

illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

Elevate prestazioni per applicazioni sensibili come il sequenziamento dell'intero genoma umano.

Punti principali

- Copertura dell'intero genoma altamente accurata**
 Risultati con meno spazi non coperti, anche in regioni genomiche con GC elevato o contenuto AT elevato
- Flusso di lavoro semplificato con durate complessive ridotte**
 Supporta il raggruppamento in pool di librerie basate sul volume e riduce al minimo le fasi di quantificazione prima e dopo la generazione delle librerie
- Altamente compatibile con l'automazione**
 Si integra con la robotica per la gestione dei liquidi per automatizzare i flussi di lavoro, ridurre i punti di contatto e ridurre significativamente la durata
- Eccellenti prestazioni con basso input di campioni di DNA**
 Offre identificazione delle basi e identificazione delle varianti accurate per un'ampia gamma di quantità di input di DNA

Introduzione

Il sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) ha rivoluzionato il modo in cui i ricercatori eseguono gli studi genomici aumentando in modo significativo la quantità e la qualità dei dati che possono essere generati per corsa riducendo al contempo il costo e la durata per ottenere la risposta. Sebbene negli ultimi anni la tecnologia di sequenziamento Illumina sia avanzata rapidamente, i protocolli per la preparazione delle librerie dipendenti dalla PCR presentano ancora sfide significative. Le distorsioni della PCR possono comportare una copertura non omogenea sulle regioni del genoma, specialmente nelle regioni con una composizione di basi estremamente non omogenea. Per affrontare queste sfide, Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) offre una combinazione di tagmentazione su microsferi con un flusso di lavoro senza PCR (Figura 1).

Come funziona

La tagmentazione è una reazione mediata da trasposoni che combina la marcatura con la tagmentazione del DNA in una singola e rapida reazione. La tagmentazione su microsferi utilizza i trasposoni legati alle microsferi per eseguire una reazione di tagmentazione più uniforme rispetto alla tagmentazione in soluzione. Dopo che i trasposoni legati alle microsferi vengono saturati con il DNA, non avviene nessun'altra tagmentazione, il che offre una resa della libreria coerente e dimensioni di inserti della libreria uniformi.^{1,2} Inoltre, rimuovendo le fasi di amplificazione della PCR, la chimica Illumina DNA PCR-Free elimina le distorsioni indotte dalla PCR e fornisce informazioni altamente accurate sul sequenziamento per applicazioni sensibili come l'identificazione della variante tumore-normale o il sequenziamento dell'intero genoma (Whole-Genome Sequencing, WGS) umano. Il saggio Illumina DNA PCR-Free può essere completato in 90 minuti a partire dal DNA genomico (Genomic DNA, gDNA) estratto oppure in appena 2,5 ore a partire dai campioni non elaborati come sangue o saliva (Tabella 1).

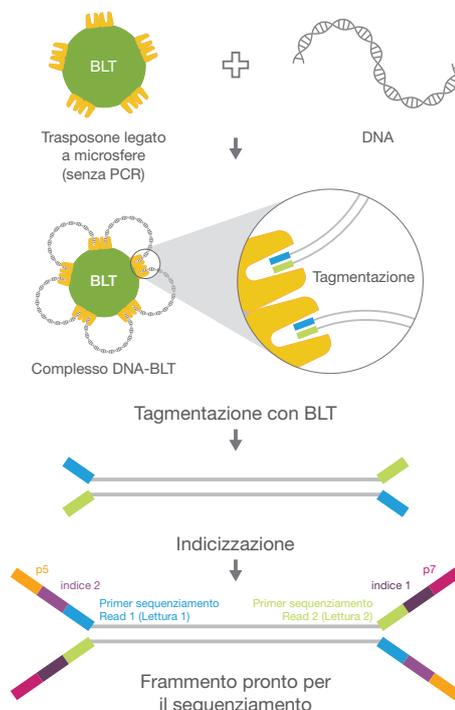


Figura 1: Chimica Illumina DNA PCR-Free: una soluzione efficiente per la preparazione e l'indicizzazione delle librerie di campioni.

Tabela 1: Specifiche di Illumina DNA PCR-Free

Parametro	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
Tipo di input di DNA	gDNA, sangue, saliva, plasmidi, gocce di sangue secco	gDNA
Quantità di input di DNA	da 25 ng a 2 µg	1-2 µg
Metodo di frammentazione	Tagmentazione su microsferi	Sonicazione Covaris
Multiplex campioni	384 indici doppi	96 indici doppi
Sistemi di sequenziamento supportati	Sistemi MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, HiSeq 2500, HiSeq 3000/4000, NovaSeq 6000	Tutti i sistemi di sequenziamento Illumina
Durata totale del flusso di lavoro ^a	circa 90 minuti per gDNA estratto circa 2,5 ore per sangue o saliva	circa 11 ore
Dimensione inserto	450 bp	350 bp o 550 bp

a. La durata totale del flusso di lavoro include le fasi di estrazione e quantificazione del DNA (o Flex Lysis), tagmentazione e raggruppamento in pool delle librerie
 b. Per regolare le dimensioni di inserti da 350 bp o 550 bp, leggere la nota sull'applicazione Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Dimensioni di inserti regolabili con Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation)

Elevata uniformità di copertura del genoma intero per WGS umano

L'uniformità di copertura misura la completezza dei dati sul genoma per una corsa di sequenziamento. La copertura uniforme consente l'identificazione più accurata delle varianti lontane dalla profondità media.³ Per valutare le prestazioni della copertura su un range di contenuto in GC basso, medio ed elevato, i dati della copertura normalizzata ottenuti da Illumina DNA PCR-Free e TruSeq™ DNA PCR-Free sono stati tracciati sul contenuto del genoma umano in base alla percentuale in GC. Il gruppo di dati del genoma umano sono costituiti dal 20-70% della sequenza GC. Entrambi i kit mostrano livelli di copertura omogenei su un range di contenuto in GC come rappresentato dai dati WGS umani (Figura 2), indicando che Illumina DNA PCR-Free è particolarmente adatto per le applicazioni WGS umane.

Copertura omogenea su regioni con GC elevato o AT elevato

A causa degli elementi strutturali della trascrizione del genoma umano, le regioni del promotore del gene umano sono frequentemente ricche in GC o scarse in GC e può essere difficile amplificarle con la PCR.⁴ Pertanto, le librerie WGS umane preparate con i kit che escludono la PCR possono mostrare una migliore copertura in determinate regioni del promotore ricco in GC. Per confrontare le prestazioni sulla copertura di Illumina DNA PCR-Free, TruSeq DNA PCR-Free e TruSeq DNA Nano (inclusa la PCR), sono state preparate librerie dal gDNA della linea cellulare umana NA12878 (Coriell Institute). Le librerie sono state sequenziate su un sistema HiSeq™ con una configurazione di 2×150 bp. I dati sono stati sottocampionati a una copertura di $32\times-40\times$. Rispetto ai dati ottenuti con TruSeq DNA Nano, i set di dati ottenuti da Illumina DNA PCR-Free e da TruSeq DNA PCR-Free hanno mostrato una copertura superiore su una regione di vuoto con GC elevato nel gene umano *RNPEPL1* (Figura 3). L'utilizzo di Illumina DNA PCR-Free migliora la copertura sulle regioni difficili.

Prestazioni eccellenti su una gamma di quantità di input di DNA

Le prestazioni di Illumina DNA PCR-Free sono state valutate su una gamma di quantità di input di DNA. Le librerie sono state preparate da DNA della linea cellulare umana (Coriell Institute, NA12878) utilizzando quantità di input di 600 ng e 20-200 ng* con TruSeq DNA PCR-Free e Illumina DNA PCR-Free, rispettivamente. Le librerie sono state sequenziate su un sistema NovaSeq™ 6000 con una configurazione della corsa di 2×150 bp e sottocampionate a una copertura media di $40\times$. Sono stati confrontati i punteggi qualitativi, le identificazioni delle basi e le identificazioni delle varianti. Il 75% dei dati ottenuti da ogni tipo di libreria ha superato la specifica di qualità Q30 per il sistema NovaSeq 6000 (Figura 4a). I set di dati hanno inoltre mostrato prestazioni equivalenti nell'identificazione delle basi sia negli autosomi che negli esoni e prestazioni equivalenti nell'identificazione delle varianti (Figura 4b). Erano inoltre equivalenti la qualità dei dati, le prestazioni nell'identificazione delle basi e l'identificazione delle varianti su tutti gli input di DNA, inclusi input bassi di 20 ng*.

Protocollo di tagmentazione su microsfere e senza PCR

Illumina DNA PCR-Free fornisce una combinazione unica ed efficace di vantaggi offerti dalla chimica di tagmentazione su microsfere e senza PCR. Il punto di saturazione su microsfere di Illumina DNA PCR-Free è ≥ 300 ng di gDNA. La saturazione su microsfere consente il controllo efficace sulla dimensione di inserti e le rese normalizzate da quantità di input di DNA superiori a 300 ng. Questo consente di ridurre al minimo le fasi di quantificazione sia prima che dopo la preparazione delle librerie. Le librerie normalizzate possono essere raggruppate in pool in base al volume evitando la lunga quantificazione di singole librerie. Eliminando la quantificazione e

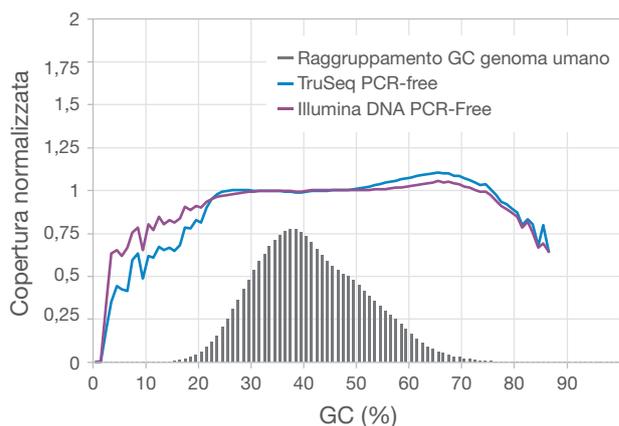
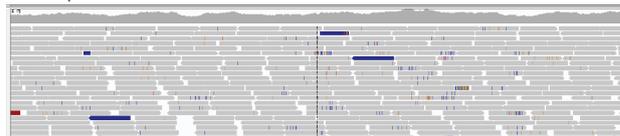


Figura 2: Uniformità di copertura di Illumina DNA PCR-Free: Illumina DNA PCR-Free fornisce uniformità di copertura su un range di contenuto in GC nel genoma umano.

Illumina DNA PCR-Free



TruSeq PCR-free



TruSeq Nano

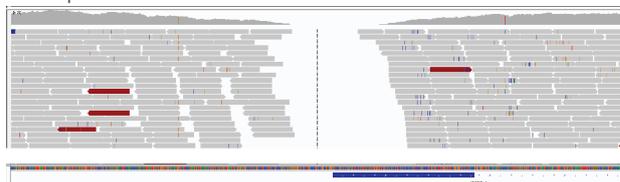


Figura 3: Confronto della copertura delle letture su regioni ricche in GC: Illumina DNA PCR-Free Library Prep Kit fornisce copertura delle letture superiore su regioni del promotore ricche in GC del gene umano *RNPEPL1*, rispetto a TruSeq DNA PCR-Free Kit e TruSeq DNA Nano Library Prep Kit. Le mappature delle letture sono visualizzate nell'applicazione Integrative Genomics Viewer (IGV), disponibile in BaseSpace™ Sequence Hub.

le fasi della PCR, Illumina DNA PCR-Free offre un saggio ottimizzato di 90 minuti (Figura 5). Sebbene la normalizzazione venga raggiunta con input ≥ 150 ng, possono essere generate librerie altamente performanti con appena 20 ng* di DNA input. La capacità di preparare librerie senza PCR da bassi input di DNA consente di eseguire applicazioni come WGS da gocce di sangue secco.

Multiplex campioni efficace per applicazioni a elevata processività

Illumina DNA PCR-Free è compatibile con IDT for Illumina DNA Unique Dual Indexes, che consentono il demultiplex efficace dei campioni sui sistemi di sequenziamento Illumina. Sono disponibili fino a 384 indici che forniscono la massima flessibilità per progetti di sequenziamento a elevata processività.

* Il range di input raccomandato per Illumina DNA PCR-Free è di 25-300 ng.

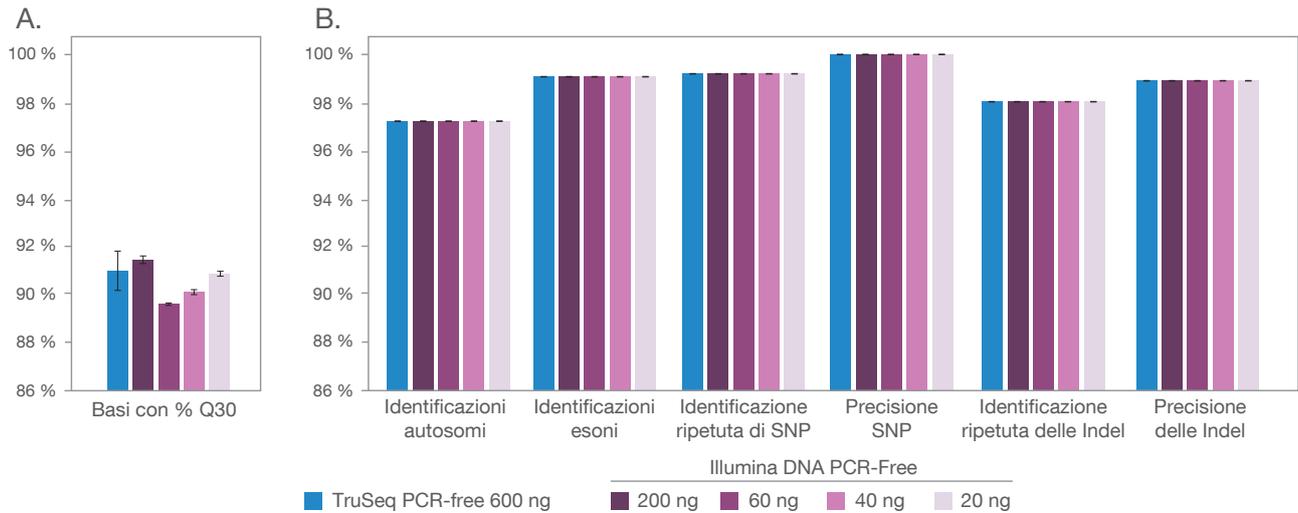


Figura 4: Prestazioni di Illumina DNA PCR-Free su un range di input di DNA: le librerie Illumina DNA PCR-Free preparate da un range di input di DNA dimostrano che (A) hanno superato le specifiche di qualità per tutti gli input di DNA e che (B) le prestazioni relative all'identificazione sono equivalenti. Punteggio Q30 = un'accuratezza di identificazione delle basi desunta del 99,9%, identificazione autosomi = la percentuale di posizioni di riferimento non N in cromosomi autosomici con un'identificazione del genotipo superata, identificazione esoni = la percentuale di posizioni di riferimento non N in esoni con un'identificazione del genotipo superata, SNP = polimorfismo di singolo nucleotide, indel = mutazione inserzione-delezione, precisione (accuratezza) = calcolata come il rapporto di $[\text{n. identificazioni vere positive} / (\text{n. identificazioni vere positive} + \text{n. identificazioni false positive})]$, reidentificazione (sensibilità) = calcolata come il rapporto di $[\text{n. identificazioni vere positive} / (\text{n. identificazioni vere positive} + \text{n. identificazioni fase negative})]$. Nota: le specifiche per il limite inferiore dell'input di campione per Illumina DNA PCR-Free non sono state finalizzate.

TruSeq DNA PCR-Free

Preparazione delle librerie con ligazione degli adattatori e marcatura degli indici	Quantificazione e normalizzazione manuale delle librerie	Raggruppamento in pool manuale
5 ore	2 ore	0,5 ore

Company K

Preparazione delle librerie con flusso di lavoro Company K	Quantificazione e normalizzazione manuale delle librerie	Raggruppamento in pool manuale
circa 2,5 ore	2 ore	0,5 ore

Company N

Preparazione delle librerie con flusso di lavoro Company N	Quantificazione e normalizzazione manuale delle librerie	Raggruppamento in pool manuale
circa 2,5 ore	2 ore	0,5 ore

Illumina DNA PCR-Free, sangue o saliva

Illumina Lysis Kit	Preparazione delle librerie mediante tagmentazione Nextera senza PCR	Pool per volume
circa 1,5 ore	1,5 ore	0,5 ore

Illumina DNA PCR-Free, gDNA

Preparazione delle librerie mediante tagmentazione legata alle microsfere senza PCR	Pool per volume
1,5 ore	0,5 ore

Figura 5: Flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free: la durata totale del saggio per il flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free è rapida: 90 minuti dalla frammentazione o dalla tagmentazione fino alla pulizia della libreria. Dati in archivio, Illumina, Inc. 2019 Nota: Company N utilizza reagenti proprietari assieme agli adattatori divergenti Illumina.

Tabella 2: Materiali di consumo per l'automazione - 96 campioni

Metodo	Tipo di campione	Punti di contatto	Piastre a 96 campioni	Punte	Durata
TruSeq DNA PCR-Free	gDNA	20	20	5.504	10 ore e 10 min
Company K	gDNA	13	19	4.076	6 ore e 21 min
Company N	gDNA	13	17	3.266	5 ore e 42 min
Illumina DNA PCR-Free (+ quantizzazione di pool mediante qPCR facoltativa)	sangue, saliva	2 (6)	10 (12)	2.016 (2.072)	2 ore e 32 min (4 ore e 7 min)
Illumina DNA PCR-Free (+ quantizzazione di pool mediante qPCR facoltativa)	gDNA	2 (6)	8 (10)	1.604 (1.660)	1 ora e 32 min (3 ore e 7 min)

Adattato utilizzando il software Hamilton per Hamilton Star con testata core da 96 + 8 canali. La qPCR è inclusa nel modello per l'automazione per tutti i flussi di lavoro campione per campione. I flussi di lavoro diversi da Illumina DNA PCR-Free presumono che ogni campione sia misurato, regolato e raggruppato in pool in base alla qPCR. Il raggruppamento in pool si basa su quattro pool di 24 campioni. Dati in archivio, Illumina, Inc. 2019 Nota: Company N utilizza reagenti proprietari assieme agli adattatori divergenti Illumina.

Flussi di lavoro compatibili con l'automazione

Illumina DNA PCR-Free è altamente compatibile con l'automazione grazie al flusso di lavoro rapido e semplificato. Grazie alla natura coerente e auto-normalizzante del flusso di lavoro basato sulle microsfere, gli utenti possono partire da campioni di sangue o saliva non elaborati, eseguire il protocollo Flex Lysis e procedere con la preparazione delle librerie senza alcuna fase di quantificazione. Queste caratteristiche consentono un semplice flusso di lavoro per l'elaborazione di batch di campioni non elaborati su piattaforme di gestione dei liquidi.

Per dimostrare la compatibilità, sono stati confrontati flussi di lavoro automatizzati TruSeq DNA PCR-Free e due flussi di lavoro senza PCR basati su enzimi della concorrenza con Illumina DNA PCR-Free. Per ogni flusso di lavoro sono stati calcolati i punti di contatto, la strumentazione da laboratorio e il tempo richiesto per la preparazione delle librerie di batch da 96 campioni sul robot di gestione dei liquidi Hamilton. I risultati hanno mostrato che Illumina DNA PCR-Free consente di risparmiare tempo in modo significativo (Tabella 2).

Costi ridotti con Illumina DNA PCR-Free

La strumentazione da laboratorio, le punte e i reagenti qPCR contribuiscono ai costi nascosti durante la preparazione delle librerie per la tecnologia NGS. Un vantaggio fondamentale della tecnologia basata su microsfere è la normalizzazione automatica basata su microsfere di tutte le librerie in un batch, eliminando la quantificazione di singole librerie e consentendo il raggruppamento in pool in base allo stesso volume.

Poiché tutte le librerie senza PCR vengono di solito quantificate mediante qPCR, Illumina DNA PCR-Free elimina o riduce in modo significativo la quantità di qPCR coinvolta nel protocollo complessivo di preparazione delle librerie (ad esempio, amplificazione delle librerie mediante PCR e quantificazione dopo la preparazione delle librerie). Un modello basato sui costi nascosti, inclusi i reagenti qPCR, la strumentazione da laboratorio, le punte, i reagenti di quantificazione e i kit di estrazione di terze parti, mostra che il flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free consente risparmi sostanziali.⁵ Ad esempio, i costi nascosti possono rappresentare circa il 56% dei costi totali per il flusso di lavoro TruSeq PCR-Free oppure circa il 44% per i kit della concorrenza senza PCR basati sugli enzimi.[†] Per il flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free, i costi nascosti sono circa il 21% ossia un riduzione sostanziale rispetto ad altri kit di preparazione delle librerie.[†]

[†] Per questo calcolo, i costi dei kit di preparazione delle librerie sono gli stessi. I costi nascosti variano e sono calcolati come una proporzione del costo totale in base ai presupposti del flusso di lavoro (Tabella 1).

Riepilogo

Illumina DNA PCR-Free offre una combinazione unica di vantaggi grazie alle fasi della chimica di tagmentazione su microsfere e senza PCR. La tagmentazione su microsfere supporta la normalizzazione basata su microsfere, il facile raggruppamento in pool delle librerie in base al volume e l'eliminazione delle fasi di quantificazione prima e dopo la preparazione delle librerie. Il flusso di lavoro senza PCR semplifica e riduce la durata complessiva del flusso di lavoro fornendo al contempo elevata uniformità di copertura su regioni del genoma ripetitive o non omogenee. Grazie a Flex Lysis Reagent Kit integrato, il flusso di lavoro è compatibile con input di campione non elaborato come sangue, saliva, gocce di sangue secco. Per le applicazioni sensibili come WGS umano, assemblaggio *de novo* di genomi microbici o identificazione delle varianti tumore-normale, Illumina DNA PCR-Free offre dati della copertura uniformi, di facile utilizzo e altamente accurati.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni, visitate la pagina Web www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.html.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 campioni)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 campioni)	20041795
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 DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20042666 Disponibile a breve
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20042667 Disponibile a breve
Illumina DNA PCR-Free R1 Sequencing Primer	20041796
Illumina Lysis Reagent Kit	20042221
*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 (2018). [Nextera DNA Flex Library Preparation Kit](#). Consultato il 10 aprile 2020.
- Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, Czyz A, Morrell N, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722.
- Illumina (2013). [Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits Technical Note](#). Consultato il 10 maggio 2020.
- Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-25.
- Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc., 2019.