

# Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

Un flujo de trabajo rápido,  
integrado y de alto rendimiento  
para aplicaciones de  
secuenciación del genoma  
completo.

- El rendimiento de preparación de librerías optimizado genera resultados muy precisos y fiables.
- El protocolo flexible se adapta a una amplia gama de tipos de muestras para aplicaciones de secuenciación sensibles.
- Flujo de trabajo rápido y compatible con la automatización de aproximadamente 1,5 horas de tiempo total con bajos requisitos 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 hasta obtener los resultados. Aunque la tecnología de secuenciación de Illumina ha avanzado con rapidez en los últimos años, los protocolos de preparación de librerías que dependen de la PCR siguen presentando importantes dificultades. El sesgo de la PCR puede dar lugar a una cobertura deficiente a lo largo del genoma, en particular, en aquellas regiones con una composición de bases irregular. Para abordar esta complicación, Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) ofrece una combinación única de tagmentación en bolas con un flujo de trabajo sin PCR (figura 1).

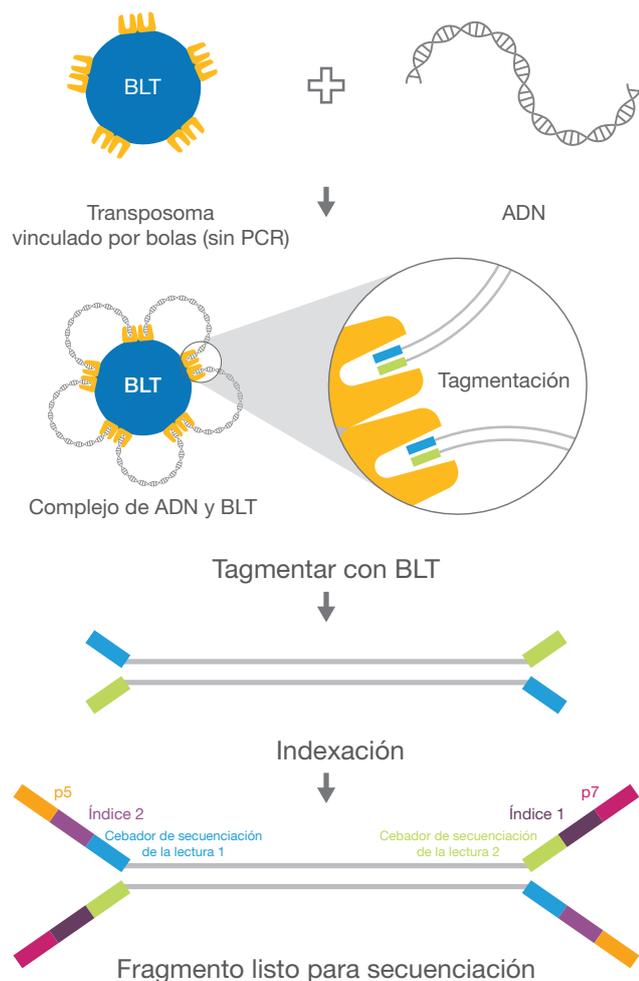


Figura 1: Química de Illumina DNA PCR-Free. Una solución eficaz para preparar e indexar librerías de muestras.

## Funcionamiento

La tagmentación es una reacción mediada por transposomas que combina el marcado 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 librería y unos tamaños de fragmentos de la librería homogéneos.<sup>1,2</sup> Además, al suprimir los pasos de amplificación PCR, la química de Illumina DNA PCR-Free 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 Illumina DNA PCR-Free 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).

Tabla 1: Especificaciones de Illumina DNA PCR-Free

Parámetro	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
Tipo de entrada de ADN	ADNg, sangre, saliva, plásmidos y gotas de sangre seca	ADNg
Cantidad de entrada de ADN	De 25 ng a 300 ng <sup>a</sup>	De 1 a 2 µg
Método de fragmentación	Tagmentación en bolas	Baño ultrasónico Covaris
Multiplexado de muestras	384 índices dobles <sup>b</sup>	96 índices dobles
Sistemas de secuenciación compatibles	MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000, NovaSeq™ 6000, NovaSeq X	Todos los sistemas de secuenciación de Illumina
Tiempo total de flujo de trabajo <sup>c</sup>	Aprox. 90 min <sup>d</sup> con ADNg extraído Aprox. 2,5 h con sangre o saliva sin procesar	Aprox. 11 h
Tamaño de fragmento <sup>e</sup>	450 pb	350 pb o 550 pb

- La cantidad de entrada máxima para Illumina DNA PCR-Free es de 2 µg.
- Para conocer las estrategias de corrección de índices para mitigar la variabilidad entre librerías multiplexadas, consulte [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Equilibrado de la cobertura de muestras para la secuenciación del genoma completo\)](#).
- La duración total del flujo de trabajo incluye los pasos de extracción y cuantificación del ADN, tagmentación y agrupación de librerías.
- Tiempo de flujo de trabajo para la saturación de ADNg de entrada (300 ng).
- Para obtener más información sobre el ajuste de los tamaños de los fragmentos a 350 pb o 550 pb, consulte [Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation \(Tamaño de fragmentos ajustable con Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation\)](#).

## 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. La cobertura uniforme permite una llamada más precisa de las variantes que están alejadas de la profundidad media.<sup>3</sup> Para evaluar el rendimiento de la cobertura en un intervalo de contenido de GC, se trazaron los datos de cobertura normalizados de Illumina DNA PCR-Free y TruSeq™ DNA PCR-Free frente al contenido del genoma humano en porcentaje de GC. Por lo general, los datos del genoma humano constan de un 20-70 % de secuencias de GC. Ambos kits muestran un grado de cobertura uniforme en una amplia gama de contenido de GC representada por los datos de WGS en humanos (figura 2), lo que indica que Illumina DNA PCR-Free es excepcionalmente adecuado para aplicaciones de WGS en humanos.

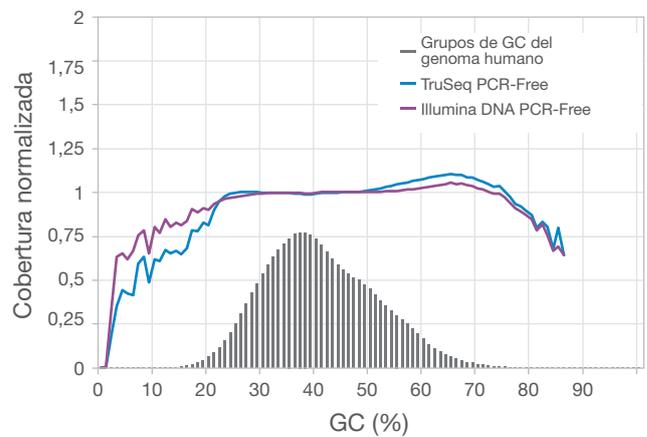


Figura 2: Uniformidad de la cobertura de Illumina DNA PCR-Free. Illumina DNA PCR-Free ofrece una cobertura uniforme en toda la gama de contenido de GC en el genoma humano.

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

Debido a los elementos estructurales en la transcripción del genoma humano, las regiones promotoras de genes humanos suelen ser de alto contenido en GC o de bajo contenido en GC y pueden ser difíciles de amplificar mediante la PCR.<sup>4</sup> Las librerías de WGS humanas preparadas con kits que excluyen la PCR pueden mostrar una mejor cobertura en determinadas regiones promotoras ricas en GC. Para comparar el rendimiento de cobertura de Illumina DNA PCR-Free, TruSeq DNA PCR-Free y TruSeq DNA Nano (incluye PCR), se prepararon librerías a partir de ADN de la estirpe celular humana NA12878 (Coriell Institute). Todas las librerías se secuenciaron en un HiSeq™ System\* con una configuración del experimento de 2 × 150 pb. La resolución de los datos se redujo a una cobertura de 32-40×. En comparación con los datos de TruSeq DNA Nano, los conjuntos de datos de Illumina DNA PCR-Free y de TruSeq DNA PCR-Free muestran una cobertura superior en una región con un gran hueco de GC en el gen humano *RNPEPL1* (figura 3). El uso de Illumina DNA PCR-Free mejora la cobertura en regiones complicadas.

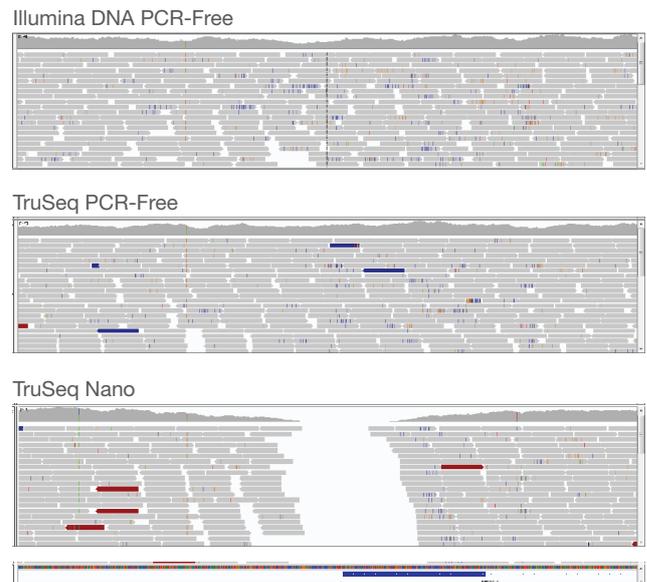


Figura 3: Comparación de la cobertura de lecturas en regiones con alto contenido en GC. Illumina DNA PCR-Free proporciona una cobertura superior en las lecturas de las regiones promotoras con alto contenido en GC del gen *RNPEPL1* humano, en comparación con TruSeq DNA PCR-Free Kit y TruSeq DNA Nano Library Prep Kit. Los mapas de lecturas se visualizaron con la aplicación Integrative Genomics Viewer (IGV), disponible en BaseSpace™ Sequence Hub.

\* HiSeq System ya no está disponible. Sin embargo, la información proporcionada es aplicable a otros sistemas enumerados en la tabla 1.

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

Se evaluó el rendimiento de Illumina DNA PCR-Free en una gama de cantidades de entrada de ADN. Se prepararon librerías de ADN<sub>g</sub> de una estirpe celular humana (Coriell Institute, NA12878) utilizando cantidades de entrada de 600 ng para TruSeq DNA PCR-Free y de 20 ng a 200 ng<sup>†</sup> para Illumina DNA PCR-Free. Las librerías se secuenciaron en un NovaSeq™ 6000 System con una configuración del experimento de 2 × 150 pb y, a continuación, se redujo la resolución a una cobertura media de 40×. Se hizo una comparación de las puntuaciones de calidad, la llamada de bases y los criterios de medición de llamada de variantes. Los datos de cada tipo de librería son muy precisos, con más del 85 % de las bases con una puntuación Q30 o superior en NovaSeq 6000 System (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, incluida la entrada escasa de 20 ng\*.

## Tagmentación en bolas y protocolo sin PCR

Illumina DNA PCR-Free proporciona una combinación única y potente de beneficios gracias a la tagmentación en bolas y a la química sin PCR. El punto de saturación en bolas de Illumina DNA PCR-Free es ≥300 ng de ADN<sub>g</sub>. La saturación en bolas permite un control robusto del tamaño de fragmento y un rendimiento normalizado a partir de cantidades de entrada de ADN superiores a 300 ng. Este protocolo minimiza los pasos de cuantificación previos y posteriores a la preparación de librerías. Las librerías normalizadas pueden agruparse en función del volumen; con ello se evita la cuantificación individual de librerías, que requiere mucho tiempo. Al eliminar los pasos de cuantificación y de PCR, Illumina DNA PCR-Free ofrece un ensayo optimizado en 90 minutos (figura 5). Aunque la normalización se consigue con entradas menores o iguales a 150 ng, se pueden generar librerías viables y de alto rendimiento con una entrada de ADN de tan solo 20 ng\*. La capacidad de hacer preparaciones de librerías sin PCR partiendo de bajas entradas de ADN abre la puerta a nuevas aplicaciones, como la WGS, a partir de gotas de sangre seca.

<sup>†</sup> La cantidad de entrada máxima para Illumina DNA PCR-Free es de 2 µg.

## Multiplexado de muestras eficaz para aplicaciones de alta productividad

Illumina DNA PCR-Free es compatible con Illumina DNA Unique Dual Indexes, lo que permite un demultiplexado preciso de las muestras en los sistemas de secuenciación de Illumina. Hasta 384 índices proporcionan máxima flexibilidad para proyectos de secuenciación de alta productividad.

## Flujos de trabajo compatibles con la automatización

Por su flujo de trabajo rápido y simplificado, Illumina DNA PCR-Free 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 de Illumina y preparar librerías 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 de TruSeq DNA PCR-Free y los de dos sistemas sin PCR basados en enzimas frente a Illumina DNA PCR-Free. 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 librería de 96 lotes de muestras en un robot de manipulación de líquidos Hamilton. Las comparaciones muestran que Illumina DNA PCR-Free ofrece un ahorro de tiempo significativo (tabla 2).

## Reducción de los costes con Illumina DNA PCR-Free

El material de laboratorio, las puntas y los reactivos para la qPCR representan gastos adicionales a la hora de preparar librerías para NGS. Una ventaja clave de la tecnología basada en bolas es la normalización automática basada en bolas de todas las librerías preparadas en un lote. Esta normalización automática elimina la necesidad de cuantificar librerías individuales y permite una agrupación de librerías sencilla por volumen equivalente. Para conocer las estrategias de corrección la variación del rendimiento específica de índices entre librerías multiplexadas, consulte la nota técnica [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Equilibrado de la cobertura de muestras para la secuenciación del genoma completo\)](#).

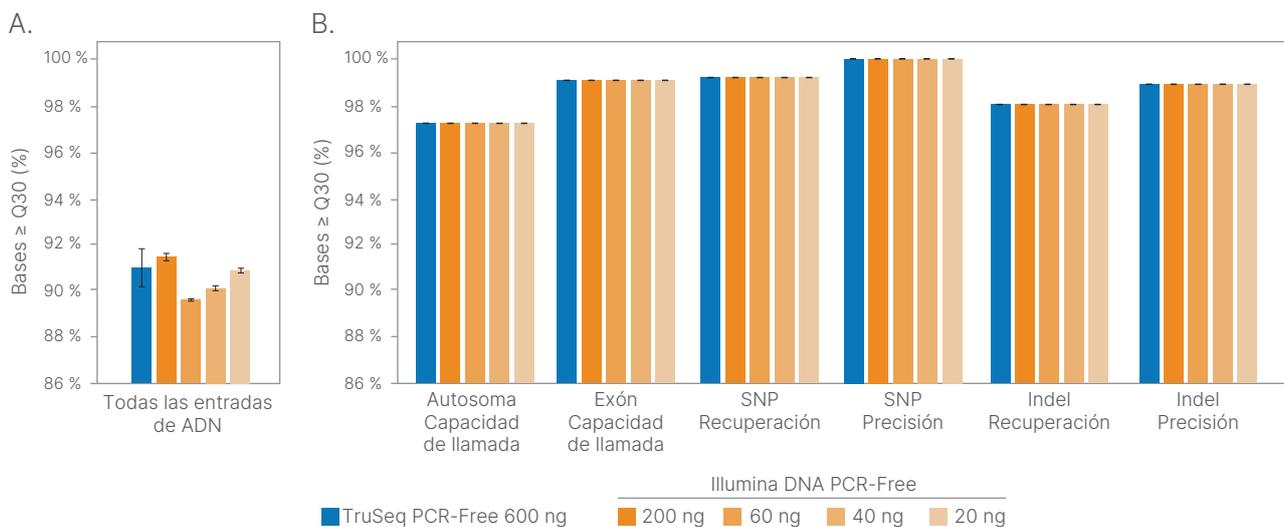


Figura 4: Rendimiento de Illumina DNA PCR-Free Prep en una gama de entradas de ADN. Se ha demostrado que las librerías preparadas con Illumina DNA PCR-Free a partir de una gama de entradas de ADN (A) cumplen las especificaciones de calidad para todas las entradas de ADN y (B) presentan un rendimiento equivalente en cuanto a la capacidad de llamada. Puntuación Q30, una precisión de la 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 de un solo nucleótido; indel, mutación de inserción-delección; precisión (exactitud), calculada como el cociente de [n.º de llamadas verdaderas positivas / (n.º de llamadas verdaderas positivas + n.º de llamadas falsas positivas)]; recuperación (sensibilidad), calculado como el cociente de [n.º de llamadas verdaderas positivas / (n.º de llamadas verdaderas positivas + n.º de llamadas falsas negativas)].

**TruSeq DNA PCR-Free**

Preparación de librerías con ligadura de adaptadores y marcado de índices	Cuantificación y normalización manuales de librerías	Agrupación manual
<b>5 h</b>	<b>2 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Empresa K**

Preparación de librerías con el flujo de trabajo de la empresa K	Cuantificación y normalización manuales de librerías	Agrupación manual
<b>Aprox. 2,5 h</b>	<b>2 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Empresa N**

Preparación de librerías con el flujo de trabajo de la empresa N	Cuantificación y normalización manuales de librerías	Agrupación manual
<b>Aprox. 2,5 h</b>	<b>2 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Illumina DNA PCR-Free, sangre o saliva**

Illumina Lysis Kit	Preparación de librerías con tagmentación vinculada por bolas sin PCR	Agrupación en volumen
<b>Aprox. 1,5 h</b>	<b>1,5 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Illumina DNA PCR-Free, ADNg**

Preparación de librerías con tagmentación vinculada por bolas sin PCR	Agrupación en volumen
<b>1,5 h</b>	<b>0,5 h</b>

Figura 5: Flujo de trabajo de Illumina DNA PCR-Free. El flujo de trabajo de Illumina DNA PCR-Free ofrece un rápido tiempo de ensayo total de 90 minutos desde la fragmentación o tagmentación hasta la limpieza de las librerías. Datos en el archivo de Illumina, Inc., 2019. Nota: La empresa N utiliza reactivos exclusivos combinados con adaptadores de Illumina.

Tabla 2: Consumibles de la automatización para 96 muestras<sup>a</sup>

Método	Tipo de muestra	Puntos de contacto	Placas de 96 muestras	Puntas	Tiempo
TruSeq DNA PCR-Free	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
Illumina DNA PCR-Free (+ cuantificación opcional de grupos mediante qPCR)	sangre, saliva	2 (6)	10 (12)	2016 (2072)	2 h 32 min (4 h 7 min)
Illumina DNA PCR-Free (+ cuantificación opcional de grupos mediante qPCR)	ADNg	2 (6)	8 (10)	1604 (1660)	1 h 32 min (3 h 7 min)

a. Modelado realizado utilizando el software de Hamilton para el sistema de manipulación de líquidos Hamilton Star con cabezal de 96 pipetas 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 Illumina DNA PCR-Free, se supone que cada muestra se mide, ajusta y agrupa mediante qPCR. La agrupación de muestras se basa en cuatro grupos de 24 muestras. Datos en el archivo de Illumina, Inc., 2019. Nota: La empresa N utiliza reactivos exclusivos combinados con adaptadores de Illumina.

Puesto que las librerías sin PCR suelen cuantificarse mediante qPCR, Illumina DNA PCR-Free elimina o reduce considerablemente el número de qPCR necesarias en el protocolo general de preparación de librerías (p. ej., amplificación de la librería mediante PCR y cuantificación después de preparar la librería). Un modelo de costes adicionales, incluidos los reactivos de qPCR, el material de laboratorio, los reactivos de cuantificación, las puntas y los kits de extracción de terceros, revela que el flujo de trabajo de Illumina DNA PCR-Free ofrece ahorros sustanciales.<sup>5</sup> Por ejemplo, los costes adicionales pueden representar aproximadamente el 56 % de los costes totales del flujo de trabajo de TruSeq PCR-Free o aproximadamente el 44 % de los kits sin PCR basados en enzimas de la competencia.<sup>‡</sup> En el caso del flujo de trabajo de Illumina DNA PCR-Free, los costes adicionales son de tan solo aproximadamente un 21 %, lo cual es una reducción notable en comparación con otros kits de preparación de librerías.<sup>†</sup>

## Resumen

Illumina DNA PCR-Free ofrece una combinación única de beneficios gracias a los pasos de tagmentación en bolas y de química sin PCR. La tagmentación en bolas es compatible con la normalización basada en bolas, la fácil agrupación de librerías en función del volumen y la eliminación de los pasos de cuantificación antes y después de la preparación de librerías. 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 Flex Lysis Reagent Kit integrado, el flujo de trabajo es compatible con la entrada de muestras sin procesar, como, por ejemplo, sangre, saliva y gotas de sangre seca. Illumina DNA PCR-Free 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 ensamblaje de genomas microbianos *de novo* o la llamada de variantes tumorales-normales.

## Información adicional

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

‡ Para este cálculo se han equiparado los costes del kit de preparación de librerías. Los costes adicionales son variables y se calculan como una proporción del coste total según las suposiciones de flujo de trabajo (tabla 2).

## Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 samples)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 samples)	20041795
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091660
Illumina Lysis Reagent Kit	20042221

## Bibliografía

1. Illumina. Illumina DNA Prep. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf) Año de publicación: 2020. Fecha de consulta: 1 de septiembre de 2023.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722. Fecha de publicación: 1 de octubre de 2018. doi:10.1186/s12864-018-5096-9
3. Illumina. Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits. [illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote\\_truseq\\_comparison.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote_truseq_comparison.pdf) Año de publicación: 2013. Fecha de consulta: 31 de enero de 2022.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-125.
5. Datos en archivo. Illumina, Inc., 2019.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 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, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-00679 ESP v2.0