

Preparación de ADN de Illumina sin PCR, tagmentación

Alto rendimiento para aplicaciones sensibles como la secuenciación del genoma humano completo.

Puntos destacados

- Cobertura de alta precisión del genoma completo**
 Se generan menos huecos en la cobertura, incluso en regiones genómicas con un alto contenido en GC o en AT
- Flujo de trabajo simplificado con una menor duración global**
 Facilita la agrupación de bibliotecas en función del volumen y minimiza los pasos de cuantificación antes y después de la preparación de estas
- Alta compatibilidad con la automatización**
 Se integra con los robots de manipulación de líquidos para automatizar los flujos de trabajo, minimizar los puntos de contacto y ahorrar un tiempo considerable
- Rendimiento excelente con una pequeña entrada de muestra de ADN**
 Ofrece una llamada de bases y una identificación de variantes precisas para diversas cantidades de entrada de ADN

Introducción

La secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) ha revolucionado la forma de hacer estudios genómicos gracias al aumento considerable de la cantidad y la calidad de los datos que los investigadores pueden generar en cada experimento y gracias a la reducción del coste y del tiempo de obtención de respuesta. Aunque la tecnología de secuenciación de Illumina ha avanzado con rapidez en los últimos años, los protocolos de preparación de bibliotecas que dependen de la PCR siguen presentando importantes dificultades. El sesgo de la PCR puede dar lugar a una cobertura deficiente en algunas regiones del genoma, en particular en aquellas con una composición de bases sumamente irregular. Para abordar esta complicación, Preparación de muestras de ADN sin PCR de Illumina, tagmentación (ADN de Illumina sin PCR) ofrece una combinación única de tagmentación en bolas con un flujo de trabajo sin PCR (figura 1).

Funcionamiento

La tagmentación es una reacción mediada por transposomas que combina el marcaje y la fragmentación del ADN en una reacción única y rápida. En la tagmentación en bolas se utilizan transposomas vinculados por bolas para conseguir una reacción más uniforme de dicho proceso en comparación con las reacciones de tagmentación en la propia solución. Una vez que los transposomas vinculados por bolas se saturan de ADN, no pueden producirse más reacciones de tagmentación, lo que ofrece un rendimiento uniforme de la biblioteca y unos tamaños de fragmentos de la biblioteca homogéneos.^{1,2} Además, al suprimir los pasos de amplificación mediante PCR, el proceso químico de Illumina DNA sin PCR elimina el sesgo inducido por la PCR y proporciona una información muy precisa de las secuencias para aplicaciones sensibles como la identificación de variantes tumorales-normales o como la secuenciación del genoma humano completo (WGS, whole-genome sequencing). El ensayo de Illumina de ADN sin PCR puede completarse en 90 minutos si se utiliza ADN genómico (ADNg) extraído o en tan solo 2,5 horas si se utilizan muestras sin procesar como, sangre o saliva (tabla 1).

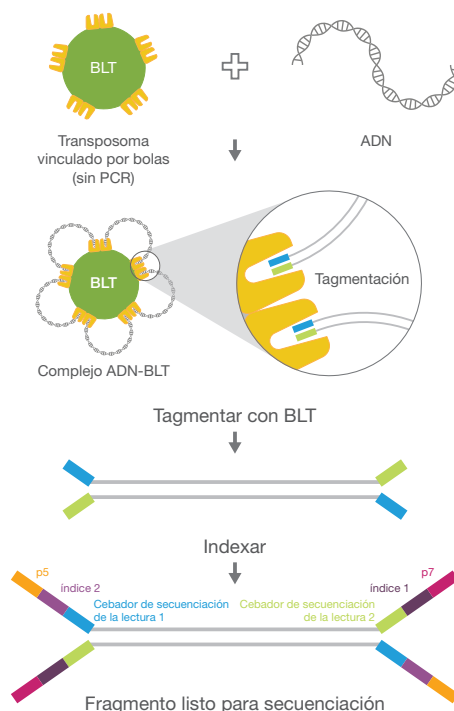


Figura 1: Proceso químico de DN de Illumina sin PCR: una solución eficaz para preparar e indexar bibliotecas de muestras.

Tabla 1: Especificaciones de ADN de Illumina sin PCR

Parámetro	ADN sin PCR de Illumina	ADN TruSeq sin PCR
Tipo de entrada de ADN	ADNg, sangre, saliva, plásmidos y gotas de sangre seca	ADNg
Cantidad de entrada de ADN	De 25 ng a 2 µg	De 1 a 2 µg
Método de fragmentación	Tagmentación en bolas	Baño ultrasónico Covaris
Multiplexado de la muestra	384 índices dobles	96 índices dobles
Sistemas de secuenciación compatibles	Sistemas MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, HiSeq 2500, HiSeq 3000/4000, NovaSeq 6000	Todos los sistemas de secuenciación de Illumina
Duración total del flujo de trabajo ^a	Aprox. 90 minutos con ADNg extraído Aprox. 2,5 horas con sangre o saliva sin procesar	Aprox. 11 horas
Tamaño de fragmento	450 pb	350 pb o 550 pb

a. La duración total del flujo de trabajo incluye los pasos de extracción y cuantificación del ADN (o lisis Flex), tagmentación y agrupación de bibliotecas
 b. Para ajustar los tamaños de fragmento a 350 pb o 550 pb, lea la nota de aplicación: Tamaños de fragmento personalizables con preparación de ADN de Illumina sin PCR, tagmentación

Cobertura muy uniforme del genoma completo para WGS en humanos

La uniformidad de la cobertura mide la exhaustividad de los datos en todo el genoma en un experimento de secuenciación. Una cobertura uniforme permite una llamada más precisa de variantes alejadas de la profundidad media.³ Para evaluar el rendimiento de la cobertura en una gama de contenido bajo, intermedio y alto de GC, se hizo una representación de los datos de cobertura normalizados obtenidos con el ADN de Illumina sin PCR y el ADN sin PCR de TruSeq™ frente al contenido del genoma humano en función del porcentaje de GC. Por lo general, los datos del genoma humano constan de un 20-70 % de secuencias GC. Ambos kits muestran un grado de cobertura uniforme en una gama de contenido de GC representada por los datos de WGS en humanos (Figura 2), lo que indica que el ADN de Illumina SIN PCR es excepcionalmente adecuado para aplicaciones de WGS en humanos.

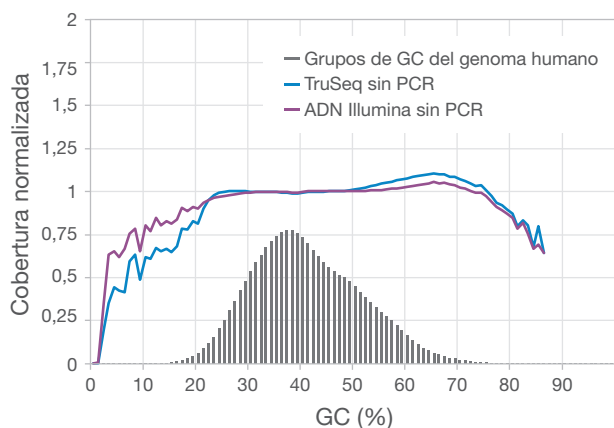
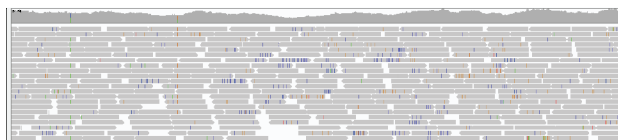


Figura 2: Uniformidad de la cobertura del ADN de Illumina sin PCR. El ADN de Illumina sin PCR ofrece una cobertura uniforme en toda la gama de contenido de GC en el genoma humano.

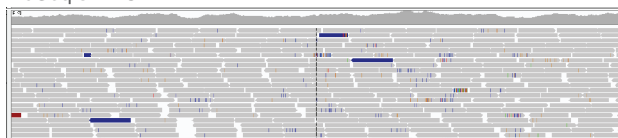
Cobertura uniforme en regiones con un alto contenido en GC o AT

Debido a elementos estructurales en la transcripción del genoma humano, las regiones promotoras de los genes humanos suelen tener un alto contenido o bien un bajo contenido en GC, y pueden ser difíciles de amplificar mediante PCR.⁴ Por tanto, las bibliotecas de WGS en humanos preparadas con kits que no precisan PCR muestran una mejor cobertura en determinadas regiones de promotores con alto contenido en GC. Para comparar el rendimiento de cobertura de ADN de Illumina sin PCR, ADN TruSeq sin PCR y nanomuestras de ADN TruSeq (incluye PCR), se prepararon bibliotecas a partir de ADN de la estirpe celular humana NA12878 (Coriell Institute). Todas las bibliotecas se secuenciaron en un sistema HiSeq™ con una configuración del experimento de 2 × 150 pb. La resolución de los datos se redujo a una cobertura de 32x-40x. En comparación con los datos de la nanomuestra de ADN TruSeq, los conjuntos de datos de ADN de Illumina sin PCR y de ADN TruSeq sin PCR muestran una cobertura superior en una región con un gran hueco de GC en el gen humano *RNPEPL1* (figura 3). El uso de ADN de Illumina sin PCR mejora la cobertura en regiones complicadas.

ADN Illumina sin PCR



TruSeq sin PCR



Nanomuestras TruSeq

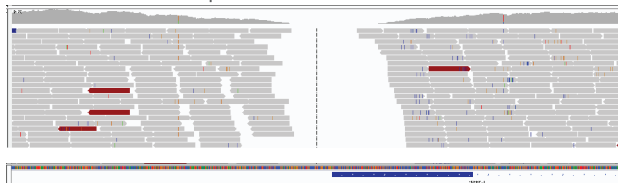


Figura 3: Comparación de la cobertura de lecturas en regiones con alto contenido en GC. El kit de preparación de bibliotecas de ADN de Illumina sin PCR proporciona una cobertura superior en las lecturas de las regiones promotoras con alto contenido en GC del gen *RNPEPL1* humano, en comparación con los kits de preparación de bibliotecas de ADN TruSeq sin PCR y de nanomuestras de ADN de TruSeq. Los mapas de lecturas se visualizaron con la aplicación Integrative Genomics Viewer (IGV), disponible en BaseSpace™ Sequence Hub.

Rendimiento excelente en toda una gama de cantidades de entrada de ADN

Se evaluó el rendimiento del ADN de Illumina DNA sin PCR en una gama de cantidades de entrada de ADN. Se prepararon bibliotecas de ADN de una estirpe celular humana (Coriell Institute, NA12878) utilizando cantidades de entrada de 600 ng para el ADN TruSeq sin PCR y de 20 a 200 ng* para el ADN de Illumina sin PCR. Las bibliotecas se secuenciaron en un sistema NovaSeq™ 6000 con una configuración del experimento de 2 × 150 pb y luego se redujo la resolución a una cobertura media de 40x. Se hizo una comparación de las puntuaciones de calidad, la llamada de bases y los parámetros de llamada de variantes. Los datos de todas las bibliotecas estuvieron por encima del 75 % de las especificaciones de calidad de la puntuación Q30 del sistema NovaSeq 6000 (figura 4a). Asimismo, los conjuntos de datos muestran un rendimiento equivalente en la llamada de bases tanto en los autosomas como en los exones y una llamada de variantes equivalente (figura 4b). También fueron equivalentes la calidad de los datos, el rendimiento de la llamada de bases y la llamada de variantes en todas las entradas de ADN, incluido el escaso aporte de 20 ng*.

Al eliminar los pasos de cuantificación y PCR, el ADN de Illumina sin PCR ofrece un ensayo optimizado en 90 minutos (figura 5). Aunque la normalización se consigue con entradas ≥ 150 ng, se pueden generar bibliotecas viables y de alto rendimiento con una entrada de ADN de tan solo 20 ng*. La capacidad de hacer preparaciones de bibliotecas sin PCR partiendo de entradas de poca cantidad de ADN abre la puerta a nuevas aplicaciones, como la secuenciación del genoma completo a partir de gotas de sangre seca.

Tagmentación en bolas y protocolo sin PCR

ADN de Illumina sin PCR proporciona una combinación única y potente de beneficios gracias a la tagmentación en bolas y al proceso químico sin PCR. El punto de saturación en bolas del ADN de Illumina DNA sin PCR es ≥ 300 ng de ADN. La saturación en bolas permite un control consistente del tamaño de fragmento y un rendimiento normalizado a partir de cantidades de entrada de ADN superiores a 300 ng. Esto minimiza los pasos de cuantificación previos y posteriores a la preparación de bibliotecas. Las bibliotecas normalizadas pueden agruparse en función del volumen; con ello se evita la cuantificación individual de bibliotecas, que requiere mucho tiempo.

Multiplexado eficaz de muestras para aplicaciones de alto rendimiento

El ADN de Illumina sin PCR es compatible con IDT (tecnologías de ADN integradas) para índices dobles únicos de ADN de Illumina, que permiten un desmultiplexado preciso de las muestras en los sistemas de secuenciación de Illumina. Hasta 384 índices proporcionan máxima flexibilidad para proyectos de secuenciación de alto rendimiento.

* El intervalo de entrada recomendado para el ADN de Illumina sin PCR es de 25 a 300 ng.

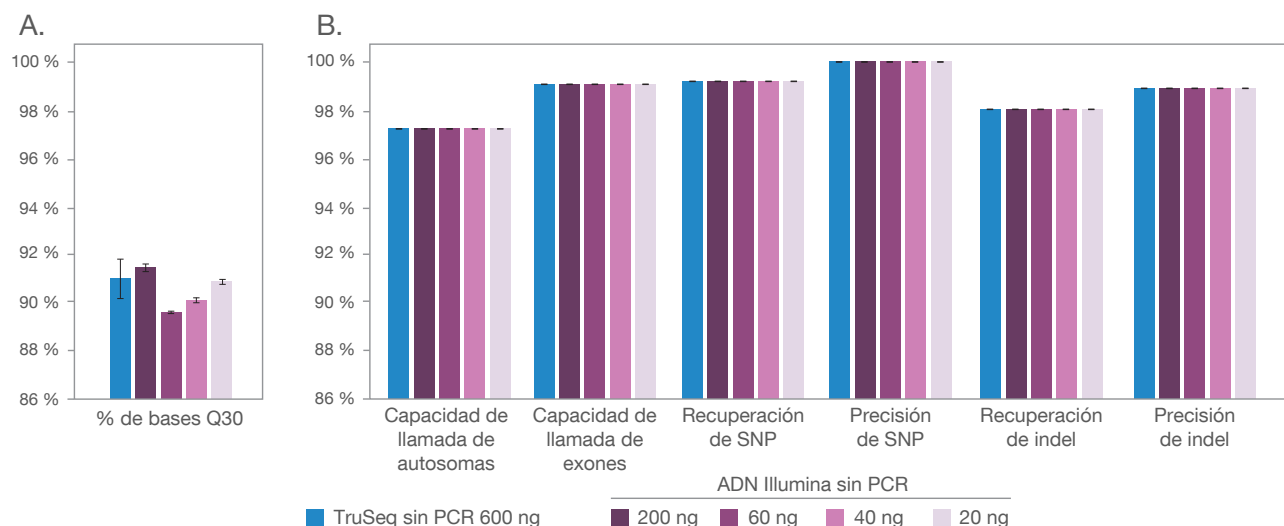


Figura 4: Rendimiento de ADN de Illumina sin PCR en una gama de entradas de ADN. Se ha demostrado que las bibliotecas preparadas con ADN de Illumina sin PCR a partir de una gama de entradas de ADN (A) cumplen las especificaciones de calidad para todas las entradas de ADN y (B) presentan un rendimiento equivalente en cuanto a la capacidad de llamada. Puntuación Q30 = una precisión de llamada de bases inferida del 99,9 %; capacidad de llamada de autosomas = porcentaje de posiciones de referencia distintas de N en cromosomas autosómicos con una llamada de genotipo apta; capacidad de llamada de exones = porcentaje de posiciones de referencia distintas de N en exones con una llamada de genotipo apta; SNP = polimorfismo mononucleotídico; indel = mutación de inserción-delección; precisión = calculada como el cociente de [n.º de llamadas positivas verdaderas/(n.º de llamadas positivas verdaderas + n.º de llamadas positivas falsas)]; recuperación (sensibilidad) = calculado como el cociente de [n.º de llamadas positivas verdaderas/(n.º de llamadas positivas verdaderas + n.º de llamadas negativas falsas)]. Nota: todavía no ha terminado la determinación de las especificaciones del límite inferior de entrada de muestra de ADN de Illumina sin PCR.

ADN TruSeq sin PCR

Preparación de bibliotecas con ligadura de adaptadores y marcado de índices	Cuantificación y normalización manuales de bibliotecas	Agrupación manual
5 h	2 h	0,5 h

Empresa K

Preparación de bibliotecas con el flujo de trabajo de la empresa K	Cuantificación y normalización manuales de bibliotecas	Agrupación manual
~2,5 h	2 h	0,5 h

Empresa N

Preparación de bibliotecas con el flujo de trabajo de la empresa N	Cuantificación y normalización manuales de bibliotecas	Agrupación manual
~2,5 h	2 h	0,5 h

ADN Illumina sin PCR, sangre o saliva

Kit de lisis de Illumina	Preparación de bibliotecas con tagmentación sin PCR Nextera	Agrupación por volumen
~1,5 h	1,5 h	0,5 h

ADN Illumina sin PCR, ADNg

Preparación de bibliotecas con tagmentación en bolas sin PCR	Agrupación por volumen
1,5 h	0,5 h

Figura 5: Flujo de trabajo de ADN de Illumina sin PCR. El flujo de trabajo de ADN de Illumina sin PCR ofrece un rápido tiempo de ensayo total de 90 minutos para la fragmentación o la tagmentación mediante limpieza de bibliotecas. Datos en el archivo de Illumina, Inc., 2019. Nota: la empresa N utiliza reactivos patentados combinados con adaptadores en Y de Illumina.

Tabla 2: Consumibles de la automatización para 96 muestras

Método	Tipo de muestra	Puntos de contacto	Placas de 96 muestras	Puntas	Tiempo
ADN TruSeq sin PCR	ADNg	20	20	5504	10 h 10 min
Empresa K	ADNg	13	19	4076	6 h 21 min
Empresa N	ADNg	13	17	3266	5 h 42 min
ADN Illumina sin PCR (+ cuantificación opcional de las agrupaciones mediante qPCR)	sangre, saliva	2 (6)	10 (12)	2016 (2072)	2 h 32 min (4 h 7 min)
ADN de Illumina sin PCR (+ cuantificación opcional de las agrupaciones mediante qPCR)	ADNg	2 (6)	8 (10)	1604 (1660)	1 h 32 min (3 h 7 min)

Modelado hecho utilizando el software Hamilton para Hamilton Star con cabezal CO-RE 96 y 8 canales. La qPCR está incluida en el modelado de la automatización para todos los flujos de trabajo muestra por muestra. Para los flujos de trabajo distintos de ADN Illumina sin PCR se supone que cada muestra se mide, ajusta y agrupa mediante qPCR. La agrupación de muestras se basa en 4 grupos de 24 muestras. Datos en el archivo de Illumina, Inc., 2019. Nota: la empresa N utiliza reactivos patentados combinados con adaptadores en Y de Illumina.

Flujos de trabajo compatibles con la automatización

Por su flujo de trabajo rápido y simplificado, el ADN de Illumina sin PCR es muy compatible con la automatización. Gracias a la naturaleza coherente y de normalización automática del flujo de trabajo basado en bolas, los usuarios pueden empezar con muestras de sangre o saliva sin procesar, ejecutar el protocolo de lisis Flex y preparar bibliotecas sin ningún paso de cuantificación. Estas funciones facilitan el flujo de trabajo para el procesamiento automatizado de lotes de muestras sin procesar en plataformas de manipulación de líquidos.

Para demostrar la compatibilidad, se compararon los flujos de trabajo automatizados del ADN de TruSeq sin PCR y los de dos sistemas sin PCR basados en enzimas frente al ADN de Illumina sin PCR. Para cada flujo de trabajo se calcularon los puntos de contacto, el material de laboratorio, el recuento de puntas y el tiempo necesario para preparar una biblioteca de 96 lotes de muestras en un robot de manipulación de líquidos Hamilton, y se observó que el ADN de Illumina sin PCR ofrece un importante ahorro de tiempo (tabla 2).

Reducción de los costes con el ADN de Illumina sin PCR

El material de laboratorio, las puntas y los reactivos para la qPCR contribuyen a los gastos adicionales a la hora de preparar bibliotecas para NGS. Una de las principales ventajas de la tecnología basada en bolas es la normalización automática y basada en bolas de todas las bibliotecas preparadas en un lote, de manera que se elimina la necesidad de cuantificar individualmente las bibliotecas y permite una agrupación sencilla de estas por equivalencia de volumen.

Puesto que las bibliotecas sin PCR suelen cuantificarse mediante qPCR, el ADN de Illumina sin PCR elimina o bien reduce considerablemente el número de qPCR necesarias en el protocolo global de preparación de bibliotecas (p. ej., amplificación de biblioteca mediante PCR y cuantificación después de preparar la biblioteca). Un modelo de gastos adicionales (como los reactivos para qPCR, el material de laboratorio, las puntas, los reactivos para cuantificación y los kits de extracción de terceros) ha revelado que el flujo de trabajo del ADN de Illumina sin PCR supone un importante ahorro económico.⁵ Por ejemplo, los gastos adicionales pueden llegar a representar aprox. un 56 % de los costes totales para el flujo de trabajo de TruSeq sin PCR, o aprox. un 44 % para los kits sin PCR basados en enzimas de la competencia.[†] En el caso del flujo de trabajo de ADN de Illumina sin PCR, los costes adicionales son de tan solo aprox. un 21 %, lo cual es una reducción notable en comparación con otros kits de preparación de bibliotecas.[†]

[†] Para este cálculo se han equiparado los costes del kit de preparación de bibliotecas. Los costes adicionales son variables y se calculan como una proporción del coste total según las suposiciones de flujo de trabajo (tabla 1).

Resumen

El ADN de Illumina sin PCR ofrece una combinación única de beneficios gracias a la tagmentación en bolas y a los pasos del proceso químico sin PCR. La tagmentación en bolas respalda la normalización basada en bolas, la fácil agrupación de bibliotecas en función del volumen y la eliminación de los pasos de cuantificación antes y después de la preparación de bibliotecas. El flujo de trabajo sin PCR simplifica y reduce la duración global del flujo de trabajo y, al mismo tiempo, proporciona una cobertura sumamente uniforme en regiones repetitivas o desiguales del genoma. Con el kit de reactivos para lisis Flex, el flujo de trabajo es compatible con la entrada de muestras sin procesar como, por ejemplo, sangre, saliva y gotas de sangre seca. El ADN de Illumina sin PCR aporta una facilidad de uso excepcional, una cobertura uniforme y datos de alta precisión para aplicaciones sensibles, como la secuenciación del genoma humano completo, el montaje de genomas microbianos *de novo* o la llamada de variantes tumorales–normales.

Información adicional

Para obtener más información, visite www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.htm

Datos para hacer pedidos

Producto	N.º de referencia
Illumina DNA PCR-Free Prep, tagmentación (24 muestras)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, tagmentación (96 muestras)	20041795
IDT® for Illumina DNA/RNA UD Indexes, juego A, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes, juego B, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	20027214
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes, juego C, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	20042666
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes, juego D, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	Próximamente
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes, juego D, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	20042667
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes, juego D, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	Próximamente
Illumina DNA PCR-Free R1, cebador de secuenciación	20041796
Kit de reactivos de lisis Illumina	20042221

[†]IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes® es el nuevo nombre de "IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes"; el contenido del kit es el mismo.

Referencias

1. Illumina (2018). *Nextera DNA Flex Library Preparation Kit*. Fecha de consulta: 10 de abril de 2020.
2. 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.
3. Illumina (2013). *Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits Technical Note*. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2020.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. *Content analysis of the core promoter region of human genes*. *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-25.
5. Cálculos de datos en el archivo. Illumina, Inc., 2019.