

# ADN sin PCR TruSeq™

Preparación sencilla y normalizada de bibliotecas de secuenciación del genoma completo que ofrece una cobertura precisa y exhaustiva de genomas complejos.

## Puntos destacados

- Preparación de bibliotecas optimizada**  
 El protocolo sin PCR acelera el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas de ADN TruSeq
- Excelente calidad de cobertura**  
 El bajísimo número de sesgos de las bibliotecas y la menor cantidad de huecos en la cobertura permiten obtener una mayor información sobre el genoma
- Gran flexibilidad**  
 Los flujos de trabajo sin PCR optimizados admiten distintas longitudes de lectura y aplicaciones
- Solución inclusiva**  
 Esta solución fiable incluye reactivos de mezcla maestra, bolas de selección de tamaño y hasta 96 índices dobles únicos (UDI, por sus siglas en inglés)

El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq reduce el tiempo de preparación de bibliotecas, lo que permite a los investigadores llevar a cabo aplicaciones que van desde la secuenciación microbiana a la WGS humana.



## Introducción

El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq ofrece numerosas mejoras en el flujo de trabajo de ADN TruSeq, ampliamente utilizado, y proporciona una preparación de bibliotecas optimizada para aplicaciones de secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés). Al eliminar los pasos de amplificación PCR, el protocolo sin PCR reduce considerablemente el sesgo habitual producido por la PCR y proporciona información de secuencias detallada para regiones del genoma tradicionalmente complicadas. Hay disponibles protocolos de bajo y alto rendimiento para adaptarse a una gran variedad de diseños de estudio (Figura 1).

## Preparación de bibliotecas acelerada

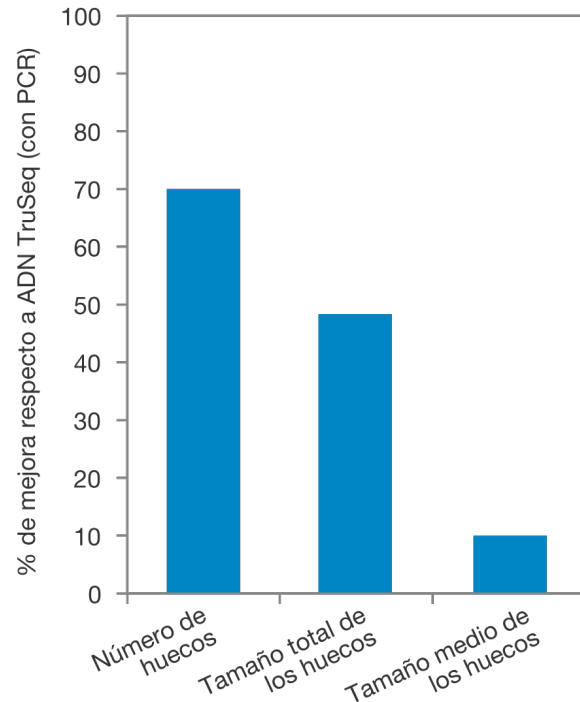
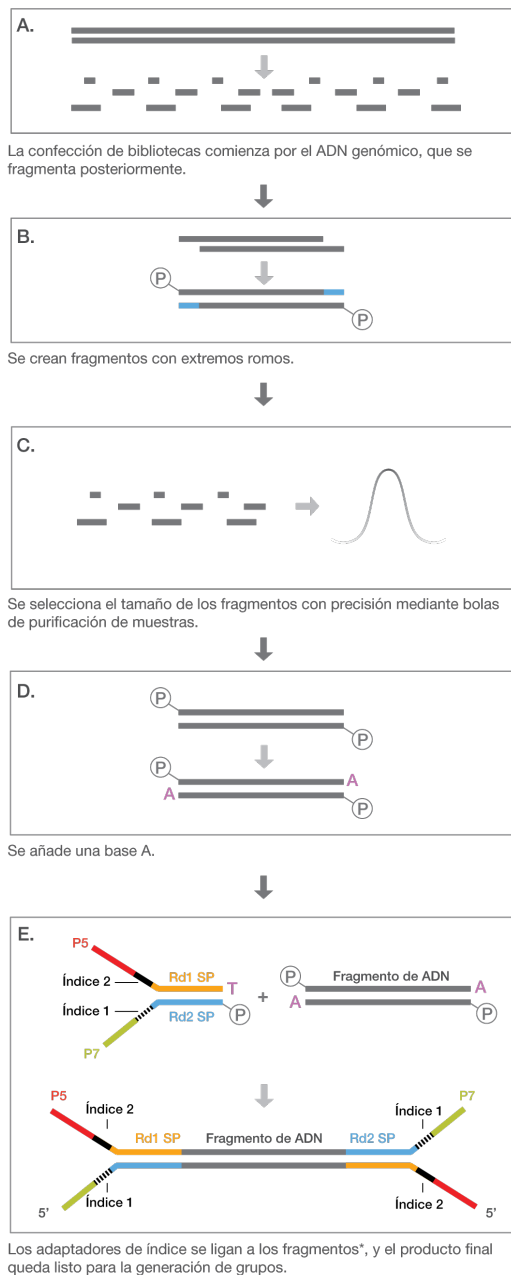
El flujo de trabajo de preparación de bibliotecas de ADN TruSeq se ha simplificado aún más gracias a la eliminación del paso de amplificación PCR y a la sustitución de la selección de tamaño basada en gel por la selección basada en bolas (Figura 2). Este flujo de trabajo ofrece una flexibilidad excepcional gracias a dos opciones de protocolo para generar tamaños de fragmento grandes (550 pb) o pequeños (350 pb), por lo que es compatible con distintas aplicaciones. Los reactivos de mezcla maestra, las bolas de purificación de muestras suministradas para la eliminación y la selección de tamaño, los índices TruSeq sólidos y los protocolos optimizados contribuyen a simplificar el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas simplificadas, que precisa muy pocos pasos de eliminación para procesar grandes números de muestras.

**Figura 1: Kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq:** el kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq ofrece una solución eficiente para la preparación y el indexado de bibliotecas de muestras. El kit de preparación de muestras sin PCR TruSeq puede albergar hasta 24 índices para estudios de bajo rendimiento, o hasta 96 índices dobles o 96 índices dobles exclusivos (vendidos por separado) para estudios de alto rendimiento.

## Fórmula química de preparación de bibliotecas innovadora

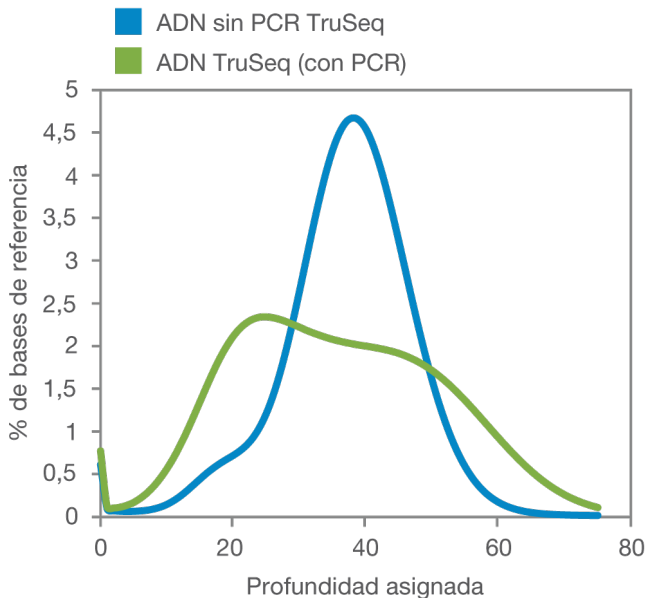
El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq se puede usar para preparar bibliotecas de ADN para secuenciación de una sola lectura, "paired-end" e indexada. El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq admite la fragmentación con el método de ultrasonidos de Covaris, que precisa de una cantidad de entrada de 1 µg de ADN para un tamaño de fragmento medio de 350 pb o bien una cantidad de entrada de 2 µg de ADN para un tamaño de fragmento medio de 550 pb. La confección de bibliotecas comienza por el ADN genómico (ADNg) (Figura 2A). Los fragmentos de ADN con extremos romos se generan mediante una combinación de reacciones de relleno y actividad de la exonucleasa (Figura 2B), mientras que el tamaño se selecciona con las bolas de purificación de muestras suministradas (Figura 2C). A continuación, se añade una base A a los extremos romos de cada cadena, lo que los prepara para la ligadura a los adaptadores indexados (Figura 2D). Cada adaptador contiene un terminal de base T para ligar el adaptador al ADN fragmentado con A-tailing. Estos adaptadores contienen el complemento completo de lugares de hibridación de cebadores de secuenciación para lecturas individuales, "paired-end" e indexadas.

Sin la necesidad de más amplificación PCR, una vez que los adaptadores de índice simple o doble se ligan a los fragmentos, los productos quedan listos para la generación de grupos (Figura 2E).



**Figura 3: Menos huecos en la cobertura:** Las bibliotecas de preparación de muestras sin PCR de ADN TruSeq muestran una reducción significativa del número y el tamaño total de los huecos en comparación con las bibliotecas preparadas mediante el protocolo ADN TruSeq (con PCR). Por hueco se entiende una región con una longitud  $\geq 10$  pb en la que no puede determinarse un genotipo preciso debido a baja profundidad, bajas puntuaciones de alineación o baja calidad de base.

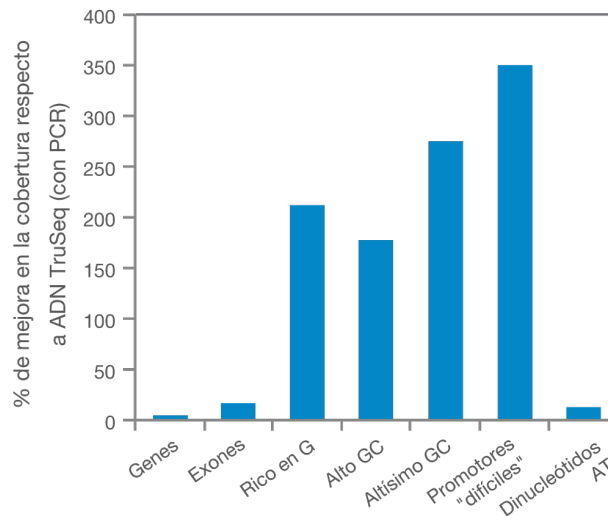
**Figura 2: Flujo de trabajo sin PCR de ADN TruSeq:** El flujo de trabajo sin PCR de ADN TruSeq ofrece ligadura de adaptadores, con lo que se obtienen productos listos para secuenciar sin amplificación PCR. \* La solución de indexación LT sin PCR de ADN TruSeq incluye un adaptador de índice simple en el paso E.



**Figura 4: Mayor uniformidad en la cobertura:** Las bibliotecas de preparación de muestras sin PCR de ADN TruSeq aportan una mayor uniformidad de cobertura en todo el genoma en comparación con las generadas mediante el protocolo ADN TruSeq (con PCR).

### Excelente calidad de cobertura

El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq reduce el número y el tamaño medio de los huecos habituales en la cobertura producidos por la PCR (Figura 3), con lo que ofrece una calidad de datos excepcional. La eliminación de la amplificación PCR del flujo de trabajo de ADN sin PCR TruSeq reduce los sesgos de las bibliotecas y aumenta la uniformidad de cobertura en todo el genoma (Figura 4). Este flujo de trabajo también proporciona una excelente cobertura de contenido genómico tradicionalmente complicado, incluidas las regiones ricas en GC, los promotores y las regiones repetitivas (Figura 5). La alta calidad de los datos proporciona una buena resolución del par de bases, gracias a lo cual se obtiene una vista detallada de las mutaciones somáticas y *de novo*, así como la información necesaria para identificar de forma precisa las variantes causantes. El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq proporciona una vista completa del genoma, incluidas las regiones codificantes, reguladoras e intrónicas, lo que permite a los investigadores acceder a más información de cada experimento de secuenciación (Figura 6).



**Figura 5: Mayor cobertura de regiones complicadas:** las bibliotecas de ADN sin PCR TruSeq muestran una cobertura mejorada del contenido genómico complicado. Estas regiones son, entre otras, exones y genes de codificación de proteínas humanas y de codificación no proteica definidos en la pista de RefSeq Genes del USCS Genome Browser. Las regiones ricas en G se refieren a 30 bases con  $\geq 80\%$  de G. Las regiones ricas en GC se refieren a 100 bases con  $\geq 75\%$  de contenido de GC. Las regiones con altísimo GC se definen como 100 bases con  $\geq 85\%$  de contenido de GC. Los promotores "difíciles" son el conjunto de 100 regiones promotoras con cobertura insuficiente, que han definido empíricamente el Broad Institute of MIT and Harvard. Los dinucleótidos AT indican 30 bases de dinucleótidos AT repetidos.

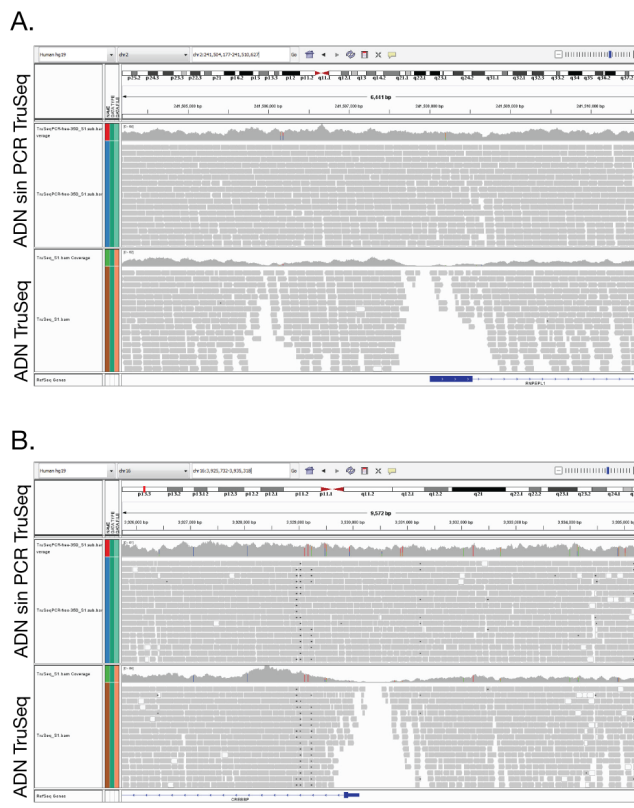
## Multiplexado de muestras eficaz

Los índices se añaden a los fragmentos de ADN<sub>g</sub> de la muestra mediante un procedimiento sencillo sin PCR, con lo que proporciona una solución innovadora para el multiplexado de muestras. A fin de lograr la máxima eficiencia operativa, se pueden agrupar y secuenciar juntas en un solo carril de una celda de flujo de cualquier plataforma de secuenciación de Illumina hasta 96 muestras colocadas previamente en placas e indexadas de forma única. Después de la secuenciación, se emplean los índices para demultiplexar los datos y asignar lecturas de forma precisa a las muestras adecuadas del conjunto. Con el kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq se puede utilizar una estrategia de indexado único o de indexado doble, que emplea una combinación exclusiva de dos índices para demultiplexar. Los adaptadores de índice doble exclusivo (UDI) (disponibles por separado) se desarrollaron en colaboración entre Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e Illumina para emplear pares exclusivos de índices para demultiplexar.

El kit de índices únicos de ADN TruSeq contiene hasta 24 índices, con dos conjuntos de 12 índices cada uno, y el kit de índices CD de ADN TruSeq cuenta con 96 índices. Los estudios con varias muestras pueden administrarse cómodamente con Illumina Experiment Manager, una herramienta de software disponible de forma gratuita que proporciona una configuración sencilla de las reacciones para el procesamiento basado en placas. Esta herramienta permite a los investigadores configurar la hoja de muestras indexadas (es decir, la matriz de multiplexado de muestras) para el experimento que se va a realizar en el instrumento, lo que permite el demultiplexado automático.



Para obtener más información acerca de Illumina Experiment Manager, visite [www.illumina.com/informatics/research/experimental-design/illumina-experiment-manager.html](http://www.illumina.com/informatics/research/experimental-design/illumina-experiment-manager.html).



**Figura 6: El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq reduce el número de huecos en la cobertura:** el aumento de la cobertura de las bibliotecas de ADN sin PCR TruSeq da lugar a menos huecos en la cobertura, como se puede observar aquí en las regiones codificantes ricas en GC del promotor *RNPEPL1* (A) y el promotor *CREBBP* (B). La información de secuencias generada por el kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq se muestra en los paneles superiores de (A) y (B), mientras que los datos de secuencias generados con el protocolo ADN TruSeq se indican en los paneles inferiores.



## Preparación de bibliotecas flexible e inclusiva

La familia TruSeq de soluciones de preparación de bibliotecas ofrece varias opciones para aplicaciones de secuenciación, compatibles con diversas necesidades de investigación y diseños de estudio (Tabla 1). Todos los productos de TruSeq admiten estudios de alto y bajo rendimiento. Estos flujos de trabajo integran numerosas mejoras en el método de preparación de bibliotecas de ADN de TruSeq, lo que facilita las distintas aplicaciones de secuenciación. Los reactivos para la preparación de bibliotecas y los índices de secuenciación se venden ahora por separado, lo que permite a los investigadores personalizar los flujos de trabajo según sus necesidades de investigación.

## Solución simplificada

El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq contiene reactivos de preparación de bibliotecas, bolas de purificación de muestras e índices TruSeq sólidos para el multiplexado, con lo que se ofrece un método completo de preparación optimizado para el máximo rendimiento en todas las plataformas de secuenciación de Illumina. El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq ofrece la versatilidad de dos opciones, 24 muestras y 96 muestras, para aportar flexibilidad al diseño del experimento. Con un protocolo simplificado y unas opciones de multiplexado flexibles, el kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq ofrece un método de preparación de bibliotecas más sencillo que proporciona datos de secuenciación de alta calidad.

## Resumen

El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq optimiza el flujo de trabajo de TruSeq para ofrecer un método de preparación de muestras más sencillo para cualquier aplicación de secuenciación. Las opciones de alto y bajo rendimiento y los diversos tamaños de fragmento lo dotan de una mayor flexibilidad para admitir varias aplicaciones y estudios genómicos. Las innovaciones en el flujo de trabajo permiten reducir el sesgo inducido por PCR y facilitar información detallada y precisa sobre el genoma. El kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq se beneficia de un flujo de trabajo más rápido y de una calidad de datos mejorada, lo que le permite ofrecer un método exhaustivo de preparación de muestras para aplicaciones de secuenciación del genoma.

## Información adicional

Para obtener más información acerca del kit de preparación de muestras de ADN sin PCR TruSeq, visite [www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-dna-pcr-free.html](http://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-dna-pcr-free.html)

**Tabla 1: Preparación de bibliotecas de ADN TruSeq**

Especificación	ADN TruSeq Nano	ADN sin PCR TruSeq	ADN TruSeq
Descripción	Basado en la preparación de bibliotecas de TruSeq ampliamente utilizada, con entrada reducida y calidad de datos mejorada	Cobertura genómica excelente con una reducción drástica del sesgo de las bibliotecas y de los huecos	Método de preparación de bibliotecas de secuenciación de próxima generación de TruSeq original
Cantidad de entrada	100-200 ng	1-2 µg	1 µg
Incluye PCR	Sí	No	Sí
Duración del ensayo	~ 6 horas	~ 5 horas	1-2 días
Tiempo de participación activa	~ 5 horas	~ 4 horas	~ 8 horas
Tamaño de fragmento objetivo	350 pb o 550 pb	350 pb o 550 pb	300 pb
Sin gel	Sí	Sí	No
Número de muestras admitidas	24 (LT) o 96 (HT) <sup>a</sup>	24 (LT) o 96 (HT) <sup>a</sup>	48 (LT) o 96 (HT) <sup>a</sup>
Admite enriquecimiento	No <sup>b</sup>	No <sup>b</sup>	Sí
Bolas de selección de tamaño	Incluido	Incluido	No incluido
Aplicaciones	WGS, incluidos la resecuenciación del genoma completo, el montaje <i>de novo</i> y los estudios metagenómicos		
Multiplexado de muestras	24 índices únicos, 96 índices dobles combinatorios, 24 y 96 índices dobles exclusivos (UDI)		
Sistemas de secuenciación de Illumina compatibles	Sistemas HiSeq™, HiScanSQ™, Genome Analyzer, MiSeq™ y MiniSeq™		

a. LT, bajo rendimiento; HT, alto rendimiento.

b. Los productos de captura rápida Nextera™ admiten distintas aplicaciones de enriquecimiento. Para más información, visite la página [www.illumina.com/NRC](http://www.illumina.com/NRC).

## Referencias

1. Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, et al. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci Translational Med.* 2012;4(154):154ra135.
2. Aird D, Ross MG, Chen WS, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 2011;12:R18.
3. University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. genome.ucsc.edu. Accessed July 2013.
4. The Broad Institute of MIT and Harvard. www.broadinstitute.org. Accessed July 2013.

## Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Kit de preparación de bibliotecas de ADN sin PCR TruSeq, 24 muestras	20015962
Kit de preparación de bibliotecas de ADN sin PCR TruSeq, 96 muestras	20015963
Conjunto A de índices únicos de ADN TruSeq	20015960
Conjunto B de índices únicos de ADN TruSeq	20015961
Índices CD de ADN TruSeq	20015949
IDT para Illumina: índices UD de ADN TruSeq (24 índices, 96 muestras)	20020590
IDT para Illumina: índices UD de ADN TruSeq (96 índices, 96 muestras)	20022370

Illumina, Inc. • 1.800.809.4566 (llamada gratuita, EE. UU.) • Tel.: +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2017 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, visite [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pub. No. 770-2013-001-D ESP QB #

