

Nextera™ DNA Flex Library Preparation Kit

Un flusso di lavoro veloce e integrato per un'ampia gamma di applicazioni dal sequenziamento dell'intero genoma umano ad ampliconi, plasmidi e specie microbiche.

Punti principali

- Flusso di lavoro di preparazione delle librerie veloce**
 Grazie alla tagmentazione su microsfere si risparmiano tempo e interventi manuali, il che riduce la durata totale della preparazione delle librerie a meno di tre ore
- Input del campione integrato**
 Migliore efficienza della preparazione delle librerie grazie a protocolli di estrazione del DNA integrati per sangue, saliva e gocce di sangue secco
- Flusso di lavoro flessibile con un'ampia gamma di input di DNA**
 Semplificazione delle operazioni quotidiane con un kit che supporta un'ampia gamma di input di DNA (1-500 ng), diversi tipi di input di DNA e dimensioni del genoma da piccolo ad ampio
- Ampia gamma di applicazioni**
 Sequenziamento del genoma umano o di altri genomi ampi/complessi nonché ampliconi e specie microbiche, parassitarie o fungine
- Prestazioni ottimizzate della preparazione delle librerie**
 Dimensioni di inserti coerenti ed elevata uniformità di copertura indipendentemente dal livello di esperienza dell'utente

Introduzione

I progressi nel campo della tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) hanno accelerato il ritmo della ricerca genomica, tuttavia molti laboratori continuano ad avere difficoltà durante la fase di preparazione delle librerie del flusso di lavoro NGS. Poiché sono richieste diverse fasi prima e dopo la preparazione delle librerie, molti laboratori devono affrontare ritardi significativi prima di poter avviare il sequenziamento. Le fasi di preparazione delle librerie includono l'estrazione del DNA, la quantificazione e la frammentazione, mentre la fase dopo la preparazione delle librerie includono le valutazioni della qualità della libreria, la quantificazione delle librerie e la normalizzazione.

Nextera DNA Library Preparation Kit introduce la chimica di tagmentazione, che unisce le fasi di frammentazione del DNA e di ligazione degli adattatori in un'unica reazione di 15 minuti riducendo la durata della preparazione delle librerie a 90 minuti.¹

Grazie a Nextera XT DNA Library Prep Kit è stata eliminata la quantificazione delle librerie prima del raggruppamento in pool delle librerie e del sequenziamento.² È arrivata l'ultima rivoluzione nella chimica di preparazione delle librerie Illumina: Nextera DNA Flex Library Preparation Kit. La straordinaria chimica di Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (Figura 1, Tabella 1) integra le fasi di estrazione del DNA, frammentazione, preparazione delle librerie e normalizzazione delle librerie per fornire i flussi di lavoro più veloci e più flessibili nel portafoglio di preparazione delle librerie Illumina (Figura 2, Tabella 2).

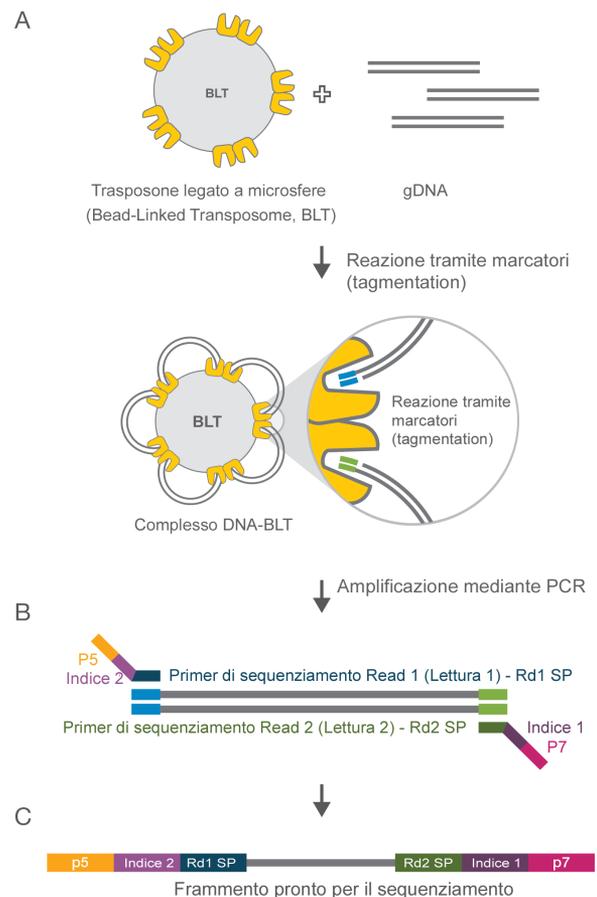


Figura 1: Chimica dei trasposoni legati alle microsfere Nextera: (A) i trasposoni legati alle microsfere mediano contemporaneamente la frammentazione del gDNA e l'aggiunta dei primer di sequenziamento Illumina; (B) cicli ridotti della PCR amplificano i frammenti di DNA pronti per il sequenziamento e l'aggiunta di indici e adattatori; (C) i frammenti pronti per il sequenziamento vengono lavati e raggruppati in pool.

Tabella 1: Specifiche di Nextera DNA Flex Library Prep Kit

	Nextera DNA Flex
Tipo di input di DNA	gDNA, sangue, saliva, ampliconi PCR, plasmidi, gocce di sangue secco
Input di DNA richiesto	1-500 ng, genoma piccolo 100-500 ng, genoma ampio
Multiplex campioni	24 indici singoli, 96 indici doppi
Sistemi di sequenziamento supportati	Tutti i sistemi Illumina
Durata totale del flusso di lavoro di preparazione delle librerie (gDNA)^a	3-4 ore

a. Include le fasi di estrazione del DNA, preparazione delle librerie e normalizzazione/raggruppamento in pool delle librerie

Oltre a fornire un flusso di lavoro veloce, Nextera DNA Flex Library Preparation Kit offre una straordinaria flessibilità per tipo di input, quantità di input e ampia gamma di applicazioni supportate. Dal sequenziamento dell'intero genoma umano (Human Whole-Genome Sequencing, WGS) a piccoli plasmidi microbici, Nextera DNA Flex Library Preparation Kit fornisce una copertura del genoma pari a quella offerta dalla chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina.³

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie veloce e flessibile

Nextera DNA Flex Library Preparation Kit presenta diverse caratteristiche per fornire il flusso di lavoro delle librerie più veloce all'interno del portafoglio Illumina. Uno dei principali miglioramenti nella chimica Nextera DNA Flex è rappresentato dalla tagmentazione su microsferi, che utilizza trasposoni legati alle microsferi per mediare una reazione di tagmentazione più uniforme rispetto alle reazioni di tagmentazione in soluzione.

Dopo la saturazione dei trasposoni legati alle microsferi con il DNA, non si verifica alcuna ulteriore tagmentazione, in questo modo il processo di normalizzazione basato sulla saturazione è altamente uniforme. Questa strategia fornisce diversi vantaggi significativi:

- Per gli input di DNA tra 100-500 ng, non è richiesta l'accurata quantificazione del campione di DNA iniziale. La dimensione degli inserti dei frammenti di DNA non incide sull'input di DNA entro questo intervallo, riducendo i tempi e i costi associati a complessi processi di quantificazione.
- Con la tagmentazione su microsferi non è più necessario separare le fasi di frammentazione meccanica o enzimatica del DNA, riducendo tempo e costi associati a strumenti per la frammentazione (shearing) o kit enzimatici.
- Per input di DNA tra 100-500 ng, la tagmentazione su microsferi permette una normalizzazione del DNA in base alla saturazione, il che elimina la necessità di lunghe e singole quantificazioni e normalizzazioni delle librerie prima del raggruppamento in pool.

Inoltre, il flusso di lavoro di facile utilizzo è progettato per ridurre il numero di fasi con interventi manuali e per supportare i sistemi di gestione dei liquidi per l'automazione della preparazione delle librerie. Tutti questi progressi forniscono un flusso di lavoro con il più basso numero di fasi e con la durata del flusso di lavoro più veloce nel portafoglio Illumina (Figura 2).

TruSeq™ Nano

Estrazione del DNA	Quant. DNA	Framm. DNA	Preparazione delle librerie con ligazione degli adattatori e marcatura degli indici	Quantificazione della libreria	Normalizzazione e raggruppamento in pool manuale	circa 11 ore TWT
1 ora	0,5 ore	1 ora	6 ore	0,5 ore	2 ore	

Nextera XT

Estrazione del DNA	Quant. DNA	Preparazione delle librerie mediante reazione tramite marcatori (tagmentation) Nextera	Normalizzazione e raggruppamento delle librerie basata su microsferi	circa 5,5 ore TWT
1 ora	0,5 ore	2,5 ore	1,5 ore	

Nextera DNA Flex

Estrazione del DNA	Quant. DNA	Preparazione delle librerie mediante reazione tramite marcatori (tagmentation) Nextera e normalizzazione integrata	circa 4 ore TWT
1 ora	0,5 ore	2,5 ore	

Nextera DNA Flex (sangue, saliva)

Flex Lysis Kit	Preparazione delle librerie senza quantificazione mediante reazione tramite marcatori (tagmentation) Nextera e normalizzazione integrata	circa 3 ore TWT
0,5 ore	2,5 ore	

Figura 2: Nextera DNA Flex fornisce il flusso di lavoro più veloce Illumina: i calcoli presumono 16 campioni elaborati nello stesso momento con un pipetta multicanale. TWT = durata totale del flusso di lavoro dall'estrazione del DNA alla normalizzazione e al raggruppamento in pool delle librerie. Le durate delle fasi del flusso di lavoro sono state calcolate presumendo metodi specifici: estrazione del DNA (QIAamp DNA Mini Kit o Flex Lysis Kit), quantificazione del DNA (Qubit), frammentazione del DNA (Covaris) e normalizzazione e raggruppamento in pool delle librerie manuali (Bioanalyzer). Le durate possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni analizzati, alle procedure automatizzate e all'esperienza dell'utente. Le fasi del flusso di lavoro colorate in grigio non sono incluse nei kit di preparazione delle librerie.

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

Tabella 2: Confronto dei flussi di lavoro di preparazione delle librerie Illumina

	TruSeq Nano	Nextera XT	Nextera DNA Flex ^{a,b}
Lisi del DNA integrata inclusa	—	—	✓
Ampia gamma di input di DNA flessibile	—	—	✓
Normalizzazione delle librerie inclusa	—	✓	✓
Input di DNA richiesto	100-200 ng	1 ng	1-500 ng
Durata totale della preparazione delle librerie ^c	11 ore	5 ore	3-4 ore
Dimensione inserto	350 bp o 550 bp	< 300	300-350 bp
Multiplex campioni	96 indici doppi	384 indici doppi	24 indici singoli, 96 indici doppi

a. Sono disponibili protocolli di estrazione del DNA integrati per sangue, saliva e campioni di gocce di sangue secco (Dry Blood Spot, DBS).

b. La normalizzazione delle librerie si verifica con ≥ 100 ng di input di DNA.

c. La durata totale della preparazione delle librerie include le fasi di estrazione del DNA, preparazione delle librerie e normalizzazione/raggruppamento in pool delle librerie.

Input di DNA integrato

Grazie a Nextera DNA Flex Library Preparation Kit e Flex Lysis Reagent Kit, l'estrazione del DNA può essere eseguita direttamente da campioni di sangue fresco o saliva. Il kit facoltativo Nextera DNA Flex Lysis Kit è stato ottimizzato e convalidato per la preparazione delle librerie Nextera DNA Flex e le fasi del flusso di lavoro, i reagenti e le istruzioni contenute nella guida per l'utente sono completamente integrate per garantire la massima efficienza. I protocolli per la lisi vengono eseguiti con comodi reagenti basati su microsfere che richiedono 30 minuti di interventi manuali e si integrano direttamente nella reazione di tagmentazione Nextera DNA Flex.

Prestazioni ottimizzate della preparazione delle librerie

Le proprietà della tagmentazione su microsfere hanno significativamente migliorato le prestazioni della preparazione delle librerie. Nextera DNA Flex Library Preparation Kit genera dimensioni di inserti estremamente uniformi e coerenti (300-350 bp), su un'ampia gamma di input di DNA (1-500 ng) (Figura 3). Poiché la tagmentazione su microsfere genera dimensioni di inserti uniformi su un'ampia gamma di input, non è più necessaria l'attenta ottimizzazione del rapporto trasposone:DNA per controllare la lunghezza del frammento. Inoltre, la flessibilità offerta dall'ampia gamma di input di DNA consente di eseguire esperimenti con diversi tipi di campioni, inclusi i campioni preziosi. Oltre alle dimensioni di inserti uniformi, la tagmentazione su microsfere fornisce una resa delle librerie uniforme e coerente su un'ampia gamma di input di DNA (100-500 ng) (Figura 4). A input di DNA pari o prossimi a 100 ng, avviene la saturazione delle microsfere, che fornisce rese normalizzate e coerenti, eliminando la necessità di lunghe fasi di quantificazione e normalizzazione delle librerie prima del raggruppamento in pool. In un confronto sulle prestazioni tra Nextera DNA Flex e TruSeq Nano DNA Library Prep Kit, Nextera DNA Flex Library Preparation Kit ha generato più risultati paragonabili o, per determinate metriche, migliori rispetto alla frammentazione meccanica (Tabella 3).

Oltre ai miglioramenti nel flusso di lavoro supportato dalla tecnologia basata su microsfere, il vantaggio più significativo delle dimensioni di inserti e di rese delle librerie coerenti e uniformi è una copertura ancora più uniforme e omogenea sul genoma sia per specie umana che non umana (Figura 5). Anche i genomi con contenuto in GC elevato o basso mostrano una straordinaria copertura omogenea senza distorsioni delle regioni specifiche (Figura 5B).

Tabella 3: Prestazioni di Nextera DNA Flex Library Prep Kit

Parametro ^a	Nextera DNA Flex	TruSeq Nano
Lecture paired-end che attraversano il filtro	$3,7 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
Identificazioni autosomiche	96,5%	96,9%
Identificazioni autosomiche di esoni	98,4%	98,4%
Copertura autosomica > 10x	98,5%	98,6%
Identificazione ripetuta di SNV	98,7%	98,7%
Precisione SNV	99,8%	99,7%
Identificazione ripetuta delle Indel	93,7%	92,9%
Precisione delle Indel	97,0%	94,9%

a. L'analisi è stata eseguita su 20 campioni (tutti i campioni NA12878 Coriell), su cinque corse, per il build del genoma umano di circa 30x. L'analisi dei dati è stata eseguita mediante le applicazioni BaseSpace [Whole Genome Sequencing v6.0.0](#) e [Variant Calling Assessment Tool v3.0.0](#). SNV = variante di singolo nucleotide, Indel = variante inserzione-delezione.

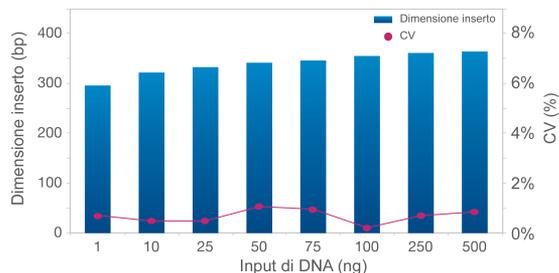


Figura 3: Dimensioni di inserti uniforme e coerenti: la tagmentazione su microsferi fornisce dimensioni di inserti coerenti indipendentemente dalla quantità di input di DNA. Da 1-500 ng di input di DNA, il coefficiente di variazione complessivo (Coefficient Of Variance, CV) è di 6,09%. Le librerie sono state generate con campioni replicati di *E. coli* utilizzando Nextera DNA Flex Kit. La corsa è stata eseguita su un sistema MiSeq™ (corsa da 2 × 76 bp).

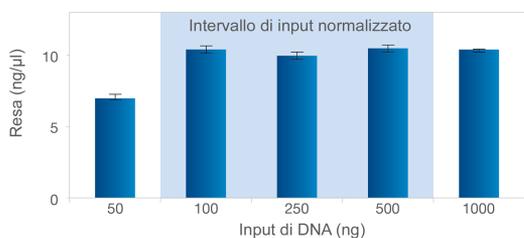


Figura 4: Librerie frammentate per tagmentazione e normalizzate: le microsferi pari o superiori a 100 ng vengono saturate fornendo una resa normalizzata di DNA frammentato per tagmentazione. La normalizzazione del DNA frammentato per tagmentazione elimina le fasi di normalizzazione delle librerie a valle. Le librerie sono state generate con i campioni Human-NA12878 (Coriell Institute) utilizzando Nextera DNA Flex Kit. La corsa è stata eseguita su un sistema MiSeq (2 × 76 bp).

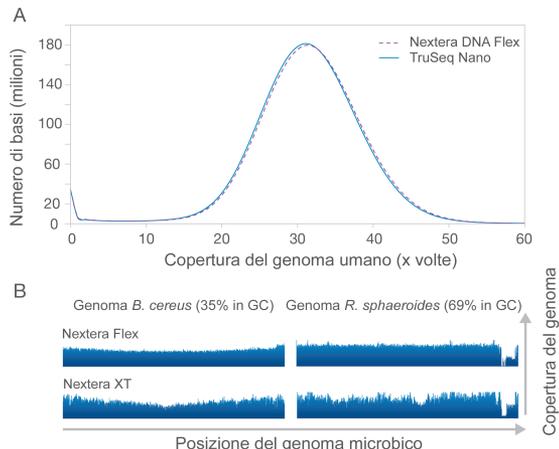


Figura 5: Nextera DNA Flex migliora l'uniformità di copertura: (A) Nextera DNA Flex Kit fornisce una copertura uniforme sul genoma paragonabile a quella di TruSeq Nano DNA Kit. Le librerie sono state generate con i campioni Human-NA12878 (Coriell Institute) utilizzando Nextera DNA Flex Kit o TruSeq Nano Kit. Il sequenziamento è stato eseguito su un sistema HiSeq X™ (2 × 151 bp); (B) la copertura è mostrata per microorganismi che presentano contenuto in GC estremamente elevato o basso. Grazie alla migliorata chimica di preparazione delle librerie su microsferi, Nextera DNA Flex mostra una copertura più uniforme rispetto a Nextera XT. Le librerie sono state preparate con Nextera XT Kit o Nextera DNA Flex Kit. I dati sono stati generati su un sistema HiSeq™ 2500 (Rapid Run v2, 2 × 151 bp).

	 WGS umano	 Genomi complessi, ampi	 Genoma piccolo
Applicazioni di sequenziamento	<ul style="list-style-type: none"> Ricerca per genomica del cancro Rilevamento delle varianti Studi sul rischio genetico Genetica della popolazione 	<ul style="list-style-type: none"> Agrigenomica (granoturco, frumento, bovino, ecc.) Organismi modello (mosca della frutta, ratto, danio rerio, ecc.) Ricerca su piante/animali 	<ul style="list-style-type: none"> Microbioma umano Microbiologia/metagenomica Ricerca sulla salute pubblica Sequenziamento di ampliconi
Esempi di sequenziamento	<ul style="list-style-type: none"> Genoma umano (3,2 Gb), 30x, S2 Kit, NovaSeq™, 8 campioni/cella a flusso Genoma umano (3,2 Gb), > 30x, v2.5 HiSeq X®, 8 campioni/cella a flusso 	<ul style="list-style-type: none"> Genoma della mosca della frutta (175 Mb), 30x, v2 Kit, sistema NextSeq® 550, 22 campioni/cella a flusso Genoma del ratto (2,7 Gb), 30x, v1 Kit, sistema HiSeq® 4000, 8 campioni/cella a flusso 	<ul style="list-style-type: none"> Genoma <i>E. coli</i> (4,6 Mb), 30x, sistema MiniSeq™, 50 campioni/cella a flusso Plasmidi/ampliconi (650 kb), 1000x, MiSeq®, 11 campioni/cella a flusso

Figura 6: Ampia gamma di applicazioni con Nextera DNA Flex: Nextera DNA Flex Library Preparation Kit può essere utilizzato per supportare un'ampia gamma di applicazioni. Dal sequenziamento WGS umano e genomi ampi/complessi a piccoli genomi microbici, Nextera DNA Flex Library Preparation Kit offre un'ottima flessibilità sperimentale.

Flusso di lavoro flessibile per un'ampia gamma di applicazioni

Il più grande vantaggio di Nextera DNA Flex Library Preparation Kit è forse rappresentato dalla flessibilità offerta per un'ampia gamma di interessi e applicazioni di ricerca. Il kit supporta il sequenziamento WGS umano, la ricerca per genomica del cancro, metagenomica ambientale, ricerca su malattie infettive, agrigenomica e altro (Figura 6). Sia che si tratti del sequenziamento di genomi complessi e ampi o di genomi piccoli, plasmidi, ampliconi, batteri gram positivi/gram negativi, funghi o una gamma di specie vegetale o animale, Nextera DNA Flex Library Preparation Kit fornisce una copertura genomica completa. Il flusso di lavoro flessibile e di facile utilizzo si può adattare a utenti con diversi livelli di esperienza, diverse applicazioni e diversi tipi di input di campione.

Riepilogo

Nextera DNA Flex Library Preparation Kit fornisce un flusso di lavoro rivoluzionario che combina estrazione del DNA, quantificazione, frammentazione e normalizzazione delle librerie per offrire il flusso di lavoro più veloce e flessibile nel portafoglio Illumina. Il flusso di lavoro di facile utilizzo e compatibile con l'automazione supporta utenti con tutti i livelli di esperienza fornendo un flusso di lavoro comune per diverse progettazioni sperimentali. La chimica di tagmentazione su microsferi supporta un'ampia gamma di quantità di input di DNA, diversi tipi di campioni e una vasta gamma di applicazioni, inclusi il sequenziamento WGS umano, la metagenomica ambientale, la ricerca su vegetali e animali, il profilo del tumore e altro. Scoprite come oggi il flusso di lavoro innovativo Nextera DNA Flex Library Prep combinato con la straordinaria chimica SBS Illumina è in grado di far progredire e accelerare gli obiettivi della vostra ricerca.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (24 campioni)	20018704
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (96 campioni)	20018705
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
Nextera DNA CD Indexes (24 indici, 24 campioni)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (96 indici, 96 campioni)	20018708

Indici CD: indici doppi combinatori. 24 indici doppi per supportare fino a 24 campioni o 96 indici doppi per supportare fino a 96 campioni. **Indici singoli:** 24 indici singoli per supportare fino a 96 campioni.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su Nextera DNA Flex Library Prep Kit, visitate la pagina Web www.illumina.com/nextera-dna-flex.

Per maggiori informazioni sul sequenziamento WGS umano con Nextera DNA Flex Library Prep Kit, leggete la nota sulle applicazioni [Human WGS with Nextera DNA Flex Application Note](#) (Nota sulle applicazioni per il sequenziamento WGS umano con Nextera DNA Flex).

Per maggiori informazioni sul sequenziamento del genoma microbico con Nextera DNA Flex Library Prep Kit leggete la nota sulle applicazioni [Microbial WGS with Nextera DNA Flex Application Note](#) (Nota sulle applicazioni per il sequenziamento del genoma microbico con Nextera DNA Flex).

Bibliografia

1. Illumina (2016). [Scheda delle specifiche per Nextera DNA Library Preparation Kit](#). Consultata il 10 luglio 2017.
2. Illumina (2014). [Scheda delle specifiche per Nextera XT DNA Library Preparation Kit](#). Consultata il 10 luglio 2017.
3. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456:53-59.