

TruSeq™ DNA Nano

Un metodo a basso input che fornisce un quadro completo del genoma altamente affidabile per praticamente qualsiasi applicazione di sequenziamento.

Punti principali

- **Input di campione ridotto**

Qualità dei dati eccellente, a partire da appena 100 ng di input, dà forza all'interrogazione di campioni con limitato DNA disponibile

- **Qualità di copertura eccellente**

Distorsioni delle librerie molto basse e meno vuoti di copertura consentono una panoramica approfondita sul genoma

- **Elevata flessibilità**

Il flusso di lavoro ottimizzato permette la preparazione delle librerie in meno di un giorno, supportando al contempo diverse lunghezze di lettura

- **Soluzione completa**

La soluzione affidabile include reagenti Master Mix, microsfere per la selezione della dimensione e fino a 96 doppi indici univoci (Unique Dual Index, UDI)

gel con la selezione a base di microsfere (Figura 2), per consentire ai ricercatori di preparare librerie di elevata qualità in meno di un giorno. TruSeq DNA Nano è ottimizzato per diverse lunghezze di letture, da 2×101 bp a 2×151 bp. Reagenti Master Mix, microsfere di purificazione dei campioni per la pulizia e la selezione della dimensione, indici TruSeq efficaci e protocolli ottimizzati contribuiscono a un flusso di lavoro semplificato, con fasi di pulizia ridotte che consentono di elaborare un ampio numero di campioni.



Figura 1: TruSeq DNA Nano: TruSeq DNA Nano offre una soluzione a basso input per la preparazione e l'indicizzazione delle librerie di campioni. TruSeq DNA Nano supporta fino a 24 indici per studi a bassa processività oppure fino a 96 doppi indici o 96 doppi indici univoci (venduti separatamente) per studi a elevata processività.

Introduzione

Grazie a un metodo a basso input basato sul flusso di lavoro ampiamente adottato per la preparazione delle librerie TruSeq, TruSeq DNA Nano permette l'interrogazione efficace di campioni con limitato DNA disponibile. Questo flusso di lavoro riduce in modo significativo le tipiche distorsioni indotte dalla PCR e fornisce informazioni dettagliate sulla sequenza per regioni del genoma tradizionalmente difficili. Sono disponibili protocolli a bassa processività (Low-Throughput, LT) e a elevata processività (High-Throughput, HT) per una vasta gamma di progettazioni di studi (Figura 1).

Input di campione ridotto

TruSeq DNA Nano riduce i requisiti tipici per microgrammi di DNA, per permettere ai ricercatori di studiare campioni con limitato DNA disponibile (ad es., campioni di tumore) e per supportare la conservazione di campioni per uso futuro o studi alternativi. Questo flusso di lavoro offre la flessibilità di due protocolli per generare inserti di dimensioni grandi (550 bp) o piccole (350 bp) al fine di supportare una gamma di applicazioni diversificate. Oltre ad accelerare il flusso di lavoro, la selezione della dimensione in base a microsfere evita la tipica perdita di campione associata con la selezione a base di gel. TruSeq DNA Nano è convalidato per una copertura genomica di elevata qualità per un'ampia gamma di applicazioni di sequenziamento dell'intero genoma (Whole-Genome Sequencing, WGS) Illumina.

Preparazione delle librerie velocizzata

Il protocollo di preparazione delle librerie TruSeq DNA è stato semplificato sostituendo la selezione della dimensione a base di

Chimica innovativa per la preparazione delle librerie

TruSeq DNA Nano può essere utilizzato per preparare le librerie di DNA per il sequenziamento unidirezionale, paired-end e con indicizzazione. TruSeq DNA Nano supporta la frammentazione (shearing) mediante l'ultrasonificazione Covaris, che richiede 100 ng di DNA input per una dimensione di inserto media di 350 bp o 200 ng di DNA per una dimensione di inserto media di 550 bp. La creazione delle librerie inizia con DNA genomico (Genomic DNA, gDNA) frammentato (Figura 2A). I frammenti di DNA con estremità tronche sono generati utilizzando una combinazione di reazioni di riempimento e di attività esonucleasica (Figura 2B) e la selezione della dimensione viene eseguita con le microsfere fornite per la purificazione dei campioni (Figura 2C). Viene quindi aggiunta una base A alle estremità tronche di ciascun filamento, per prepararle per la ligazione agli adattatori indicizzati (Figura 2D). Ciascun adattatore contiene una sporgenza della base T per sottoporre a ligazione l'adattatore con il frammento di DNA con tailing A. Questi adattatori contengono un complemento completo di siti di ibridazione dei primer di sequenziamento per letture unidirezionali, paired-end e con indicizzazione. Gli adattatori a singolo indice o a doppio indice sono sottoposti a ligazione con i frammenti (Figura 2E) e i prodotti sottoposti a ligazione sono amplificati mediante PCR con distorsione ridotta (Figura 2F).

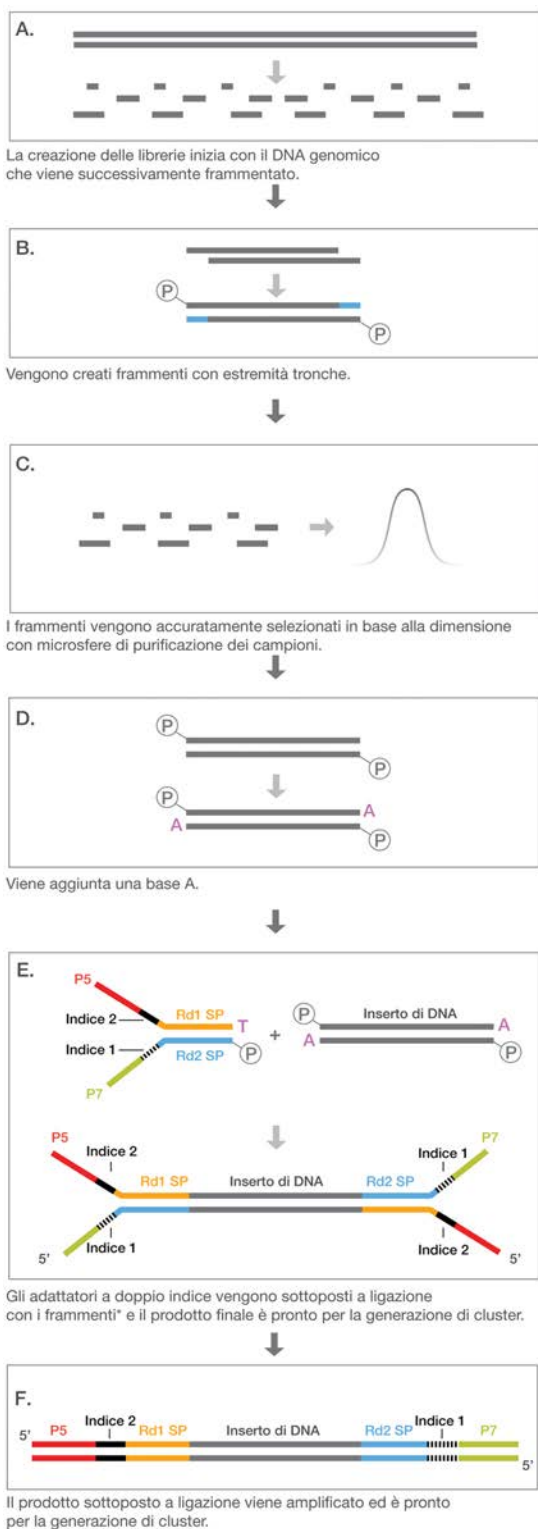


Figura 2: Flusso di lavoro TruSeq DNA Nano: il flusso di lavoro TruSeq DNA Nano include la ligazione degli adattatori che genera prodotti pronti per il sequenziamento con distorsioni minime indotte dalla PCR. * La soluzione di indicizzazione TruSeq Nano DNA LT fornisce un adattatore a singolo indice alla Fase E.

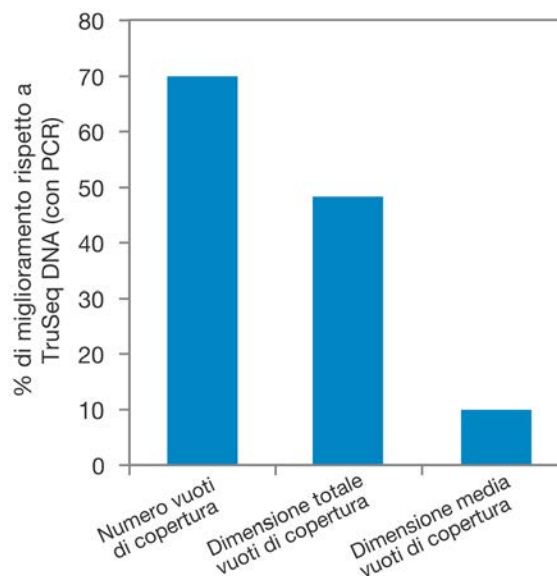


Figura 3: Meno vuoti di copertura: le librerie TruSeq DNA Nano mostrano una riduzione significativa nel numero e nella dimensione totale di vuoti di copertura rispetto alle librerie preparate utilizzando il protocollo TruSeq DNA (con PCR). Si definisce vuoto di copertura una regione di ≥ 10 bp in lunghezza, in cui non può essere determinato un genotipo accurato a causa di bassa profondità, bassi punteggi di allineamento o bassa qualità della base.

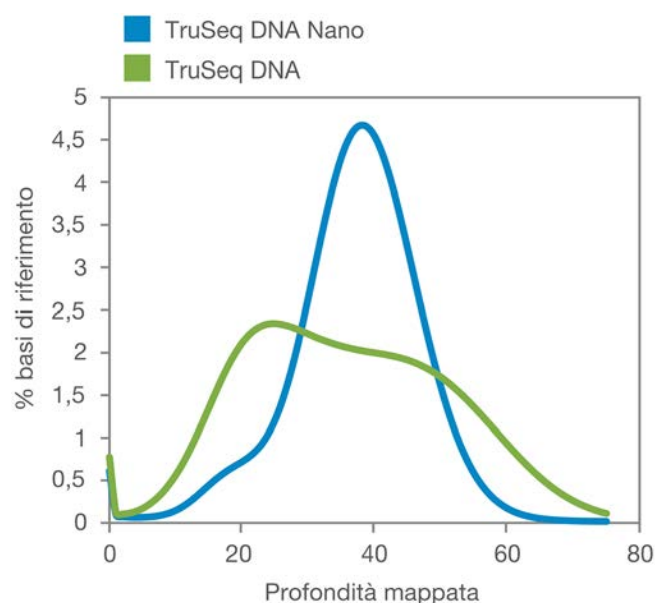


Figura 4: Maggiore uniformità di copertura: le librerie TruSeq DNA Nano forniscono una maggiore uniformità di copertura sul genoma rispetto a quelle generate utilizzando il protocollo TruSeq DNA (con PCR).

Tabella 1: Preparazione delle librerie TruSeq DNA

Specifica	TruSeq DNA Nano	TruSeq DNA PCR-Free	Legacy TruSeq DNA
Descrizione	Basato sulla preparazione delle librerie TruSeq ampiamente adottata, con input più basso e qualità dei dati migliorata	Copertura del genoma eccellente con distorsioni e vuoti di copertura delle librerie radicalmente ridotti	Metodo originale di preparazione delle librerie TruSeq per il sequenziamento di nuova generazione
Quantità di input	100-200 ng	1-2 µg	1 µg
Include la PCR	Sì	No	Sì
Durata del saggio	circa 6 ore	circa 5 ore	1-2 giorni
Interventi manuali	circa 5 ore	circa 4 ore	circa 8 ore
Dimensione dell'inserto target	350 bp o 550 bp	350 bp o 550 bp	300 bp
Senza gel	Sì	Sì	No
Numero di campioni supportati	24 (LT) o 96 (HT) ^a	24 (LT) o 96 (HT) ^a	48 (LT) o 96 (HT) ^a
Microsfere per la selezione della dimensione	Incluse	Incluse	Non incluse
Applicazioni	Applicazioni WGS, incluso risequenziamento dell'intero genoma, assemblaggio <i>de novo</i> e studi di metagenomica		
Multiplex campioni	24 indici singoli, 96 doppi indici combinatori, 24 e 96 doppi indici univoci (UDI), (disponibile a breve)		
Compatibile con i sistemi di sequenziamento Illumina	HiSeq™ 1000, HiSeq 1500, HiSeq 2000, HiSeq 2500, HiSeq 3000, HiSeq 4000, HiSeq X Five. Sistemi HiSeq X Ten, MiniSeq™, MiSeq™, MiSeqDx in modalità di ricerca, NextSeq™ 500, NextSeq 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000 e NovaSeq™ 6000		Sistemi HiSeq, HiScanSQ, Genome Analyzer, MiSeq e MiniSeq

a. LT, low-throughput (processività bassa); HT, high-throughput (processività elevata).

Qualità di copertura eccellente

TruSeq DNA Nano riduce il numero e la dimensione media dei tipici vuoti di copertura indotti dalla PCR (Figura 3), fornendo dati di qualità eccellente. Il flusso di lavoro migliorato riduce le distorsioni delle librerie e migliora l'uniformità di copertura sul genoma (Figura 4). Fornisce inoltre una copertura eccellente del contenuto genomico tradizionalmente difficile, comprese regioni ricche in GC, promotori e regioni ripetitive (Figura 5). L'elevata qualità dei dati fornisce risoluzione di coppie di basi, offrendo un quadro dettagliato di mutazioni somatiche o *de novo* e supportando la caratterizzazione di varianti causative. TruSeq DNA Nano fornisce una panoramica completa del genoma, comprese regioni codificanti, regolatorie e introniche, per permettere ai ricercatori di accedere a un numero maggiore di informazioni ottenute da ogni corsa di sequenziamento (Figura 6).

Preparazione delle librerie flessibile e completa

La famiglia TruSeq di soluzioni per la preparazione delle librerie offre diversi flussi di lavoro per le applicazioni di sequenziamento, compatibili con una gamma di esigenze di ricerca e progettazione di studi (Tabella 1). Tutti i flussi di lavoro TruSeq supportano studi a elevata processività e a bassa processività. TruSeq DNA Nano supporta il sequenziamento WGS ed è ideale per le applicazioni di sequenziamento che richiedono DNA la cui disponibilità è scarsa. Questi flussi di lavoro offrono numerosi miglioramenti rispetto al metodo di preparazione delle librerie TruSeq DNA e supportano varie applicazioni di sequenziamento. I reagenti per la preparazione delle librerie e gli indici di sequenziamento sono ora offerti separatamente per consentire ai ricercatori di adattare i flussi di lavoro alle proprie esigenze sperimentali.

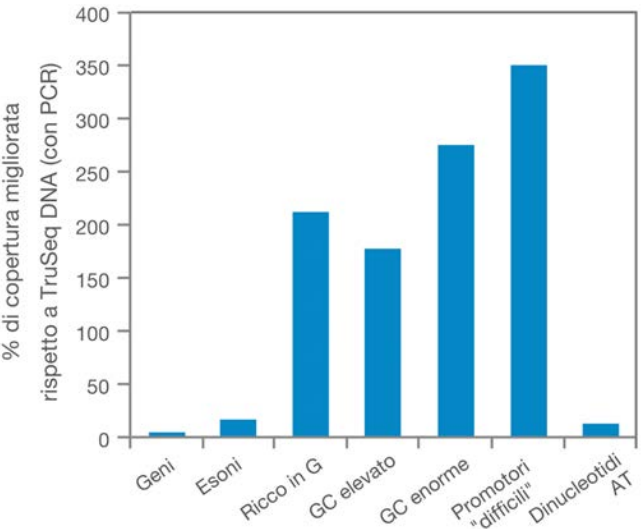


Figura 5: Copertura incrementata di regioni difficili: le librerie TruSeq DNA Nano dimostrano una copertura migliorata di contenuto genomico difficile. Queste regioni includono esoni e geni noti codificanti e non codificanti le proteine umane, definiti nel monitoraggio dei geni RefSeq nel browser genomico dell'UCSC.¹ Le regioni ricche in G indicano 30 basi con ≥ 80% di G. Le regioni con GC elevato sono definite come 100 basi con ≥ 75% di contenuto GC. Le regioni con GC enorme sono definite come 100 basi con ≥ 85% di contenuto GC. I promotori "difficili" indicano il set di 100 regioni del promotore coperte in modo insufficiente, che sono state definite empiricamente dal Broad Institute di MIT and Harvard.² I dinucleotidi AT indicano 30 basi di dinucleotidi AT ripetuti.

Multiplex campioni efficiente

Grazie a una semplice procedura, gli indici sono aggiunti ai frammenti dei campioni di gDNA e forniscono una soluzione innovativa per il multiplex campioni. Per ottenere la più elevata efficienza operativa, è possibile raggruppare in pool fino a 96 campioni, univocamente indicizzati già posizionati su piastra, e sequenziarli assieme sulla corsia di una singola cella a flusso di qualsiasi piattaforma di sequenziamento Illumina. Dopo il sequenziamento, gli indici sono utilizzati per il demultiplex dei dati e per assegnare accuratamente le letture ai campioni corretti nel pool.

TruSeq DNA Nano può utilizzare una strategia di indicizzazione singola o doppia che impieghi una combinazione univoca di due indici per il demultiplex. Gli adattatori con doppi indici univoci (UDI) sono stati sviluppati grazie a una collaborazione tra Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e Illumina e impiegano coppie univoche di indici per il demultiplex. Gli indici UDI di nuova introduzione (24 e 96, disponibili separatamente) forniscono un plex aumentato che consente l'assegnazione accurata delle letture e un uso efficace delle celle a flusso. Le combinazioni che utilizzano gli indici UDI rappresentano la miglior prassi per essere certi che le letture con indici errati non influiscano sull'identificazione delle varianti.

Soluzione ottimizzata

TruSeq DNA Nano contiene reagenti per la preparazione delle librerie, microsfere per la purificazione dei campioni ed efficaci indici TruSeq per il multiplex, fornendo un metodo di preparazione completo e ottimizzato per ottenere prestazioni elevate su tutte le piattaforme di sequenziamento Illumina. TruSeq DNA Nano dispone di due opzioni, a 24 campioni e a 96 campioni, che consentono una progettazione sperimentale scalabile e flessibile. Grazie a un protocollo semplificato e opzioni di multiplex flessibili, il protocollo TruSeq DNA Nano offre un metodo per la preparazione delle librerie ottimizzato che fornisce dati di sequenziamento di qualità elevata.

Riepilogo

TruSeq DNA Nano ottimizza il protocollo TruSeq fornendo un metodo per la preparazione delle librerie a basso input per praticamente qualsiasi applicazione di sequenziamento. Le opzioni di processività elevata e di processività bassa assieme alle diverse dimensioni di inserto forniscono una maggiore flessibilità per supportare diverse applicazioni e studi genomici. Le innovazioni del flusso di lavoro riducono le distorsioni indotte dalla PCR per facilitare una panoramica dettagliata e accurata del genoma. Grazie a un flusso di lavoro più veloce e alla qualità dei dati migliorata, TruSeq DNA Nano fornisce un metodo di preparazione dei campioni completo per le applicazioni di sequenziamento del genoma.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su TruSeq DNA Nano, visitate la pagina Web www.illumina.com/products/truseq-nano-dna-sample-prep-kits.html.

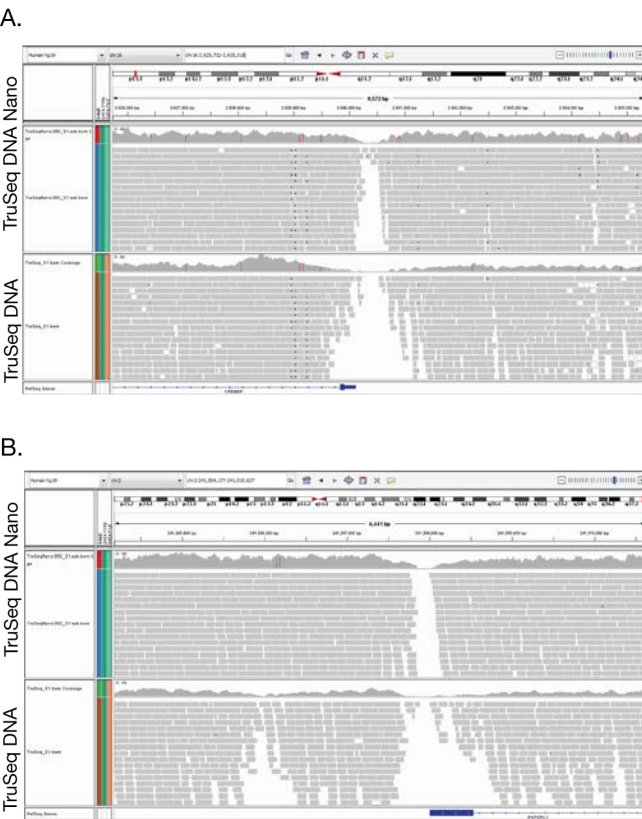


Figura 6: TruSeq DNA Nano riduce il numero di vuoti di copertura: la copertura incrementata delle librerie TruSeq DNA Nano determina meno vuoti di copertura, come dimostrato qui nelle regioni codificanti ricche in GC (A) del promotore *RNPEL1* e (B) del promotore *ZBTB34*. Le informazioni della sequenza generate mediante la preparazione TruSeq DNA Nano sono mostrate nei pannelli superiori di (A) e (B), mentre i dati della sequenza generati utilizzando il protocollo TruSeq DNA sono mostrati nei pannelli inferiori.

Informazioni sugli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSeq DNA Nano Low Throughput Library Prep Kit (24 campioni)	20015964
TruSeq DNA Nano High Throughput Library Prep Kit (96 campioni)	20015965
TruSeq DNA Single Indexes Set A (12 indici, 24 campioni)	20015960
TruSeq DNA Single Indexes Set B (12 indici, 24 campioni)	20015961
TruSeq DNA CD Indexes 96 campioni	20015949
IDT per Illumina–TruSeq DNA UD Indexes (24 indici, 96 campioni)	20020590
IDT per Illumina–TruSeq DNA UD Indexes (96 indici, 96 campioni)	20022370

Bibliografia

1. University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser.
genome.ucsc.edu. Consultato a luglio 2013.
2. The Broad Institute of MIT and Harvard. www.broadinstitute.org.
Consultato a luglio 2013.

Illumina, Inc. • N. verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) • Tel. +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2020 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, visitate la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html. Pubbl.n. 770-2013-012-F ITA QB11476

illumina[®]