

Illumina DNA Prep

Un flujo de trabajo de preparación de librerías rápido e integrado para una amplia gama de aplicaciones de secuenciación

- Preparación de librerías en menos de 3 horas con puntos de contacto de participación activa mínimos
- Compatibilidad con un amplio intervalo de entradas de ADN (1 ng a 500 ng) y múltiples tipos de entrada de ADN
- Acceso a una amplia gama de aplicaciones con la capacidad de secuenciar genomas y amplicones grandes y pequeños



Introducción

Aunque los avances en la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, Next-Generation Sequencing) han acelerado el ritmo de la investigación genómica, numerosos laboratorios siguen experimentando cuellos de botella durante la fase de preparación de librerías del flujo de trabajo de NGS. Muchos laboratorios en los que hacen falta varios pasos previos y posteriores a la preparación de librerías tienen que lidiar con retrasos significativos antes de poder iniciar un experimento de secuenciación. Entre los pasos previos a la preparación de librerías, se incluyen la extracción, la cuantificación y la fragmentación del ADN, mientras que las evaluaciones de calidad, la cuantificación y la normalización de las librerías constituyen pasos posteriores a dicha preparación.

Nextera™ DNA Library Preparation Kit introdujo la química de tagmentación, que combinaba los pasos de fragmentación de ADN y de ligadura de adaptadores en una única reacción de 15 minutos, con lo que se redujo el tiempo de preparación de librerías a 90 minutos. Nextera XT DNA Library Prep Kit eliminó la necesidad de la cuantificación de librerías antes de la agrupación y la secuenciación de librerías.¹ Basándose en estas innovaciones, Illumina DNA Prep Kit* ofrece una química única (figura 1, tabla 1) que integra las etapas de extracción de ADN, fragmentación, preparación de librerías y normalización de librerías para ofrecer el flujo de trabajo más rápido y flexible de la gama de soluciones de preparación de librerías de Illumina (figura 2, tabla 2).

Además de ofrecer un flujo de trabajo rápido, Illumina DNA Prep Kit proporciona una extraordinaria flexibilidad en cuanto a los tipos y cantidades de entrada y permite aplicaciones muy variadas. Illumina DNA Prep Kit ofrece una cobertura del genoma uniforme y una calidad de datos excepcional desde la secuenciación del genoma completo (WGS, Whole-Genome Sequencing) humano hasta los pequeños plásmidos microbianos.

Flujo de trabajo rápido de preparación de librerías

Illumina DNA Prep Kit combina varias características para ofrecer el flujo de trabajo de preparación de librerías más rápido de la gama de soluciones de Illumina. Uno de los principales avances es la tagmentación en bolas, que usa procesos de transposomas vinculados por bolas que actúan como mediadores en una reacción de tagmentación más uniforme en comparación con las reacciones de tagmentación en la propia solución. Una vez que los transposomas vinculados por bolas se saturan de ADN, no se pueden realizar más procesos de tagmentación, lo que permite que el proceso de normalización por saturación sea extremadamente uniforme.

* Se trata de lo que antes se denominaba Nextera DNA Flex Library Preparation Kit.

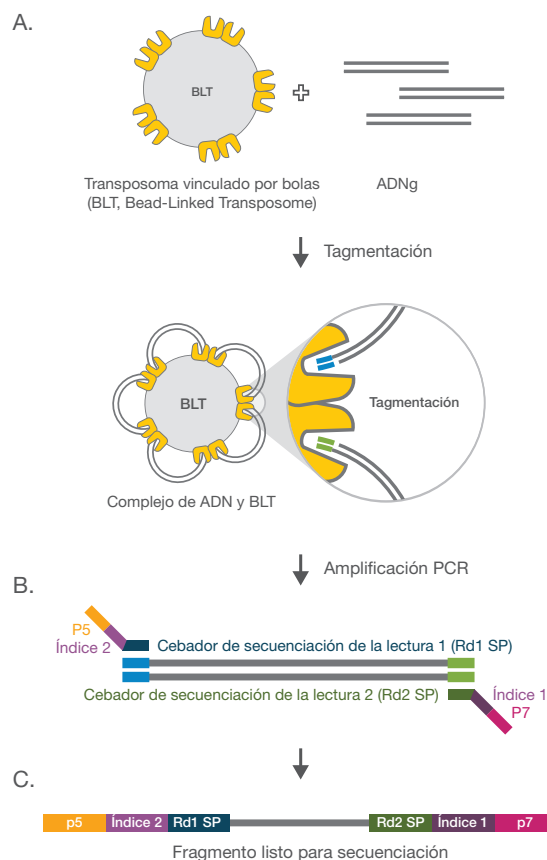


Figura 1: Química de transposomas vinculados por bolas de Illumina. (A) Los transposomas vinculados por bolas actúan como mediadores entre la fragmentación simultánea del ADN y la adición de cebadores de secuenciación. (B) La PCR de ciclo reducido amplifica los fragmentos de ADN listos para la secuenciación y añade índices y adaptadores. (C) Los fragmentos listos para la secuenciación se lavan y se agrupan.

Tabla 1: Especificaciones de Illumina DNA Prep

Parámetro	Especificación
Tipo de entrada de ADN	ADNg, sangre, saliva, amplicones de PCR, plásmidos y gotas de sangre seca
Cantidad necesaria de entrada de ADN	1-500 ng para genomas pequeños 100-500 ng para genomas grandes
Multiplexado de muestras	384 índices dobles
Sistemas de secuenciación compatibles	Todos los sistemas de Illumina
Duración total del flujo de trabajo ^a (ADNg)	3-4 h

a. Se incluyen los pasos de extracción de ADN, preparación de librerías y normalización y agrupación de librerías.

Esta estrategia ofrece varias ventajas significativas:

- En el caso de entradas de ADN con cantidades de 100 ng a 500 ng, no es necesario llevar a cabo una cuantificación exacta de la muestra de ADN inicial. El tamaño del fragmento de ADN no se ve afectado por la cantidad de entrada de ADN dentro de este intervalo, lo que ahorra tiempo y evita los costes asociados a los laboriosos procesos de cuantificación
- El proceso de tagmentación en bolas suprime la necesidad de llevar a cabo pasos independientes de fragmentación del ADN con medios mecánicos o enzimáticos, lo que ahorra tiempo y evita los costes asociados a los instrumentos de recorte o kits enzimáticos

- En el caso de las entradas de ADN de 100 ng a 500 ng, el proceso de tagmentación en bolas deriva en una normalización de ADN por saturación, por lo que ya no son necesarios los lentos procesos de cuantificación y normalización de librerías individuales antes de la agrupación

Además, el sencillo flujo de trabajo reduce el número de pasos para los que hace falta participación activa y admite sistemas de manipulación de líquidos para automatizar la preparación de librerías. Estos avances producen un flujo de trabajo con el mínimo número de pasos y la duración total más larga del flujo de trabajo de la gama de soluciones de Illumina (figura 2).

TruSeq Nano

Extracción de ADN	Cuantificación de ADN	Fragmentación de ADN	Preparación de librerías con ligadura de adaptadores y marcado de índices	Cuantificación de librerías	Normalización y agrupación manuales	Aprox. 11 h TWT
1 h	0,5 h	1 h	6 h	0,5 h	2 h	

Nextera XT

Extracción de ADN	Cuantificación de ADN	Preparación de librerías con tagmentación Nextera	Normalización y agrupación basados en bolas	Aprox. 5,5 h TWT
1 h	0,5 h	2,5 h	1,5 h	

Illumina DNA Prep

Extracción de ADN	Cuantificación de ADN	Preparación de librerías con tagmentación y normalización integrada Nextera	Aprox. 4 h TWT
1 h	0,5 h	2,5 h	

Illumina DNA Prep (blood)

Flex Lysis Kit	Preparación de librerías sin cuantificación, con tagmentación y normalización integrada Nextera	Aprox. 3 h TWT
0,5 h	2,5 h	

Figura 2: Illumina DNA Prep ofrece el flujo de trabajo de Illumina más rápido. Cálculos basados en el procesamiento de 16 muestras a la vez con una pipeta multicanal. TWT, duración total del flujo de trabajo, desde la extracción de ADN hasta la normalización y la agrupación de librerías. Duraciones de los pasos de los flujos de trabajo calculadas con métodos específicos: Extracción del ADN (QIAamp DNA Mini Kit o Flex Lysis Kit), cuantificación del ADN (Qubit), fragmentación del ADN (Covaris) y normalización y agrupación manual de librerías (Bioanalyzer). El tiempo puede variar dependiendo del equipo empleado, el número de muestras procesadas, los procedimientos de automatización o la experiencia del usuario. Los pasos del flujo de trabajo de color gris no se incluyen en los kits de preparación de librerías.

Tabla 2: Comparación de flujos de trabajo de preparación de librerías de Illumina

	TruSeq DNA Nano	Nextera XT	Illumina DNA Prep ^{a,b}
Protocolo de lisis de ADN integrado	—	—	✓
Intervalo amplio y flexible de cantidad de entrada de ADN	—	—	✓
Normalización de librerías incluida	—	✓	✓
Entrada de ADN	100-200 ng	1 ng	1-500 ng
Duración total de la preparación de librerías ^c	11 h	5 h	3-4 h
Tamaño de fragmento	350 pb o 550 pb	<300 pb	300-350 pb
Multiplexado de muestras	96 índices dobles	384 índices dobles	384 índices dobles

a. Hay protocolos integrados de extracción de ADN disponibles para muestras de sangre y gotas de sangre seca.

b. La normalización de librerías se produce con cantidades de entrada de ADN iguales o superiores a 100 ng.

c. Se incluyen los pasos de extracción de ADN, preparación de librerías y normalización y agrupación de librerías.

Entrada de ADN integrada

Gracias a Illumina DNA Prep Kits y Flex Lysis Reagent Kits, es posible extraer ADN directamente a partir de las muestras de sangre reciente. Los Flex Lysis Reagent Kits opcionales se han optimizado y validado para su uso con Illumina DNA Prep y los pasos del flujo de trabajo, los reactivos y las instrucciones de la guía del usuario se encuentran completamente integrados para lograr la máxima eficiencia. Los protocolos de lisis se llevan a cabo con cómodos reactivos basados en bolas, necesitan menos de 30 minutos de participación activa y se integran directamente en la reacción del proceso de tagmentación de Illumina DNA Prep.

Rendimiento optimizado

Las propiedades del proceso de tagmentación en bolas han hecho posible importantes mejoras en el rendimiento de la preparación de librerías. Illumina DNA Prep Kit produce fragmentos con un tamaño extremadamente uniforme y homogéneo (de 300 pb a 350 pb) en un amplio intervalo de entradas de ADN (de 1 ng a 500 ng) (figura 3). El proceso de tagmentación en bolas permite generar fragmentos de tamaño uniforme, lo que suprime la necesidad de optimizar con cautela la relación entre transposomas y ADN como forma de controlar la longitud de los fragmentos. Asimismo, el amplio intervalo de entradas de ADN favorece la flexibilidad en los experimentos con diversos tipos de muestras. Además de la uniformidad en el tamaño de los fragmentos, el proceso de tagmentación en bolas también ofrece librerías con un rendimiento uniforme y homogéneo (figura 4). Cuando la cantidad de entrada de ADN es de 100 ng o de aproximadamente este tamaño, las bolas se saturan, por lo que el rendimiento se normaliza y uniformiza. Además, se elimina la necesidad de llevar a cabo los lentos pasos de cuantificación y normalización de librerías antes de la agrupación. Al comparar el rendimiento de Illumina DNA Prep y de TruSeq™ DNA Nano Library Prep Kit, se observó que Illumina DNA Prep Kit produjo resultados comparables a la fragmentación mecánica o mejores, en el caso de algunos criterios de medición (tabla 3).

Más allá de las mejoras en el flujo de trabajo que favorece la tecnología basada en bolas, la ventaja más significativa de tener tamaños de fragmento y rendimientos de librerías homogéneos y uniformes es que la cobertura del genoma humano y del de especies no humanas es más regular y uniforme (figura 5A). Los genomas uniformes con alto o bajo contenido de GC muestran una cobertura extraordinariamente coherente sin tendencia específica de ninguna zona (figura 5B).

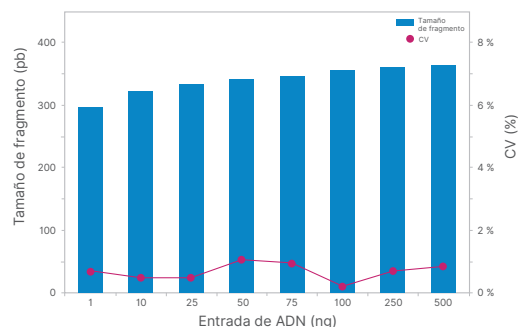


Figura 3: Tamaños de fragmento uniformes y homogéneos. El proceso de tagmentación en bolas ofrece fragmentos de tamaños homogéneos independientemente de la cantidad de entrada de ADN. Con cantidades de entrada de ADN de 1 ng a 500 ng, el coeficiente de variación (CV) total es del 6,09 %. Las librerías se produjeron con réplicas de muestras de *E. coli* empleando Illumina DNA Prep y experimentos en MiSeq™ System (2 × 76 pb).

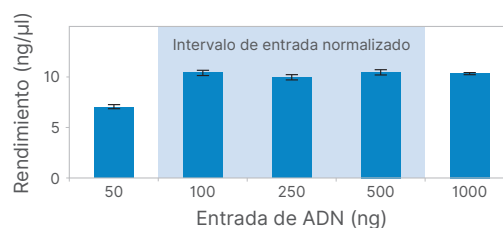


Figura 4: Librerías sometidas a un proceso de tagmentación y normalización. Las bolas se saturan a partir de 100 ng, lo que permite normalizar el rendimiento del ADN sometido a tagmentación, eliminando la necesidad de realizar pasos posteriores de normalización de librerías. Se produjeron librerías con muestras Human-NA12878 (Coriell Institute) y experimentos en MiSeq System (2 × 76 pb).

Tabla 3: Rendimiento de Illumina DNA Prep

Parámetro ^a	Illumina DNA Prep	TruSeq Nano
Lecturas PF "paired-end"	3,7 × 10 ⁸	3,7 × 10 ⁸
Capacidad de llamada de autosomas	96,5 %	96,9 %
Capacidad de llamada de exones de autosomas	98,4 %	98,4 %
Cobertura de autosomas >10×	98,5 %	98,6 %
Recuperación de SNV	98,7 %	98,7 %
Precisión de SNV	99,8 %	99,7 %
Recuperación de indel	93,7 %	92,9 %
Precisión de indel	97,0 %	94,9 %

a. El análisis se realizó con 20 muestras (todas ellas NA12878 Coriell), en cinco experimentos, con estructuras de genoma humano de aproximadamente 30x. Los datos se analizaron aplicando las aplicaciones de BaseSpace™ Whole Genome Sequencing v6.0.0 y Variant Calling Assessment Tool v3.0.0. SNV, variantes de nucleótido único; indel, variante de inserción y delección.

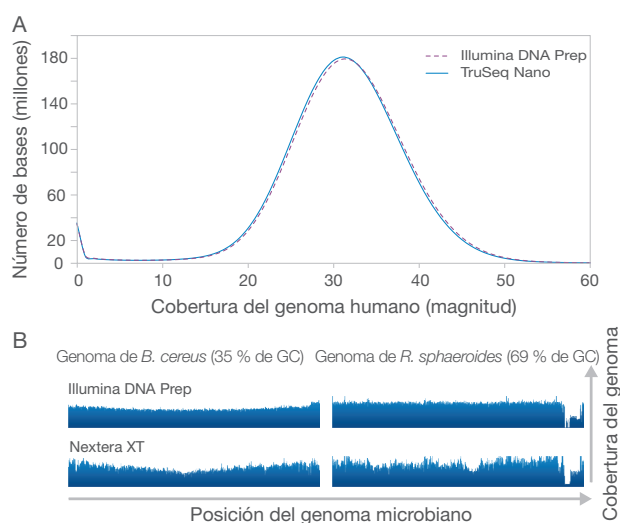


Figura 5: Aumento de la uniformidad de la cobertura.

(A) Illumina DNA Prep ofrece una cobertura uniforme del genoma, que es comparable a la de TruSeq DNA Nano Kit. Se produjeron librerías con muestras de Human-NA12878 (Coriell Institute) con Illumina DNA Prep Kit o TruSeq DNA Nano Kit. La secuenciación se realizó en HiSeq X™ System (2 × 151 pb). (B) Se muestra la cobertura para los microorganismos con contenido de GC extremadamente alto o bajo. Debido a la mejora de la química de preparación de librerías en bolas, Illumina DNA Prep muestra una cobertura más uniforme que la de Nextera XT. Las librerías se prepararon con Nextera XT Kit o Illumina DNA Prep Kit. Los datos se generaron con HiSeq™ 2500 System (Rapid Run v2, 2 × 151 pb).

El flujo de trabajo flexible favorece una amplia gama de aplicaciones

Es posible que la mayor ventaja de Illumina DNA Prep sea la flexibilidad que ofrece para una amplia gama de aplicaciones y campos de investigación de interés. El kit permite la secuenciación del genoma humano completo, la investigación genómica del cáncer, la metagenómica ambiental, la investigación de enfermedades infecciosas, la agrigenómica y mucho más (figura 6). Ya se realicen secuenciaciones de genomas grandes y complejos, genomas pequeños, plásmidos, amplicones, bacterias grampositivas o gramnegativas, hongos o distintas especies de animales y plantas, Illumina DNA Prep ofrece una cobertura genómica completa. El flujo de trabajo flexible y de uso sencillo para los usuarios se adapta a diversos niveles de experiencia, numerosas aplicaciones y diversos tipos de entrada de muestras.



	Secuenciación del genoma humano completo	Genomas grandes y complejos	Genomas pequeños
Aplicaciones de secuenciación	- Investigación genómica del cáncer - Detección de variantes - Estudios de riesgos genéticos - Genética de poblaciones	- Agrigenómica (maíz, trigo, res vacuna, etc.) - Organismos modelo (mosca de la fruta, ratón, rata, pez cebra, etc.) - Investigación de plantas y animales	- Microbioma humano - Microbiología/metagenómica - Investigación de salud pública - Secuenciación de amplicones

Figura 6: Amplia gama de aplicaciones con Illumina DNA Prep. Illumina DNA Prep ofrece flexibilidad en todos los experimentos, desde la secuenciación del genoma humano completo y genomas grandes y complejos, hasta la de pequeños genomas microbianos.

Resumen

Illumina DNA Prep Kit cuenta con un flujo de trabajo optimizado que combina la extracción, la cuantificación y la fragmentación del ADN, así como la normalización de librerías, para ofrecer el flujo de trabajo de preparación de librerías más rápido y flexible de la gama de soluciones de Illumina. El flujo de trabajo, de uso sencillo y con posibilidad de automatización, es apto para usuarios de cualquier nivel de experiencia, además de ser común a varios diseños de experimento. La química de tagmentación en bolas admite una amplia gama de cantidades de entrada de ADN, diversos tipos de muestras y muchas aplicaciones distintas, incluidas la secuenciación del genoma humano completo, la metagenómica ambiental, la investigación de plantas y animales, la creación de perfiles tumorales y mucho más. No espere más para constatar de qué manera el innovador flujo de trabajo de Illumina DNA Prep (combinado con la potencia de la química de SBS de Illumina) puede llevarle más rápido a lograr sus objetivos de investigación.

Información adicional

[Illumina DNA Prep](#)

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 samples, IPB)	20060060
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (96 samples, IPB)	20060059
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660
Nextera DNA CD Indexes (96 indexes, 96 samples)	20018708

Bibliografía

1. Illumina. [Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#). Fecha de publicación: 2 de noviembre de 2016. Fecha de consulta: 28 de agosto de 2023.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01373 ESP v1.0