

# TruSeq™ DNA Exome

Una solución rentable para la preparación de bibliotecas y el enriquecimiento de exomas con una precisión líder del sector.

## Puntos destacados

- Calidad de datos TruSeq comprobada**  
 La fragmentación mecánica y el proceso químico de enriquecimiento de TruSeq proporcionan una cobertura uniforme y  $\geq 80\%$  de lecturas de secuenciación sobre objetivos.
- Secuenciación de exomas rentable**  
 La agrupación de bibliotecas de enriquecimiento previo y una cobertura óptima proporcionan una secuenciación de exomas económica.
- Resultados precisos y fiables**  
 El análisis de datos, que se efectúa con unas pocas pulsaciones de botones, identifica variantes de exones de forma fiable.
- Solución con un flujo de trabajo integral**  
 El flujo de trabajo exhaustivo simplifica la secuenciación de exomas desde la preparación de bibliotecas hasta el análisis de datos.

## Introducción

La secuenciación de exomas ha ido adquiriendo reconocimiento entre la comunidad científica como método potente para descubrir posibles variantes causantes de enfermedades de origen genético.<sup>1-3</sup> El TruSeq DNA Exome representa una solución de secuenciación económica que permite a los investigadores secuenciar más exomas en cada estudio y acelerar la investigación. El kit combina la tecnología probada TruSeq con una precisión excepcional, incluso para las muestras más complicadas. Dentro de un flujo de trabajo integrado que incluye la preparación de bibliotecas, el enriquecimiento de los exomas, la secuenciación y el análisis de datos, el TruSeq DNA Exome proporciona llamadas de variantes precisas y permite un mayor conocimiento de las mutaciones de codificación.

## Calidad de datos TruSeq comprobada

La obtención de llamadas de variantes de gran fiabilidad depende tanto de la precisión de la secuenciación como de un enriquecimiento y una preparación de bibliotecas de alta calidad. El TruSeq DNA Exome es compatible con los sistemas de secuenciación de las series MiSeq™, NextSeq™, HiSeq™ y NovaSeq™ (tabla 1). Estos sistemas de secuenciación de Illumina emplean un proceso químico de secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés), utilizado para generar más del 90 % de los datos de secuenciación del mundo.\* El proceso químico de SBS de Illumina proporciona un porcentaje elevado de bases secuenciadas por encima de Q30. Al combinar el TruSeq DNA Exome con la SBS, los investigadores pueden identificar un número elevado de variantes de codificación verdaderas y minimizar las llamadas de falsos positivos y falsos negativos.

## Contenido exónico específico

El TruSeq DNA Exome se ha optimizado para proporcionar una cobertura uniforme y específica de 45 Mb de contenido exónico. El conjunto de sondas se ha diseñado para enriquecer 214 405 exones (tabla 2). Este diseño específico, junto con el enriquecimiento uniforme y selectivo, permite realizar una secuenciación de exomas completa y una identificación fiable de las variantes codificantes y auténticas.

Tabla 1: Comparación del rendimiento con TruSeq DNA Exome<sup>a</sup>

Sistema de secuenciación	pub. de exomas por experimento a 50x	pub. de exomas por experimento a 100x
<b>Serie MiSeq</b>	1	N/D
<b>Serie NextSeq</b>		
Celda de flujo de rendimiento medio	3	2
Celda de flujo de rendimiento elevado	12	6
<b>Serie HiSeq</b>		
Sistema HiSeq 2500 en modo de experimento rápido (celda de flujo doble)	24	12
Sistema HiSeq 2500 en modo de rendimiento elevado (celda de flujo doble)	156	78
Sistema HiSeq 3000	96	48
Sistema HiSeq 4000 (celda de flujo doble)	192	96

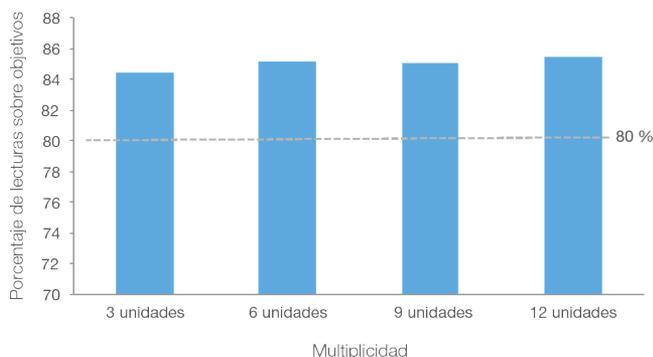
a. El número estimado de exomas secuenciados por experimento se calcula con una cobertura media de 50x y 100x respectivamente. Illumina recomienda una longitud de lectura de  $2 \times 75$  pb en todos los secuenciadores cuando se use TruSeq DNA Exome.

\*Cálculos de datos en archivo. Illumina, Inc., 2015.

**Tabla 2: Contenido de exomas con TruSeq DNA Exome y Nextera™ Exome**

Especificaciones de cobertura	TruSeq DNA Exome o Nextera Exome
Tamaño de objetivo	45 Mb
pub. de exones objetivo	214.405
Contenido objetivo	Exones codificantes
Porcentaje de exoma cubierto (por base de datos)	
RefSeq <sup>a</sup>	99,45 %
CCDS <sup>b</sup>	98,83 %
ENSEMBL <sup>c</sup>	99,68 %
GENCODE v19 <sup>d</sup>	99,68 %

- a. RefSeq: Base de datos de secuencias de referencia del NCBI. [www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/). Acceso: 11 de febrero de 2015.
- b. CCDS - Consensus CDS (CCDS) Database. [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi). Acceso: 11 de febrero de 2015.
- c. ENSEMBL: Explorador de genomas Ensembl. [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html). Acceso: 11 de febrero de 2015.
- d. GENCODE, GENCODE Project: enciclopedia de genes y variantes de genes. [www.genecodegenes.org/](http://www.genecodegenes.org/). Acceso: 11 de febrero de 2015.



**Figura 1: Enriquecimiento del objetivo:** el TruSeq DNA Exome ofrece un porcentaje  $\geq 80\%$  en las lecturas de secuenciación del objetivo para lograr una secuenciación de exomas eficaz y económica.

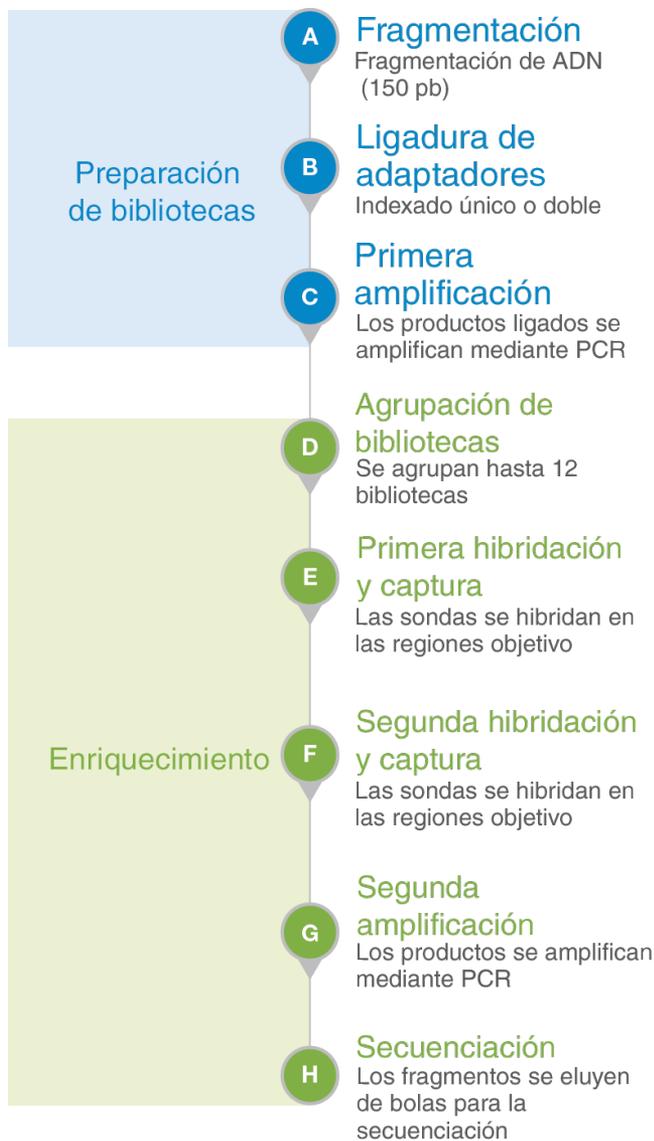
## Secuenciación de exomas eficiente

El TruSeq DNA Exome es compatible con agrupaciones de 12 unidades, lo que permite a los investigadores maximizar el rendimiento de la secuenciación e identificar variantes en menos tiempo, gracias a la secuenciación de hasta 12 bibliotecas por cada carril de celda de flujo. El TruSeq DNA Exome proporciona  $\geq 80\%$  de lecturas de secuenciación sobre objetivos (figura 1) y buena uniformidad de cobertura, por lo que se obtienen unos resultados muy fiables. También permite secuenciar más exomas en cada experimento, con lo que los investigadores pueden sacar el máximo partido a sus presupuestos.

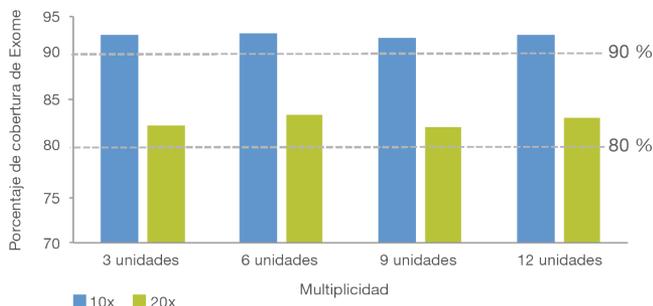
## Proceso químico de enriquecimiento eficiente

El TruSeq DNA Exome se ha optimizado para proporcionar una cobertura uniforme de muchos tipos distintos de muestras. El flujo de trabajo de preparación de bibliotecas (figura 2) empieza con la fragmentación mecánica, que genera fragmentos de tamaño uniforme para lograr la máxima reproducibilidad entre bibliotecas (figura 2A). Esta fragmentación mecánica mediante el método de ultrasonidos de Covaris o uno parecido permite usar muestras deterioradas, como las que contienen fragmentos cortos de ADN. Los fragmentos de ADN con extremos romos se generan mediante una combinación de reacciones de relleno y actividad de exonucleasa, seguida de una selección por tamaño con las bolas de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI) AMPure (Beckman Coulter) suministradas. En los fragmentos se ligan adaptadores que contienen el complemento completo de sitios de hibridación de cebadores de secuenciación para proporcionar lecturas individuales, "paired-end" e indexadas (figura 2B). Los productos ligados se amplifican mediante PCR (figura 2C).

A continuación, las bibliotecas se agrupan y desnaturalizan (figura 2D). Las sondas con biotina se hibridan en las regiones objetivo (figuras 2E y 2F), que se enriquecen mediante bolas de estreptavidina. Después de otra reacción de PCR (figura 2G), los fragmentos se eluyen de las bolas y quedan listos para la secuenciación (figura 2H). Este flujo de trabajo optimizado genera un tamaño de fragmento objetivo de  $\sim 150$  pb y puede completarse en  $< 2,5$  días. El TruSeq DNA Exome enriquece de forma eficiente el contenido de exomas para la secuenciación y proporciona una alta uniformidad de cobertura con  $> 85\%$  de las bases cubiertas a una profundidad de  $10\times$  (figura 3).



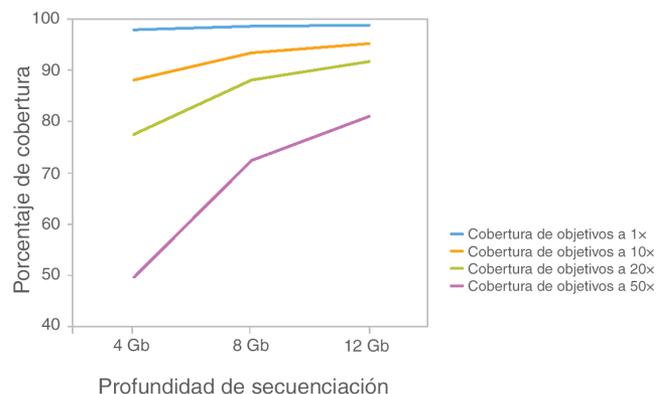
**Figura 2: Flujo de trabajo de TruSeq DNA Exome:** el TruSeq DNA Exome combina la preparación de bibliotecas con el enriquecimiento de exomas y puede completarse en menos de 2,5 días.



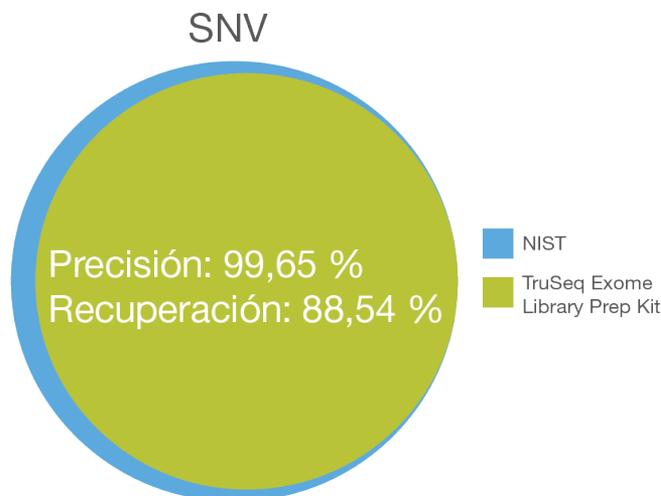
**Figura 3: Alta uniformidad de cobertura:** el TruSeq DNA Exome proporciona una cobertura uniforme, con >85 % de las bases cubiertas a una profundidad de 10x.

### Resultados precisos y fiables

El TruSeq DNA Exome proporciona una cobertura excepcional de objetivos en un rango amplio de profundidades de lectura (figura 4). Al combinar la reproducibilidad de TruSeq ADN Exome, una alta uniformidad de cobertura y el proceso químico SBS, se obtienen llamadas de variantes de gran precisión. Más del 99,65 % de las llamadas de variantes realizadas mediante TruSeq ADN Exome y la secuenciación de Illumina coincide con los datos de referencia estándar de la base de datos del Instituto de Estándares y Tecnología de EE. UU. (National Institute of Standards and Technology, NIST) (figura 5).<sup>4,5</sup>



**Figura 4: Eficiencia de cobertura a profundidades variables:** el TruSeq DNA Exome ofrece una cobertura excepcional a profundidades variables de secuenciación, con >80 % de lecturas cubiertas a una profundidad de 20x.



**Figura 5: Correspondencia elevada con la base de datos del NIST:** las llamadas de variantes realizadas con TruSeq DNA Exome muestran una elevada coincidencia con los datos de referencia estándar. La muestra de ADN NA12878 del centro de estudios del polimorfismo humano (Centre de'Etude du Polymorphism Humain, CEPH) se secuenció a una profundidad de cobertura de 100x. Se notifican las llamadas de variante de nucleótido único (SNV). La **precisión** se definió como la probabilidad de que una variante llamada fuera precisa. La **recuperación** se definió como la probabilidad de llamar a una variante validada.

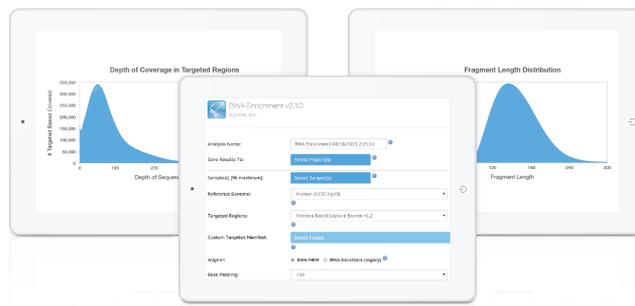
## Flujo de trabajo de secuenciación integrado

TruSeq DNA Exome forma parte de una solución compatible y cohesionada que guía a los investigadores desde la preparación de bibliotecas hasta el análisis de datos (figura 7). El kit combina la preparación de bibliotecas con el enriquecimiento de exomas, por lo que elimina la necesidad de adquirir índices, bolas de purificación de muestras y otros materiales auxiliares. Todos los componentes del TruSeq DNA Exome se han diseñado, optimizado y validado analíticamente en conjunto, por lo que no hay necesidad de evaluar varios componentes distintos. Los científicos expertos de Illumina proporcionan una única fuente de asistencia técnica y de campo para todas las etapas del flujo de trabajo. Al unirse a la comunidad de Illumina, los investigadores pueden aprovechar la pericia del equipo de asistencia de Illumina y colaborar con la amplia red de científicos que usan su tecnología.

Los datos de secuenciación se transfieren automáticamente de los sistemas Illumina a BaseSpace® Sequence Hub, el entorno informático de genómica de Illumina. BaseSpace Sequence Hub elimina gran parte de la complejidad asociada a un flujo de trabajo de análisis típico, lo que simplifica el análisis de datos y la interpretación biológica. BaseSpace Sequence Hub ofrece un ecosistema consolidado de herramientas de análisis de datos integral que se ha diseñado para biólogos. Las aplicaciones de BaseSpace integran las herramientas de análisis preferidas por los expertos en una interfaz intuitiva y fácil de usar, a fin de que cualquier investigador pueda acceder a procesos de análisis fiables sin necesidad de contar con una experiencia previa en bioinformática (figura 6).

Los investigadores pueden optar por analizar los datos de exomas mediante la aplicación BWA Enrichment, que usa el método BWA/GATK estándar del sector, o bien mediante la aplicación Isaac™ Enrichment, que usa el proceso rápido y fiable de Illumina.<sup>6</sup>

Para los biólogos que investigan la base genética de enfermedades, la aplicación VariantStudio permite llevar a cabo la identificación y la interpretación funcional de variantes de nucleótido único (SNV) asociadas a la enfermedad, así como de inserciones y deleciones. Los investigadores pueden filtrar y aislar rápidamente las variantes relevantes para enriquecer los datos de secuenciación con el contexto biológico. Los hallazgos importantes se exportan en forma de informes concisos. La aplicación VariantStudio permite a los investigadores explorar la relevancia biológica en unos pocos pasos sencillos.



**Figura 6: Análisis de datos simplificado con las aplicaciones de BaseSpace:** los datos de secuenciación de TruSeq DNA Exome se pueden cargar de manera sencilla y segura en BaseSpace Sequence Hub y analizar con la aplicación BWA Enrichment. Los resultados se suministran en formatos de fácil lectura.

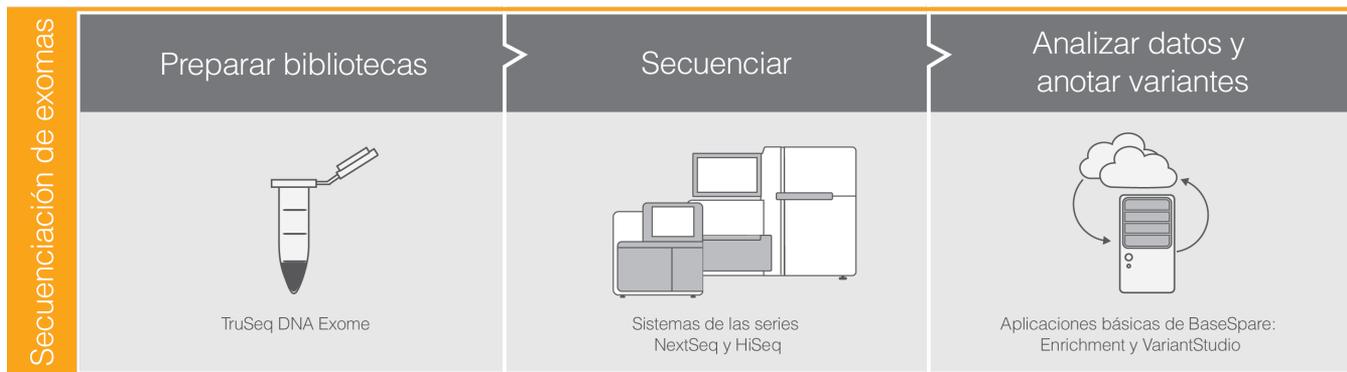
## Comparación de rendimiento en la secuenciación de exomas

Illumina ofrece dos soluciones de flujo de trabajo integral para la secuenciación de exomas. También hay flujos de trabajo disponibles que combinan la preparación de bibliotecas de Illumina con TruSeq DNA Exome o Nextera DNA Exome, seguida de enriquecimiento de exomas mediante xGen® Universal Blockers, xGen Lockdown Reagents y xGen Exome Research Panel v1.0, disponibles en IDT (tabla 3).

**Tabla 3: Comparación del rendimiento del flujo de trabajo con exomas**

Criterio de medición	TruSeq-xGen <sup>a</sup>	Nextera-xGen <sup>a</sup>	TruSeq Exome	Nextera Exome
Aporte de ADN	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng
Tipos de muestras	ADN	ADN	ADN y FFEP	ADN
Tiempo de participación activa	5 horas	2 horas	6 horas	3 horas
Duración total del ensayo	2,5 días	2 días	2,5 días	2 días
Tiempo de hibridación	4 horas	4 horas	16 horas	2 horas
% sobre objetivos	> 91 %	> 92 %	>80 %	> 75 %
% de cobertura a 20x <sup>b</sup>	>95 %	> 85 %	>90 %	> 85 %

- Las especificaciones para los flujos de trabajo de enriquecimiento de exomas con Illumina-IDT se basan en datos preliminares incorporados a BaseSpace Sequence Hub.
- Para los kits de TruSeq-xGen y Nextera-xGen, el porcentaje de cobertura a 20x se determinó con 3,5 Gb de secuenciación. Para TruSeq DNA Exome y Nextera DNA Exome, el porcentaje de cobertura a 20x se determinó con 8 Gb de secuenciación.



**Figura 7: Flujo de trabajo de secuenciación de exomas:** el TruSeq DNA Exome forma parte de un flujo de trabajo integrado de secuenciación de exomas que incluye la preparación de bibliotecas, la secuenciación y el análisis de datos.

## Resumen

El TruSeq DNA Exome ofrece un método optimizado y rentable para identificar y entender las variantes de codificación con una precisión de datos excepcional. La integración en un flujo de trabajo completo compuesto por la tecnología de secuenciación líder del sector y herramientas de análisis fáciles de usar permite a los investigadores acceder a una única fuente para todas sus necesidades de secuenciación de exomas.

## Información adicional

Para obtener más información sobre la secuenciación de exomas, visite [www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html](http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html).

## Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
TruSeq Exome Kit (24 muestras)	20020614
TruSeq Exome Kit (96 muestras)	20020615
IDT para Illumina: TruSeq DNA UD Indexes (24 índices, 96 muestras)	20020590
IDT para Illumina: TruSeq DNA UD Indexes (96 índices, 96 muestras)	20022370

## Referencias

- Litchfield K, Summersgill B, Yost S et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun.* 2015;6:5973.
- Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol.* 2014;76:473–483.
- Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med.* 2011;13:255-262.
- Datos de referencia estándar ([www.nist.gov/srd](http://www.nist.gov/srd)). Acceso: 11 de febrero de 2015.
- Genome in a Bottle Consortium | Advances in Biological and Medical Measurement Science ([sites.stanford.edu/abms/giab](http://sites.stanford.edu/abms/giab)). Acceso: 20 de febrero de 2015.
- Raczy C, Petrovski R, Saunders CT et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics.* 2013;29:2041–2043.

Illumina, Inc. • 1.800.809.4566 (llamada gratuita, EE. UU.) • Tel.: +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2017 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, visite [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pub. No. 770-2015-007-C ESP QB #

illumina®