

Kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera™

Un flujo de trabajo rápido e integrado para una amplia variedad de aplicaciones, desde la secuenciación del genoma humano completo hasta amplicones, plásmidos y especies microbianas.

Puntos destacados

- Rápido flujo de trabajo de preparación de bibliotecas**
 Ahorre tiempo y reduzca los puntos de contacto que precisan de participación activa con el proceso de tagmentación en bolas, que disminuye el tiempo total de preparación de bibliotecas a menos de tres horas.
- Entrada de muestras integrada**
 Aumente la eficacia de la preparación de bibliotecas con los protocolos de extracción de ADN integrados para sangre, saliva y gotas de sangre seca.
- Flujo de trabajo flexible con un amplio rango de entrada de ADN**
 Simplifique las operaciones diarias con un kit que funciona con un amplio rango de cantidad de entrada de ADN (entre 1 y 500 ng), varios tipos de entrada de ADN y genomas desde pequeños hasta grandes.
- Amplia gama de aplicaciones**
 Secuencie genomas humanos u otros genomas grandes o complejos, así como amplicones y series microbianas, parasitarias o fúngicas.
- Rendimiento optimizado de preparación de bibliotecas**
 Consiga fragmentos de tamaño homogéneo y alta uniformidad de cobertura independientemente del nivel de experiencia de usuario.

Introducción

Aunque los avances en la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) han acelerado el ritmo de la investigación genómica, numerosos laboratorios siguen experimentando cuellos de botella durante la fase de preparación de bibliotecas del flujo de trabajo de NGS. Muchos laboratorios en los que hacen falta varios pasos previos y posteriores a la preparación de bibliotecas tienen que lidiar con retrasos significativos en el proceso de secuenciación. Entre los pasos previos a la preparación de bibliotecas se incluyen la extracción, la cuantificación y la fragmentación del ADN, mientras que las evaluaciones de calidad, la cuantificación y la normalización de las bibliotecas constituyen pasos posteriores a dicha preparación.

Con los kits de preparación de bibliotecas de ADN Nextera se introdujeron los procesos químicos de tagmentación, que combinaban los pasos de fragmentación de ADN y de ligadura de adaptadores en una única reacción de 15 minutos, con lo que se redujo el tiempo de preparación de bibliotecas a 90 minutos.¹ Con el lanzamiento de los kits de preparación de bibliotecas de ADN Nextera XT, dejó de ser necesario cuantificar las bibliotecas antes de

agruparlas y secuenciarlas.² Ya está aquí la última revolución en los procesos químicos de preparación de bibliotecas de Illumina: el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera. El exclusivo proceso químico del kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera (figura 1 y tabla 1) integra los pasos de extracción y fragmentación de ADN y los de preparación y normalización de bibliotecas, para ofrecer los flujos de trabajo más rápidos y flexibles de la gama de soluciones de preparación de bibliotecas de Illumina (figura 2 y tabla 2).

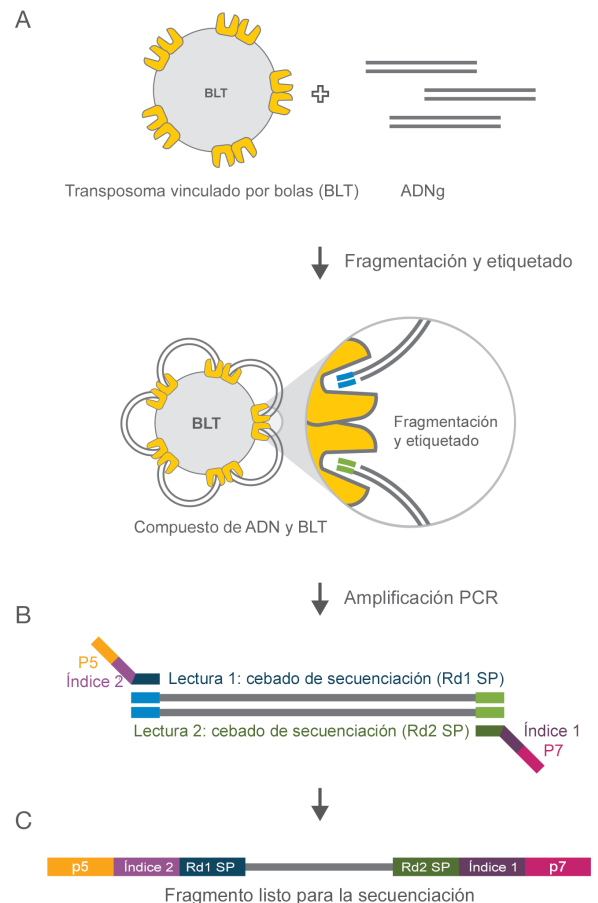


Figura 1: Procesos químicos de transposomas vinculados por bolas Nextera. (A) Los transposomas vinculados por bolas actúan como mediadores entre la fragmentación simultánea de ADNng y la adición de cebadores de secuenciación de Illumina. (B) La PCR de ciclo reducido amplifica los fragmentos de ADN listos para la secuenciación y añade índices y adaptadores. (C) Los fragmentos listos para la secuenciación se lavan y se agrupan.

Tabla 1: Especificaciones de la preparación flexible de bibliotecas de ADN Nextera

	Kit flexible de ADN Nextera
Tipo de entrada de ADN	ADNg, sangre, saliva, amplicones de PCR, plásmidos y gotas de sangre seca
Cantidad de ADN de entrada necesaria	1-500 ng para genomas pequeños 100-500 ng para genomas grandes
Multiplexado de muestras	24 índices individuales y 96 índices dobles
Sistemas de secuenciación compatibles	Todos los sistemas de Illumina
Duración total del flujo de trabajo de preparación de bibliotecas (ADNg) ^a	De 3 a 4 horas

a. Se incluyen los pasos de extracción de ADN, preparación de bibliotecas, y normalización y agrupación de bibliotecas.

Además de ofrecer un flujo de trabajo rápido, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera proporciona una extraordinaria flexibilidad en cuanto a los tipos y cantidades de entrada, y permite aplicaciones muy variadas.

Desde la secuenciación del genoma humano completo (WGS) hasta pequeños plásmidos microbianos, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera ofrece una cobertura uniforme del genoma con la precisión demostrada de los procesos químicos de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina.³

Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas rápido y flexible

El kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera incluye varias características que se combinan para ofrecer el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas más rápido de la gama de soluciones de Illumina. Una ventaja importante de los procesos químicos de este kit es el proceso de tagmentación en bolas, en el que 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 se pueden realizar más procesos de tagmentación, lo que permite que el proceso de normalización por saturación sea extremadamente uniforme. Esta estrategia ofrece varias ventajas significativas:

- En el caso de entradas de ADN con cantidades de 100 a 500 ng, no es preciso llevar a cabo una cuantificación exacta de la muestra de ADN inicial. El tamaño del fragmento de ADN no se ve afectado por la cantidad de entrada de ADN dentro de este rango, lo que ahorra tiempo y evita los costes asociados a los incómodos procesos de cuantificación.
- El proceso de tagmentación en bolas suprime la necesidad de llevar a cabo pasos independientes de fragmentación del ADN con medios mecánicos o enzimáticos, lo que ahorra tiempo y evita los costes asociados a los instrumentos de recorte o kits enzimáticos.
- En el caso de las entradas de ADN de 100 a 500 ng, el proceso de tagmentación en bolas deriva en una normalización de ADN por saturación, por lo que ya no son necesarios los lentos procesos de cuantificación y normalización de bibliotecas individuales antes de la agrupación.

Además, el flujo de trabajo, fácil de usar, está diseñado para reducir el número de pasos para los que hace falta participación activa y admitir sistemas de manipulación de líquidos para automatizar la preparación de bibliotecas. Estos avances se combinan para producir un flujo de trabajo con el mínimo número de pasos y la duración total más corta de la gama de soluciones de Illumina (figura 2).

Nanomuestras TruSeq™

Extracción de ADN	Cuantificación de ADN	Fragmentación de ADN	Preparación de bibliotecas con ligadura de adaptadores y marcado de índices	Cuantificación de bibliotecas	Normalización y agrupación manuales	TWT de ~11 horas
1 h	0,5 h	1 h	6 h	0,5 h	2 h	

Nextera XT

Extracción de ADN	Cuantificación de ADN	Preparación de bibliotecas con fragmentación y etiquetado Nextera	Normalización y agrupación basadas en bolas	TWT de ~5,5 horas
1 h	0,5 h	2,5 h	1,5 h	

Kit flexible de ADN Nextera

Extracción de ADN	Cuantificación de ADN	Preparación de bibliotecas con fragmentación y etiquetado, y normalización integrada Nextera	TWT de ~4 horas
1 h	0,5 h	2,5 h	

Kit flexible de ADN Nextera (sangre y saliva)

Kit flexible de lisis	Preparación de bibliotecas sin cuantificación, con fragmentación y etiquetado, y normalización integrada Nextera	TWT de ~3 horas
0,5 h	2,5 h	

Figura 2: El kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera ofrece el flujo de trabajo más rápido de Illumina. Los cálculos se han realizado suponiendo que se procesaron 16 muestras a la vez con una pipeta multicanal. TWT = duración total del flujo de trabajo, desde la extracción de ADN hasta la normalización y agrupación de bibliotecas. La duración de los pasos del flujo de trabajo se calculó dando por sentado que se emplearon los siguientes métodos específicos: extracción de ADN (minikit de ADN QIAamp o kit flexible de lisis), cuantificación de ADN (Qubit), fragmentación de ADN (Covaris), y normalización y agrupación de bibliotecas manuales (bioanizador). El tiempo puede variar dependiendo del equipo empleado, el número de muestras procesadas, los procesos de automatización o la experiencia del usuario. Los pasos del flujo de trabajo de color gris no se incluyen en los kits de preparación de bibliotecas.

Tabla 2: Comparación de flujos de trabajo de preparación de Illumina

	TruSeq Nano	Nextera XT	ADN flexible Nextera ^{a,b}
Protocolo de lisis de ADN integrado	—	—	✓
Rango de entrada de ADN amplio y flexible	—	—	✓
Normalización de bibliotecas incluida	—	✓	✓
Cantidad de ADN de entrada necesaria	100-200 ng	1 ng	1-500 ng
Tiempo total de preparación de bibliotecas ^c	11 horas	5 horas	De 3 a 4 horas
Tamaño de fragmento	350 pb o 550 pb	< 300	300-350 pb
Multiplexado de muestras	96 índices dobles	384 índices dobles	24 índices individuales y 96 índices dobles

- a. Protocolos integrados de extracción de ADN disponibles para muestras de sangre, saliva y gotas de sangre seca.
- b. La normalización de las bibliotecas se produce con cantidades de entrada de ADN iguales o superiores a 100 ng.
- c. El tiempo total de preparación de bibliotecas incluye la extracción de ADN y la preparación, la normalización y la agrupación de bibliotecas.

Entrada de ADN integrada

Gracias a los kits flexibles de preparación de bibliotecas de ADN y a los kits flexibles de reactivos de lisis Nextera, es posible extraer ADN directamente a partir de las muestras de saliva o sangre recién extraída. Los kits opcionales flexibles de lisis de ADN Nextera se han optimizado y validado para la preparación flexible de bibliotecas de ADN Nextera, y los pasos del flujo de trabajo, los reactivos y las instrucciones de la guía del usuario se encuentran completamente integrados para lograr la máxima eficiencia. Los protocolos de lisis se llevan a cabo con cómodos reactivos basados en bolas, necesitan menos de 30 minutos de participación activa y se integran directamente en la reacción del proceso de tagmentación del kit flexible de ADN Nextera.

Rendimiento optimizado de preparación de bibliotecas

Las propiedades del proceso de tagmentación en bolas han hecho posible importantes mejoras en el rendimiento de la preparación de bibliotecas. El kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera produce fragmentos con un tamaño extremadamente uniforme y homogéneo (300-350 pb) en un amplio rango de entrada de ADN (1 500 ng), como se puede ver en la figura 3. Dado que el proceso de tagmentación en bolas permite generar fragmentos de tamaño uniforme en un amplio rango de entrada, se ha suprimido la necesidad de optimizar con cautela la relación entre transposomas y ADN como forma de controlar la longitud de los fragmentos. Asimismo, el amplio rango de entrada de ADN favorece la flexibilidad en los experimentos con diversos tipos de muestras, incluidas las muestras de gran valor. Además de la uniformidad en el tamaño de los fragmentos, el proceso de tagmentación en bolas ofrece bibliotecas con un rendimiento también uniforme y homogéneo en un amplio rango de cantidad de entrada de ADN (100-500 ng), como

se puede ver en la figura 4. Cuando la cantidad de entrada de ADN es de 100 ng o de un tamaño aproximado, las bolas se saturan, por lo que el rendimiento se normaliza y uniformiza. De esta manera, se elimina la necesidad de llevar a cabo los lentos pasos de cuantificación y normalización de bibliotecas antes de la agrupación. Al comparar el rendimiento del kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera y del kit de preparación de bibliotecas con nanomuestras de ADN TruSeq, se observó que el primero produjo resultados comparables a la fragmentación mecánica (o mejores, en el caso de determinadas mediciones), como se puede ver en la tabla 3.

Más allá de las mejoras en el flujo de trabajo que favorece la tecnología basada en bolas, la ventaja más significativa de tener tamaños de fragmento y rendimiento de bibliotecas homogéneos y uniformes es que la cobertura del genoma humano y del de especies no humanas es más regular y uniforme (figura 5). Los genomas uniformes con alto o bajo contenido de GC muestran una cobertura extraordinariamente coherente sin tendencia específica de ninguna zona (figura 5B).

Tabla 3: Rendimiento de la preparación flexible de bibliotecas de ADN Nextera

Parámetro ^a	Kit flexible de ADN Nextera	Nanomuestras TruSeq
Lecturas "paired-end" que superan el filtro	3,7 × 10 ⁸	3,7 × 10 ⁸
Capacidad de realizar llamadas de autosomas	96,5 %	96,9 %
Capacidad de realizar llamadas de exones de autosomas	98,4 %	98,4 %
Cobertura de autosomas > 10x	98,5 %	98,6 %
Recuperación de SNV	98,7 %	98,7 %
Precisión de SNV	99,8 %	99,7 %
Recuperación de inserciones y deleciones	93,7 %	92,9 %
Precisión de inserciones y deleciones	97,0 %	94,9 %

a. El análisis se realizó con 20 muestras (todas ellas NA12878 Corriell), en cinco experimentos, con estructuras de genoma humano de aproximadamente 30x. Los datos se analizaron aplicando la [secuenciación de genoma completo v. 6.0.0](#) y la [herramienta de evaluación de llamadas de variantes v. 3.0.0](#) de las aplicaciones de BaseSpace. SNV = variante de nucleótido único.

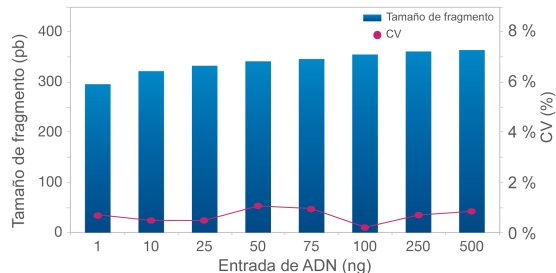


Figura 3: Tamaños de fragmento uniformes y homogéneos. El proceso de tagmentación en bolas ofrece fragmentos de tamaño homogéneo independientemente de la cantidad de entrada de ADN. Con cantidades de entrada de ADN de 1-500 ng, el coeficiente de variación (CV) total es del 6,09 %. Las bibliotecas producidas con *E. coli* duplican las muestras con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera. Experimento realizado en MiSeq™ System (de 2 × 76 pb).

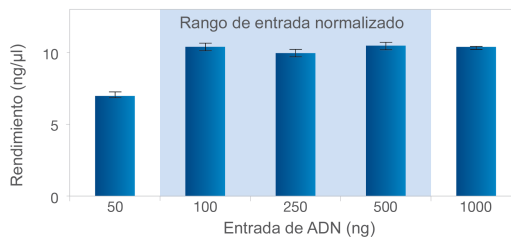


Figura 4: Bibliotecas fragmentadas por tagmentación y normalizadas. Las bolas se saturan con 100 ng o más, lo que normaliza el rendimiento del ADN fragmentado por tagmentación. La normalización del ADN fragmentado por tagmentación suprime la necesidad de llevar a cabo los pasos posteriores de normalización de bibliotecas. Bibliotecas producidas con muestras Human-NA12878 (Coriell Institute) con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera. Experimento realizado en MiSeq System (de 2 × 76 pb).

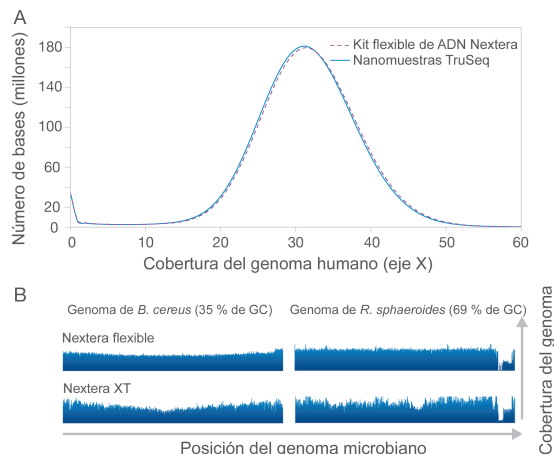


Figura 5: El kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera aumenta la uniformidad de la cobertura. (A) El kit Nextera ofrece una cobertura uniforme del genoma que se asemeja a la del kit de nanomuestras de ADN TruSeq. Bibliotecas producidas con muestras Human-NA12878 (Coriell Institute) con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera o el kit de nanomuestras TruSeq. Secuenciación realizada en un sistema HiSeq X™ (de 2 × 151 pb). (B) Se muestra la cobertura para los microorganismos con contenido de GC extremadamente alto o bajo. Debido a la mejora de los procesos químicos de preparación de bibliotecas en bolas, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera muestra una cobertura más uniforme que la del kit Nextera XT. Las bibliotecas se prepararon con el kit Nextera XT o el kit flexible de ADN Nextera. Los datos se generaron con un sistema HiSeq™ 2500 (modo de experimento rápido v. 2, de 2 × 151 pb).

El flujo de trabajo flexible favorece una amplia gama de aplicaciones

Es posible que la mayor ventaja del kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera sea la flexibilidad que ofrece para una amplia gama de aplicaciones y campos de investigación de interés. Permite la secuenciación del genoma humano completo, la investigación genómica del cáncer, la metagenómica ambiental, la investigación de enfermedades infecciosas, la agrigenómica y mucho más (figura 6). Ya se realicen secuenciaciones de genomas grandes y complejos, genomas pequeños, plásmidos, amplicones, bacterias grampositivas o gramnegativas, hongos o distintas especies de animales y plantas, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera ofrece una cobertura genómica completa. El flujo de trabajo flexible y de uso sencillo para los usuarios se adapta a diversos niveles de experiencia, numerosas aplicaciones y diversos tipos de entrada de muestras.




	 Secuenciación del genoma humano completo	 Genomas grandes y complejos	 Genomas pequeños
Aplicaciones de secuenciación	<ul style="list-style-type: none"> Investigación genómica del cáncer Detección de variantes Estudios de riesgos genéticos Genética de poblaciones 	<ul style="list-style-type: none"> Agrigenómica (maíz, trigo, res vacuna, etc.) Organismos modelo (mosca de la fruta, ratón, pez cebra, etc.) Investigación de plantas y animales 	<ul style="list-style-type: none"> Microbioma humano Microbiología/metagenómica Investigación de salud pública Secuenciación de amplicones
Ejemplos de secuenciación	<ul style="list-style-type: none"> Genoma humano (3,2 Gb), 30×, kit S2, NovaSeq™, 8 muestras/celda de flujo Genoma humano (3,2 Gb), > 30×, kit v. 2.5, HiSeq X®, 8 muestras/celda de flujo 	<ul style="list-style-type: none"> Genoma de la mosca de la fruta (175 Mb), 30×, kit v. 2, NextSeq® 550 System, 22 muestras/celda de flujo Genoma del ratón (2,7 Gb), 30×, kit v.1, sistema HiSeq® 4000, 8 muestras/celda de flujo 	<ul style="list-style-type: none"> Genoma <i>E. coli</i> (4,6 Mb), 30×, sistema MiniSeq™, 50 muestras/celda de flujo Plásmidos o amplicones (650 kb), 1000×, MiSeq®, 11 muestras/celda de flujo

Figura 6: Amplia gama de aplicaciones con el kit flexible de ADN Nextera. El kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera se puede utilizar para una amplia gama de aplicaciones. Desde la secuenciación del genoma humano completo y genomas grandes y complejos, hasta la de pequeños genomas microbianos, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera ofrece flexibilidad en todos los experimentos.

Resumen

El kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera cuenta con un flujo de trabajo revolucionario que combina la extracción, la cuantificación y la fragmentación del ADN, así como la normalización de bibliotecas, para ofrecer el flujo de trabajo de preparación de bibliotecas más rápido y flexible de la gama de soluciones de Illumina. El flujo de trabajo, de uso sencillo y con posibilidad de automatización, es apto para usuarios de cualquier nivel de experiencia, además de ser común a varios diseños de experimento. Los procesos químicos de tagmentación en bolas admiten una amplia gama de cantidades de entrada de ADN, diversos tipos de muestras y muchas aplicaciones distintas, incluidas la secuenciación del genoma humano completo, la metagenómica ambiental, la investigación de plantas y animales, el establecimiento de perfiles tumorales y mucho más. No espere más para constatar de qué manera el innovador flujo de trabajo del kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera (combinado con la potencia de los procesos químicos de SBS de Illumina) puede llevarle más rápido a sus objetivos de investigación.

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera (24 muestras)	20018704
Kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera (96 muestras)	20018705
Kit flexible de reactivos de lisis	20018706
Índices CD de ADN Nextera (24 índices, 24 muestras)	20018707
Índices CD de ADN Nextera (96 índices, 96 muestras)	20018708

Índices CD: Índices dobles combinatorios. 24 índices dobles proporcionados para admitir hasta 24 muestras, o 96 índices dobles proporcionados para admitir hasta 96 muestras. **Índices individuales:** 24 índices individuales proporcionados para admitir hasta 96 muestras.

Información adicional

Para obtener más información acerca del kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera, visite www.illumina.com/nextera-dna-flex.

Para obtener más información acerca de la secuenciación del genoma humano completo con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera, lea la [nota de la aplicación de secuenciación del genoma humano completo con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera](#) (en inglés).

Para obtener más información acerca de la secuenciación de genomas microbianos con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera, lea la [nota de la aplicación de secuenciación del genoma microbiano completo con el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera](#) (en inglés).

Referencias

1. Illumina (2016). [Hoja de datos del kit de preparación de bibliotecas de ADN Nextera](#) (en inglés). Acceso: 10 de julio de 2017.
2. Illumina (2014). [Hoja de datos del kit de preparación de bibliotecas de ADN Nextera XT](#) (en inglés). Acceso: 10 de julio de 2017.
3. Bentley, D. R.; Balasubramanian, S.; Swerdlow, H. P.; et ál. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456:53-59.