

TruSeq^{MC} DNA Nano

Une méthode à faible prise qui produit une vue complète et sûre du génome pour pratiquement toutes les applications de séquençage.

Points saillants

- **Faible entrée d'échantillon**

Des données d'excellente qualité à partir d'une prise de 100 ng seulement permettent l'analyse des échantillons avec un ADN disponible en quantité limitée.

- **Excellente qualité de couverture**

Les très faibles biais de librairie et les écarts de couverture réduits permettent d'atteindre une compréhension approfondie du génome.

- **Grande flexibilité**

Un flux de travail simplifié permet la préparation de librairies en moins d'une journée, tout en prenant en charge diverses longueurs de lecture.

- **Solution complète**

Cette solution fiable comprend des réactifs d'un mélange étalon, des billes de sélection de taille et jusqu'à 96 index doubles uniques (IDU).

Préparation accélérée de librairies

Le protocole de préparation de librairies TruSeq DNA a été simplifié grâce au remplacement de la sélection de la taille à l'aide de gel par celle avec les billes (Figure 2), permettant ainsi aux chercheurs de préparer des librairies de haute qualité en moins d'une journée. TruSeq DNA Nano est optimisé pour diverses longueurs de lecture de 2 × 101 pb à 2 × 151 pb. Des réactifs d'un mélange étalon, des billes de purification d'échantillons pour le nettoyage et la sélection de taille, de robustes index TruSeq ainsi que des protocoles optimisés complètent le flux de travail simplifié qui requiert peu d'étapes de nettoyage pour le traitement d'un grand nombre d'échantillons.



Figure 1 : TruSeq DNA Nano : TruSeq DNA Nano offre une solution à faible prise pour la préparation et l'indexage des librairies d'échantillons. TruSeq DNA Nano prend en charge jusqu'à 24 index pour des études à faible débit, ou bien 96 index doubles ou 96 index uniques (vendus séparément) pour des études à débit élevé.

Introduction

En proposant une méthode à partir d'une prise d'échantillon faible fondée sur le flux de travail de préparation de librairies TruSeq largement répandu, TruSeq DNA Nano permet d'analyser efficacement les échantillons qui possèdent peu d'ADN. Ce flux de travail diminue de manière considérable le biais généralement induit par PCR et fournit des renseignements détaillés sur la séquence des régions habituellement problématiques du génome. Les protocoles relatifs au débit (faible et élevé) sont disponibles pour prendre en charge tout un éventail de modèles d'étude (Figure 1).

Faible prise d'échantillons

TruSeq DNA Nano diminue l'exigence habituelle en matière de microgrammes d'ADN, permettant aux chercheurs d'étudier des échantillons contenant un ADN disponible en quantité limitée (p. ex., des échantillons de tumeur) et prenant en charge la préservation des échantillons pour une utilisation ultérieure ou au cours d'autres études. Ce flux de travail propose deux protocoles pour avoir la possibilité de générer des tailles d'inserts grandes (550 pb) ou petites (350 pb) afin de prendre en charge une large variété d'applications. En plus d'accélérer le flux de travail, la sélection simple de la taille avec les billes évite la perte d'échantillons habituelle associée à la sélection à l'aide de gel. TruSeq DNA Nano est validé pour la couverture génomique de haute qualité d'un vaste éventail d'applications de séquençage du génome entier (SGE) Illumina.

Une préparation de librairie à la composition chimique innovante

TruSeq DNA Nano peut être utilisé pour préparer des librairies d'ADN pour le séquençage unique, apparié et à index. TruSeq DNA Nano prend en charge la coupe par ultrasonication Covaris, exigeant 100 ng d'ADN pour une taille moyenne d'insert de 350 pb ou 200 ng d'ADN pour une taille moyenne d'insert de 550 pb. La construction de la librairie commence à l'aide de l'ADN génomique (ADNg) fragmenté (Figure 2A). Les fragments d'ADN aux extrémités franches sont générés à l'aide d'une association de réactions de remplissage et d'activité d'exonucléase (Figure 2B), et la sélection de taille est réalisée avec les billes de purification d'échantillons foumies (Figure 2C). Une base A est ensuite ajoutée aux extrémités franches de chaque brin, ce qui les prépare pour la ligation aux adaptateurs indexés (Figure 2D). Chaque adaptateur présente une base T sortante pour la ligation de l'adaptateur à l'extrémité A du fragment d'ADN. Ces adaptateurs contiennent le complément entier du séquençage des sites d'hybridation du primer pour les lectures uniques, appariées et à index. Les adaptateurs à index unique ou double sont ligaturés aux fragments

(Figure 2E), et les produits ligaturés sont amplifiés à l'aide de la PCR à biais réduit (Figure 2F).

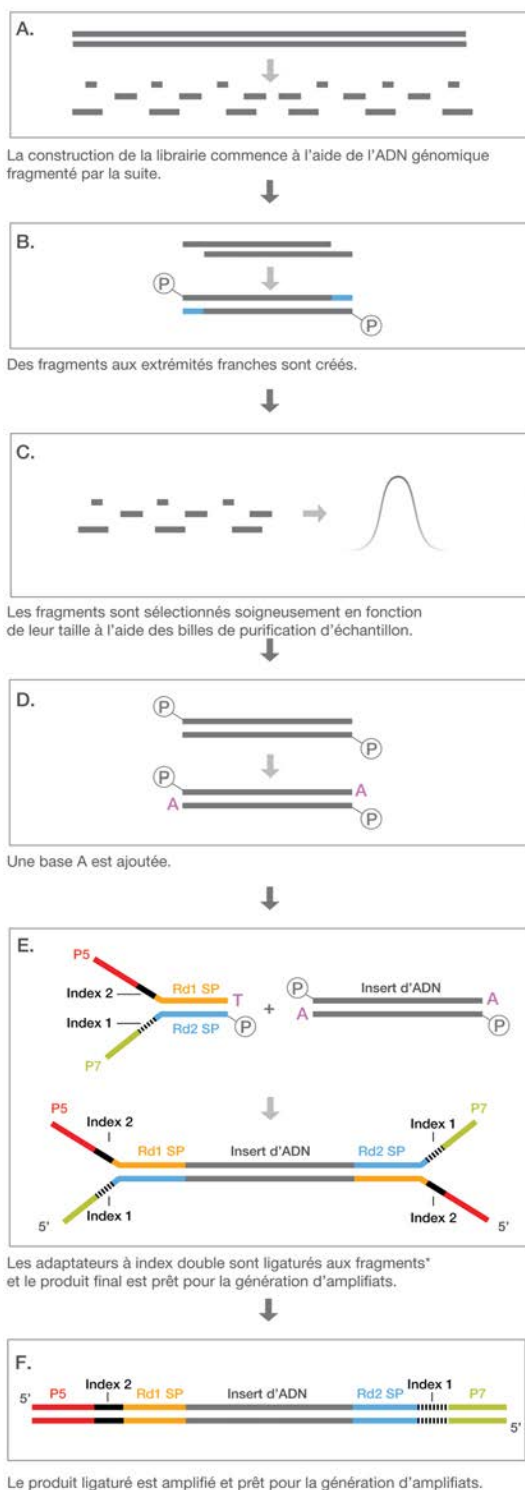


Figure 2 : Flux de travail de la trousse TruSeq Nano DNA : le flux de travail de la trousse TruSeq Nano DNA propose la ligation d'adaptateurs qui crée des produits prêts pour le séquençage avec peu de biais issus de la PCR. * La solution d'indexage TruSeq DNA Nano LT comporte un adaptateur à index unique à l'étape E.

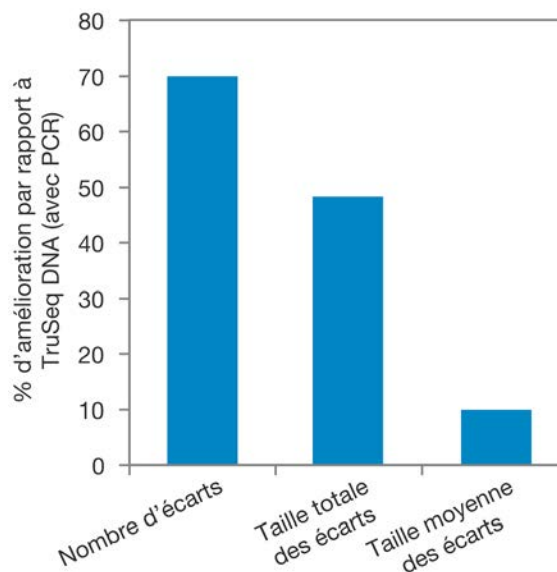


Figure 3 : Réduction du nombre d'écarts de couverture : les librairies TruSeq DNA Nano montrent une importante réduction du nombre et de la taille totale des écarts par rapport aux librairies préparées à l'aide du protocole TruSeq DNA (avec la PCR). Un écart se définit comme une région d'une longueur ≥ 10 pb dans laquelle un génotype exact ne peut pas être déterminé en raison d'une faible profondeur, de faibles scores d'alignement ou d'une base de mauvaise qualité.

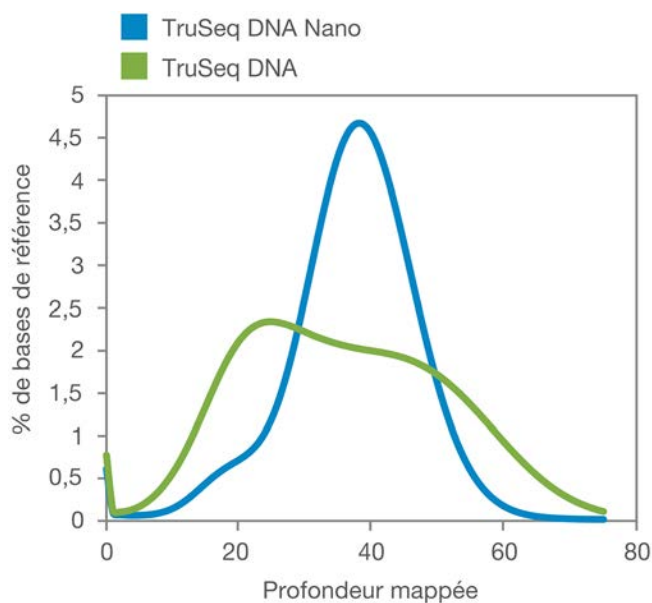


Figure 4 : Meilleure uniformité de couverture : les librairies générées à l'aide de TruSeq DNA Nano fournissent une meilleure uniformité de couverture du génome que celles générées à l'aide du protocole TruSeq DNA (avec la PCR).

Tableau 1 : Préparation de bibliothèques d'ADN TruSeq DNA

Spécification	TruSeq DNA Nano	TruSeq DNA sans PCR	Ancien TruSeq DNA
Description	Basé sur la préparation de bibliothèques TruSeq largement utilisée, avec une prise plus faible et une qualité des données améliorée	Une couverture génomique supérieure avec un biais de librairie et des écarts radicalement réduits	Méthode originale de préparation de bibliothèques de séquençage nouvelle génération TruSeq
Quantité d'entrée	100 à 200 ng	1 à 2 µg	1 µg
Comprend la PCR	Oui	Non	Oui
Durée du test	~ 6 heures	~ 5 heures	1 à 2 jours
Durée de manipulation	~ 5 heures	~ 4 heures	~ 8 heures
Taille d'insert cible	350 pb ou 550 pb	350 pb ou 550 pb	300 pb
Sans gel	Oui	Oui	Non
Nombre d'échantillons pris en charge	24 (LT) ou 96 (HT) ^a	24 (LT) ou 96 (HT) ^a	48 (LT) ou 96 (HT) ^a
Billes de sélection de taille	Incluses	Incluses	Non incluses
Applications	Applications de séquençage du génome entier, y compris reséquençage du génome entier, assemblage <i>de novo</i> et études métagénomiques		
Multiplexage des échantillons	24 index uniques, 96 index doubles combinatoires, 24 et 96 index doubles uniques (disponibles prochainement)		
Systèmes de séquençage d'Illumina compatibles	HiSeq ^{MC} 1000, HiSeq 1500, HiSeq 2000, HiSeq 2500, HiSeq 3000, HiSeq 4000, HiSeq X Five. Systèmes HiSeq X Ten, MiniSeq ^{MC} , MiSeq ^{MC} , MiSeqDx en mode recherche, NextSeq ^{MC} 500, NextSeq 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000 et NovaSeq ^{MC} 6000		Systèmes HiSeq, HiScanSQ, Genome Analyzer, MiSeq et MiniSeq

a. LT, faible débit; HT, débit élevé.

Excellente qualité de couverture

TruSeq DNA Nano réduit le nombre et la taille moyenne des écarts de couverture habituels induits par PCR (Figure 3), fournissant des données d'une qualité exceptionnelle. Le flux de travail amélioré réduit le biais de librairie et améliore l'uniformité de la couverture sur le génome (Figure 4). Il fournit également une excellente couverture du contenu habituellement problématique du génome, y compris des régions riches en GC, des promoteurs et des régions répétitives (Figure 5). La haute qualité des données fournit une résolution de paires de bases, ce qui procure une vue détaillée des mutations somatiques et *de novo* et facilite l'identification précise des variants causaux. TruSeq DNA Nano offre une vue complète du génome, y compris des régions codantes, régulatrices et introniques, permettant aux chercheurs d'accéder à plus de renseignements pour chaque analyse de séquençage (Figure 6).

Préparation flexible et complète de bibliothèques

La gamme TruSeq de solutions de préparation de bibliothèques propose plusieurs flux de travail pour les applications de séquençage, compatibles avec un éventail de besoins de recherche et de modèles d'étude (Tableau 1). Tous les flux de travail TruSeq prennent en charge les études à débit faible et élevé. TruSeq DNA Nano prend en charge le séquençage du génome entier et est idéal pour les applications de séquençage exigeant un ADN partiellement disponible. Ces flux de travail améliorent de nombreuses façons la méthode de préparation de bibliothèques TruSeq DNA et permettent différentes applications de séquençage. Les réactifs de préparation de bibliothèques et les index de séquençage sont désormais proposés séparément afin que les chercheurs puissent adapter ces flux de travail en fonction de leurs besoins expérimentaux.

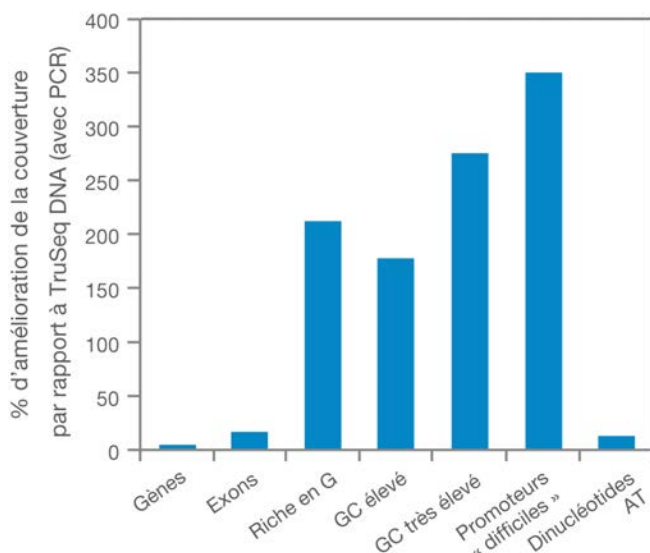


Figure 5 : Meilleure couverture des régions difficiles : les librairies TruSeq DNA Nano montrent une couverture améliorée du contenu problématique du génome. Ces régions comprennent les exons humains connus codants et non codants pour une protéine ainsi que les gènes définis dans la piste RefSeq Genes dans le navigateur génomique de l'UCSC.¹ Les régions riches en G comptent 30 bases dont le contenu en G est $\geq 80\%$. Quant à elles, les régions dont le contenu de GC est élevé comptent 100 bases dont le contenu de GC est $\geq 75\%$. Les régions à contenu très élevé en GC se définissent comme des régions dont 100 bases affichent un contenu en GC $\geq 85\%$. Les promoteurs « difficiles » indiquent une série de 100 régions promotrices dont la couverture n'est pas suffisante; le Broad Institute du MIT et de Harvard les a définies de manière empirique.² Les dinucléotides AT comptent 30 bases de dinucléotides AT répétées.

Multiplexage efficace des échantillons

À l'aide d'une procédure simple, les index sont ajoutés aux fragments d'ADNg des échantillons afin de fournir une solution innovante de multiplexage des échantillons. Pour la meilleure efficacité opérationnelle, jusqu'à 96 échantillons pré-répartis dans des plaques et à index unique peuvent être regroupés et séquencés simultanément dans une ligne de Flow Cell unique sur toute plate-forme de séquençage d'Illumina. Après le séquençage, les index sont utilisés pour démultiplexer les données et affecter précisément des lectures aux échantillons appropriés dans le groupe.

TruSeq DNA Nano peut utiliser une stratégie à index unique ou à index double employant une combinaison unique de deux index pour le démultiplexage. Les adaptateurs d'index doubles uniques, ou IDU, ont été conçus par Illumina en collaboration avec Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) pour utiliser des paires uniques d'index dans le cadre du démultiplexage. Les nouveaux index doubles uniques récemment mis sur le marché (24 et 96, disponibles séparément) offrent une complexité accrue permettant une affectation des lectures exacte et une utilisation efficace des Flow Cells. L'utilisation de combinaisons d'index doubles uniques constitue une meilleure pratique afin de s'assurer que les lectures dont les index sont erronés n'ont aucun impact sur les appels de variants.

Solution simplifiée

TruSeq DNA Nano comprend des réactifs de préparation de librairies, des billes de purification d'échantillons et de robustes index TruSeq pour le multiplexage qui fournissent ensemble une méthode exhaustive de préparation optimisée pour la performance élevée sur toutes les plates-formes de séquençage d'Illumina. TruSeq DNA Nano exploite la flexibilité de deux options, à 24 échantillons ou à 96 échantillons, pour un modèle expérimental évolutif. Avec un protocole simplifié et des options de multiplexage flexibles, TruSeq DNA Nano offre une méthode rationalisée de préparation de librairies qui produit des données de séquençage de haute qualité.

Récapitulatif

TruSeq DNA Nano optimise le protocole TruSeq pour fournir une méthode de préparation de librairies à prise facile pour pratiquement toute application de séquençage. Les options relatives au débit (bas et élevé) ainsi que les différentes tailles d'inserts offrent une plus grande flexibilité pour prendre en charge diverses applications et études génomiques. Les innovations liées au flux de travail réduisent le biais induit par PCR dans le but de produire une vue détaillée et précise du génome. En exploitant un flux de travail plus rapide et une qualité supérieure des données, TruSeq DNA Nano offre une méthode de préparation des échantillons complète pour les applications de séquençage génomique.

En savoir plus

Pour obtenir de plus amples renseignements sur TruSeq DNA Nano, veuillez visiter le site www.illumina.com/products/truseq-nano-dna-sample-prep-kits.html.

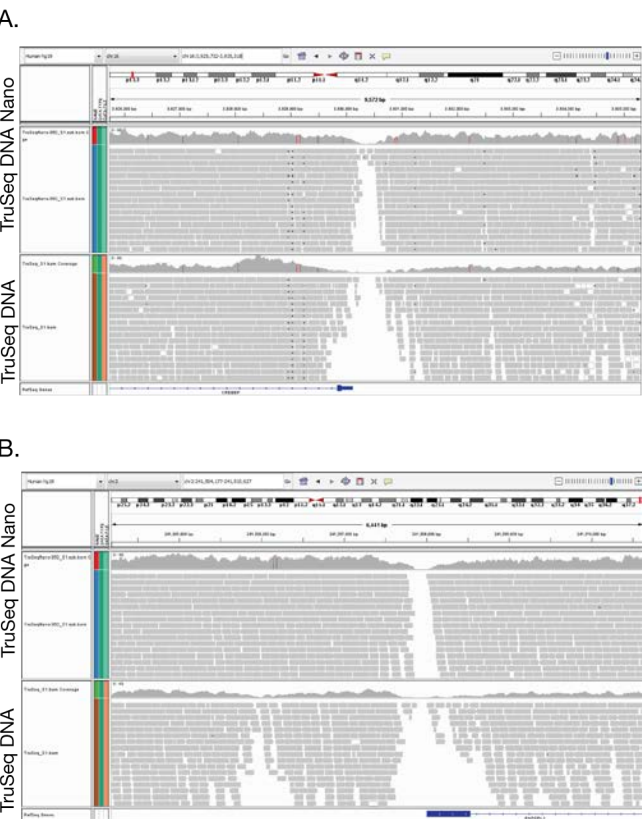


Figure 6 : TruSeq DNA Nano réduit le nombre d'écarts de couverture : la couverture élevée des librairies TruSeq DNA Nano entraîne la réduction des écarts de couverture, illustrée ici dans les régions codantes riches en GC des promoteurs (A) *RNPEPL1* et (B) *ZBTB34*. Les renseignements de séquençage issus de la préparation d'ADN TruSeq DNA Nano sont indiqués dans la partie supérieure des images A et B, tandis que les données sur la séquence tirées à l'aide du protocole TruSeq DNA sont présentées dans la partie inférieure.

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
Trousse de préparation de librairies TruSeq DNA Nano Low Throughput (24 échantillons)	20015964
Trousse de préparation de librairies TruSeq DNA Nano High Throughput (96 échantillons)	20015965
Ensemble A d'index uniques pour TruSeq DNA (12 index, 24 échantillons)	20015960
Ensemble B d'index uniques pour TruSeq DNA (12 index, 24 échantillons)	20015961
Index doubles combinatoires TruSeq DNA CD Indexes, 96 échantillons	20015949
Technologies intégrées d'ADN pour Illumina : index doubles uniques TruSeq DNA UD Indexes (24 index, 96 échantillons)	20020590
Technologies intégrées d'ADN pour Illumina : index doubles uniques TruSeq DNA UD Indexes (96 index, 96 échantillons)	20022370

Références

- University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. genome.ucsc.edu. Consulté en juillet 2013.
- The Broad Institute of MIT and Harvard. www.broadinstitute.org. Consulté en juillet 2013.