

# Nextera™ DNA Exome

Un flujo de trabajo sencillo simplifica la preparación de bibliotecas y el enriquecimiento de los exomas para acelerar la secuenciación del exoma humano.

## Puntos destacados

- Flexibilidad para adaptarse a diferentes tipos de estudio**  
 Proceso químico optimizado que se adapta a bajas cantidades de aporte
- Enriquecimiento de exomas y preparación de bibliotecas eficientes**  
 Flujo de trabajo rápido fácilmente automatizable que finaliza en menos de dos días y tan solo requiere tres horas de tiempo de participación activa
- Llamadas de variante precisas**  
 La gran cobertura y la secuenciación del objetivo ofrecen datos precisos
- Solución con un flujo de trabajo integrado**  
 El flujo de trabajo exhaustivo simplifica la secuenciación de exomas desde la preparación de bibliotecas hasta el análisis de datos

Tabla 1: Contenido de exomas con Nextera DNA Exome y TruSeq DNA Exome

Especificaciones de cobertura	Nextera DNA Exome o TruSeq DNA Exome
Tamaño de objetivo	45 Mb
N.º 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/CcidsBrowse.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.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.gencodegenes.org/](http://www.gencodegenes.org/). Acceso: 11 de febrero de 2015.

## 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> Nextera DNA Exome, comercializado anteriormente como TruSeq™ Rapid Exome Kit, ofrece un flujo rápido de trabajo de secuenciación de exomas combinando la preparación de bibliotecas y el enriquecimiento de exomas en un solo proceso simplificado sin necesidad de utilizar equipo de recorte de ADN.

## Flexibilidad para adaptarse a diferentes tipos de estudio

Nextera DNA Exome está optimizado para un aporte de 50 ng de ADN. Gracias a los procesos químicos de transposoma mejorada se reduce el sesgo, lo que ofrece una preparación de bibliotecas y un enriquecimiento de exomas homogéneos en distintas cantidades de ADN (figura 1). La enzima del transposoma muestra una alta tolerancia a distintas cantidades de aporte de ADN y se adapta a ligeras incoherencias en la cuantificación de ADN. El kit admite la agrupación de bibliotecas antes del enriquecimiento, lo que permite a los laboratorios analizar hasta 12 muestras a la vez en función del volumen de procesamiento de las muestras. Nextera DNA Exome incluye un flujo de trabajo fácilmente automatizable para simplificar y agilizar aún más los procesos de laboratorio.

## Contenido exónico específico

Nextera 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.

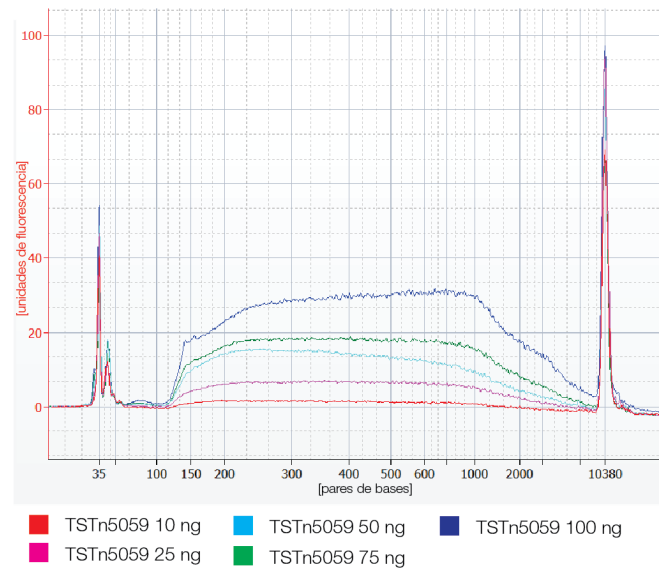


Figura 1: Fragmentación y etiquetado homogéneo para cantidades de aporte variables: los procesos químicos de transposoma mejorada muestran una alta tolerancia a distintas cantidades de aporte de ADN, de manera que se reduce el sesgo y ofrecen resultados homogéneos. Las bibliotecas se evaluaron en un instrumento bioanalizador.

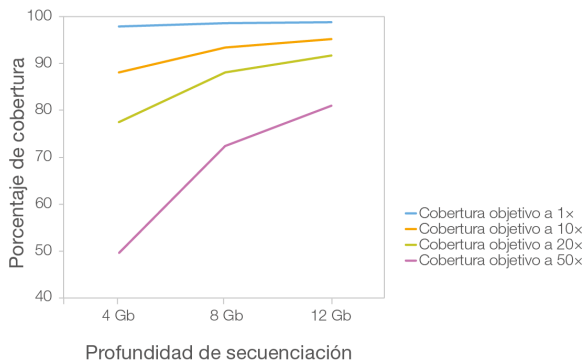
## Enriquecimiento de exomas y preparación de bibliotecas eficientes

Nextera DNA Exome permite preparar las bibliotecas y enriquecer los exomas en menos de dos días, con solo tres horas de participación activa (figura 3). La preparación de bibliotecas comienza con la fragmentación y el etiquetado, donde el ADN genómico se fragmenta y etiqueta a la vez con adaptadores (figura 3A). El ADN fragmentado y etiquetado se amplifica y se añaden índices de secuenciación mediante PCR (figura 3B). Se agrupan hasta 12 bibliotecas, se concentra el grupo y se desnaturalizan las bibliotecas para convertirlas en ADN de una sola cadena (figura 3C). Para realizar dos rondas de hibridación (figura 3D y 3E), se emplean sondas etiquetadas con biotina específicas para las regiones objetivo. El grupo se enriquece en las regiones deseadas mediante bolas de estreptavidina que se unen a las sondas con biotina. Los fragmentos de ADN con biotina unidos a las bolas de estreptavidina se extraen de la solución por medios magnéticos. Los fragmentos de ADN enriquecidos se eluyen desde las bolas y se siguen amplificando por PCR (figura 3F). Las bibliotecas amplificadas se recogen y se preparan para la secuenciación (figura 3G).

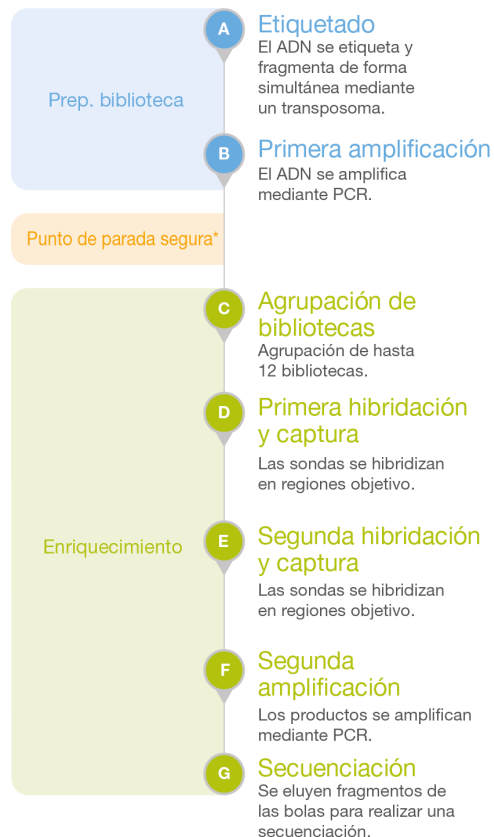
## Llamadas de variante precisas

Las bibliotecas preparadas con Nextera DNA Exome ofrecen una gran cobertura, con un 85 % de lecturas cubiertas a una profundidad de 20x (figura 2). Una cobertura tan alta ofrece llamadas de variante precisas. Más del 99,58 % de las llamadas de variante realizadas con Nextera DNA Exome coinciden con los datos de referencia estándar de la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST) (figura 4).<sup>5, 6</sup>

Nextera DNA Exome proporciona una media del 75 % de lecturas de secuenciación de objetivos (figura 6). Este elevado porcentaje del objetivo requiere menos ciclos de secuenciación para alcanzar los niveles de cobertura deseados, pero sigue logrando una cobertura uniforme para obtener resultados de gran fiabilidad. También permite la secuenciación de más exomas por experimento, de manera que los laboratorios rentabilizan al máximo sus presupuestos (tabla 2).

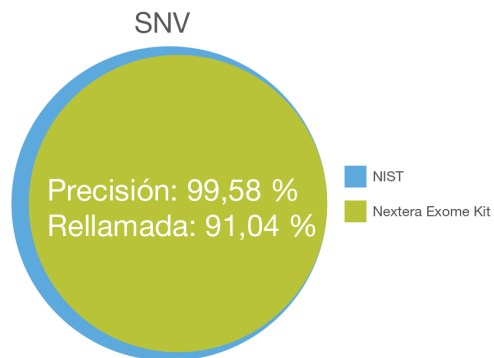


**Figura 2: Eficiencia de cobertura a distintas profundidades:** Nextera DNA Exome ofrece una cobertura excepcional a distintas profundidades de secuenciación, con un 80 % de lecturas cubiertas a una profundidad de 20x.

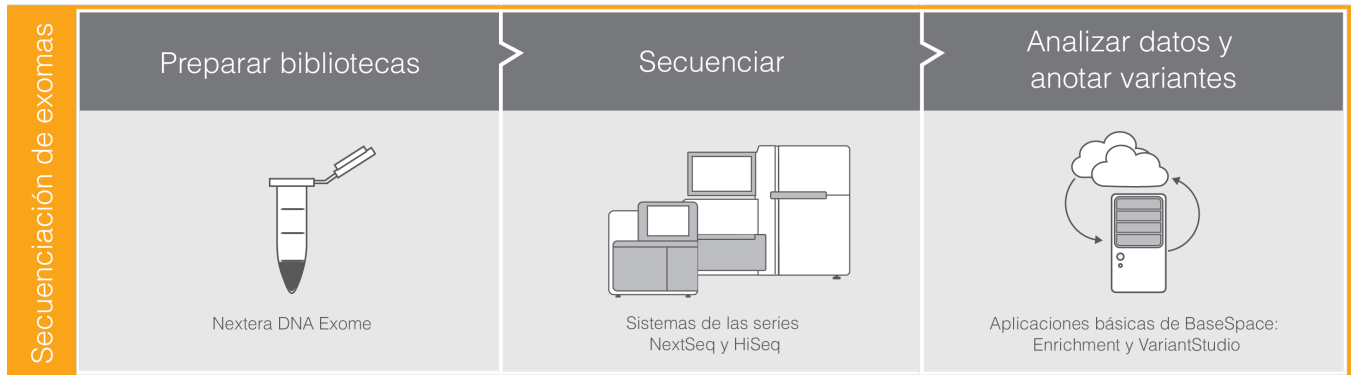


\* Illumina recomienda parar en este punto y resumir el flujo de trabajo el día 2 si fuera necesario.

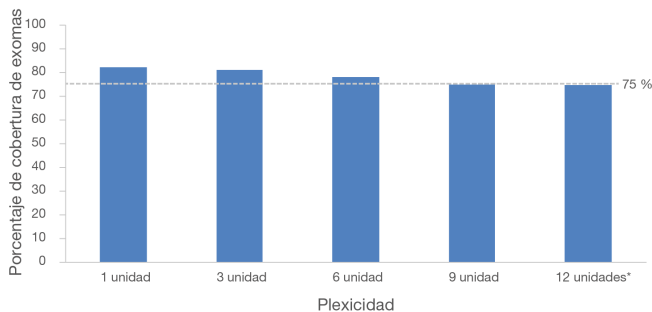
**Figura 3: Flujo de trabajo eficiente y rápido:** Nextera DNA Exome realiza la preparación de bibliotecas y el enriquecimiento de exomas en menos de dos días e incluye un punto de parada segura para aportararle una mayor flexibilidad.



**Figura 4: Correspondencia elevada con la base de datos del NIST:** las llamadas de variante de nucleótido único (SNV) realizadas con Nextera DNA Exome demuestran una elevada coincidencia con los datos de referencia estándar. La muestra de ADN NA12878 del centro de estudios del polimorfismo humano, Centre d'Etude du Polymorphism Humain (CEPH), se secuenció a una profundidad de cobertura de 100x. La **precisión** se definió como la probabilidad de que una variante llamada fuera precisa. La **rellamada** se definió como la probabilidad de llamar a una variante validada.



**Figura 5: Flujo de trabajo de secuenciación de exomas:** Nextera 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.



**Figura 6: Enriquecimiento en objetivo:** Nextera DNA Exome ofrece una media del 75 % de lecturas de secuenciación en objetivo a 4 Gb por exoma, consiguiendo una secuenciación eficiente y rentable.

**Tabla 2: Comparación del rendimiento con Nextera DNA Exome<sup>a</sup>**

Sistema de secuenciación	N.º de exomas por experimento a 50x	N.º 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 (doble celda de flujo)	24	12
Sistema HiSeq 2500 en modo de rendimiento elevado (doble celda de flujo)	156	78
Sistema HiSeq 3000	96	48
Sistema HiSeq 4000 (doble celda de flujo)	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 x 75 pb en todos los secuenciadores cuando se use Nextera DNA Exome.

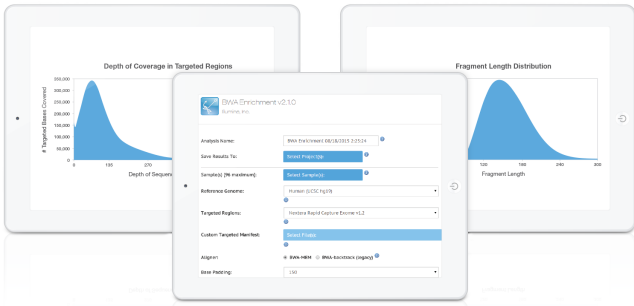
## Flujo de trabajo de secuenciación integrado

Nextera 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 5). 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 de Nextera DNA Exome se han diseñado, optimizado y validado analíticamente en conjunto, por lo que eliminan la 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.

Nextera DNA Exome es compatible con los sistemas de secuenciación de las series MiSeq™, NextSeq™, HiSeq™ y NovaSeq™. Los 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.\* 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 habitual, lo que simplifica el análisis de datos y la interpretación biológica. BaseSpace Sequence Hub ofrece un ecosistema consolidado de herramientas de análisis de datos integrada 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 7). 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.

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



**Figura 7: Análisis de datos simplificado con las aplicaciones de BaseSpace:** Los datos de secuenciación de Nextera DNA Exome se pueden cargar de manera sencilla y segura en BaseSpace Sequence Hub y analizarse con la aplicación BWA Enrichment. Los resultados se suministran en formatos de fácil lectura.

### Comparación de rendimiento en la secuenciación de exomas

Ilumina ofrece dos soluciones de flujo de trabajo integrado para la secuenciación de exomas. También hay flujos de trabajo disponibles que combinan la preparación de bibliotecas de Ilumina 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 %

- a. Las especificaciones para los flujos de trabajo de enriquecimiento de exomas con Ilumina-IDT se basan en datos preliminares incorporados a BaseSpace Sequence Hub.
- b. 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.

### Resumen

Nextera DNA Exome ofrece un método simple y racionalizado para identificar y comprender las variantes codificantes con una precisión de datos excepcional. La preparación rápida de bibliotecas y el flujo de trabajo de enriquecimiento de exomas permite crear bibliotecas listas para secuenciar en menos de dos días y ofrece flexibilidad para

planificar proyectos en función del volumen de muestras. Dentro de un flujo de trabajo completo que consta de una tecnología de secuenciación líder y herramientas de análisis de datos fáciles de utilizar, Nextera DNA Exome permite a los investigadores implementar la secuenciación de exomas de forma eficaz y económica.

### 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
Nextera Exome Kit (24 muestras)	20020616
Nextera Exome Kit (96 muestras)	20020617

### 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.
- Raczky C, Petrovski R, Saunders CT et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics.* 2013;29:2041–2043.

Ilumina, 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)

Para uso exclusivo en investigación. Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.

© 2017 Ilumina, Inc. Todos los derechos reservados. Ilumina, BaseSpace, HiSeq, Isaac, MiSeq, Nextera, NextSeq, NovaSeq, TruSeq y el color naranja calabaza son marcas comerciales de Ilumina, Inc. o sus filiales en EE. UU. o en otros países. xGen es una marca comercial de Integrated DNA Technologies, Inc. en EE. UU. o en otros países. N.º de pub. 770-2015-018-B-ESP

