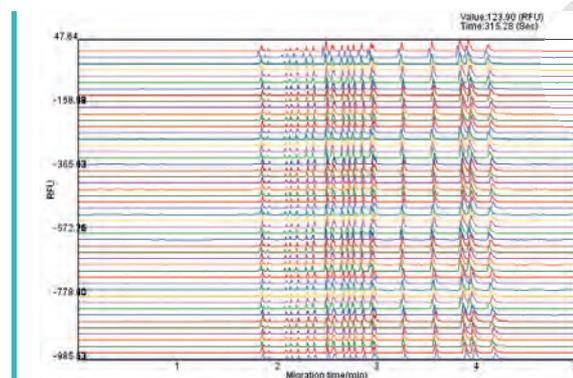
**Biopptic** propone sistemi per analisi rapida e accurata di smear di library NGS, frammenti di DNA, gDNA/gRNA e proteine. La tecnologia innovativa CGE, basata su cartucce facilmente intercambiabili, garantisce la massima flessibilità operativa (1-96 campioni). Disponibile in 3 versioni con diverso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



**Elevata Riproducibilità.** Cartuccia: S1; Campione: Size Marker BOPC109200 + Alignment marker 20 bp - 1 kb; Numero di corse: 50.

### 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.



### SERVIZI DI ANALISI BIOINFORMATICA E NGS

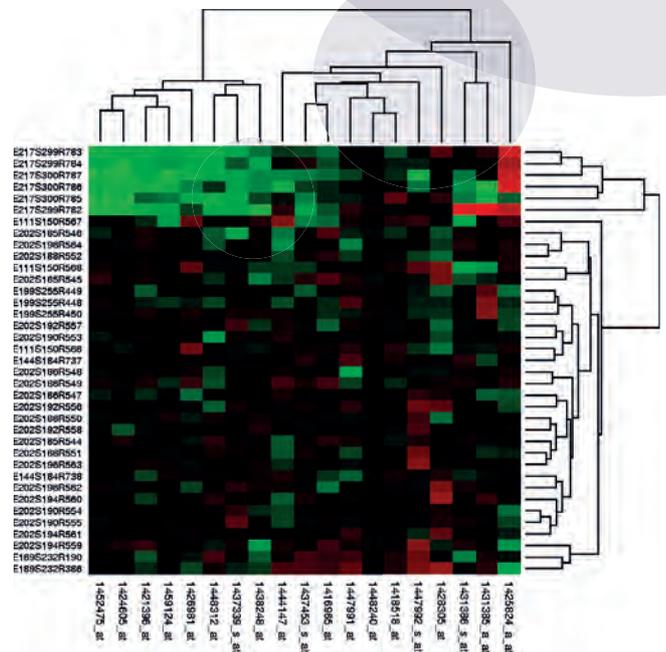
Euroclone offre su richiesta Servizi di Analisi Bioinformatica per

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

E di Sequenziamento NGS per:

- miRNA e smallRNA-Seq
- RNA-Seq
- DNA-Seq
- ChIP-Seq
- Target Sequencing
- Exo-NGS: purificazione, caratterizzazione e sequenziamento smallRNA-Seq e RNA-Seq da esosomi (**SBI**)
- Methyl-Seq: per la preparazione di librerie WGBS (**Zymo Research**).

Contattaci per maggiori informazioni



“Heatmap”

	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-cfRNA™ SERUM &amp; PLASMA ZYMO RESEARCH</b> Isolamento di cell free RNA da biofluidi	ZYR1059	Quick-cfRNA™ Serum & Plasma	50 preps
<b>SpinNAker EUROCLONE</b>	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
<b>NEB MONARCH® NEW ENGLANG BIOLABS</b>  Kit per l'estrazione di acidi nucleici	EMR507100/200	Eurogold Trifast Nucleic Acids Isolation Reagent	100/200 ml
	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-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>XCF™ EXOSOME AND cfDNA ISOLATION KIT (FOR SERUM &amp; PLASMA) SYSTEM BIOSCIENCES</b> Isolamento di DNA libero circolante da siero e plasma	SBXCF100A1	XCF™ COMPLETE Exosome and cfDNA Isolation Kit	20 rxns
	SBXCF200A1	XCF™ Exosomal DNA Isolation Kit	20 rxns
<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>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>MAGSI-NGS BEADS MAGTIVIO</b> Bead magnetiche per Size Selection	MDKT00010005/75	MagSi-NGSPREP Plus	5/75 mL
<b>SERA-MAG SELECT GE HEALTHCARE</b> Biglie magnetiche pe il clean-up del DNA e per la size-selection in un unico reagente pronto all'uso	GEH29343052	Sera-Mag Select	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

PR 2050\_NGS\_0819