

TruSeq™ ChIP Library Preparation Kit

La comprovata qualità dei dati di TruSeq fornisce un profilo esaustivo e accurato delle interazioni proteina target-DNA

- Profilo esaustivo e accurato delle interazioni proteina target-DNA
- Risultati affidabili a partire da appena 5 ng di DNA input ottenuto da diversi tipi di campione
- Scalabilità aumentata grazie a un flusso di lavoro semplice e ottimizzato
- Distribuzione ottimizzata degli output di sequenziamento sui campioni e riduzione del costo per campione

illumina®

Introduzione

Per comprendere a fondo i diversi processi biologici e stati della patologia, è fondamentale determinare il modo in cui le interazioni proteina-DNA regolano l'espressione genica. Queste informazioni epigenetiche sono complementari al sequenziamento del DNA, alla genotipizzazione, all'espressione genica e ad altri tipi di analisi genomica. Il sequenziamento per immunoprecipitazione della cromatina (ChIP-Seq, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) sfrutta il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) per determinare in modo veloce ed efficiente la distribuzione e l'abbondanza delle proteine target di interesse che si legano al DNA sul genoma. Il ChIP-Seq è diventato una delle applicazioni basata sul sequenziamento NGS più ampiamente utilizzata e consente ai ricercatori di identificare in modo affidabile e con elevata risoluzione i siti di legame per un'ampia gamma di target sull'intero genoma.

Poiché gli output dei sistemi NGS sono aumentati, i ricercatori che utilizzano il ChIP-Seq richiedono sempre più una combinazione di sequenziamento con elevato multiplex e flussi di lavoro semplici e ottimizzati. I TruSeq ChIP Library Preparation Kit soddisfano queste esigenze e offrono una soluzione semplice ed efficace dal punto di vista economico per ottenere informazioni sui meccanismi di regolazione dei geni. La generazione di librerie a partire da DNA derivato da ChIP include l'aggiunta di adattatori indici per ottenere la distribuzione ottimale degli output del sequenziamento in base alle esigenze di copertura. Un flusso di lavoro di preparazione delle librerie ottimizzato e altamente scalabile e i reagenti Master Mix riducono gli interventi manuali e supportano un formato di facile automazione fino a 48 campioni. I campioni con diversi indici possono essere miscelati e abbinati per massimizzare la processività sperimentale. Un basso requisito di input di campione (5 ng) assicura risultati affidabili anche quando è disponibile una quantità limitata di DNA input. Questo fornisce la flessibilità di scegliere il tipo di campione e le proteine target per l'analisi.

Flusso di lavoro semplice e ottimizzato

I TruSeq ChIP Library Preparation Kit forniscono, rispetto ad altri metodi, un flusso di lavoro di preparazione delle librerie significativamente migliorato. Il flusso di lavoro TruSeq riduce il numero di fasi di purificazione, di trasferimento del campione, di pipettamento e di pulizia. Una progettazione di adattatori universali incorpora una sequenza d'indice nella fase di ligazione iniziale per migliorare l'efficienza del flusso di lavoro e ottenere un sequenziamento in multiplex più efficace (Figura 1). Il flusso di lavoro inizia con l'arricchimento di specifici complessi DNA-proteine ottenuti mediante crosslinking utilizzando un anticorpo su una proteina di interesse (Figura 1A-B). Gli allungamenti del DNA legato alla proteina target vengono quindi isolati e utilizzati come DNA input per la preparazione delle librerie TruSeq ChIP.

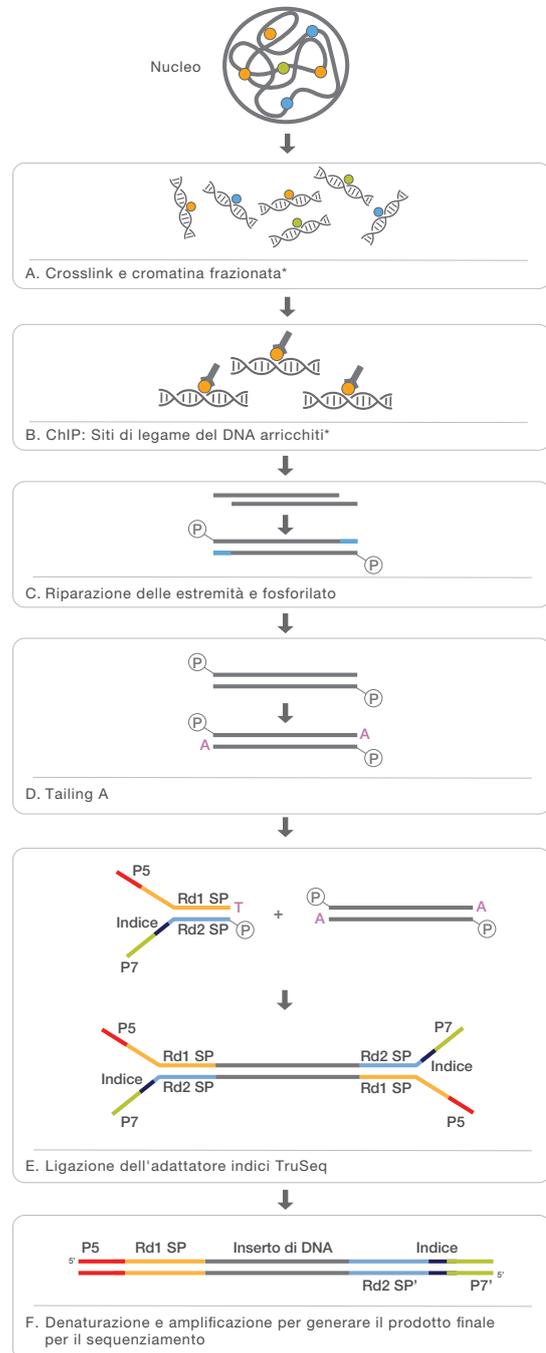


Figura 1: Flusso di lavoro TruSeq ChIP-Seq: il flusso di lavoro semplice e ottimizzato (fasi C-F) riduce gli interventi manuali e accelera l'analisi; gli adattatori universali TruSeq migliorano l'efficienza del flusso di lavoro e consentono di eseguire in modo efficiente il sequenziamento in multiplex.

I frammenti di DNA vengono riparati alle estremità e viene aggiunta una base "A" alle estremità smussate di ciascun filamento, preparandoli per la ligazione agli adattatori di sequenziamento (Figura 1C-D). Ciascun adattatore TruSeq contiene una sporgenza della base "T" sull'estremità 3' fornendo una sporgenza complementare per legare l'adattatore al DNA frammentato con tailing A (Figura 1E). Una volta creato il prodotto finale (Figura 1F) e selezionata la dimensione, tutti i frammenti di DNA ChIP vengono sequenziati simultaneamente.

Per fornire la massima flessibilità, i TruSeq ChIP Library Preparation Kit possono essere utilizzati per preparare i campioni per il sequenziamento unidirezionale o paired-end e sono compatibili con qualsiasi sistema di sequenziamento di Illumina.

Qualità dei dati di TruSeq

La comprovata qualità dei dati di TruSeq fornisce il profilo esaustivo e accurato delle interazioni proteina target-DNA e fornisce una percentuale di letture che attraversano il filtro, una percentuale di letture allineabili e uniformità di copertura ottimali nonché una elevata sensibilità per il rilevamento di identificazioni a bassa abbondanza.

Prestazioni efficaci in multiplex

I TruSeq ChIP Library Preparation Kit forniscono fino a 24 indici totali per aumentare la processività e la coerenza senza compromissione dei risultati. Gli adattatori universali TruSeq si legano ai frammenti del campione durante la creazione della libreria; in questo modo i campioni possono essere raggruppati in pool e identificati singolarmente durante l'analisi a valle. Questa capacità di indicizzazione migliora l'efficienza del flusso di lavoro e consente di eseguire in modo efficace il sequenziamento in multiplex. Migliorando la flessibilità della progettazione dello studio, l'indicizzazione permette ai ricercatori di massimizzare il valore di ciascuna corsa distribuendo in modo efficiente l'output delle letture in base ai requisiti di profondità di lettura per singolo campione.

Gamma flessibile di target

I TruSeq ChIP Library Preparation Kit consentono di generare librerie con appena 5 ng di DNA input e forniscono una soluzione di elevata qualità, efficiente dal punto di vista economico e a elevata processività su un'ampia gamma di progettazioni di studi ChIP. Il ChIP-Seq è un'applicazione versatile che è stata applicata con successo su un'ampia gamma di target di proteine, inclusi i fattori di trascrizione e gli istoni che sono alla base della cromatina.

Gli studi ChIP che mirano ai fattori di trascrizione sono utili per chiarire i pathway dei modulatori specifici e della trasduzione del segnale che contribuiscono agli stati della patologia, alle fasi dello sviluppo o ad altre condizioni, mentre i "marchi" istonici possono essere utilizzati per comprendere meglio il modo in cui le modificazioni della cromatina e le modifiche strutturali locali influiscono sull'attività dell'espressione genica.¹⁻⁸

Rilevamento di picchi sul genoma

Per dimostrare le prestazioni del TruSeq ChIP Library Preparation Kit, è stata generata una libreria per il fattore di trascrizione MafK utilizzando 5 ng di DNA input (Figura 2) derivato da un ChIP eseguito su cellule HELA.

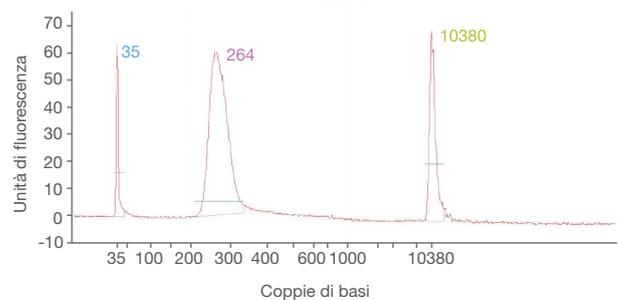


Figura 2: Tracciato del bioanalizzatore per la libreria MafK: dati del tracciato del bioanalizzatore per una libreria generata per il fattore di trascrizione MafK target utilizzando il TruSeq ChIP Library Preparation Kit con 5 ng di DNA input. Il picco centrale indica una resa efficace nella gamma di dimensioni di inserto desiderata.

I dati del sequenziamento sono stati generati con una singola corsa sul MiSeq™ System. I file di output BAM, filtrati in base alla qualità, sono quindi stati immessi nel software di individuazione dei picchi MACS. I picchi identificati sono stati poi sottoposti a screening per l'arricchimento utilizzando il software di individuazione dei motivi MEME. I risultati mostrano un rilevamento sensibile e affidabile delle interazioni DNA-proteina, con un picco identificato e rappresentativo corrispondente a un sito di legame MafK incluso nel database del progetto ENCODE (Figura 3).

L'arricchimento per il motivo del legame MafK noto è stato rilevato come previsto (Tabella 1) ed era corrispondente ai dati generati utilizzando i dati del picco MafK disponibile in ENCODE.⁹ La capacità di rilevare in modo efficace i picchi sul genoma con basse quantità di input iniziale è fondamentale per assicurare studi ChIP di successo. La flessibilità dei TruSeq ChIP Library Preparation Kit consente di mirare a qualsiasi proteina target di interesse offrendo una soluzione ottimizzata ed efficiente dal punto di vista economico per studi che richiedono un'ampia gamma di letture per campione, inclusi i fattori di trascrizione (Figura 3) e i "marchi" istonici come H3K4Me3 (Figura 4).

Tabella 1: Analisi per l'individuazione del motivo dei picchi utilizzando TruSeq ChIP

Nome	% dei principali picchi con motivo MafK
TruSeq ChIP	95%
HELA ENCODE	92%
HES ENCODE	86%

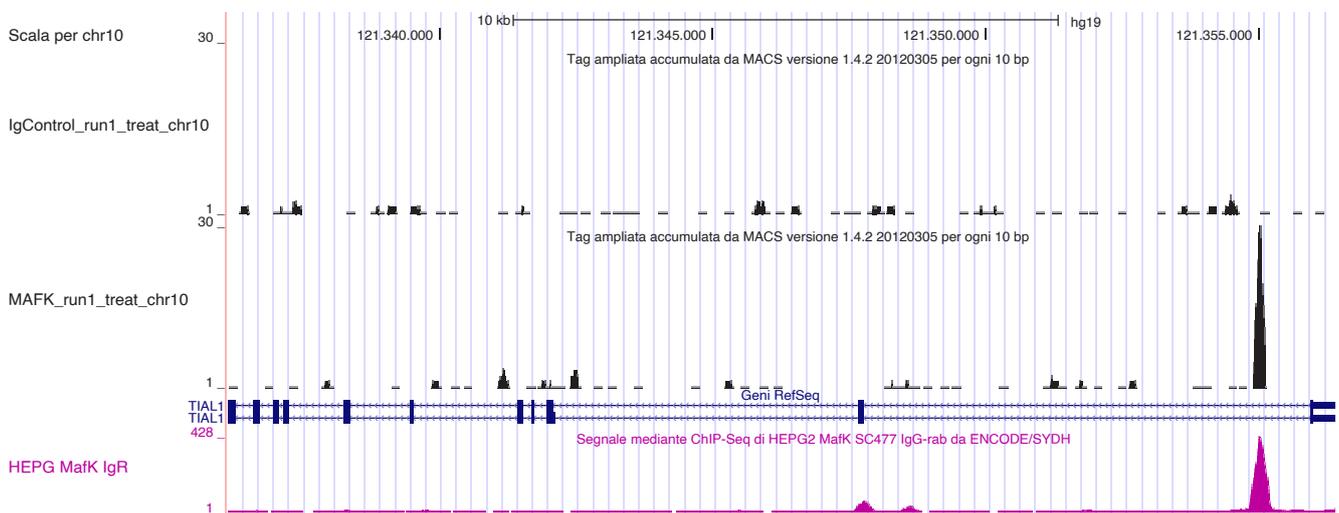


Figura 3: Output di individuazione dei picchi per MafK: i TruSeq ChIP Library Preparation Kit consentono la generazione di librerie per un'ampia gamma di progettazioni di studi. Sopra sono illustrati i dati per i picchi di un controllo Ig negativo, del fattore di trascrizione target MafK e di un picco di riferimento per MafK dal database ENCODE.

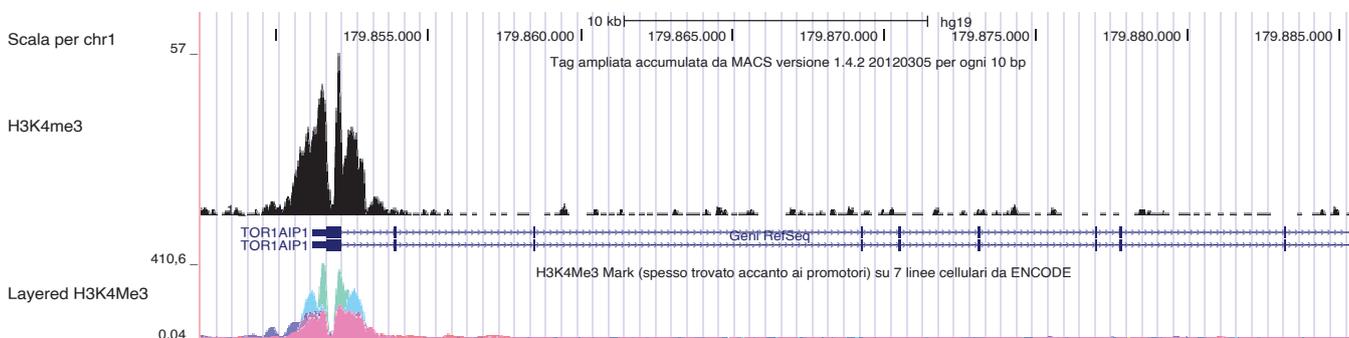


Figura 4: Output di individuazione dei picchi per MafK: i risultati dei picchi per il target H3K4me3 reggono il confronto con i dati delle annotazioni ENCODE per questo target ben caratterizzato, con un picco rappresentativo per il "marchio" istonico target H3K4me3 e un picco di riferimento corrispondente ENCODE.

Soluzioni di sequenziamento di Illumina

I TruSeq ChIP Library Preparation Kit sono compatibili con tutti i sistemi NGS basati sulla chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) di Illumina. Independentemente dal sistema scelto, è assicurata la compatibilità dei dati.

Riepilogo

I TruSeq ChIP Library Preparation Kit offrono la comprovata accuratezza di TruSeq e un flusso di lavoro semplice e ottimizzato e consentono il sequenziamento ChIP in multiplex ed efficace dal punto di vista economico. Supportando l'analisi di un'ampia gamma di target sul genoma anche con un basso input di campione, i kit forniscono un profilo esaustivo e accurato delle interazioni del legame DNA-proteina e informazioni più approfondite sui meccanismi di regolazione genica.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSeq ChIP Library Preparation Kit, Set A (12 indexes, 48 samples)	IP-202-1012
TruSeq ChIP Library Preparation Kit, Set B (12 indexes, 48 samples)	IP-202-1024

Bibliografia

- Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. [Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions](#). *Science*. 2007;316(5830):1497-1502. doi:10.1126/science.1141319.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. [High-resolution profiling of histone methylations in the human genome](#). *Cell*. 2007;129(4):823-837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009.
- Marban C, Su T, Ferrari R, et al. [Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome](#). *PLoS One*. 2011;6(11):e26894. doi:10.1371/journal.pone.0026894.
- Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, et al. [GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination](#). *Nature*. 2011;480(7378):557-560. Pubblicato il 27 novembre 2011. doi:10.1038/nature10656.
- Botti E, Spallone G, Moretti F, et al. [Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13710-13715. doi:10.1073/pnas.1110931108.
- Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, et al. [MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L](#). *Cancer Cell*. 2011;20(1):66-78. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.010.
- de Almeida SF, Grosso AR, Koch F, et al. [Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36](#). *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(9):977-983. Pubblicato il 26 luglio 2011. doi:10.1038/nsmb.2123.
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, et al. [Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells](#). *Nature*. 2011;473(7347):389-393. doi:10.1038/nature09934.
- ENCODE Project Consortium. [A user's guide to the encyclopedia of DNA elements \(ENCODE\)](#). *PLoS Biol*. 2011;9(4):e1001046. doi:10.1371/journal.pbio.1001046.

illumina®

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

© 2022 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-01512 ITA v1.0