Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit

El flujo de trabajo de preparación de muestras más rápido y sencillo para genomas pequeños, amplicones de PCR y plásmidos.

Características destacadas

- **Rápida preparación de muestras**
  Preparación de muestras completa en tan solo 90 minutos con un tiempo de participación activa de tan solo 15 minutos.
- **Obtención de resultados más rápida**
  Pase del ADN a los datos en ocho horas con el sistema MiSeq®.
- **Optimización para genomas pequeños, amplicones de PCR y plásmidos**
  Un kit de preparación de muestras para muchas aplicaciones.
- **Normalización de muestras innovadora**
  Evita tener que realizar la cuantificación de la biblioteca antes de agrupar y secuenciar muestras.

Introducción

Nextera XT DNA Sample Preparation Kit permite a los investigadores preparar bibliotecas listas para la secuenciación de genomas pequeños (bacterias, arqueas y virus), amplicones de PCR y plásmidos en 90 minutos con un tiempo de participación activa de tan solo 15 minutos. La combinación del sistema MiSeq y Nextera XT DNA Sample Preparation Kit le permite pasar de ADN a datos en ocho horas (Figura 1). La poca cantidad (1 ng) de entrada de ADN hace de este un método flexible para las muestras valiosas disponibles en cantidades limitadas. La preparación de muestras de Nextera, compatible con todos los secuenciadores de Illumina, puede acortar el tiempo global del flujo de trabajo de secuenciación para una amplia variedad de aplicaciones establecidas,[1-9] así como automatizarse fácilmente para disfrutar de un mayor rendimiento.

El flujo de preparación de muestras más rápido y sencillo

El ADN de la muestra se fragmenta y etiqueta simultáneamente con los adaptadores mediante una única reacción enzimática de marcado. Un protocolo de PCR optimizado y limitado por ciclo amplía el ADN etiquetado y añade índices de secuencias (Figura 1). De principio a fin, el completo protocolo de Nextera XT resulta un 80 % más rápido que otros métodos de preparación de muestras disponibles y requiere una cantidad mínima de tiempo de participación activa.

Normalización de muestras innovadora

Los kits de preparación de muestras permiten obtener resultados de secuenciación de última generación en bibliotecas de diversas concentraciones. Para agrupar las muestras de forma equitativa y lograr las densidades de grupos objetivo, suele recurrirse a métodos de cuantificación que requieren mucho tiempo, seguidos de diluciones y agrupamientos de muestras con código de barras. Nextera XT DNA Sample Preparation Kit evita tener que realizar la cuantificación de la biblioteca antes de agrupar y secuenciar muestras mediante una única fase de normalización de muestras basada en bolas (Figura 2). Las bibliotecas preparadas se generan en concentraciones equivalentes, lo que permite realizar el agrupamiento por volúmenes; para ello, tan solo es necesario agrupar 5 µl de cada biblioteca que se vaya a secuenciar.

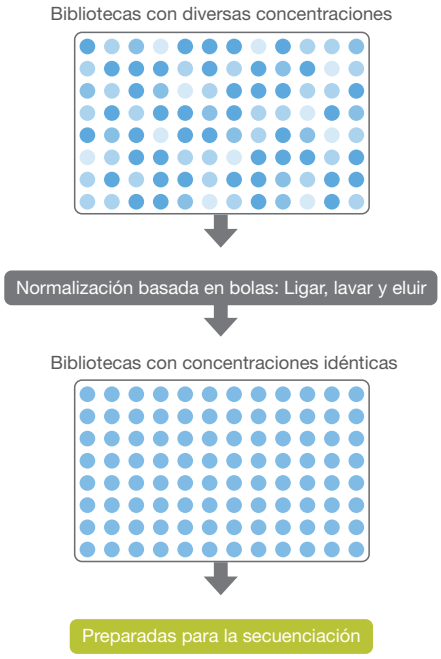
Multiplexado flexible

Nextera XT Sample Preparation Kit incluye una innovadora solución de indexado para procesar y aplicar códigos de barras de forma exclusiva a hasta 384 muestras en un solo experimento. Tras añadir los dos índices en cada fragmento de ADN, pueden agruparse y secuenciarse conjuntamente hasta 384 muestras indexadas. Tras la secuenciación, se emplea la combinación única de los dos índices

Figura 1. Flujo de trabajo de preparación de muestras de Nextera XT

La combinación de Nextera XT y la secuenciación rápida con el sistema MiSeq brindan un flujo de trabajo de ADN a datos completo en tan solo ocho horas.

Figura 2. Normalización de muestras innovadora



Nextera XT Sample Preparation Kit evita tener que realizar la cuantificación de la biblioteca antes de agrupar y secuenciar muestras. Las bibliotecas de concentraciones equivalentes se crean mediante un sistema de normalización de muestras basado en bolas cuyo uso consiste simplemente en el pipeteo de 5 µl de cada biblioteca que se vaya a secuenciar.

para demultiplexar los datos y asignar lecturas a la muestra pertinente. Con este enfoque de doble código de barras, Nextera XT Index Kit tan solo precisa 40 oligonucleótidos de índice únicos para procesar hasta 384 muestras para obtener un enfoque redimensionable. Los estudios con varias muestras pueden administrarse cómodamente con Illumina Experiment Manager, una herramienta de software disponible de forma gratuita que proporciona una sencilla configuración de reacciones para el procesamiento basado en placas.

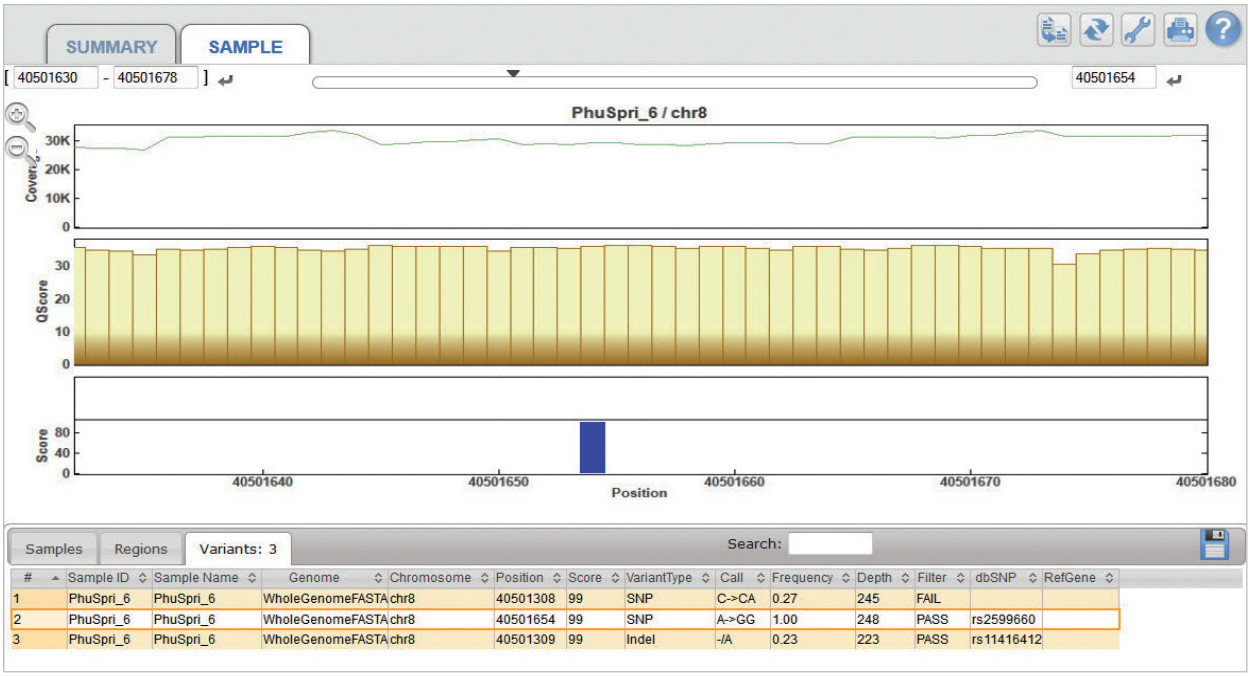
Interfaz de usuario sencilla para análisis

MiSeq Reporter proporciona un análisis automatizado integrado en el instrumento para numerosas aplicaciones, como el pequeño genoma *de novo* o la resecuenciación, el amplicón de PCR y la secuenciación de plásmidos. Los resultados de secuenciación y análisis pueden verse e interpretarse fácilmente. Por ejemplo, con el flujo de trabajo del amplicón de PCR en el software MiSeq Reporter, los datos de secuencias pueden categorizarse automáticamente en fichas intuitivas: Samples (Muestras), Regions (Regiones) y Variants (Variantes) (Figura 3). En cada una de estas fichas, pueden determinarse la puntuación de la variante, la de calidad (indicada con una Q) y los niveles de cobertura de la secuenciación en bases únicas, lo que posibilita un análisis sencillo de las variantes de interés.

Elevada cobertura y llamadas precisas

Con el fin de demostrar el potencial de la secuenciación de amplicones que ofrecen Nextera XT y el sistema MiSeq, se prepararon nueve amplicones de PCR de diversos tamaños procedentes de dos muestras de ADN humano. Se agruparon los amplicones de cada muestra y se preparó 1 ng de ADN de cada grupo mediante el kit Nextera XT. Se combinaron las bibliotecas de los dos grupos

Figura 3. Flujo de trabajo de amplicón de PCR en MiSeq Reporter



#	Sample ID	Sample Name	Genome	Chromosome	Position	Score	VariantType	Call	Frequency	Depth	Filter	dbSNP	RefGene
1	PhuSpri_6	PhuSpri_6	WholeGenomeFASTA	chr8	40501308	99	SNP	C->CA	0.27	245	FAIL		
2	PhuSpri_6	PhuSpri_6	WholeGenomeFASTA	chr8	40501654	99	SNP	A->GG	1.00	248	PASS	rs2599660	
3	PhuSpri_6	PhuSpri_6	WholeGenomeFASTA	chr8	40501309	99	Indel	-/A	0.23	223	PASS	rs11416412	

MiSeq Reporter ofrece un análisis automatizado integrado en el instrumento para diversas aplicaciones, como el amplicón de PCR que aquí se muestra. Es posible acceder a las muestras, regiones y variantes fácilmente, mientras que la puntuación de esta última, la de calidad y el diagrama de cobertura se muestran en una resolución con un único nucleótido.

Tabla 1. Cobertura de amplicón y variantes llamadas

Longitud del amplicón (bp)	Cobertura media (miles de lecturas)	Variantes llamadas (SNV/Indels)
953	15,1	4 SNV
1083	27,4	4 SNV
1099	22,1	1 SNV
1800	22,4	7 SNV
1809	17,8	1 SNV
2166	17,6	7 SNV
3064	12,5	4 SNV
3064	13,3	1 SNV
3072	14 800	1 SNV + 1 indel

de muestras, se secuenciaron con 150 lecturas "paired-end" cada uno en el sistema MiSeq y se analizaron con MiSeq Reporter. Los valores de cobertura de secuenciación medios aproximados por amplicón y el número de variantes llamadas (puntuación de variantes superior a 99) que se identificaron en el amplicón en una de las dos muestras aparecen en la Tabla 1. El resultado del sistema MiSeq admitió la secuenciación de estos amplicones con una profundidad de más de 12 000×, lo cual posibilita la llamada segura de variantes. Del total de 31 variantes denominadas en este ejemplo, el 94 % se han confirmado con la base de datos de dbSNP. Estos resultados muestran que la cobertura es elevada y pareja en diversos tamaños de amplicones, así como que las llamadas de variantes son precisas.

Cobertura pareja en amplicones grandes

Los amplicones grandes (más de 1 kb) que generan las PCR de rango largo se pueden preparar fácilmente con el kit Nextera XT, así como secuenciar con cualquier secuenciador de Illumina. En la Figura 4, la cobertura a lo largo de la longitud del amplicón y la posición de las variantes llamadas se muestra para un solo amplicón de 5,1 kb en una región no codificadora y muy variable del genoma humano. El amplicón de 5,1 kb formaba parte de un grupo de 24 procedentes de ADN humano cuyo tamaño oscilaba aproximadamente entre 300 bp y 10 kb. Los grupos de amplicones se generaron a partir de cinco muestras diferentes y las bibliotecas de Nextera XT se crearon mediante 1 ng de ADN de cada grupo. Las bibliotecas se combinaron, y se realizó una secuenciación de una única lectura con un ciclo de 150 bp en MiSeq que se analizó mediante MiSeq Reporter con el flujo de trabajo del amplicón de PCR.

Figura 4. Cobertura de amplicones de gran tamaño

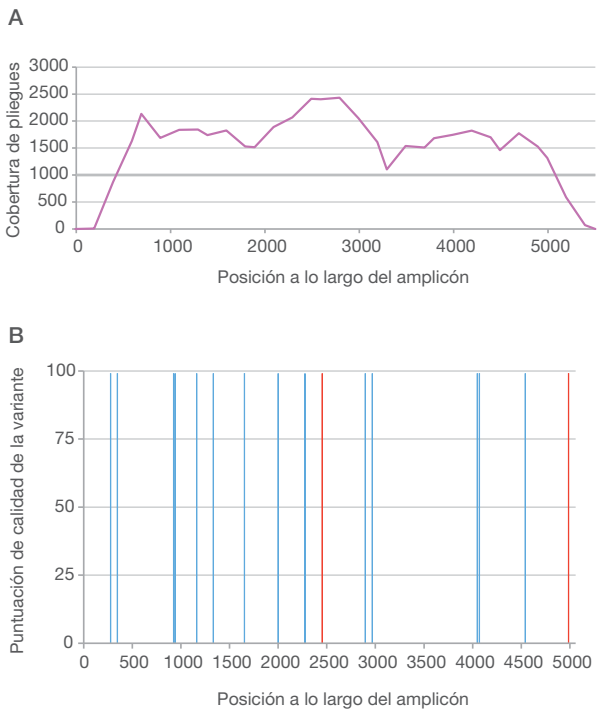


Gráfico A: Cobertura de secuenciación de alto rendimiento (más de 1000×) en un amplicón de 5,1 kb
Gráfico B: En el mismo amplicón, se muestra la posición de 16 variantes que superan el filtro (14 SNV en azul y 2 indels en rojo), incluidas en el gráfico de acuerdo con la puntuación de la variante (una medición calculada con el algoritmo Phred de la precisión de la llamada de la variante; valor máximo = 99).
De las 16 variantes, 13 se encuentran en dbSNP.

Tabla 2. Ensamblaje *de novo* de *E. coli*

Parámetro	Valor
Porcentaje del genoma cubierto	98 %
Número de cóntigos	314
Longitud de cóntigo máxima	221 108
Recuento de bases	4 548 900
N50	111 546
Cobertura media por base	184,9

Ensamblaje de novo de pequeños genomas

Con el fin de demostrar cuán útil resulta Nextera XT a la hora de preparar genomas microbianos, se preparó 1 ng de ADN genómico de la cepa de referencia MG1655 de *Escherichia coli* mediante el kit Nextera XT y se secuenció utilizando dos lecturas "paired-end" de 150 bp en el sistema MiSeq System. Los datos se analizaron con el flujo de trabajo Assembly (Conjunto) de MiSeq Reporter. El tiempo total de análisis posterior al experimento de esta muestra fue de 28 minutos. Las métricas del conjunto se muestran en la Tabla 2. Se obtuvo un conjunto de gran calidad con excelentes coberturas y puntuaciones N50. El conjunto de datos está disponible para su análisis en el entorno informático basado en la nube BaseSpace®, de Illumina.[10]

Resumen

Nextera XT DNA Sample Preparation Kit resulta idóneo para experimentos en los que priman la velocidad y la sencillez. Nextera XT DNA Sample Preparation Kit proporciona el flujo de trabajo de preparación de muestras más rápido y sencillo, y permite secuenciar con rapidez genomas pequeños, amplicones de PCR y plásmidos. Junto con los sistemas MiSeq y NextSeq™, Nextera XT DNA Sample Preparation Kit le permite pasar del ADN a los datos en tan solo un día.

Referencias

1. Loman N, Misra RJ, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE et ál. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nature Biotechnology, 22 de abril.
2. Gertz J, Varley KE, Davis NS, Baas BJ, Goryshin IY et ál. (2012) Transposase mediated construction of RNA-Seq libraries. Genome Research 22(1): 134–41.
3. Parkinson NJ, Maslau S, Ferneyhough B, Zhang G, Gregory L et ál. (2012) Preparation of high-quality next-generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA. Genome Research 22(1): 125–33.
4. Toprak E, Veres A, Michel J-B, Chait R, Hartl D et ál. (2012) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nature Genetics 1 (44): 101–106.
5. Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, Tan PL, Tai AK et ál. (2011) A rare penetrant mutation in *CFH* confers high risk of age-related macular degeneration. Nature Genetics 43 (12): 1176–7.
6. Depledge DP, Palser AL, Watson SJ, Lai I Y-C, Gray E et ál. (2011) Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. PLoS One 6(11): e27805.
7. Lieberman TD, Michel J-B , Aingaran M, Potter-Bynoe G, Roux D et ál. (2011) Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. Nature Genetics 43 (12): 1275–80.
8. Young TS y Walsh CT (2011) Identification of the thiazolyl peptide GE37468 gene cluster from *Streptomyces* ATCC 55365 and heterologous expression in *Streptomyces lividans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, EE. UU. 108 (32): 13053–8.
9. Adey A, Morrison HG, Asan, Xun X, Kitzman JO, Turner EH et ál. (2010) Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density *in vitro* transposition. Genome Biology 2010; 11 (12): R119.
10. basespace.illumina.com

Especificaciones de Nextera XT DNA Sample Prep Kit

Especificación	Valor
Tipo de entrada de ADN de muestra	ADN genómico, amplicones de PCR y plásmidos
Entrada de ADN	1 ng
Tamaño de inserción medio habitual	Menos de 300 bp
Índices disponibles	Hasta 384
Secuenciadores compatibles	Sistemas MiSeq, NextSeq y HiSeq®
Longitudes de lectura compatibles	Compatible con todas las longitudes de lectura de cualquier sistema de secuenciación de Illumina

Datos del pedido

Producto	N.° catálogo
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (24 muestras)	FC-131-1024
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 muestras)	FC-131-1096
Nextera XT Index Kit (24 índices y 96 muestras)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit (96 índices y 384 muestras)	FC-131-1002
TruSeq® Dual Index Sequencing Primer Kit, lectura única (kit de un solo uso)*	FC-121-1003
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Kit, lectura "paired-end" (kit de un solo uso)*	PE-121-1003
Nextera XT Index Kit v2, conjunto A (96 índices y 384 muestras)	FC-131-2001
Nextera XT Index Kit v2, conjunto B (96 índices y 384 muestras)	FC-131-2002
Nextera XT Index Kit v2, conjunto C (96 índices y 384 muestras)	FC-131-2003
Nextera XT Index Kit v2, conjunto D (96 índices y 384 muestras)	FC-131-2004

* Se requieren los kits de cebadores de secuenciación para todos los secuenciadores, salvo el sistema MiSeq.

Illumina • 1.800.809.4566 (llamada gratuita, EE. UU.) • Tel.: +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN

© 2012–2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.
Illumina, BaseSpace, HiSeq, MiSeq, Nextera, NextSeq, TruSeq, el color naranja calabaza y el diseño de las bases de streaming de Genetic Energy son marcas comerciales o marcas registradas de Illumina, Inc. en EE. UU. o en otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños.
Pub. n.° 770-2012-011_ESP Actualizada por última vez el 07 Abril 2014

illumina®