



RISE

Infrastruttura Strategica della Ricerca
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO

Sistema iScan™ Illumina



Per informazioni rivolgersi al responsabile scientifico:

Prof.ssa Anna Maria D'Erchia
annamaria.derchia@uniba.it

Polo Scientifico Tecnologico

Dipartimento di Bioscienze,
Biotecnologie e Ambiente (DBBA)

Via Orabona 4, 70125 (BA)

ENG: The iScan system uses its own microarray technology for a wide range of DNA analysis applications, including genome-wide genotyping of humans, plants, livestock, and model organisms. For organisms that have not yet been genetically characterized, customized microarrays can be created using known or putative markers. The iScan system is therefore ideal for rapid, accurate, and high-throughput screening in clinical research, genomics, and agrigenomics applications.

Illumina microarray technology, also known as BeadArray technology, uses silica microspheres housed in precisely etched microwells and coated with hundreds of thousands of copies of a 50-base oligonucleotide probe corresponding to a specific genomic locus. The probe length (50 nucleotides) ensures high hybridization specificity with the target sequence. On the surface of each array, or BeadChip, from hundreds of thousands to millions of genotypes can be analyzed simultaneously for a single individual. When DNA fragments are transferred onto the BeadChip, each probe hybridizes to its corresponding complementary sequence in the DNA sample, leaving the base at the polymorphic site of interest unpaired. A single-base extension performed by a high-fidelity DNA polymerase, incorporating one of four fluorophore-labeled nucleotides, enables detection of the site of interest. When excited by a laser, the fluorophore emits a signal that provides information about the allelic ratio at that

locus. In fact, each assay genotypes a locus using two color channels: one color for each allele. The relative intensity of the two colors indicates whether the genotype at that locus is heterozygous or homozygous.

Genotyping analysis allows the analysis of between 300 and 5 million loci in a single reaction, with specificity provided by hybridization to the 50-mer probe, which ensures specificity at two levels, followed by high-fidelity enzymatic extension.

For CNV analysis, iScan can detect many types and sizes of structural variation in the human genome that affect phenotypes, including duplications, deletions, amplifications, loss of heterozygosity (LOH), and mosaicism. This is possible because dedicated microarrays provide dense coverage of approximately 250 clinically relevant regions, including subtelomeric and pericentromeric regions and the sex chromosomes, which are commonly screened in cytogenetics laboratories. This scalable solution offers substantially higher resolution for detecting smaller regions compared with fluorescence in situ hybridization (FISH) or comparative genomic hybridization (CGH).

The iScan system also enables quantitative measurement of cytosine methylation at individual CpG sites in bisulfite-treated genomic DNA through the use of methylation arrays, providing high resolution for the investigation of epigenetic changes. Following bisulfite treatment, unmethylated cytosine bases are converted to uracil, whereas methylated cytosine bases remain unchanged. The assay interrogates these chemically differentiated loci using two site-specific probes associated with each type of microsphere: one for the methylated locus and the other for the unmethylated locus. The methylation level at the interrogated locus can be determined by calculating the ratio of fluorescent signals from the methylated and unmethylated sites following single-base extension of the probes with a fluorescence-labeled ddNTP.

The iScan system provides analytical flexibility because it uses BeadChips in different formats to analyze 4, 8, 24, or 96 samples in parallel. The system employs high-performance lasers, optics, and detection systems to provide sub-micron resolution and high throughput. Specifically, the instrument is equipped with lasers operating at excitation wavelengths of 532 nm and 658 nm and a scanner with a true spatial resolution of 0.53 microns, featuring dual-channel fluorescence detection, with an analysis time of 20 to 45 minutes per chip. Scanning times are extremely fast without compromising data quality or reproducibility. Samples are prepared manually, but the iScan is compatible with an automated liquid-handling system, which reduces sample preparation time and enables continuous microarray scanning 24 hours a day. The iScan achieves high call rates (>99%), supporting population screening studies and high-resolution CNV analysis, including the accurate detection of single-copy-number variations.

ITA: Il sistema iScan utilizza una propria tecnologia di microarray per un'ampia gamma di applicazioni di analisi del DNA, per la genotipizzazione del genoma umano e del genoma di piante, bestiame e organismi modello. Per organismi non ancora studiati geneticamente, è possibile creare microarray personalizzati con marcatori noti o presunti. Il sistema iScan quindi ideale per uno screening rapido, accurato e ad alto rendimento nella ricerca clinica, nella genomica o nelle applicazioni di agrigenomica.

La tecnologia dei microarray Illumina (nota anche come tecnologia BeadArray) utilizza microsfeere di silice che sono alloggiate in micropozzetti accuratamente incisi e rivestite con centinaia di migliaia di copie di una sonda oligonucleotidica lunga 50 basi corrispondente ad un locus specifico del genoma. La lunghezza della sonda (50 nucleotidi) garantisce un'elevata specificità di appaiamento con la sequenza bersaglio durante l'ibridazione. Sulla superficie di ciascun array, o BeadChip, è possibile analizzare contemporaneamente da centinaia di migliaia a milioni di genotipi per un singolo individuo. Quando i frammenti di DNA sono trasferiti sul BeadChip, si realizza l'appaiamento tra ciascuna sonda e la corrispondente sequenza complementare del DNA del campione in esame, lasciando libera la base del sito polimorfico d'interesse. Una singola estensione da parte di una DNA polimerasi ad alta fedeltà, che incorpora uno dei quattro nucleotidi marcato con un fluoroforo, permette di individuare il sito di interesse. Quando eccitato da un laser, il fluoroforo emette un segnale che fornisce informazioni sul rapporto allelico in quel locus. Infatti, ciascun test genotipizza un locus utilizzando due letture di colore: un colore per ciascun allele. L'intensità relativa dei due colori indica se un genotipo è eterozigote o omozigote in quel locus.

L'analisi di genotipizzazione permette di analizzare da 300 fino a 5 Milioni di loci in una singola reazione con una specificità data dall'ibridazione sulla sonda 50-mer che garantisce specificità a due livelli, seguita dall'estensione enzimatica ad alta fedeltà.

Per l'analisi dei CNV, iScan permette di rilevare molti tipi e dimensioni di variazione strutturale nel genoma umano che influenzano i fenotipi, tra cui duplicazioni, delezioni, amplificazioni, perdita di eterozigosità (LOH) e mosaicismi, perchè i microarray dedicati presentano una densa copertura di circa 250 regioni patologiche, comprese le regioni subtelomeriche, le regioni pericentromeriche e i cromosomi sessuali, regioni che sono comunemente sottoposte a screening nei laboratori di citogenetica. Questa soluzione scalabile e offre una risoluzione sostanzialmente migliore per rilevare regioni più piccole rispetto all'ibridazione fluorescente in situ (FISH) o all'ibridazione genomica comparativa (CGH).

Il sistema iScan, mediante array di metilazione, permette anche una misurazione quantitativa della metilazione della citosina a livello del singolo sito CpG del DNA genomico, trattato con bisolfito, offrendo un'elevata risoluzione per la comprensione dei cambiamenti epigenetici. Dopo il trattamento con bisolfito, le basi della citosina non metilate vengono convertite in uracile, mentre le basi della citosina metilata rimangono

invariate. Il saggio interroga questi loci chimicamente differenziati utilizzando due sonde sito-specifiche, che ricoprono ciascun tipo di microsfera, una per il locus metilato e un'altra per il locus non metilato. Il livello di metilazione per il locus interrogato può essere determinato calcolando il rapporto dei segnali fluorescenti dai siti metilati rispetto a quelli non metilati, in seguito all'estensione di una singola base delle sonde con un ddNTP marcato per fluorescenza.

Il sistema iScan consente flessibilità di analisi perché utilizza BeadChip dal formato variabile per analizzare in parallelo 4, 8, 24 o 96 campioni. Il sistema utilizza laser, ottiche e sistemi di rilevamento ad alte prestazioni per offrire una risoluzione inferiore al micron e un'elevata produttività. Infatti, lo strumento è dotato di un laser con eccitazione a 532 nm e 658 nm e di uno scanner con una risoluzione spaziale reale di 0,53 micron con raccolta della fluorescenza a doppio canale, con tempo di analisi da 20 a 45 minuti per singolo chip. I tempi di scansione sono estremamente rapidi senza sacrificare la qualità o la riproducibilità dei dati. I campioni da analizzare sono preparati manualmente ma iScan è compatibile con un sistema automatizzato per la gestione dei liquidi, che riduce i tempi di preparazione del campione e consente la scansione dei microarray 24 ore su 24. iScan ha elevati tassi di chiamata (> 99%) che consentono studi di screening della popolazione e analisi CNV ad alta risoluzione, rilevando con precisione anche le variazioni del numero di copie singole.