

# TruSeq™ DNA PCR-Free

Preparazione semplice e ottimizzata delle librerie di sequenziamento dell'intero genoma che offre una copertura accurata e completa di genomi complessi.

## Punti principali

- **Preparazione delle librerie ottimizzata**  
Il protocollo PCR-Free velocizza il flusso di lavoro di preparazione delle librerie TruSeq DNA
- **Qualità di copertura eccellente**  
Distorsioni delle librerie molto basse e meno vuoti di copertura consentono una panoramica approfondita sul genoma
- **Elevata flessibilità**  
I flussi di lavoro PCR-Free ottimizzati supportano varie lunghezze di lettura e applicazioni
- **Soluzione completa**  
La soluzione affidabile include reagenti Master Mix, microsferi per la selezione della dimensione e fino a 96 doppi indici univoci (unique dual index, UDI)

## Introduzione

TruSeq DNA PCR-Free fornisce numerosi miglioramenti del flusso di lavoro TruSeq DNA ampiamente adottato e permette una preparazione delle librerie ottimizzata per le applicazioni di sequenziamento dell'intero genoma (WGS). Eliminando le fasi di amplificazione mediante PCR, il protocollo PCR-Free riduce in modo significativo le tipiche distorsioni indotte dalla PCR e fornisce informazioni dettagliate sulla sequenza per regioni del genoma tradizionalmente difficili. Sono disponibili protocolli a bassa processività (low-throughput, LT) e a elevata processività (high-throughput, HT) per una vasta gamma di progettazioni di studi (Figura 1).

## Preparazione delle librerie velocizzata

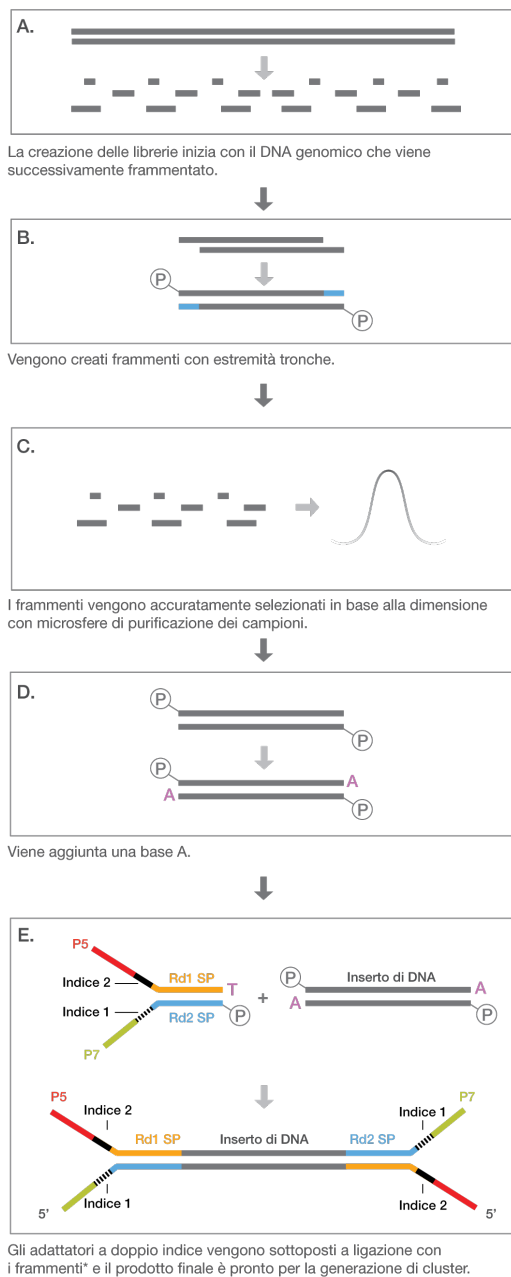
Il flusso di lavoro per la preparazione delle librerie TruSeq DNA è stato ulteriormente ottimizzato eliminando la fase di amplificazione mediante PCR e sostituendo la selezione della dimensione a base di gel con la selezione a base di microsferi (Figura 2). Questo flusso di lavoro offre una flessibilità eccezionale grazie a due opzioni di protocollo per generare dimensioni di inserti ampie (550 bp) o piccole (350 bp) e supportare una gamma di applicazioni diversificate. Reagenti Master Mix, microsferi di purificazione dei campioni forniti per la pulizia e la selezione della dimensione, indici TruSeq robusti e protocolli ottimizzati contribuiscono a un flusso di lavoro ottimizzato per la preparazione delle librerie, con fasi di pulizia ridotte per l'elaborazione di un ampio numero di campioni. TruSeq DNA PCR-Free riduce il tempo di preparazione delle librerie, permettendo ai ricercatori di eseguire applicazioni che spaziano dal sequenziamento di microbi a quello dell'intero genoma (whole-genome sequencing, WGS) umano.



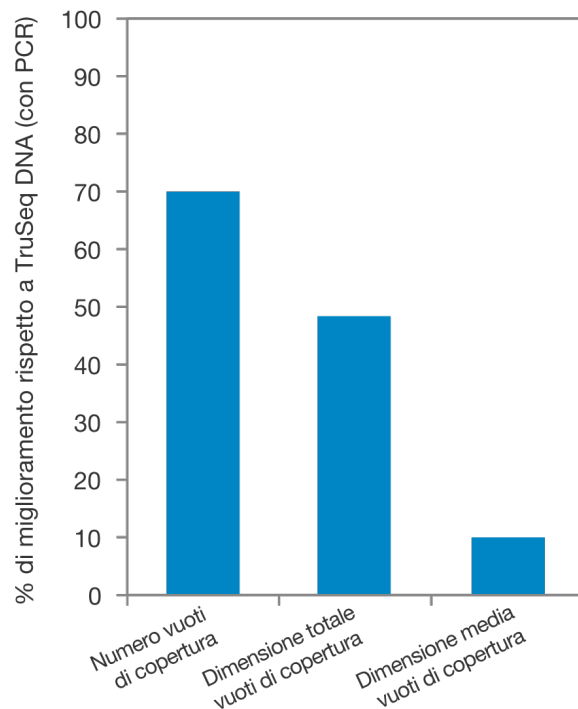
**Figura 1: TruSeq DNA PCR-Free:** TruSeq DNA PCR-Free offre una soluzione efficiente per la preparazione e l'indicizzazione delle librerie di campioni. TruSeq DNA PCR-Free supporta fino a 24 indici per studi a bassa processività oppure fino a 96 indici doppi o 96 doppi indici univoci (venduti separatamente) per studi a elevata processività.

## Chimica innovativa per la preparazione delle librerie

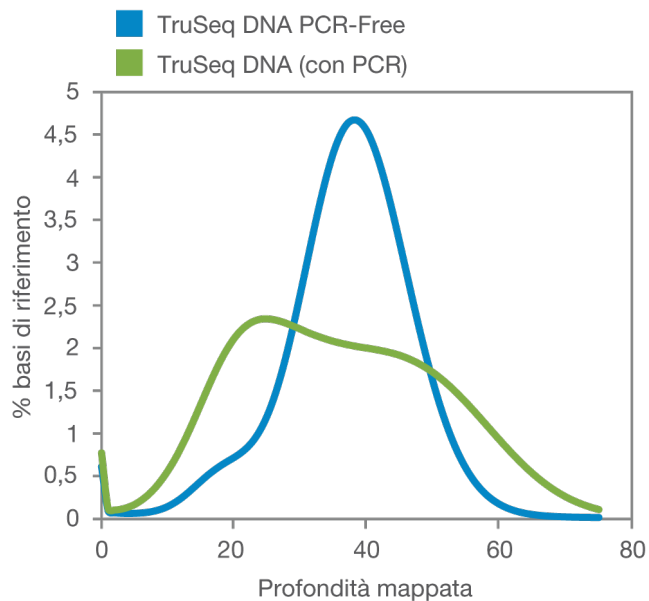
TruSeq DNA PCR-Free può essere utilizzato per preparare librerie di DNA per il sequenziamento unidirezionale, paired-end e con indicizzazione. TruSeq DNA PCR-Free supporta la frammentazione (shearing) mediante l'ultrasonificazione Covaris, che richiede 1 µg di DNA input per una dimensione di inserto media di 350 bp o 2 µg di DNA per una dimensione di inserto media di 550 bp. La creazione delle librerie inizia con DNA genomico (genomic DNA, gDNA) frammentato (Figura 2A). I frammenti di DNA con estremità tronche sono generati utilizzando una combinazione di reazioni di riempimento e di attività esonucleasica (Figura 2B) e la selezione della dimensione viene eseguita con le microsferi per la purificazione dei campioni fornite (Figura 2C). Viene quindi aggiunta una base A alle estremità tronche di ciascun filamento, per prepararle per la ligazione agli adattatori indicizzati (Figura 2D). Ciascun adattatore contiene una sporgenza della base T per sottoporre a ligazione l'adattatore con il frammento di DNA con tailing A. Questi adattatori contengono un complemento completo di siti di ibridazione dei primer di sequenziamento per letture unidirezionali, paired-end e con indicizzazione. Senza la necessità di ulteriore amplificazione mediante PCR, gli adattatori a singolo o doppio indice sono sottoposti a ligazione con i frammenti e i prodotti sono pronti per la generazione di cluster (Figura 2E).



**Figura 2: Flusso di lavoro TruSeq DNA PCR-Free:** il flusso di lavoro TruSeq DNA PCR-Free include la ligazione degli adattatori che genera prodotti pronti per il sequenziatore senza amplificazione mediante PCR. \*La soluzione di indicizzazione TruSeq DNA PCR-Free LT include un adattatore a singolo indice nella Fase E.



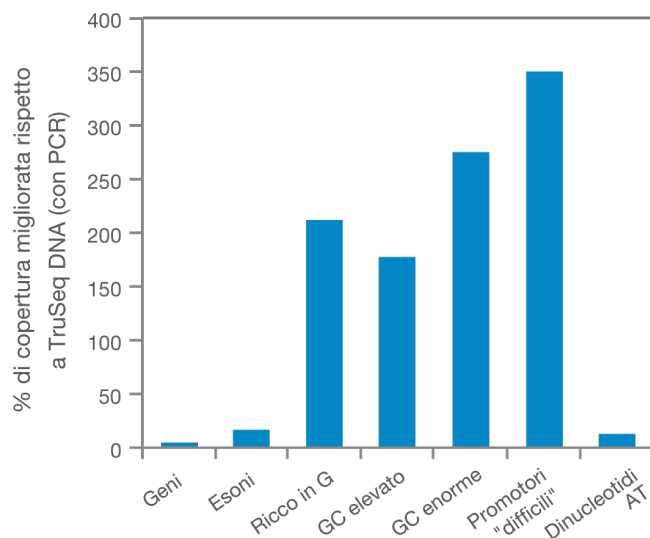
**Figura 3: Vuoti di copertura minori:** le librerie TruSeq DNA PCR-Free mostrano una riduzione significativa nel numero e nella dimensione totale di vuoti di copertura rispetto alle librerie preparate utilizzando il protocollo TruSeq DNA (con PCR). Un vuoto di copertura viene definito come una regione di  $\geq 10$  bp in lunghezza, in cui non può essere determinato un genotipo accurato a causa di bassa profondità, bassi punteggi di allineamento e bassa qualità della base.



**Figura 4: Uniformità di copertura maggiore:** le librerie TruSeq DNA PCR-Free forniscono uniformità di copertura maggiore sul genoma rispetto alle librerie generate utilizzando il protocollo TruSeq DNA (con PCR).

## Qualità di copertura eccellente

TruSeq DNA PCR-Free riduce il numero e la dimensione media dei tipici vuoti di copertura indotti dalla PCR (Figura 3), fornendo dati di qualità eccellente. L'eliminazione dell'amplificazione mediante PCR dal flusso di lavoro TruSeq DNA PCR-Free riduce le distorsioni delle librerie e migliora l'uniformità della copertura nel genoma (Figura 4). Questo flusso di lavoro fornisce inoltre una copertura eccellente di contenuto genomico tradizionalmente difficile, comprese regioni ricche in GC, promotori e regioni ripetitive (Figura 5). L'elevata qualità dei dati fornisce risoluzione di coppie di basi, offre un quadro dettagliato di mutazioni somatiche o *de novo* e supporta l'identificazione accurata di varianti causative. TruSeq DNA PCR-Free fornisce una panoramica completa del genoma, comprese regioni codificanti, regolatorie e introniche, per permettere ai ricercatori di accedere a un numero maggiore di informazioni ottenute da ciascuna corsa di sequenziamento (Figura 6).



**Figura 5: Copertura incrementata di regioni difficili:** le librerie TruSeq DNA PCR-Free dimostrano una copertura migliorata di contenuto genomico difficile. Queste regioni includono esoni e geni noti codificanti e non codificanti le proteine umane, definiti nel monitoraggio dei geni RefSeq nel browser genomico dell'UCSC. Le regioni ricche in G indicano 30 basi con  $\geq 80\%$  di G. Le regioni con GC elevato sono definite come 100 basi con  $\geq 75\%$  di contenuto GC. Le regioni con GC enorme sono definite come 100 basi con  $\geq 85\%$  di contenuto GC. I promotori "difficili" indicano il set di 100 regioni del promotore coperte in modo insufficiente, che sono state definite empiricamente dal Broad Institute of MIT and Harvard. I dinucleotidi AT indicano 30 basi di dinucleotidi AT ripetuti.

## Multiplex campioni efficiente

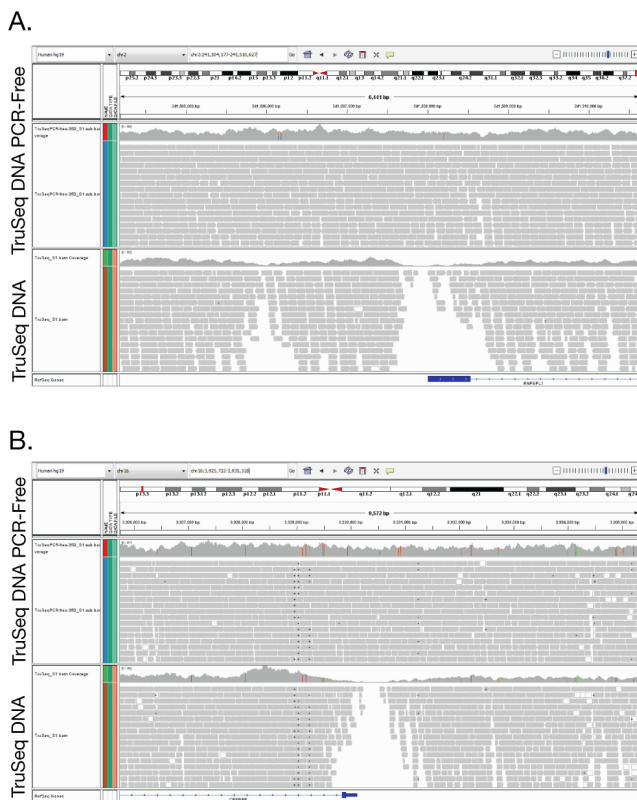
Grazie a una procedura semplice senza PCR, gli indici sono aggiunti ai frammenti dei campioni di gDNA per fornire una soluzione innovativa per il multiplex campioni. Per ottenere la più elevata efficienza operativa, è possibile sottoporre a pooling fino a 96 campioni, univocamente indicizzati già posizionati su piastra, e sequenziarli assieme sulla corsia di una singola cella a flusso di qualsiasi piattaforma di sequenziamento Illumina. Dopo il sequenziamento, gli indici sono utilizzati per il demultiplex dei dati e per assegnare accuratamente le letture ai campioni corretti nel pool. TruSeq DNA PCR-Free può utilizzare una strategia di indicizzazione singola o doppia che impieghi una combinazione univoca di due indici per il demultiplex. Gli adattatori con doppi indici univoci (unique dual index, UDI) (disponibili separatamente) sono stati sviluppati grazie a una collaborazione tra Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e Illumina e impiegano coppie univoche per il demultiplex.

TruSeq DNA Single Indexes contiene fino a 24 indici con due set di 12 indici ciascuno, mentre TruSeq DNA CD Indexes contiene 96 indici. Gli studi multicampione possono essere gestiti comodamente usando Experiment Manager Illumina, un software gratuito che permette la facile impostazione delle reazioni per elaborazioni basate su piastra. Questo software permette ai ricercatori di configurare il foglio campioni con indice (vale a dire, matrice multiplex campioni) per la corsa sullo strumento, permettendo il demultiplex automatico.



Per maggiori informazioni su Illumina Experiment Manager, visitate la pagina Web

[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: TruSeq DNA PCR-Free riduce il numero di vuoti di copertura:** la maggiore copertura di librerie TruSeq DNA PCR-Free determina meno vuoti di copertura, com'è dimostrato qui nelle regioni codificanti ricche in GC del promotore (A) *RINPEPL1* e del promotore (B) *CREBBP*. Le informazioni della sequenza generate mediante TruSeq DNA PCR-Free sono indicate nei pannelli superiori di (A) e (B), mentre i dati della sequenza generati utilizzando il protocollo TruSeq DNA sono riportati nei pannelli inferiori.

## Preparazione delle librerie flessibile e completa

La famiglia di soluzioni per la preparazione delle librerie TruSeq offre diverse alternative per le applicazioni di sequenziamento, compatibili con le varie esigenze di ricerca e progettazione di studi (Tabella 1). Tutti i prodotti TruSeq supportano studi a elevata processività e a bassa processività. Questi flussi di lavoro offrono numerosi miglioramenti rispetto al metodo di preparazione delle librerie TruSeq DNA, grazie a varie applicazioni di sequenziamento. I reagenti per la preparazione delle librerie e gli indici di sequenziamento sono ora offerti separatamente per consentire ai ricercatori di adattare i flussi di lavoro alle proprie esigenze sperimentali.

## Soluzione ottimizzata

TruSeq DNA PCR-Free contiene reagenti per la preparazione delle librerie, microsferi per la purificazione dei campioni e indici robusti TruSeq per il multiplex, fornendo un metodo di preparazione completo e ottimizzato per ottenere prestazioni elevate su tutte le piattaforme di sequenziamento Illumina. TruSeq DNA PCR-Free offre la flessibilità di due opzioni, 24 campioni e 96 campioni, per una progettazione sperimentale scalabile. Grazie a un protocollo ottimizzato e opzioni di multiplex flessibili, TruSeq DNA PCR-Free offre un metodo per la preparazione delle librerie ottimizzato che fornisce dati di sequenziamento di qualità elevata.

Tabella 1: Preparazione delle librerie TruSeq DNA

Specifiche	TruSeq DNA Nano	TruSeq DNA PCR-Free	TruSeq DNA
Descrizione	Basato sulla preparazione delle librerie TruSeq ampiamente adottata, con input più basso e qualità dei dati migliorata	Copertura del genoma eccellente con distorsioni e vuoti di copertura delle librerie radicalmente ridotti	Metodo originale di preparazione delle librerie TruSeq per il sequenziamento di nuova generazione
Quantità di input	100-200 ng	1-2 µg	1 µg
Include la PCR	Sì	No	Sì
Tempo del saggio	circa 6 ore	circa 5 ore	1-2 giorni
Durata interventi manuali	circa 5 ore	circa 4 ore	circa 8 ore
Dimensione dell'inserito target	350 bp o 550 bp	350 bp o 550 bp	300 bp
Senza gel	Sì	Sì	No
Numero di campioni supportati	24 (LT) o 96 (HT) <sup>a</sup>	24 (LT) o 96 (HT) <sup>a</sup>	48 (LT) o 96 (HT) <sup>a</sup>
Supporta l'arricchimento	No <sup>b</sup>	No <sup>b</sup>	Sì
Microsfere per la selezione della dimensione	Incluse	Incluse	Non incluse
Applicazioni	WGS, incluso risequenziamento dell'intero genoma, assemblaggio <i>de novo</i> e studi di metagenomica		
Multiplex campioni	24 indici singoli, 96 doppi indici combinatori, 24 e 96 doppi indici univoci (UDI)		
Compatibile con i sistemi di sequenziamento Illumina	Sistemi HiSeq™, HiScanSQ™, Genome Analyzer, MiSeq™ e MiniSeq™		

a. LT, low-throughput (processività bassa); HT, high-throughput (processività elevata).

b. I prodotti Nextera™ Rapid Capture supportano varie applicazioni di arricchimento. Per maggiori informazioni, visitate la pagina Web [www.illumina.com/NRC](http://www.illumina.com/NRC).

## Riepilogo

TruSeq DNA PCR-Free ottimizza il flusso di lavoro TruSeq per fornire un metodo ottimizzato per la preparazione delle librerie per qualsiasi applicazione di sequenziamento. Le opzioni di processività elevata e di processività bassa assieme alle diverse dimensioni di inserito forniscono una maggiore flessibilità per supportare diverse applicazioni e studi genomici. Le innovazioni del flusso di lavoro riducono le distorsioni indotte dalla PCR facilitando una panoramica dettagliata e accurata del genoma. Grazie a un flusso di lavoro più veloce e alla qualità dei dati migliorata, TruSeq DNA PCR-Free fornisce un metodo di preparazione dei campioni completo per le applicazioni di sequenziamento del genoma.

## Maggiori informazioni

Per maggior informazioni su TruSeq DNA PCR-Free, visitate la pagina Web [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)

## Bibliografia

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](http://genome.ucsc.edu). Accessed July 2013.
4. The Broad Institute of MIT and Harvard. [www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org). Accessed July 2013.

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep 24 campioni	20015962
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep 96 campioni	20015963
TruSeq DNA Single Indexes Set A	20015960
TruSeq DNA Single Indexes Set B	20015961
TruSeq DNA CD Indexes	20015949
IDT per Illumina–TruSeq DNA UD Indexes (24 indici, 96 campioni)	20020590
IDT per Illumina–TruSeq DNA UD Indexes (96 indici, 96 campioni)	20022370

Illumina, Inc. • Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) • Tel. +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2017 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. e dei rispettivi proprietari. Per specifiche informazioni sui marchi, consultate [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pub. No. 770-2013-001-D-ITA QB #

**illumina**®