

# Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

Flusso di lavoro integrato,  
rapido e ad alte prestazioni per  
applicazioni di sequenziamento  
dell'intero genoma

- Risultati affidabili e altamente accurati grazie a prestazioni ottimizzate per la preparazione delle librerie
- Protocollo flessibile adatto a un'ampia gamma di tipi di campioni per applicazioni di sequenziamento sensibili
- Flusso di lavoro rapido e compatibile con l'automazione, della durata di circa 1,5 ore totali con requisiti di DNA a basso input

**illumina**<sup>®</sup>

## Introduzione

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) ha rivoluzionato le modalità di esecuzione degli studi genomici da parte dei ricercatori, aumentando significativamente la quantità e la qualità dei dati generabili per corsa e riducendo al contempo costi e tempistiche per ottenere una risposta. Sebbene negli ultimi anni la tecnologia di sequenziamento Illumina sia avanzata rapidamente, i protocolli di preparazione delle librerie dipendenti dalla PCR presentano ancora complessità significative. Le distorsioni della PCR possono comportare una copertura non omogenea sul genoma, specialmente nelle regioni con una composizione di basi non omogenea. Per risolvere tali complessità, Illumina DNA PCR-Free Prep Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) offre una combinazione univoca di tagmentazione su microsfere con un flusso di lavoro senza PCR (Figura 1).

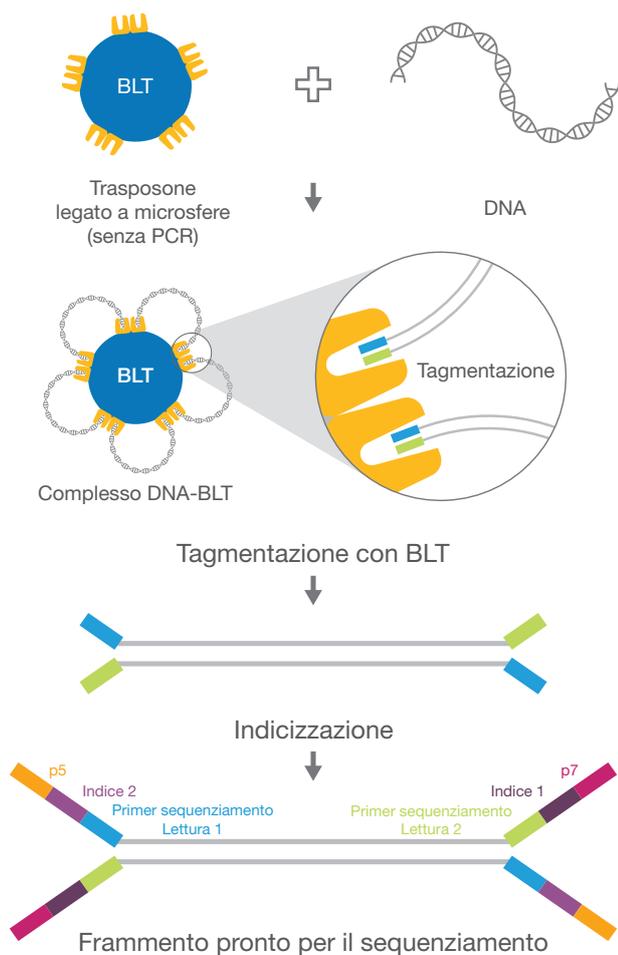


Figura 1: chimica di Illumina DNA PCR-Free. Una soluzione efficiente per la preparazione e l'indicizzazione delle librerie di campioni.

## Come funziona

La tagmentazione è una reazione mediata da trasposoni che combina la marcatura con la tagmentazione del DNA in una singola e rapida reazione. La tagmentazione su microsfere utilizza i trasposoni legati alle microsfere per eseguire una reazione di tagmentazione più uniforme rispetto alla tagmentazione in soluzione. Dopo che i trasposoni legati alle microsfere vengono saturati con il DNA, non avviene nessun'altra tagmentazione, il che assicura la resa coerente della libreria e dimensioni uniformi degli inserti della libreria.<sup>1,2</sup> Inoltre, eliminando le fasi di amplificazione della PCR, la chimica Illumina DNA PCR-Free elimina le distorsioni indotte dalla PCR e fornisce informazioni altamente accurate sul sequenziamento per applicazioni sensibili come l'identificazione della variante tumore-normale o il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) umano. Il saggio Illumina DNA PCR-Free può essere completato in 90 minuti a partire dal DNA genomico (gDNA, Genomic DNA) estratto oppure in 2,5 ore a partire da campioni non elaborati come sangue o saliva (Tabella 1).

Tabella 1: specifiche di Illumina DNA PCR-Free

Parametro	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
Tipo di input di DNA	gDNA, sangue, saliva, plasmidi, gocce di sangue secco	gDNA
Quantità di input di DNA	Da 25 ng a 300 ng <sup>a</sup>	Da 1 a 2 µg
Metodo di frammentazione	Tagmentazione su microsfere	Sonicazione Covaris
Multiplex campioni	384 indici doppi <sup>b</sup>	96 indici doppi
Sistemi di sequenziamento supportati	MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000, NovaSeq™ 6000, NovaSeq X	Tutti i sistemi di sequenziamento Illumina
Durata totale del flusso di lavoro <sup>c</sup>	~90 min <sup>d</sup> gDNA estratto circa 2,5 ore per sangue o saliva	Circa 11 ore
Dimensione inserto <sup>e</sup>	450 bp	350 bp o 550 bp

- La quantità massima di input per Illumina DNA PCR-Free è 2 µg.
- Per le strategie di correzione dell'indice per mitigare la variabilità tra le librerie multiplexate, leggere [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Bilanciamento della copertura dei campioni per il sequenziamento dell'intero genoma\)](#).
- La durata totale del flusso di lavoro include le fasi di estrazione e quantificazione del DNA, tagmentazione e raggruppamento in pool delle librerie.
- Durata del flusso di lavoro per la saturazione del gDNA di input (300 ng).
- Per maggiori informazioni sulla regolazione delle dimensioni degli inserti a 350 bp o 550 bp, leggere [Dimensioni degli inserti regolabili con Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation](#).

## Elevata uniformità di copertura dell'intero genoma per WGS umano

L'uniformità di copertura misura la completezza dei dati sul genoma per una corsa di sequenziamento. La copertura uniforme consente di identificare più accuratamente le varianti distanti dalla profondità media.<sup>3</sup> Per valutare le prestazioni della copertura su un intervallo di contenuto di GC, i dati di copertura normalizzati ottenuti da Illumina DNA PCR-Free e TruSeq™ DNA PCR-Free sono stati tracciati rispetto al contenuto di genoma umano in base alla percentuale di GC. Il gruppo di dati del genoma umano è costituito dal 20-70% della sequenza GC. Entrambi i kit mostrano livelli di copertura omogenei su un ampio range di contenuto in GC come rappresentato dai dati WGS umani (Figura 2), indicando che Illumina DNA PCR-Free è particolarmente adatto per le applicazioni WGS umane.

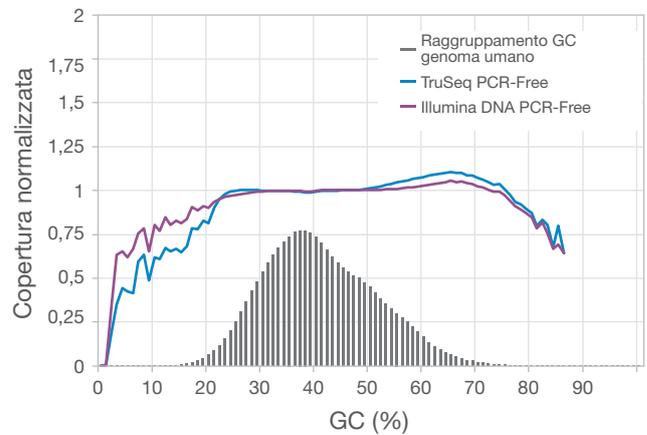


Figura 2: uniformità di copertura di Illumina DNA PCR-Free. Illumina DNA PCR-Free fornisce una copertura uniforme su un range di contenuto in GC nel genoma umano.

## Copertura omogenea su regioni con GC o AT elevato

A causa degli elementi strutturali nella trascrizione del genoma umano, le regioni del promotore genico umano sono spesso ricche o scarse di GC e possono essere difficili da amplificare con la PCR.<sup>4</sup> Le librerie WGS umane preparate con kit che escludono la PCR possono mostrare una migliore copertura in alcune regioni del promotore ricche di GC. Per confrontare le prestazioni sulla copertura di Illumina DNA PCR-Free, TruSeq DNA PCR-Free e TruSeq DNA Nano (inclusa la PCR), sono state preparate delle librerie dal gDNA della linea cellulare umana NA12878 (Coriell Institute). Tutte le librerie sono state sequenziate su un HiSeq™ System\* con una configurazione della corsa di 2 × 150 bp. I dati sono stati sottocampionati a una copertura di 32-40×. Rispetto ai dati ottenuti con TruSeq DNA Nano, i dataset ottenuti sia da Illumina DNA PCR-Free sia da TruSeq DNA PCR-Free hanno mostrato una copertura superiore su una regione di vuoto con GC elevato nel gene umano *RNPEPL1* (Figura 3). L'utilizzo di Illumina DNA PCR-Free migliora la copertura sulle regioni difficili.

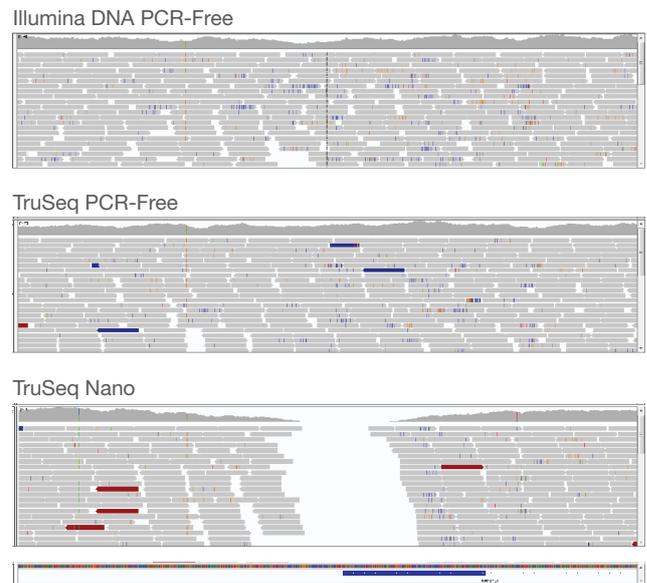


Figura 3: confronto della copertura delle letture su regioni ricche in GC. Illumina DNA PCR-Free fornisce una copertura superiore delle letture su regioni del promotore ricche in GC del gene umano *RNPEPL1*, rispetto al TruSeq DNA PCR-Free Kit e al TruSeq DNA Nano Library Prep Kit. Le mappature delle letture sono visualizzate nell'app Integrative Genomics Viewer (IGV), disponibile in BaseSpace™ Sequence Hub.

\* HiSeq System non è più disponibile. Tuttavia, le informazioni fornite sono applicabili ad altri sistemi indicati nella Tabella 1.

## Prestazioni eccellenti su una gamma di quantità di input di DNA

Le prestazioni di Illumina DNA PCR-Free sono state valutate su diverse quantità di input di DNA. Le librerie sono state preparate da gDNA della linea cellulare umana (Coriell Institute, n. di catalogo NA12878) utilizzando quantità di input di 600 ng e 20-200 ng\* rispettivamente con TruSeq DNA PCR-Free e Illumina DNA PCR-Free. Le librerie sono state sequenziate su un NovaSeq™ 6000 System con una configurazione della corsa di 2 × 150 bp e sottocampionate a una copertura media di 40×. Sono stati confrontati i punteggi qualitativi, le identificazioni delle basi e le identificazioni di varianti. I dati di ciascun tipo di libreria sono altamente accurati, con oltre l'85% delle basi con un punteggio pari o superiore a Q30 sul NovaSeq 6000 System (Figura 4A). I dataset hanno inoltre mostrato prestazioni equivalenti nell'identificazione delle basi sia negli autosomi che negli esoni e prestazioni equivalenti nell'identificazione di varianti (Figura 4B). Erano inoltre equivalenti la qualità dei dati, le prestazioni nell'identificazione delle basi e l'identificazione di varianti su tutti gli input di DNA, inclusi input bassi di 20 ng\*.

## Protocollo di tagmentazione su microsfere e senza PCR

Illumina DNA PCR-Free fornisce una combinazione unica ed efficace di vantaggi offerti dalla chimica di tagmentazione su microsfere e senza PCR. Il punto di saturazione su microsfere di Illumina DNA PCR-Free è maggiore o uguale a 300 ng di gDNA. La saturazione su microsfere consente il controllo efficace sulla dimensione di inserti e le rese normalizzate da quantità di input di DNA superiori a 300 ng. Questo protocollo consente di ridurre al minimo le fasi di quantificazione sia prima sia dopo la preparazione delle librerie. Le librerie normalizzate possono essere raggruppate in pool in base al volume, il che evita una quantificazione di lunga durata di singole librerie. Eliminando la quantificazione e le fasi della PCR, Illumina DNA PCR-Free offre un saggio ottimizzato di 90 minuti (Figura 5). Sebbene la normalizzazione venga raggiunta con input uguali o superiori a 150 ng, è possibile generare librerie altamente performanti con appena 20 ng\* di DNA input. La capacità di preparare librerie senza PCR da bassi input di DNA consente di eseguire applicazioni come WGS da gocce di sangue secco.

† La quantità massima di input per Illumina DNA PCR-Free è 2 µg.

## Multiplex campioni efficace per applicazioni a elevata processività

Illumina DNA PCR-Free è compatibile con Illumina DNA Unique Dual Indexes, che consentono il demultiplex accurato dei campioni sui sistemi di sequenziamento Illumina. Sono disponibili fino a 384 indici che forniscono la massima flessibilità per progetti di sequenziamento a elevata processività.

## Flussi di lavoro compatibili con l'automazione

Illumina DNA PCR-Free è altamente compatibile con l'automazione grazie al flusso di lavoro rapido e semplificato. Grazie alla natura coerente e auto-normalizzante del flusso di lavoro basato sulle microsfere, gli utenti possono partire da campioni di sangue o saliva non elaborati, eseguire il protocollo Illumina Lysis e procedere con la preparazione delle librerie senza alcuna fase di quantificazione. Queste caratteristiche consentono un semplice flusso di lavoro per l'elaborazione di batch di campioni non elaborati su piattaforme di gestione dei liquidi.

Per dimostrare la compatibilità, sono stati confrontati flussi di lavoro automatizzati per TruSeq DNA PCR-Free e due flussi di lavoro senza PCR basati su enzimi della concorrenza con Illumina DNA PCR-Free. Per ogni flusso di lavoro sono stati calcolati i punti di contatto, la strumentazione da laboratorio, le punte e il tempo necessario alla preparazione delle librerie di batch da 96 campioni sul robot di gestione dei liquidi Hamilton. I risultati hanno mostrato che Illumina DNA PCR-Free consente di risparmiare tempo in modo significativo (Tabella 2).

## Costi ridotti con Illumina DNA PCR-Free

La strumentazione da laboratorio, le punte e i reagenti qPCR comportano costi aggiuntivi durante la preparazione delle librerie per la tecnologia NGS. Un vantaggio fondamentale della tecnologia basata su microsfere è la normalizzazione automatica basata su microsfere di tutte le librerie preparate in un batch. Questa auto-normalizzazione elimina la necessità della quantificazione delle singole librerie e consente un semplice raggruppamento in pool delle librerie per volume uguale. Per le strategie di correzione della variazione delle prestazioni specifica per l'indice su librerie multiplex, fare riferimento alla nota tecnica [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Bilanciamento della copertura dei campioni per il sequenziamento dell'intero genoma\)](#).

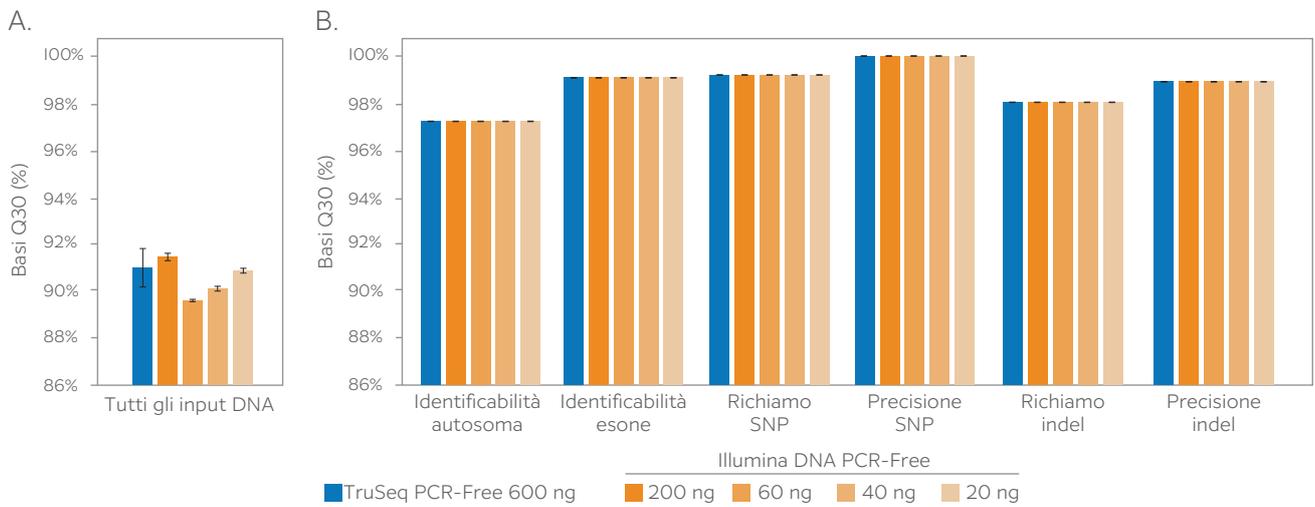


Figura 4: prestazioni di Illumina DNA PCR-Free Prep su un range di input di DNA. Le librerie Illumina DNA PCR-Free preparate da un range di input di DNA dimostrano che (A) hanno superato le specifiche di qualità per tutti gli input di DNA e che (B) le prestazioni relative all'identificazione sono equivalenti. Punteggio Q30 = accuratezza dell'identificazione delle basi desunta del 99,9%, identificazione autosomi = percentuale di posizioni di riferimento non N in cromosomi autosomici con un'identificazione del genotipo superata, identificazione esomi = percentuale di posizioni di riferimento non N in esomi con un'identificazione dei genotipi superata, SNP = polimorfismo di singolo nucleotide, indel = mutazione inserzione-delezione, precisione (accuratezza) = calcolata come rapporto tra [n. di identificazioni vere positive/(n. di identificazioni vere positive + n. di identificazioni false positive)], reidentificazione (sensibilità) = calcolata come rapporto tra [n. di identificazioni vere positive/(n. di identificazioni vere positive + n. di identificazioni fase negative)].

### TruSeq DNA PCR-Free

Preparazione delle librerie con ligazione degli adattatori e marcatura degli indici	Quantificazione e normalizzazione manuale delle librerie	Raggruppamento manuale in pool
<b>5 ore</b>	<b>2 ore</b>	<b>0,5 ore</b>

### Azienda K

Preparazione delle librerie con flusso di lavoro Azienda K	Quantificazione e normalizzazione manuale delle librerie	Raggruppamento manuale in pool
<b>Circa 2,5 ore</b>	<b>2 ore</b>	<b>0,5 ore</b>

### Azienda N

Preparazione delle librerie con flusso di lavoro Azienda N	Quantificazione e normalizzazione manuale delle librerie	Raggruppamento manuale in pool
<b>Circa 2,5 ore</b>	<b>2 ore</b>	<b>0,5 ore</b>

### Illumina DNA PCR-Free, sangue o saliva

Illumina Lysis Kit	Preparazione delle librerie mediante tagmentazione legata alle microsfere senza PCR	Raggruppamento in pool per volume
<b>Circa 1,5 ore</b>	<b>1,5 ore</b>	<b>0,5 ore</b>

### Illumina DNA PCR-Free, gDNA

Preparazione delle librerie mediante tagmentazione legata alle microsfere senza PCR	Raggruppamento in pool per volume
<b>1,5 ore</b>	<b>0,5 ore</b>

Figura 5: flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free. La durata totale del saggio per il flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free è rapida: 90 minuti dalla frammentazione o dalla tagmentazione fino alla pulizia della libreria. Dati in archivio, Illumina, Inc., 2019.

Nota: l'azienda N utilizza reagenti proprietari assieme agli adattatori Illumina.

Tabella 2: materiali di consumo per l'automazione per 96 campioni<sup>a</sup>

Metodo	Tipo di campione	Punti di contatto	Piastre a 96 campioni	Punte	Durata
TruSeq DNA PCR-Free	gDNA	20	20	5.504	10 ore 10 min
Azienda K	gDNA	13	19	4.076	6 ore 21 min
Azienda N	gDNA	13	17	3.266	5 ore 42 min
Illumina DNA PCR-Free (+quantificazione qPCR facoltativa dei pool)	sangue, saliva	2 (6)	10 (12)	2.016 (2.072)	2 ore 32 min (4 ore 7 min)
Illumina DNA PCR-Free (+quantificazione qPCR facoltativa dei pool)	gDNA	2 (6)	8 (10)	1.604 (1.660)	1 ora 32 min (3 ore 7 min)

a. Adattato utilizzando il software Hamilton per Hamilton Star con testata a 96 core + sistema di gestione dei liquidi a 8 canali. La qPCR è inclusa nel modello per l'automazione per tutti i flussi di lavoro campione per campione. I flussi di lavoro diversi da Illumina DNA PCR-Free presumono che ogni campione sia misurato, regolato e raggruppato in pool in base alla qPCR. Il raggruppamento in pool dei campioni si basa su quattro pool di 24 campioni. Dati in archivio, Illumina, Inc., 2019. Nota: l'azienda N utilizza reagenti proprietari assieme agli adattatori Illumina.

Poiché tutte le librerie senza PCR vengono di solito quantificate mediante qPCR, Illumina DNA PCR-Free elimina o riduce in modo significativo la quantità di qPCR coinvolta nel protocollo complessivo di preparazione delle librerie (ad esempio, amplificazione delle librerie mediante PCR e quantificazione dopo la preparazione delle librerie). Un modello di costi aggiuntivi, inclusi i reagenti qPCR, la strumentazione da laboratorio, i reagenti di quantificazione, le punte e i kit di estrazione di terze parti, rivela che il flusso di lavoro di Illumina DNA PCR-Free consente di risparmiare notevolmente.<sup>5</sup> Ad esempio, i costi aggiuntivi possono rappresentare circa il 56% dei costi totali per il flusso di lavoro TruSeq PCR-Free o circa il 44% per i kit senza PCR basati su enzimi della concorrenza.<sup>‡</sup> Per il flusso di lavoro Illumina DNA PCR-Free, i costi aggiuntivi sono circa il 21%, con una riduzione sostanziale rispetto ad altri kit di preparazione delle librerie.<sup>†</sup>

† Per questo calcolo, i costi dei kit di preparazione delle librerie sono gli stessi. I costi aggiuntivi variano e sono calcolati come proporzione del costo totale in base ai presupposti del flusso di lavoro (Tabella 2).

## Riepilogo

Illumina DNA PCR-Free offre una combinazione univoca di vantaggi grazie alle fasi della chimica di tagmentazione su microsfere e senza PCR. La tagmentazione su microsfere supporta la normalizzazione basata su microsfere, il facile raggruppamento in pool delle librerie in base al volume e l'eliminazione delle fasi di quantificazione prima e dopo la preparazione delle librerie. Il flusso di lavoro senza PCR semplifica e riduce la durata complessiva del flusso di lavoro fornendo al contempo elevata uniformità di copertura su regioni del genoma ripetitive o non omogenee. Grazie a Flex Lysis Reagent Kit integrato, il flusso di lavoro è compatibile con input di campione non elaborato come sangue, saliva, gocce di sangue secco. Per le applicazioni sensibili come WGS umano, assemblaggio *de novo* di genomi microbici o identificazione di varianti tumore-normale, Illumina DNA PCR-Free offre dati sulla copertura uniforme eccezionali, di facile utilizzo e altamente accurati.

## Maggiori informazioni

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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

## Bibliografia

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) Pubblicato nel 2020. Consultato il 1° settembre 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. Pubblicato il 1° ottobre 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) Pubblicato nel 2013. Consultato il 31 gennaio 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. Dati in archivio. Illumina, Inc., 2019.



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

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

M-GL-00679 ITA v2.0