

DNA Prep Illumina

Un flusso di lavoro veloce e integrato per un'ampia gamma di applicazioni dal sequenziamento dell'intero genoma umano ad ampliconi, plasmidi e specie microbiche.

Punti principali

- Rapido flusso di lavoro di preparazione delle librerie**
 Grazie alla tagmentazione su microsferi si risparmiano tempo e interventi manuali, il che riduce la durata totale della preparazione delle librerie a meno di tre ore
- Input del campione integrato**
 Preparazione delle librerie più efficiente grazie a protocolli di estrazione del DNA integrati per sangue, saliva e gocce di sangue secco
- Flusso di lavoro flessibile con un'ampia gamma di input di DNA**
 Operazioni quotidiane semplificate grazie a un kit che supporta un'ampia gamma di input di DNA (1-500 ng), diversi tipi di input di DNA e dimensioni del genoma da piccolo ad ampio
- Ampia gamma di applicazioni**
 Sequenziamento del genoma umano o di altri genomi ampi/complessi nonché ampliconi e specie microbiche, parassitarie o fungine
- Prestazioni ottimizzate della preparazione delle librerie**
 Dimensioni di inserti coerenti ed elevata uniformità di copertura indipendentemente dal livello di esperienza dell'utente

Introduzione

I progressi nel campo della tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) hanno accelerato il ritmo della ricerca genomica, tuttavia molti laboratori continuano ad avere difficoltà durante la fase di preparazione delle librerie del flusso di lavoro NGS. Poiché sono richieste diverse fasi prima e dopo la preparazione delle librerie, molti laboratori devono affrontare ritardi significativi prima di poter avviare il sequenziamento. Le fasi che precedono la preparazione delle librerie includono l'estrazione del DNA, la quantificazione e la frammentazione, mentre le fasi che seguono la preparazione delle librerie includono le valutazioni della qualità della libreria, la quantificazione delle librerie e la normalizzazione.

Nextera™ DNA Library Preparation Kit introduce la chimica di tagmentazione, che unisce le fasi di frammentazione del DNA e di ligazione degli adattatori in un'unica reazione di 15 minuti riducendo la durata della preparazione delle librerie a 90 minuti. Grazie a Nextera XT DNA Library Prep Kit è stata eliminata la quantificazione delle librerie prima del raggruppamento in pool delle librerie e del sequenziamento.¹ Ora è arrivata l'ultima rivoluzione nella chimica di preparazione delle librerie Illumina: DNA Prep Kit Illumina. DNA Prep Kit Illumina offre una chimica straordinaria (Figura 1, Tabella 1) che integra le fasi di estrazione del DNA, frammentazione, preparazione delle librerie e normalizzazione delle librerie per fornire i flussi di lavoro più veloci e flessibili nel portafoglio di preparazione delle librerie Illumina (Figura 2, Tabella 2).

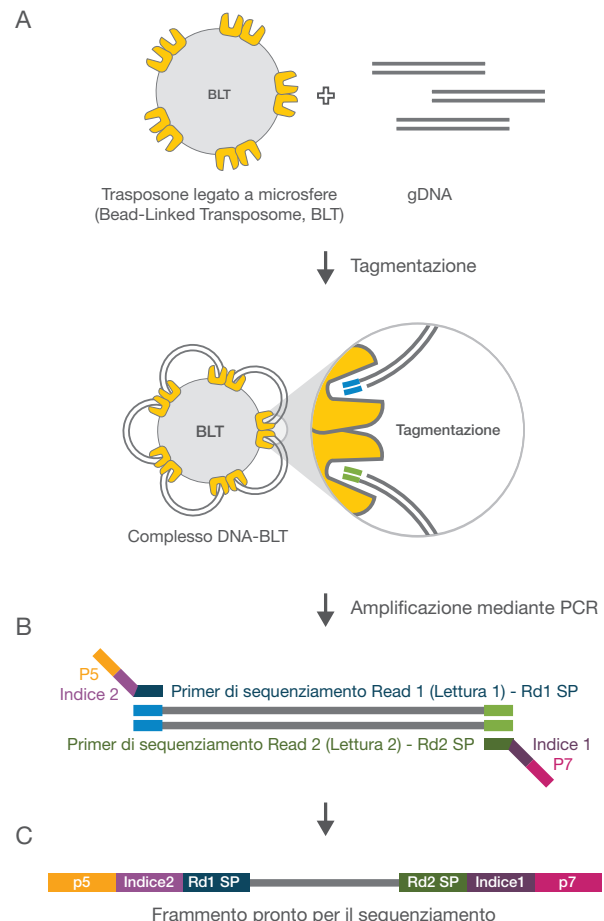


Figura 1: Chimica dei trasposoni legati alle microsferi Illumina: (A) i trasposoni legati alle microsferi mediano contemporaneamente la frammentazione del gDNA e l'aggiunta dei primer di sequenziamento Illumina; (B) cicli ridotti della PCR amplificano i frammenti di DNA pronti per il sequenziamento e l'aggiunta di indici e adattatori; (C) i frammenti pronti per il sequenziamento vengono lavati e raggruppati in pool.

Tabella 1: Specifiche di DNA Prep DNA Illumina

Parametro	DNA Prep Kit Illumina
Tipo di input di DNA	gDNA, sangue, saliva, ampliconi PCR, plasmidi, gocce di sangue secco
Input di DNA richiesto	1-500 ng, genomi piccoli 100-500 ng, genomi ampi
Multiplex campioni	24 indici singoli, 384 indici doppi
Sistemi di sequenziamento supportati	Tutti i sistemi Illumina
Durata totale del flusso di lavoro di preparazione delle librerie (gDNA) ^a	3-4 ore

a. Include le fasi di estrazione del DNA, preparazione delle librerie e normalizzazione/raggruppamento in pool delle librerie

* In precedenza Nextera DNA Flex Library Preparation Kit

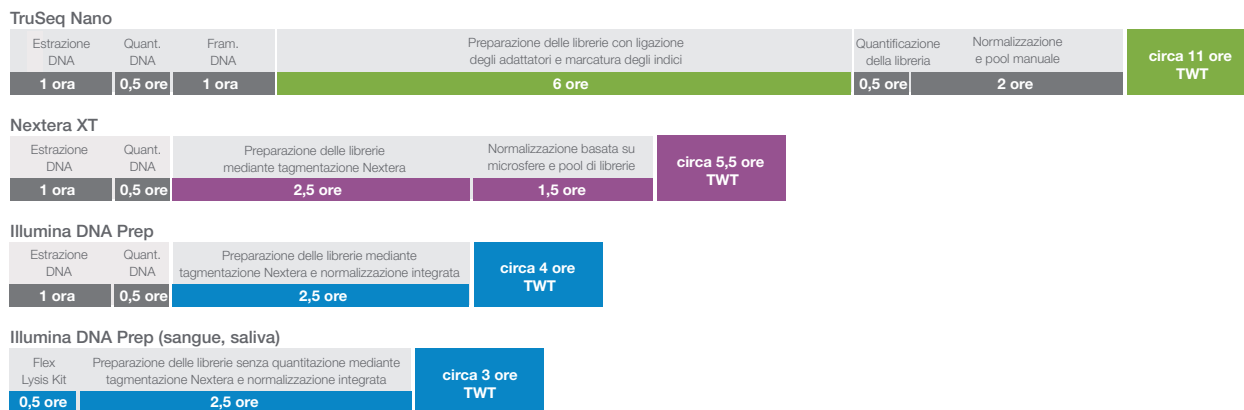


Figura 2: DNA Prep Illumina fornisce il flusso di lavoro Illumina più veloce: i calcoli si basano sull'elaborazione di 16 campioni alla volta con un pipetta multicanale. TWT = durata totale del flusso di lavoro dall'estrazione del DNA alla normalizzazione e al raggruppamento in pool delle librerie. Le durate delle fasi del flusso di lavoro sono state calcolate presumendo metodi specifici: estrazione del DNA (QIAamp DNA Mini Kit o Flex Lysis Kit), quantificazione del DNA (Qubit), frammentazione del DNA (Covaris) e normalizzazione e raggruppamento in pool delle librerie manuali (Bioanalyzer). Le durate possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni analizzati, alle procedure automatizzate o all'esperienza dell'utente. Le fasi del flusso di lavoro colorate in grigio non sono incluse nei kit di preparazione delle librerie.

Tabella 2: Confronto dei flussi di lavoro di preparazione delle librerie di DNA Illumina

	TruSeq Nano	Nextera XT	DNA Prep Illumina ^{a,b}
Lisi del DNA integrata inclusa	—	—	✓
Ampia gamma di input di DNA flessibile	—	—	✓
Normalizzazione delle librerie inclusa	—	✓	✓
Input di DNA	100-200 ng	1 ng	1-500 ng
Durata totale della preparazione delle librerie ^c	11 ore	5 ore	3-4 ore
Dimensione inserto	350 bp o 550 bp	< 300 bp	300-350 bp
Multiplex campioni	96 indici doppi	384 indici doppi	24 indici singoli 384 indici doppi

a. Sono disponibili protocolli di estrazione del DNA integrati per sangue, saliva e campioni di gocce di sangue secco (Dry Blood Spot, DBS).
 b. La normalizzazione delle librerie avviene con ≥ 100 ng di input di DNA.
 c. La durata totale della preparazione delle librerie include le fasi di estrazione del DNA, preparazione delle librerie e normalizzazione/raggruppamento in pool delle librerie.

Oltre a fornire un flusso di lavoro veloce, DNA Prep Kit Illumina offre una straordinaria flessibilità per tipo di input, quantità di input e ampia gamma di applicazioni supportate. Dal sequenziamento dell'intero genoma umano (Human Whole-Genome Sequencing, WGS) a piccoli plasmidi microbici, DNA Prep Kit Illumina fornisce una copertura del genoma pari a quella offerta dalla chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina.²

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie veloce e flessibile

DNA Prep Kit Illumina presenta diverse caratteristiche per fornire il flusso di lavoro delle librerie più veloce all'interno del portafoglio Illumina. Uno dei principali miglioramenti nella chimica Illumina

è rappresentato dalla tagmentazione su microsfere, che utilizza trasposoni legati alle microsfere per mediare una tagmentazione più uniforme rispetto alle reazioni di tagmentazione in soluzione. Dopo la saturazione dei trasposoni legati alle microsfere con il DNA, non si verifica alcuna ulteriore tagmentazione, in questo modo il processo di normalizzazione basato sulla saturazione è altamente uniforme. Questa strategia fornisce diversi vantaggi significativi:

- Per gli input di DNA tra 100-500 ng, non è richiesta l'accurata quantificazione del campione di DNA iniziale. La dimensione degli inserti dei frammenti di DNA non incide sull'input di DNA entro questo intervallo, riducendo i tempi e i costi associati a complessi processi di quantificazione.
- Con la tagmentazione su microsfere non è più necessario separare le fasi di frammentazione meccanica o enzimatica del DNA, riducendo tempo e costi associati a strumenti per la frammentazione (shearing) o kit enzimatici.
- Per input di DNA tra 100-500 ng, la tagmentazione su microsfere permette una normalizzazione del DNA in base alla saturazione, il che elimina la necessità di lunghe e singole quantificazioni e normalizzazioni delle librerie prima del raggruppamento in pool.

Inoltre, il flusso di lavoro di facile utilizzo riduce il numero di fasi con interventi manuali e supporta i sistemi di gestione dei liquidi per l'automazione della preparazione delle librerie. Tutti questi progressi forniscono un flusso di lavoro con il più basso numero di fasi e con la durata del flusso di lavoro più veloce nel portafoglio Illumina (Figura 2).

Input di DNA integrato

Grazie a DNA Prep Kit e Flex Lysis Reagent Kit Illumina, l'estrazione del DNA può essere eseguita direttamente da campioni di sangue fresco o saliva. Il kit facoltativo Flex Lysis Reagent Kit è stato ottimizzato e convalidato per la preparazione delle librerie DNA Prep Illumina e le fasi del flusso di lavoro, i reagenti e le istruzioni contenute nella guida per l'utente sono completamente integrate per garantire la massima efficienza. I protocolli per la lisi vengono eseguiti con comodi reagenti basati su microsfere che richiedono 30 minuti di interventi manuali e si integrano direttamente nella tagmentazione DNA Prep Illumina.

Prestazioni ottimizzate della preparazione delle librerie

Le proprietà della tagmentazione su microsferi hanno significativamente migliorato le prestazioni della preparazione delle librerie. DNA Prep Kit Illumina genera dimensioni di inserti estremamente uniformi e coerenti (300-350 bp), su un'ampia gamma di input di DNA (1-500 ng) (Figura 3). Poiché la tagmentazione su microsferi genera dimensioni di inserti uniformi su un'ampia gamma di input, non è più necessaria l'attenta ottimizzazione del rapporto trasposone:DNA per controllare la lunghezza del frammento. Inoltre, la flessibilità offerta dall'ampia gamma di input di DNA consente di eseguire esperimenti con diversi tipi di campioni, inclusi i campioni preziosi. Oltre alle dimensioni di inserti uniformi, la tagmentazione su microsferi fornisce una resa delle librerie uniforme e coerente su un'ampia gamma di input di DNA (100-500 ng) (Figura 4). A input di DNA pari o prossimi a 100 ng, avviene la saturazione delle microsferi, che fornisce rese normalizzate e coerenti, eliminando la necessità di lunghe fasi di quantizzazione e normalizzazione delle librerie prima del raggruppamento in pool. Un confronto sulle prestazioni tra DNA Prep and TruSeq™ Nano DNA Library Prep Kit Illumina, DNA Prep Kit Illumina ha generato più risultati paragonabili o, per determinate metriche, migliori rispetto alla frammentazione meccanica (Tabella 3).

Oltre ai miglioramenti nel flusso di lavoro supportato dalla tecnologia basata su microsferi, il vantaggio più significativo delle dimensioni di inserti e di rese delle librerie coerenti e uniformi è una copertura ancora più uniforme e omogenea sul genoma sia per specie umana che non umana (Figura 5). Anche i genomi con contenuto in GC elevato o basso mostrano una straordinaria copertura omogenea senza distorsioni delle regioni specifiche (Figura 5B).

Tabella 3: Prestazioni di DNA Prep Illumina

Parametro ^a	DNA Prep Illumina	TruSeq Nano
Letture paired-end che attraversano il filtro	3,7 × 10 ⁸	3,7 × 10 ⁸
Identificazioni autosomiche	96,5%	96,9%
Identificazioni autosomiche di esoni	98,4%	98,4%
Copertura autosomica > 10x	98,5%	98,6%
Identificazione ripetuta di SNV	98,7%	98,7%
Precisione SNV	99,8%	99,7%
Identificazione ripetuta delle Indel	93,7%	92,9%
Precisione delle Indel	97,0%	94,9%

a. L'analisi è stata eseguita su 20 campioni (tutti i campioni NA12878 Coriell), su cinque corse, per il build del genoma umano di circa 30x. L'analisi dei dati è stata eseguita mediante le applicazioni BaseSpace™ Apps Whole Genome Sequencing v6.0.0 e Variant Calling Assessment Tool v3.0.0. SNV = variante di singolo nucleotide, Indel = variante inserzione-delezione.

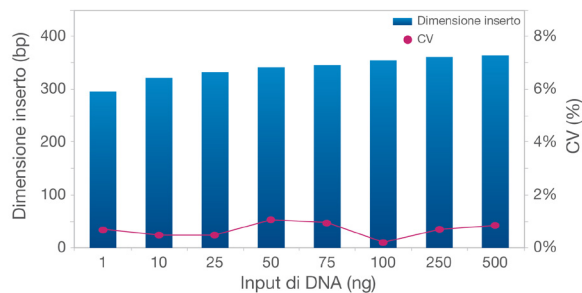


Figura 3: Dimensioni di inserto uniformi e coerenti: la tagmentazione su microsferi fornisce dimensioni di inserti coerenti indipendentemente dalla quantità di input di DNA. Da 1-500 ng di input di DNA, il coefficiente di variazione complessivo (Coefficient Of Variance, CV) è di 6,09%. Le librerie sono state generate con campioni replicati di *E. coli* utilizzando DNA Prep Illumina. La corsa è stata eseguita su un sistema MiSeq™ (corsa da 2 × 76 bp).

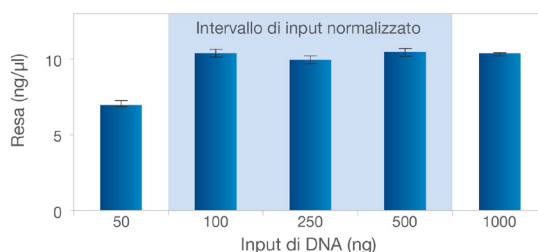


Figura 4: Librerie tagmentate e normalizzate: le microsferi pari o superiori a 100 ng vengono saturate e forniscono una resa di DNA tagmentato e normalizzato. La normalizzazione del DNA tagmentato elimina le fasi di normalizzazione delle librerie a valle. Le librerie sono state generate con i campioni Human-NA12878 (Coriell Institute) utilizzando DNA Prep Illumina. La corsa è stata eseguita su un sistema MiSeq (2 × 76 bp).

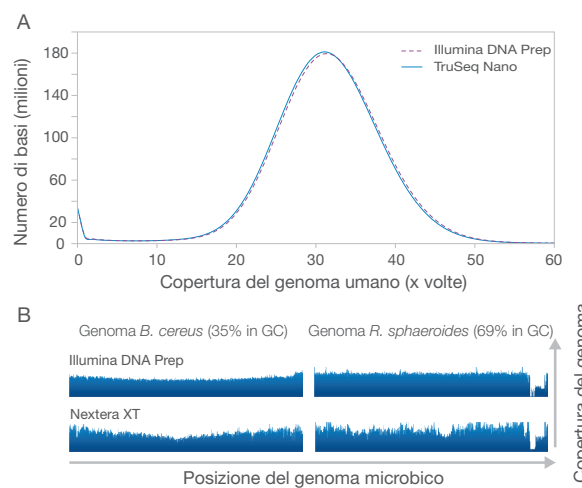


Figura 5: DNA Prep Illumina migliora l'uniformità di copertura: (A) DNA Prep Illumina fornisce una copertura uniforme sul genoma paragonabile a quella di TruSeq Nano DNA Kit. Le librerie sono state generate con i campioni Human-NA12878 (Coriell Institute) utilizzando DNA Prep Kit o TruSeq Nano Kit Illumina. Il sequenziamento è stato eseguito su un sistema HiSeq X™ (2 × 151 bp). (B) La copertura è mostrata per microorganismi che presentano contenuto in GC estremamente elevato o basso. Grazie alla migliorata chimica di preparazione delle librerie su microsferi, DNA Prep Illumina mostra una copertura più uniforme rispetto a Nextera XT. Le librerie sono state preparate con Nextera XT Kit o DNA Prep Kit Illumina. I dati sono stati generati su un sistema HiSeq™ 2500 (Rapid Run v2, 2 × 151 bp).

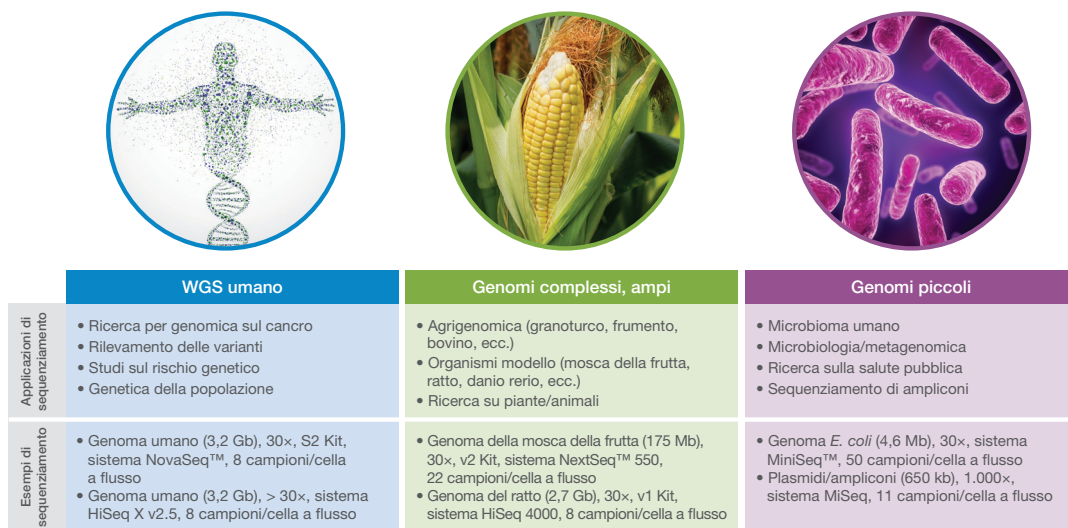


Figura 6: Ampia gamma di applicazioni con DNA Prep Illumina: dal sequenziamento WGS umano dai genomi ampi/complessi fino ai genomi microbici piccoli, DNA Prep Illumina fornisce la flessibilità sperimentale.

Flusso di lavoro flessibile per un'ampia gamma di applicazioni

Il più grande vantaggio di DNA Prep Illumina è forse rappresentato dalla flessibilità offerta per un'ampia gamma di interessi e applicazioni di ricerca. Il kit supporta il sequenziamento WGS umano, la ricerca per genomica sul cancro, la metagenomica ambientale, la ricerca su malattie infettive, l'agrigenomica e altro (Figura 6). Sia che si tratti del sequenziamento di genomi complessi e ampi o di genomi piccoli, plasmidi, ampliconi, batteri gram positivi/gram negativi, funghi o una gamma di specie vegetale o animale, DNA Prep Illumina fornisce una copertura genomica completa. Il flusso di lavoro flessibile e di facile utilizzo si può adattare a utenti con diversi livelli di esperienza, diverse applicazioni e diversi tipi di input di campione.

Riepilogo

DNA Prep Kit Illumina fornisce un flusso di lavoro rivoluzionario che combina estrazione del DNA, quantizzazione, frammentazione e normalizzazione delle librerie per offrire il flusso di lavoro più veloce e flessibile nel portafoglio Illumina. Il flusso di lavoro di facile utilizzo e compatibile con l'automazione supporta utenti con tutti i livelli di esperienza fornendo un flusso di lavoro comune per diverse progettazioni sperimentali. La chimica di tagmentazione su microsferi supporta un'ampia gamma di quantità di input di DNA, diversi tipi di campioni e una vasta gamma di applicazioni, inclusi il sequenziamento WGS umano, la metagenomica ambientale, la ricerca su vegetali e animali, la profilazione del tumore e altro. Scoprite come oggi il flusso di lavoro innovativo DNA Prep Illumina combinato con la straordinaria chimica SBS Illumina è in grado di far progredire e accelerare gli obiettivi della vostra ricerca.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su DNA Prep Illumina, visitate la pagina Web www.illumina.com/illumina-dna-prep.

Per maggiori informazioni su WGS con DNA Prep Illumina, leggete la nota sull'applicazione del sequenziamento WGS umano e le note sull'applicazione del sequenziamento WGS microbico.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 campioni)	20018704
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (96 campioni)	20018705
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
IDT® for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20027214
IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set C (96 indici, 96 campioni)	20027215
IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set D (96 indici, 96 campioni)	20027216
IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set A-D (384 indici, 384 campioni)	20027217
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20042666 Presto disponibile
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20042667 Presto disponibile
Nextera DNA CD Indexes (24 indici, 24 campioni)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (96 indici, 96 campioni)	20018708
*IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes® sono i nuovi nomi per "IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes"; il contenuto dei kit rimane lo stesso.	

Bibliografia

- Illumina (2014). [Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#) (Scheda tecnica di Nextera XT DNA Library Preparation Kit). Consultato il 14 aprile 2020.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry.](#) *Nature*. 2008;456:53-59.