

illumina DNA Prep

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie integrato e rapido per un'ampia gamma di applicazioni di sequenziamento

- Preparazione delle librerie in meno di 3 ore con interventi manuali minimi
- Compatibilità con vari range di input di DNA (da 1 a 500 ng) e diversi tipi di input di DNA
- Accesso a un'ampia gamma di applicazioni con la possibilità di sequenziare genomi piccoli e grandi e ampliconi

Introduzione

I progressi nel campo della tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) 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 una corsa di 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.

Il Nextera™ DNA Library Preparation Kit ha introdotto 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. Il Nextera XT DNA Library Prep Kit ha eliminato la quantificazione delle librerie prima del raggruppamento in pool e del sequenziamento.¹ Basandosi su queste innovazioni, l'Illumina DNA Prep Kit* offre una chimica unica (Figura 1, Tabella 1) che integra l'estrazione del DNA, la frammentazione, la preparazione delle librerie e la normalizzazione delle librerie per offrire il flusso di lavoro più veloce e più flessibile nel portafoglio di preparazione delle librerie di Illumina (Figura 2, Tabella 2).

Oltre a fornire un flusso di lavoro veloce, l'Illumina DNA Prep Kit offre una straordinaria flessibilità per tipo di input, quantità di input e un'ampia gamma di applicazioni supportate. Dal sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) umano fino a piccoli plasmidi microbici, l'Illumina DNA Prep Kit fornisce copertura del genoma uniforme e straordinaria qualità dei dati.

Rapido flusso di lavoro di preparazione delle librerie

L'Illumina DNA Prep Kit unisce diverse caratteristiche e fornisce il flusso di lavoro delle librerie più veloce all'interno del portafoglio di Illumina. Uno dei principali miglioramenti è rappresentato dalla tagmentazione su microsfere, che utilizza trasposoni legati alle microsfere per mediare una reazione di 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.

* In precedenza Nextera DNA Flex Library Preparation Kit.

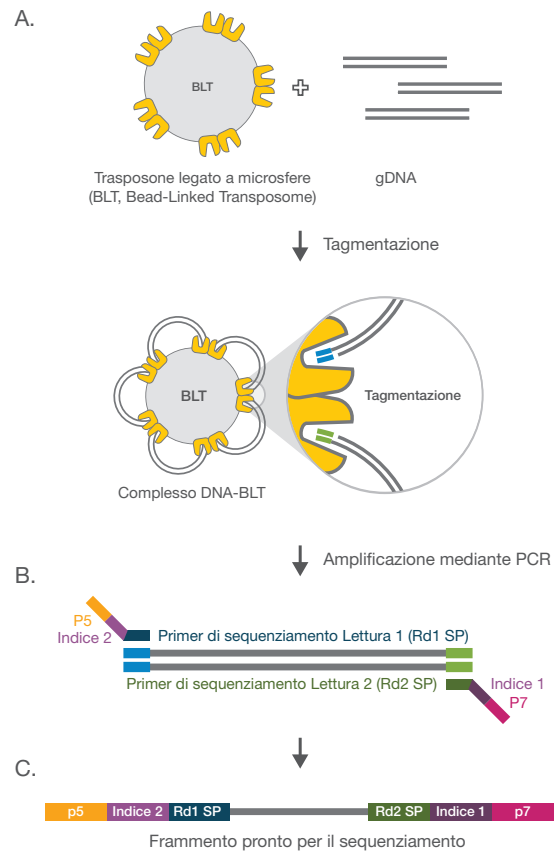


Figura 1: chimica dei trasposoni legati alle microsfere di Illumina. (A) I trasposoni legati alle microsfere mediano contemporaneamente la frammentazione del gDNA e l'aggiunta dei primer di sequenziamento; (B) cicli ridotti della PCR amplificano i frammenti di DNA pronti per il sequenziamento e l'aggiunta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

Tabella 1: specifiche dell'Illumina DNA Prep

Parametro	Specifica
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 grandi
Multiplex campioni	384 indici doppi
Sistemi di sequenziamento supportati	Tutti i sistemi di Illumina
Durata totale del flusso di lavoro ^a (gDNA)	3-4 ore

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

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 dei frammenti degli inserti di DNA non incide sull'input di DNA entro questo intervallo, il che riduce tempi e costi associati ai complessi processi di quantificazione.
- Con la tagmentazione su microsfere non è più necessario separare le fasi di frammentazione meccanica o enzimatica del DNA, il che riduce 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 basata sulla 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 la durata totale più ridotta del flusso di lavoro nel portafoglio di Illumina (Figura 2).

TruSeq Nano

Estrazione DNA	Quantificazione DNA	Fram. DNA	Preparazione delle librerie con ligazione degli adattatori e marcatura degli indici	Quantificazione libreria	Normalizzazione e pool manuale	Circa 11 ore TWT
1 ora	0,5 ore	1 ora	6 ore	0,5 ore	2 ore	

Nextera XT

Estrazione DNA	Quantificazione DNA	Preparazione delle librerie mediante tagmentazione Nextera	Normalizzazione basata su microsfere e pool di librerie	Circa 5,5 ore TWT
1 ora	0,5 ore	2,5 ore	1,5 ore	

Illumina DNA Prep

Estrazione DNA	Quantificazione DNA	Preparazione delle librerie mediante tagmentazione Nextera e normalizzazione integrata	Circa 4 ore TWT
1 ora	0,5 ore	2,5 ore	

Illumina DNA Prep (sangue)

Flex Lysis Kit	Preparazione delle librerie senza quantificazione mediante tagmentazione Nextera e normalizzazione integrata	Circa 3 ore TWT
0,5 ore	2,5 ore	

Figura 2: l'Illumina DNA Prep fornisce il flusso di lavoro di Illumina più veloce. I calcoli si basano sull'elaborazione di 16 campioni alla volta con una pipetta multicanale. TWT è la 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 tempistiche possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni analizzati, alle procedure automatizzate e 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 Illumina

	TruSeq DNA Nano	Nextera XT	Illumina DNA Prep ^{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	384 indici doppi

a. Sono disponibili protocolli di estrazione del DNA integrati per campioni di sangue e di gocce di sangue secco (DBS, Dry Blood Spot).

b. La normalizzazione delle librerie avviene con una quantità superiore o uguale a 100 ng di input di DNA.

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

Input di DNA integrato

Grazie agli Illumina DNA Prep Kit e ai Flex Lysis Reagent Kit, l'estrazione del DNA può essere eseguita direttamente da campioni di sangue fresco. Il Flex Lysis Reagent Kit è facoltativo ed è stato ottimizzato e convalidato per l'uso con l'Illumina DNA Prep 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 di lisi vengono eseguiti con comodi reagenti basati su microsfere che richiedono 30 minuti di interventi manuali e si integrano direttamente nella reazione di tagmentazione dell'Illumina DNA Prep.

Prestazioni ottimizzate

Le proprietà della tagmentazione su microsfere hanno significativamente migliorato le prestazioni nella preparazione delle librerie. L'Illumina DNA Prep Kit 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 microsfere genera dimensioni di inserti uniformi, 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. Oltre alle dimensioni di inserti uniformi, la tagmentazione su microsfere fornisce rese delle librerie uniformi e coerenti (Figura 4). A input di DNA pari o prossimi a 100 ng, avviene la saturazione delle microsfere, che fornisce rese normalizzate e coerenti, eliminando la necessità di lunghe fasi di quantificazione e normalizzazione delle librerie prima del raggruppamento in pool. In un confronto sulle prestazioni tra l'Illumina DNA Prep e il TruSeq™ DNA Nano Library Prep Kit, l'Illumina DNA Prep Kit ha generato 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 microsfere, 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 sia non umana (Figura 5A). Anche i genomi con contenuto in GC elevato o basso mostrano una straordinaria copertura omogenea senza distorsioni specifiche per regioni (Figura 5B).

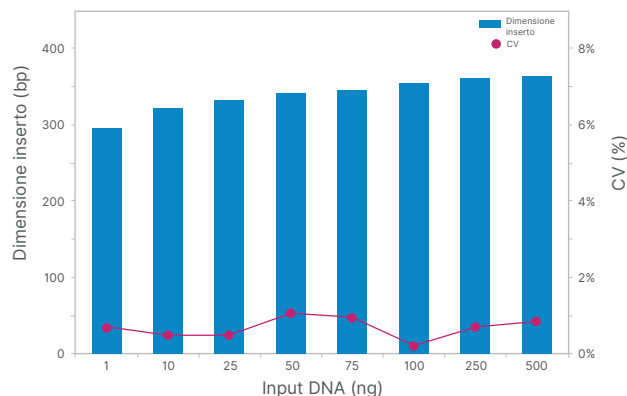


Figura 3: dimensioni di inserto uniformi e coerenti.

La tagmentazione su microsfere 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 (CV, Coefficient Of Variance) è di 6,09%. Le librerie sono state generate con campioni replicati di *E. coli* utilizzando Illumina DNA Prep e analizzate su un MiSeq™ System (2 × 76 bp).

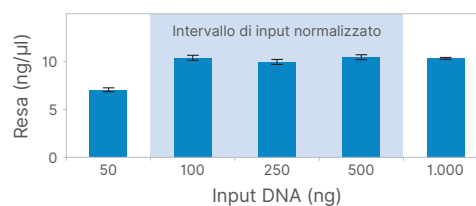


Figura 4: librerie tagmentate e normalizzate. Le microsfere si saturano a una quantità pari o superiore a 100 ng generando una resa normalizzata di DNA tagmentato il che elimina la necessità di passaggi a valle di normalizzazione delle librerie. Librerie generate con i campioni Human-NA12878 (Coriell Institute) e analizzate sul MiSeq System (2 × 76 bp).

Tabella 3: prestazioni dell'Illumina DNA Prep

Parametro ^a	Illumina DNA Prep	TruSeq Nano
PF letture paired-end	3,7 × 10 ⁸	3,7 × 10 ⁸
Identificazioni autosomi	96,5%	96,9%
Identificazioni esoni autosomici	98,4%	98,4%
Copertura autosomica >10×	98,5%	98,6%
Richiamo SNV	98,7%	98,7%
Precisione SNV	99,8%	99,7%
Richiamo indel	93,7%	92,9%
Precisione indel	97,0%	94,9%

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

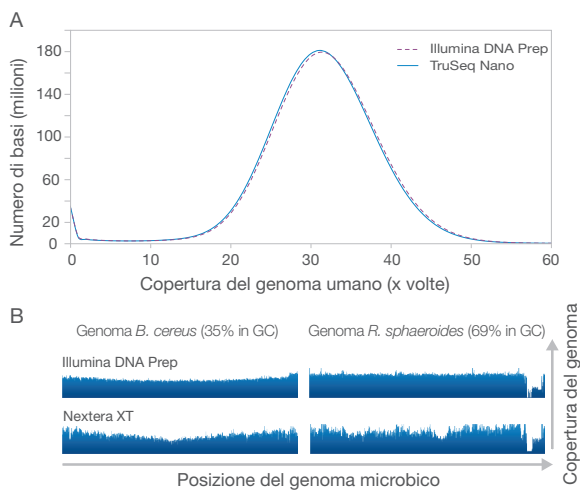
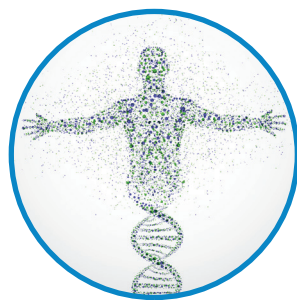


Figura 5: uniformità di copertura migliorata. (A) L'Illumina DNA Prep fornisce una copertura uniforme sul genoma paragonabile a quella del TruSeq DNA Nano Kit. Le librerie sono state generate con i campioni Human-NA12878 (Coriell Institute) utilizzando l'Illumina DNA Prep Kit o il TruSeq DNA Nano Kit. Il sequenziamento è stato eseguito su un HiSeq™ X System (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, l'Illumina DNA Prep mostra una copertura più uniforme rispetto al Nextera XT. Le librerie sono state preparate con i Nextera XT Kit o gli Illumina DNA Prep Kit. I dati sono stati generati su un HiSeq™ 2500 System (Rapid Run v2, 2 × 151 bp).

Flusso di lavoro flessibile per un'ampia gamma di applicazioni

Il più grande vantaggio dell'Illumina DNA Prep 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 grandi, di genomi piccoli, plasmidi, ampliconi, batteri gram positivi/gram negativi, funghi sia di una gamma di specie vegetale o animale, l'Illumina DNA Prep fornisce una copertura del genoma esaustiva. Il flusso di lavoro è flessibile e di facile utilizzo e si adatta a utenti con diversi livelli di esperienza, a diverse applicazioni e a diversi tipi di input di campione.



WGS umano

- Ricerca per genomica sul cancro
- Rilevamento delle varianti
- Studi sul rischio genetico
- Genetica della popolazione



Genomi complessi, grandi

- Agrigenomica (granoturco, frumento, bovini, ecc.)
- Organismi modello (mosca della frutta, topo, ratto, danio rerio, ecc.)
- Ricerca su piante/animali



Genomi piccoli

- Microbioma umano
- Microbiologia/metagenomica
- Ricerca sulla salute pubblica
- Sequenziamento di ampliconi

Figura 6: ampia gamma di applicazioni con l'Illumina DNA Prep. L'Illumina DNA Prep fornisce flessibilità sperimentale a partire dal sequenziamento WGS umano e dai genomi ampi/complessi fino ai genomi microbici piccoli.

Riepilogo

L'Illumina DNA Prep Kit fornisce un flusso di lavoro ottimizzato che unisce estrazione del DNA, quantificazione, frammentazione e normalizzazione delle librerie per offrire il flusso di lavoro più veloce e più flessibile nel portafoglio di 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 dell'Illumina DNA Prep combinato con la straordinaria chimica SBS di Illumina è in grado di far progredire e accelerare gli obiettivi della vostra ricerca.

Maggiori informazioni

[Illumina DNA Prep](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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

Bibliografia

1. Illumina. [Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#). Pubblicato il 2 novembre 2016. Consultato il 28 agosto 2023.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-01373 ITA v1.0