

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados (“Illumina”) y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicará, divulgará ni reproducirá en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor ni similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS Y OTROS Y DAÑOS EN OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SE DERIVE DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE), NI DEL USO DE DICHS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE APLICACIÓN DE LAS LICENCIAS O LOS PERMISOS EXPRESOS ESCRITOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN RELACIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN

© 2012-2013 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIX, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, el color naranja calabaza y el diseño de las bases de streaming de Genetic Energy son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

Licencia de etiqueta de uso limitado: este producto y su uso están sujetos a una o más solicitudes de patentes ya expedidas o en trámite en los EE. UU. y en el extranjero que son propiedad de Max Planck Gesellschaft, con licencia exclusiva a New England Biolabs, Inc. y sublicencia a Illumina, Inc. La compra de este producto a Illumina, Inc., a sus filiales a sus distribuidores autorizados confiere al comprador el derecho intransferible de utilizar la cantidad comprada del producto y sus componentes (tanto si el comprador es una institución académica como una entidad con ánimo de lucro). La compra de este producto no confiere bajo ningún concepto licencia alguna sobre las patentes anteriores o sobre solicitudes de patentes orientadas a la fabricación de este producto. El comprador no puede vender ni transferir en modo alguno este producto ni sus componentes a terceros, ni utilizar en modo alguno este producto con los fines comerciales siguientes: 1) uso del producto o de sus componentes en procesos de fabricación, o 2) uso del producto o de sus componentes con fines terapéuticos o profilácticos en seres humanos o animales.

Leer antes de usar este producto

Este producto y su uso y disposición están sujetos a los siguientes términos y condiciones. Si el comprador no acepta estos términos y condiciones, no contará con la autorización de Illumina para utilizar este producto y no deberá utilizarlo.

- 1 **Definiciones.** “**PI de aplicaciones específicas**” hace referencia a los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina que se refieren a este producto (y a su uso) solo en relación con aplicaciones específicas o campos específicos. La PI de aplicaciones específicas excluye la propiedad intelectual que controla o posee Illumina que cubre los aspectos o las características de este producto (o su uso) que son comunes a este producto en todas las posibles aplicaciones y todos los posibles campos de uso (la “**PI común**”). La PI de aplicaciones específicas y la PI común son subconjuntos separados y no superpuestos de todos los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina. A modo de ejemplo, pero sin limitarse a este, los derechos de propiedad intelectual de Illumina sobre métodos diagnósticos específicos, métodos forenses específicos o biomarcadores de ácido nucleico, secuencias o combinaciones

de biomarcadores o secuencias específicas son ejemplos de una PI de aplicaciones específicas. “**Consumibles**” hace referencia a los elementos fungibles y los reactivos de marca Illumina que ha concebido Illumina para utilizarse junto con el hardware, así como para consumirse mediante el uso del hardware. “**Documentación**” comprende el manual del usuario de Illumina correspondiente a este producto, incluidas, entre otros, las instrucciones de uso, y cualquier otro tipo de documentación que se adjunte a este producto, al que el producto haga referencia o que se encuentre en su embalaje vigentes en la fecha de envío por parte de Illumina. Entre la documentación, se incluye este documento. “**Hardware**” engloba los instrumentos, accesorios o periféricos de marca Illumina. “**Illumina**” hace referencia a Illumina, Inc. o a una filial de Illumina, según corresponda. “**Producto**” comprende el producto al que se adjunta este documento (por ejemplo, hardware, consumibles o software). “**Comprador**” es la persona o entidad que adquiere de manera legal y correcta este producto de Illumina o de un distribuidor autorizado de Illumina. “**Software**” hace referencia al software de marca Illumina (por ejemplo, el software que hace funcionar el hardware o el software de análisis de datos). Todo el software se concede mediante licencia y no se vende, al tiempo que puede estar sujeto a términos adicionales que figuren en el acuerdo de licencia del usuario final del software. “**Especificaciones**” incluye las especificaciones escritas de Illumina con respecto a este producto vigentes en la fecha de envío del producto por parte de Illumina.

- 2 **Derechos para uso exclusivo en investigación.** De conformidad con estos términos y condiciones y, a menos que se acuerde lo contrario por escrito a través de un funcionario de Illumina, al comprador solo se le concede un derecho no exclusivo, no transferible, personal y sin posibilidad de sublicencia sobre la PI común de Illumina, existente en la fecha de envío de este producto por parte de Illumina, con el único fin de utilizar este producto en las instalaciones del comprador para los fines de investigación interna del comprador (que incluye servicios de investigación prestados a terceros) y únicamente conforme a la documentación de este producto, **pero se excluye de manera específica cualquier uso que** (a) requiriera derechos o una licencia por parte de Illumina sobre la PI de aplicaciones específicas, (b) constituya un nuevo uso de un consumible utilizado previamente, (c) constituya el desmontaje, la ingeniería inversa, la compilación inversa o el montaje inverso de este producto, (d) constituya la separación, la extracción o el aislamiento de los componentes de este producto u otros análisis no autorizados de este producto, (e) conceda acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o determine dichos métodos, (f) constituya el uso de consumibles o reactivos que no sean de Illumina con el hardware de Illumina (no se aplica si las especificaciones o la documentación disponen lo contrario), o bien (g) constituya la transferencia a un tercero, o la sublicencia, del software o de cualquier software de terceros. Todo el software, ya se proporcione por separado, se instale o se incorpore en un producto, se otorga en forma de licencia al comprador y no se vende. Salvo que se estipule de manera expresa en esta sección, no se otorga ningún derecho ni ninguna licencia de los derechos de propiedad intelectual de Illumina de manera expresa, implícita o por impedimento legal (estoppel).

El comprador solo será responsable de determinar si posee todos los derechos de propiedad intelectual necesarios para los usos previstos de este producto por su parte, incluidos, entre otros, cualquier derecho de terceros o derechos en relación con la PI de aplicaciones específicas. Illumina no garantiza que los usos previstos específicos del comprador no infrinjan los derechos de propiedad intelectual de un tercero o de una PI de aplicaciones específicas.

- 3 **Aspectos normativos.** Este producto no ha sido aprobado, autorizado ni le ha sido otorgada licencia alguna por parte de la Food and Drug Administration (FDA) de los EE. UU. o de cualquier otro organismo regulador, ya sea extranjero o nacional, para ningún uso previsto específico, bien para su uso en investigación, uso comercial, uso diagnóstico o de cualquier otro tipo. Este producto contiene la etiqueta “Para uso exclusivo en investigación”. El comprador debe asegurarse de que cuenta con todas las aprobaciones normativas pertinentes para los usos previstos de este producto por su parte.
- 4 **Usos no autorizados.** El comprador acepta: (a) utilizar cada consumible solo una vez y (b) utilizar solo consumibles o reactivos de Illumina con el hardware de Illumina. Las limitaciones de (a)-(b) no se aplican si la documentación o las especificaciones de este producto disponen lo contrario. El comprador acepta no participar, ni autorizar a terceros a ello, en ninguna de las siguientes actividades: (i) desmontar, llevar a cabo actos de ingeniería inversa, compilación inversa



o montaje inverso del producto, (ii) separar, extraer o aislar componentes de este producto, o bien someter este producto o sus componentes a cualquier tipo de análisis que no se haya autorizado expresamente en la documentación de este producto, (iii) acceder a los métodos de funcionamiento de este producto o intentar determinarlos, o bien (iv) transferir a un tercero cualquier software o cualquier software de terceros o conceder una sublicencia de estos. Además, el comprador acepta que el contenido y los métodos de funcionamiento de este producto son propiedad de Illumina y que este producto contiene o incluye secretos de mercado de Illumina. Las condiciones y restricciones que figuran en estos términos y condiciones se negocian como condiciones de venta y, por tanto, controlan la venta de este producto, así como su uso por parte del comprador.

- 5 **Limitación de responsabilidades.** EN LA MEDIDA EN QUE LA LEY LO PERMITA, EN NINGÚN CASO SE CONSIDERARÁ RESPONSABLE A ILLUMINA NI A SUS PROVEEDORES EN RELACIÓN CON EL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DE LOS COSTES DE GESTIÓN DE SUSTITUCIÓN DE PRODUCTOS O SERVICIOS, DE LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS, DATOS U OPERACIONES COMERCIALES, NI DE NINGÚN DAÑO INDIRECTO, ESPECIAL, ACCIDENTAL, EJEMPLAR, CONSECUENTE O PUNITIVO DE NINGÚN TIPO DERIVADO DE O RELACIONADO CON, ENTRE OTROS, LA VENTA DE ESTE PRODUCTO, SU USO, EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA DE LA PRESENTE NI DE CUALQUIERA DE ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, YA SE DERIVEN O PROCEDAN DE CUALQUIER PRINCIPIO DE RESPONSABILIDAD (BIEN POR CONTRATO, DELITO [INCLUIDA LA NEGLIGENCIA], RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD).
- 6 LA RESPONSABILIDAD TOTAL Y ACUMULATIVA DE ILLUMINA CON RESPECTO AL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DERIVADA DE, O EN RELACIÓN CON, ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, INCLUIDOS, ENTRE OTROS, ESTE PRODUCTO (INCLUIDO SU USO) Y EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA CONFORME A LA PRESENTE, YA SEA POR CONTRATO, DELITO (INCLUIDA LA NEGLIGENCIA), RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD, NO SUPERARÁ EN NINGÚN CASO LA CANTIDAD PAGADA A ILLUMINA POR ESTE PRODUCTO.
- 7 **Limitaciones sobre las garantías concedidas por Illumina.** EN LA MEDIDA EN QUE LA LEY LO PERMITA Y SUJETO A LA GARANTÍA EXPRESA DEL PRODUCTO QUE FIGURA EN ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, ILLUMINA NO OTORGA NINGUNA GARANTÍA (Y RENUNCIA DE MANERA EXPRESA A CUALQUIER GARANTÍA), YA SEA EXPRESA, IMPLÍCITA O LEGAL, EN RELACIÓN CON ESTE PRODUCTO, INCLUIDAS, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZACIÓN, DE IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO PARTICULAR, DE NO INFRACCIÓN O DERIVADA DEL TRANSCURSO DE LA EJECUCIÓN DEL CONTRATO, DE UN ACUERDO, DEL USO O TRANSACCIÓN COMERCIAL. SIN LIMITAR LA GENERALIDAD DE LO DISPUESTO ANTERIORMENTE, ILLUMINA NO AFIRMA, REPRESENTA NI GARANTIZA DE NINGUNA MANERA LA UTILIDAD DE ESTE PRODUCTO PARA LOS USOS PREVISTOS DEL COMPRADOR.
- 8 **Garantía del producto.** Todas las garantías en relación con el comprador son personales y no se pueden transferir ni asignar a un tercero, incluido un afiliado del comprador. Todas las garantías son específicas de las instalaciones y no se transfieren si el producto se traslada a otra instalación del comprador, a menos que Illumina efectúe dicho traslado.
 - a **Garantía de los consumibles.** Illumina garantiza que los consumibles que no sean consumibles personalizados cumplirán sus especificaciones hasta pasado un periodo de (i) 3 meses a partir de la fecha de envío por parte de Illumina y hasta (ii) cualquier fecha de caducidad o el final de su vida útil impresa previamente en dicho consumible por parte de Illumina, pero en ningún caso será superior a un periodo de 12 meses a partir de la fecha de envío. En relación con los consumibles personalizados (es decir, consumibles fabricados de acuerdo con las especificaciones o los diseños elaborados por el comprador o que el comprador, o alguna entidad en su nombre, proporciona a Illumina), Illumina solo garantiza que se fabricarán y probarán de acuerdo con los procesos de control de calidad y fabricación estándar de Illumina. Illumina no garantiza que los consumibles personalizados funcionen de la manera prevista por el comprador o para los usos previstos del comprador.

- b **Garantía del hardware.** Illumina garantiza que el hardware, siempre que no se trate de componentes actualizados, cumplirá sus especificaciones durante un periodo de 12 meses tras la fecha de envío por parte de Illumina, a menos que el hardware incluya la instalación ofrecida por Illumina, en cuyo caso el periodo de garantía comienza en la fecha de instalación o 30 días después de la fecha de envío, lo que ocurra primero (“Garantía básica del hardware”). El término “componentes actualizados” hace referencia a los componentes, las modificaciones o las mejoras de Illumina en el hardware que el comprador haya adquirido previamente. Illumina garantiza que los componentes actualizados cumplirán sus especificaciones durante un periodo de 90 días a partir de la fecha de instalación de dichos componentes actualizados. Los componentes actualizados no amplían el periodo de garantía del hardware a menos que la actualización la haya llevado a cabo Illumina en las instalaciones de Illumina, en cuyo caso el hardware actualizado enviado al comprador incorporará una garantía básica del hardware.
 - c **Exclusiones de la cobertura de la garantía.** Las anteriores garantías no se aplican en la medida en que un incumplimiento se deba a (i) un abuso, uso indebido, abandono, negligencia, accidente, almacenamiento inadecuado o un uso contrario a lo dispuesto en la documentación o las especificaciones, (ii) una manipulación, instalación, mantenimiento o reparación indebidos (que no sean realizadas por el personal de Illumina), (iii) alteraciones no autorizadas, (iv) sucesos de fuerza mayor, o bien (v) su uso con un producto de terceros no suministrado por Illumina (a menos que la documentación o las especificaciones del producto dispongan de manera expresa que dicho producto de terceros es para su uso con el producto).
 - d **Procedimiento para la cobertura de la garantía.** Con el objeto de ser apto para cualquier servicio de reparación o sustitución conforme a esta garantía, el comprador debe (i) ponerse en contacto con la mayor brevedad posible con el departamento de asistencia de Illumina para informarle del incumplimiento, (ii) cooperar con Illumina en la confirmación o el diagnóstico del incumplimiento y (iii) devolver este producto, con pago previo de los costes de transporte a Illumina de acuerdo con las instrucciones de Illumina o, si se acuerda entre Illumina y el comprador, conceder acceso a este producto al personal de reparación autorizado de Illumina con el objeto de confirmar el incumplimiento y realizar las reparaciones pertinentes.
 - e **Único recurso legal conforme a la garantía.** Según su criterio, Illumina reparará o sustituirá el producto no conforme a las especificaciones que se confirme que está cubierto por esta garantía. Los consumibles reparados o sustituidos cuentan con una garantía de 30 días. El hardware se puede reparar o sustituir por un hardware o componentes funcionalmente equivalentes, reacondicionados o nuevos (solo si un componente del hardware no cumple las especificaciones). Si el hardware se sustituye en su totalidad, el periodo de garantía correspondiente a la sustitución es de 90 días a partir de la fecha de envío o el periodo restante de la garantía del hardware original, lo que finalice antes. Si solo se repara o sustituye un componente, el periodo de garantía de dicho componente será de 90 días a partir de la fecha de envío o el periodo restante de la garantía del hardware original, lo que finalice antes. Las anteriores disposiciones establecen la única solución del comprador y las únicas obligaciones de Illumina conforme a la garantía que se otorga por la presente.
 - f **Productos de terceros y garantía.** Illumina no tiene ninguna obligación de garantía en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador de acuerdo con los presentes términos y condiciones. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. La garantía de los productos de terceros, si la hubiera, la proporciona el fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha garantía al comprador.
- 9 **Indemnización.**
- a **Indemnización por infracción por parte de Illumina.** Conforme a estos términos y condiciones, incluidas, entre otras, las exclusiones de las obligaciones de indemnización por parte de Illumina (sección 9(b) más adelante) y las condiciones de las obligaciones de indemnización (sección 9(d) a continuación), Illumina (i) defenderá, indemnizará y eximirá al comprador frente a cualquier reclamación o demanda de terceros en la que se alegue que este producto, al utilizarse con fines de investigación, de acuerdo con estos términos y condiciones y de acuerdo con la documentación y las especificaciones de este producto, infringe los derechos de propiedad intelectual válidos y ejecutables de un tercero y (ii) pagará todas las liquidaciones derivadas y todos los juicios finales y costes (incluidos los honorarios razonables de los abogados) que se le imputen al comprador en relación con dicha reclamación de

infracción. Si este producto, o alguna de sus partes, pasa a ser o, según la opinión de Illumina, puede ser el objeto de una reclamación por infracción, Illumina tendrá derecho, según su propio criterio, a (A) procurar al comprador el derecho a continuar utilizando este producto, (B) modificar o sustituir este producto por un sustituto no infractor esencialmente equivalente, o bien (C) solicitar la devolución de este producto y poner fin a los derechos, la licencia o cualquier otro permiso otorgado al comprador en relación con este producto, así como a reembolsar al comprador el valor depreciado (tal como se muestra en los registros oficiales del comprador) del producto devuelto en el momento de dicha devolución; siempre que no se otorgue ningún tipo de reembolso para consumibles utilizados o caducados. Esta sección establece la responsabilidad total de Illumina por cualquier infracción de derechos de propiedad intelectual de terceros.

- b **Exclusiones de obligaciones de indemnización por parte de Illumina.** Illumina no tiene la obligación de defender, indemnizar o liberar de responsabilidad al comprador por cualquier reclamación de infracción de Illumina en la medida en que dicha infracción se derive: (i) del uso de este producto en una manera o para un propósito que se encuentre fuera del ámbito de la finalidad de uso para investigación, (ii) del uso de este producto en una manera que no sea conforme a sus especificaciones, su documentación, los derechos concedidos de manera expresa al comprador conforme estos términos y condiciones o cualquier infracción por parte del comprador de estos términos y condiciones, (iii) del uso de este producto junto con cualquier otro producto, material o servicio no prestados por Illumina, (iv) del uso de este producto para realizar un ensayo u otro proceso no proporcionado por Illumina, o bien (v) del cumplimiento de las especificaciones o instrucciones por parte de Illumina para este producto que ha proporcionado el comprador o que se han proporcionado en su nombre (las condiciones de (i) a (v) se denominan “reclamación excluida”).
- c **Indemnización por parte del comprador.** El comprador defenderá, indemnizará y eximirá a Illumina, sus filiales, sus colaboradores no afiliados y los socios de desarrollo que contribuyeron al desarrollo de este producto, así como a sus funcionarios, directores, representantes y empleados correspondientes frente a cualquier reclamación, responsabilidad, daño, multa, pena, demanda y pérdida de cualquier tipo, incluidos, entre otros, reclamaciones por daños personales o muerte o la infracción de los derechos de propiedad intelectual de terceros, que se deriven, estén relacionados o procedan de (i) una infracción por parte del comprador de cualquiera de estos términos y condiciones, (ii) el uso del comprador de este producto fuera del ámbito de la finalidad de uso para investigación, (iii) cualquier uso de este producto que no sea conforme a las especificaciones o la documentación de este producto, o bien (iv) cualquier reclamación excluida.
- d **Condiciones de las obligaciones de indemnización.** Las obligaciones de indemnización de las partes estarán condicionadas por las siguientes acciones de la parte que solicita la indemnización: (i) notificación inmediata a la otra parte por escrito de dicha reclamación o demanda, (ii) concesión de autorización y control exclusivo a la otra parte sobre la defensa y la resolución de cualquier reclamación o demanda, (iii) no admisión de la infracción de ningún derecho de propiedad intelectual sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte, (iv) no negociación de ningún acuerdo o compromiso en relación con dicha reclamación o demanda sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte y (v) prestación de asistencia razonable a la otra parte en la defensa de la reclamación o demanda; siempre que la parte reembolse a la parte indemnizada los gastos razonables complementarios que se deriven de la prestación de dicha asistencia.
- e **Productos de terceros e indemnización.** Illumina no tiene ninguna obligación de indemnización en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. Los derechos de indemnización del comprador, si los hubiera, en relación con los productos de terceros serán conforme a la indemnización del propietario de la patente o del fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha indemnización, si la hubiera, al comprador.

Historial de revisiones

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15031048	E	Octubre de 2013	<ul style="list-style-type: none">• Aclaradas las opciones del tipo de placa PDP para el protocolo LS: una placa de PCR de 0,3 ml cuando se agrupen ≤ 40 muestras o una placa MIDI de 96 pocillos cuando se agrupen > 40 muestras• Creado un nuevo apéndice de <i>Información de apoyo</i> con <i>Acrónimos</i>, <i>Contenido de los kits</i>, <i>Consumibles y equipos</i> y <i>Secuencias de adaptadores indexados</i>• Reemplazada la sección de <i>Prácticas óptimas</i> por una referencia a su contenido en el sitio web de Illumina• Reemplazadas las secciones de <i>Opciones de adaptador</i> y <i>Directrices de agrupación</i> por una referencia a la <i>TruSeq Sample Preparation Pooling Guide</i> (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq) (n.º de referencia 15042173)

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15031048	D	Abril de 2013	<ul style="list-style-type: none"> • Añadida nueva información del kit de ARN total monocatenario TruSeq Plant y Globin en las siguientes secciones. <ul style="list-style-type: none"> • <i>Introducción</i> • <i>Acrónimos</i> • <i>Contenido de los kits</i> • Procedimientos de <i>Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero</i> • <i>Directrices de uso</i> • Añadido el bioanalizador y el kit DNA 1000 a la lista de equipos. • Corregida la temperatura de envío de la caja 1 de <i>Contenido de los kits</i>. • Corregida la temperatura de almacenamiento del tampón de ligadura de ARNr a entre -15 °C y -25 °C. • Eliminados los pasos de transferencia de las placas SIP y RIP de los procedimientos de <i>Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero</i> • En el protocolo HS de <i>Limpieza de PCR</i>, añadido el paso de centrifugación a los procedimientos de mezclado para que dicho mezclado guarde coherencia a lo largo del protocolo • Aclarados en los pasos de los protocolos que, en el caso del de LS, la placa PDP es una placa de PCR de 0,3 ml y, en el de HS, una placa HSP • En el apéndice <i>Protocolos de fragmentación alternativos</i>, añadido un paso de elución para ARN intacto con una longitud de fragmento de 130-350 pb • <i>Directrices de uso</i> trasladadas a un apéndice
15031048	C	Septiembre de 2012	<ul style="list-style-type: none"> • Añadida la licencia de New England Biolabs, Inc. a los avisos • Corregido el número de referencia de la mezcla de cebadores de PCR en el contenido del kit LT • Nombre del kit corregido: 96 muestras, caja de PCR para síntesis de ADNc • Reformateada en una tabla la lista de consumibles al inicio de cada procedimiento • Tras la descongelación inicial, en todos los procesos en que se emplea un tampón de resuspensión, añadido un paso de preparación para retirarlo del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15031048	B	Julio de 2012	<ul style="list-style-type: none"> • Añadidas las funciones y contenido del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq en las siguientes secciones: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Directrices de uso</i> • <i>Contenido de los kits</i> • <i>Secuencias de adaptadores indexados</i> • <i>Opciones de adaptador</i> • <i>Directrices de agrupación</i> • Procedimientos de <i>Ligadura de adaptadores</i> • Procedimientos de <i>Enriquecimiento de fragmentos de ADN</i> • Procedimientos de <i>Normalización y agrupación de bibliotecas</i> • Añadida la tabla de volumen de reactivos en las <i>Directrices de uso</i> • Revisada la información de descarga de documentación de <i>Herramientas de seguimiento</i> • Eliminada la descripción de la hoja de muestras detalladas de <i>Herramientas de seguimiento</i> • Añadidas las instrucciones para la elección de cada ensayo al utilizar Illumina Experiment Manager • Corregida la temperatura de almacenamiento del tampón de elución y el tampón de ligadura de ARNr de 2 °C a 8 °C • Añadidos los kits Agilent RNA 6000 Nano o Pico para la fragmentación alternativa en la lista de <i>Consumibles y Equipos</i> • Especificada la temperatura de almacenamiento especificada del tampón de resuspensión a entre 2 °C y 8 °C tras la descongelación inicial • Realización de RRP: añadidos los pasos para transferir el sobrenadante de la placa RIP a la placa SIP e incubar
15031048	A	Abril de 2012	Publicación inicial

X

N.º de referencia 15031048 Rev. E ESP

Contenido

Historial de revisiones	vii
Contenido	xi
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1 Descripción general	1
Introducción	2
Características del protocolo	4
Recomendaciones de entrada de ARN	6
ADN de control en línea	8
Recursos adicionales	10
Capítulo 2 Protocolo de bajo número de muestras (LS)	15
Introducción	16
Flujo de trabajo de la preparación de muestras	18
Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero	19
Síntesis de ADNc de la primera cadena	29
Síntesis de ADNc de la segunda cadena	32
Adenilación de extremos 3'	37
Ligadura de adaptadores	40
Enriquecimiento de fragmentos de ADN	49
Validación de bibliotecas	54
Normalización y agrupación de bibliotecas	56
Capítulo 3 Protocolo de alto número de muestras (HS)	61
Introducción	62
Flujo de trabajo de la preparación de muestras	64
Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero	65
Síntesis de ADNc de la primera cadena	74
Síntesis de ADNc de la segunda cadena	77
Adenilación de extremos 3'	82
Ligadura de adaptadores	85
Enriquecimiento de fragmentos de ADN	94
Validación de bibliotecas	99
Normalización y agrupación de bibliotecas	101
Apéndice A Información de apoyo	105

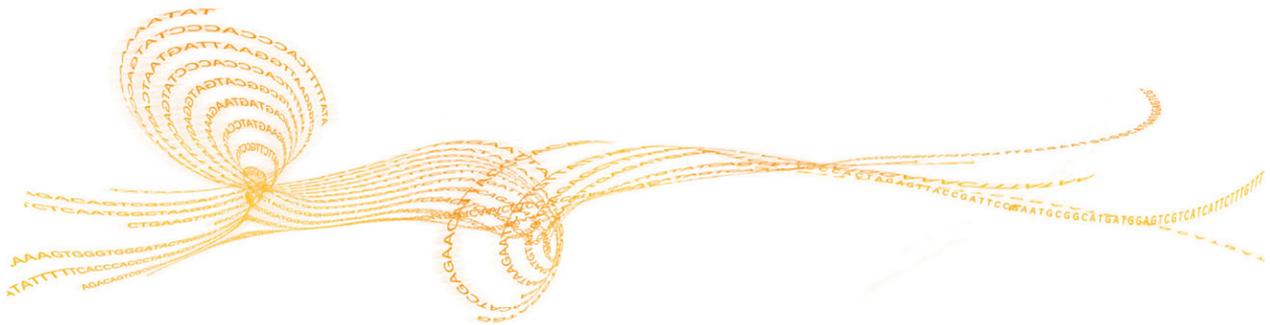
Introducción	106
Acrónimos	107
Contenido de los kits	110
Consumibles y equipos	123
Secuencias de adaptadores indexados	127
Apéndice B Protocolos de fragmentación alternativos	131
Introducción	132
Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN intacto	133
Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN degradado	135
Índice	141
Asistencia técnica	143

Lista de tablas

Tabla 1	Características del protocolo	4
Tabla 2	Recomendaciones sobre el número de muestras y el kit	5
Tabla 3	Recomendaciones sobre kits y protocolos	5
Tabla 4	Funciones de control en línea	9
Tabla 5	Recomendaciones sobre el número de muestras y el kit	16
Tabla 6	Recomendaciones sobre kits y protocolos	16
Tabla 7	Recomendaciones sobre el número de muestras y el kit	62
Tabla 8	Recomendaciones sobre kits y protocolos	62
Tabla 9	Acrónimos de la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq	107
Tabla 10	Kits de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq	110
Tabla 11	Consumibles suministrados por el usuario	123
Tabla 12	Consumibles suministrados por el usuario: artículos adicionales para el procesamiento LS	125
Tabla 13	Consumibles suministrados por el usuario: artículos adicionales para el procesamiento HS	125
Tabla 14	Equipo suministrado por el usuario	125
Tabla 15	Equipos suministrados por el usuario: artículos adicionales para el procesamiento HS	126
Tabla 16	Secuencias del adaptador indexado del juego A del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq	128
Tabla 17	Secuencias del adaptador indexado del juego B del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq	128
Tabla 18	Secuencias del adaptador indexado 1 del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq	129
Tabla 19	Secuencias del adaptador indexado 2 del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq	129
Tabla 20	Tiempo de fragmentación para los fragmentos de bibliotecas	133
Tabla 21	Información de contacto general de Illumina	143
Tabla 22	Números del Servicio de asistencia al cliente de Illumina	143

Descripción general

Introducción	2
Características del protocolo	4
Recomendaciones de entrada de ARN	6
ADN de control en línea	8
Recursos adicionales	10



Introducción

Este protocolo explica cómo convertir ARN total en una biblioteca de moléculas de plantillas de origen catenario conocido y aptas para la posterior generación de grupos y secuenciación de ADN utilizando los reactivos suministrados en los kits de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq® de Illumina®. El ARN total monocatenario TruSeq con Ribo-Zero™ para humano/ratón/rata, el ARN total monocatenario TruSeq con Ribo-Zero Gold y el ARN total monocatenario TruSeq con Ribo-Zero Globin son compatibles con humanos, ratones y ratas, mientras que el ARN total monocatenario TruSeq con Ribo-Zero Plant es compatible con especies de plantas.

Todos los kits de ARN total monocatenario TruSeq siguen el mismo flujo de trabajo. El primer paso implica la eliminación del ARN ribosómico (ARNr) mediante el uso de oligonucleótidos específicos según el objetivo biotinilados combinados con bolas de eliminación de ARNr Ribo-Zero. El kit Ribo-Zero para humano/ratón/rata elimina el ARNr citoplásmico de las muestras y el kit Ribo-Zero Gold, el ARNr citoplásmico y mitocondrial. Además de las especies de ARNr sobre las que actúa Ribo-Zero Gold, el kit Ribo-Zero Globin elimina el ARNm que codifica globinas. El kit Ribo-Zero Plant actúa sobre el ARNr citoplásmico y del cloroplasto. Tras la purificación, el ARN se fragmenta en trozos pequeños por medio de cationes divalentes a temperatura elevada. Los fragmentos de ARN segmentados se copian en el ADNc de la primera cadena mediante cebadores aleatorios y transcriptasa inversa y, seguidamente, se produce la síntesis de ADNc de la segunda cadena mediante ADN polimerasa I y ARNasa H. Entonces, se añade una base única “A” en estos fragmentos de ADNc y se produce la posterior ligadura del adaptador. Los productos se purifican y se enriquecen con PCR para crear la biblioteca definitiva de ADNc.

Este protocolo de preparación de muestras ofrece:

- ▶ Información de cadena sobre la transcripción del ARN
- ▶ Captura de bibliotecas de ARN codificante, así como de múltiples formas de ARN no codificante
- ▶ El ARN degradado puede utilizarse introduciendo leves ajustes en los procedimientos de fragmentación
- ▶ Reducción del tiempo total del ensayo
- ▶ Flujos de trabajo optimizados para el procesamiento de números altos y bajos de muestras (HS y LS) en paralelo
- ▶ Compatibilidad con las configuraciones de kits de alto rendimiento (HT) y bajo rendimiento (LT)

- ▶ El kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq contiene tubos de índices de adaptadores recomendados para la preparación y agrupación de un número igual o inferior a 24 muestras para la secuenciación
- ▶ El kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq contiene una placa de 96 pocillos con 96 combinaciones de adaptadores indexados de manera exclusiva diseñadas para la preparación manual o automatizada de 96 muestras indexadas de manera exclusiva

El protocolo es compatible con un nivel de agrupación de indexación menor o sin indexación. Las bibliotecas generadas no requieren amplificación PCR para activar la generación de grupos, aunque se recomienda introducir la PCR en el protocolo estándar para cumplir de manera sólida con los requisitos de rendimiento de la mayor parte de aplicaciones estándar.

Características del protocolo

En esta guía, se documenta el protocolo de preparación de muestras en el que se emplea el kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq o el kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq de Illumina.

- ▶ Capítulo 2 Protocolo de bajo número de muestras (LS explica cómo llevar a cabo la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq mediante el protocolo de bajo número de muestras
- ▶ Capítulo 3 Protocolo de alto número de muestras (HS explica cómo realizar la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq mediante el protocolo de alto número de muestras)

Cabe esperar resultados equivalentes con los dos protocolos y sus elementos distintivos son los siguientes:

Tabla 1 Características del protocolo

	Bajo número de muestras	Alto número de muestras
Kit LT: número de muestras que se procesa a la vez	≤48 con tubos adaptadores indexados	>48 con tubos adaptadores indexados
Kit HT: número de muestras que se procesa a la vez	≤24 con placa adaptadora indexada	>24 con placa adaptadora indexada
Tipo de placa	PCR de 96 pocillos de 0,3 ml MIDI de 96 pocillos	HSP de 96 pocillos MIDI de 96 pocillos
Equipo de incubación	Ciclador térmico de 96 pocillos	Ciclador térmico de 96 pocillos Sistema de microcalentamiento
Método de mezcla	Pipeteo	Agitador de microplacas

Ilumina recomienda las siguientes combinaciones de protocolo, número de muestras y kits:

Tabla 2 Recomendaciones sobre el número de muestras y el kit

Número de muestras procesadas a la vez	Kit recomendado
<24	LT
24-48	LT o HT
>48	HT

Tabla 3 Recomendaciones sobre kits y protocolos

Kit	Número de muestras admitidas	Número de muestras procesadas a la vez	Protocolo
LT	48	≤48	Bajo número de muestras, LS
		>48	Alto número de muestras, HS
HT	96	≤24	Bajo número de muestras, LS
		>24	Alto número de muestras, HS

Recomendaciones de entrada de ARN

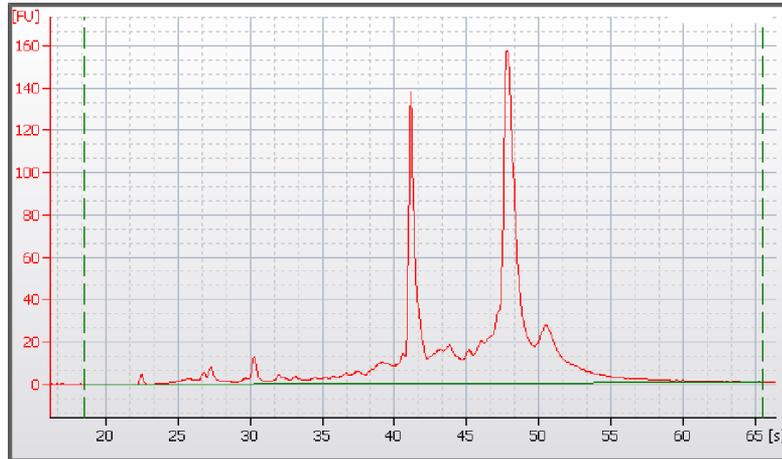
Es importante seguir las recomendaciones de entrada para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq.

Entrada de ARN total

- ▶ Este protocolo se ha optimizado para 0,1-1 µg de ARN total.
 - Usar cantidades menores puede tener como resultado una ligadura ineficiente o bajo rendimiento.
- ▶ El protocolo se ha probado utilizando como entrada 0,1-1 µg de ARN total de referencia universal humano de alta calidad.
 - El uso de ARN de otras especies, tejidos o calidades podría necesitar una mayor optimización en función de la cantidad de entrada inicial.
- ▶ El protocolo aconseja diluir los controles en línea para realizar un seguimiento de los pasos involucrados en la conversión del ADN bicatenario en bibliotecas.
 - La dilución se ha optimizado para una entrada de 0,1-1 µg de ARN de alta calidad.
 - Al usar menos cantidad de ARN o ARN muy degradado, es posible que haga falta más dilución para estos controles.
 - Si no se añaden controles, utilice el tampón de resuspensión en lugar de los controles en el protocolo.
- ▶ Es importante conocer la calidad del material de partida del ARN. Las condiciones de fragmentación se han optimizado para ARN de alta calidad.
 - Los ARN degradados son más cortos que un ARN de longitud completa. Si se utilizan las mismas condiciones para ARN degradados, como resultado, las bibliotecas serán más cortas y podrán entrañar un bajo rendimiento o el fracaso del protocolo.
 - Si se comienza con ARN degradado, deberá ajustarse el tiempo de fragmentación para evitar la sobrefragmentación de las muestras de ARN. Para obtener más información, consulte Apéndice B Protocolos de fragmentación alternativos.
 - El ARN contaminado con ADN dará como resultado una subestimación de la cantidad de ARN utilizado.

- ▶ La siguiente figura muestra un trazo de inicio del bioanalizador de ARN de referencia universal humano (UHR, Universal Human Reference).

Figura 1 Trazo de inicio del bioanalizador de ARN



Control positivo

Ilumina recomienda utilizar ARN total de referencia universal humano (UHR) de Agilent Technologies (n.º de catálogo 740000) como muestra de control positiva para este protocolo.

ADN de control en línea

Los reactivos de control de reparación de extremos, de control de A-Tailing y de control de ligadura contienen fragmentos de ADN utilizados como controles para las actividades enzimáticas de la mezcla maestra de marcación de la segunda cadena, la mezcla de A-Tailing y la mezcla de ligadura, respectivamente. Cada reactivo contiene fragmentos de ADN bicatenario diseñados para notificar si una actividad enzimática específica utilizada en el proceso de preparación de una biblioteca se ha llevado a cabo correctamente o no. La secuenciación determina la lectura. Si la secuencia de un control en línea está en los datos definitivos de secuenciación observados en el visor del análisis de secuenciación (SAV, Sequence Analysis Viewer), quiere decir que su paso correspondiente se ha realizado correctamente. Si no lo está o si arroja números considerablemente reducidos, quiere decir que ha fracasado el paso. Los controles están destinados a la resolución de problemas y son útiles para identificar el modo específico de fallo, pero son poco informativos en los casos en los que los datos de secuenciación no se generan a partir de una biblioteca.



NOTA

El uso de estos controles es opcional y pueden sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

Las moléculas de control funcionan a través del diseño de sus extremos. Los controles se añaden a las reacciones antes de efectuar su paso correspondiente en el protocolo. Las estructuras de sus extremos coinciden con las de una molécula de ADN que no ha sido sometida al paso. Si el paso se realiza correctamente, se modificará la molécula de control para participar en las reacciones descendentes de generación de bibliotecas y, como resultado, se crearán datos de secuenciación. Si el paso fracasa, la molécula de control no seguirá adelante en el proceso y no se generarán datos de secuenciación. Si se utilizan 100 ng de material de partida, los controles producen aproximadamente un 0,2 % de grupos, aunque esto puede diferir en función del rendimiento de la biblioteca.

Tabla 4 Funciones de control en línea

Reactivo	Función	Control	Estructura de extremos de ADN de control
Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena	Reparación de extremos: genera fragmentos de extremos romos mediante actividades exonucleasas 3'→5' y polimerasas 5'→3'	Control de reparación de extremos 1*	5' protuberante en un extremo, 3' protuberante en el otro extremo
Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena	Reparación de extremos: agrega grupos 5'-fosfato necesarios para una ligadura descendente	Control de reparación de extremos 2*	Romo con grupo 5'-OH
Mezcla de A-Tailing	A-Tailing: hace que los fragmentos sean compatibles con adaptadores y evita la autoligadura mediante la adición un 3'-A protuberante	Control de A-Tailing	Romo con grupo 5'-fosfato
Mezcla de ligadura	Ligadura: une los adaptadores 3'-T protuberantes a los fragmentos 3'-A protuberantes	Control de ligadura	Base sencilla 3' "A" base protuberante

*El control de reparación de extremos 1 y el control de reparación de extremos 2 son controles independientes que forman parte del reactivo de control de reparación de extremos

Los reactivos de control pueden utilizarse con distintos tamaños de fragmentos de bibliotecas. Cada uno se suministra en escalas que van aproximadamente de 150 pb a 850 pb en incrementos de 100 pb. Cada molécula de control cuenta con una secuencia de ADN exclusiva, que indica su función y su tamaño. El software RTA (v1.9 y posteriores) reconoce estas secuencias y aísla las secuencias de control del grupo principal de lecturas de secuenciación. El software RTA notifica el número de secuencias de control por carril en las pestañas de los controles de la página RTA status.html. Para obtener más información acerca de la lectura de controles en el SAV, consulte la *Sequence Analysis Viewer User Guide (Guía del usuario del visor del análisis de secuenciación)* (n.º de referencia 15020619).

Recursos adicionales

Los siguientes recursos están disponibles para realizar un seguimiento de las muestras y servir como asesoramiento del protocolo de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. Acceda a estos y otros recursos a través del sitio web de Illumina, en support.illumina.com/sequencing/kits.ilmn. A continuación, seleccione **TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support** (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq) o **TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support** (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).

Recurso	Descripción
Formación	<p>Explica los elementos del proceso de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. Se recomienda que los usuarios nuevos y con menos experiencia vean estos vídeos antes de comenzar la preparación de muestras.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haga clic en Training (Formación) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o • haga clic en Training (Formación) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).

Recurso	Descripción
Prácticas óptimas	<p>Ofrece las prácticas óptimas específicas de este protocolo. Revise estas prácticas óptimas antes de iniciar la preparación de muestras. Los temas son los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Manipulación de líquidos • Manipulación de reactivos de mezclas maestras • Manipulación de bolas magnéticas • Procedimientos para evitar la contaminación cruzada • Posibles contaminantes del ADN • Consideraciones acerca de las temperaturas • Equipo <ul style="list-style-type: none"> • Haga clic en Best Practices (Prácticas óptimas) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o • haga clic en Best Practices (Prácticas óptimas) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).
TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Low Sample Experienced User Card and Lab Tracking Form (Formulario de seguimiento de laboratorio y tarjeta de usuario experimentado de bajo número de muestras para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq) (n.º de referencia 15031060)	<p>Ofrece instrucciones del protocolo LS, pero de forma menos detallada que en esta guía del usuario. Se aconseja a los usuarios nuevos o con menos experiencia seguir esta guía del usuario y no el formulario de seguimiento de laboratorio y la tarjeta de usuario experimentado.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o • haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).

Recurso	Descripción
<p>TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation High Sample Experienced User Card and Lab Tracking Form (Formulario de seguimiento de laboratorio y tarjeta de usuario experimentado de alto número de muestras para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq) (n.º de referencia 15031059)</p>	<p>Ofrece instrucciones del protocolo HS, pero de forma menos detallada que en esta guía del usuario. Se aconseja a los usuarios nuevos o con menos experiencia seguir esta guía del usuario y no el formulario de seguimiento de laboratorio y la tarjeta de usuario experimentado.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o • haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).
<p>TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq) (n.º de referencia 15042173)</p>	<p>Proporciona las directrices de agrupación TruSeq para la preparación de muestras. Revise esta guía antes de iniciar la preparación de bibliotecas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o • haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).

Recurso	Descripción
Illumina Experiment Manager (IEM)	<p>Le permite crear y editar hojas de muestras adecuadas para el software de análisis y los secuenciadores de Illumina y registrar parámetros de su placa de muestras.</p> <p>Para descargar el software:</p> <ul style="list-style-type: none">• Haga clic en Downloads (Descargas) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o• haga clic en Downloads (Descargas) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq). <p>Para descargar la documentación:</p> <ul style="list-style-type: none">• Haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq); o• haga clic en Documentation & Literature (Documentación y bibliografía) en TruSeq Stranded Total RNA HT Sample Prep Kit Support (Ayuda del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq).

Protocolo de bajo número de muestras (LS)

Introducción	16
Flujo de trabajo de la preparación de muestras	18
Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero	19
Síntesis de ADNc de la primera cadena	29
Síntesis de ADNc de la segunda cadena	32
Adenilación de extremos 3'	37
Ligadura de adaptadores	40
Enriquecimiento de fragmentos de ADN	49
Validación de bibliotecas	54
Normalización y agrupación de bibliotecas	56



Introducción

En este capítulo, se describe el protocolo LS de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. Illumina recomienda las siguientes combinaciones de protocolo, número de muestras y kits:

Tabla 5 Recomendaciones sobre el número de muestras y el kit

Número de muestras procesadas a la vez	Kit recomendado
<24	LT
24-48	LT o HT
>48	HT

Tabla 6 Recomendaciones sobre kits y protocolos

Kit	Número de muestras admitidas por kit	Número de muestras procesadas a la vez	Protocolo
LT	48	≤48	Bajo número de muestras, LS
		>48	Alto número de muestras, HS

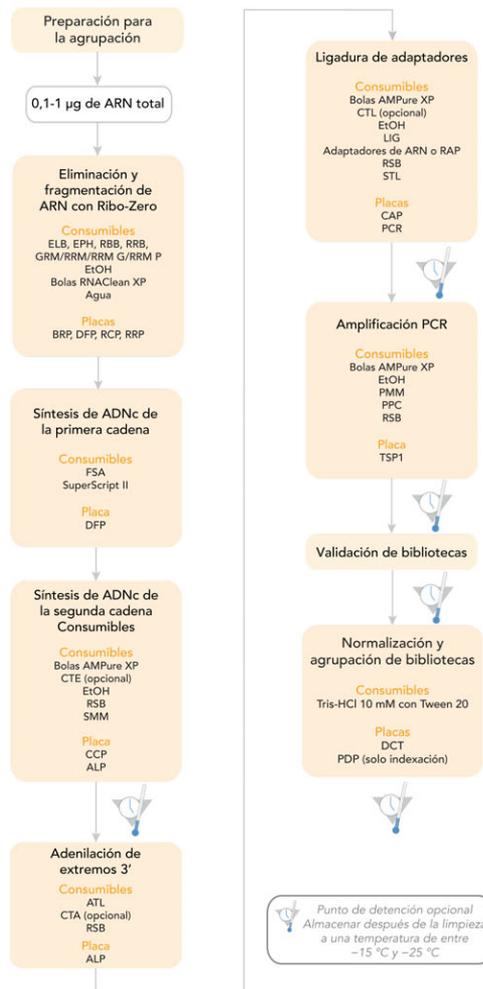
Kit	Número de muestras admitidas por kit	Número de muestras procesadas a la vez	Protocolo
HT	96	≤24	Bajo número de muestras, LS
		>24	Alto número de muestras, HS

- ▶ Siga el protocolo en el orden descrito, con los volúmenes y los parámetros de incubación especificados.
- ▶ Antes de proceder, revise los siguientes documentos:
 - Best Practices (Prácticas óptimas): consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
 - *TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq) (n.º de referencia 15042173)*: consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo descargar la guía desde el sitio web de Illumina.
 - Apéndice A Información de apoyo: sirve para comprobar el contenido del kit y asegurarse de que ha obtenido todos los consumibles y equipos necesarios para el protocolo LS.

Flujo de trabajo de la preparación de muestras

A continuación, se ilustran los procesos del protocolo LS de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq para preparar plantillas mediante 24 tubos adaptadores indexados o una RAP.

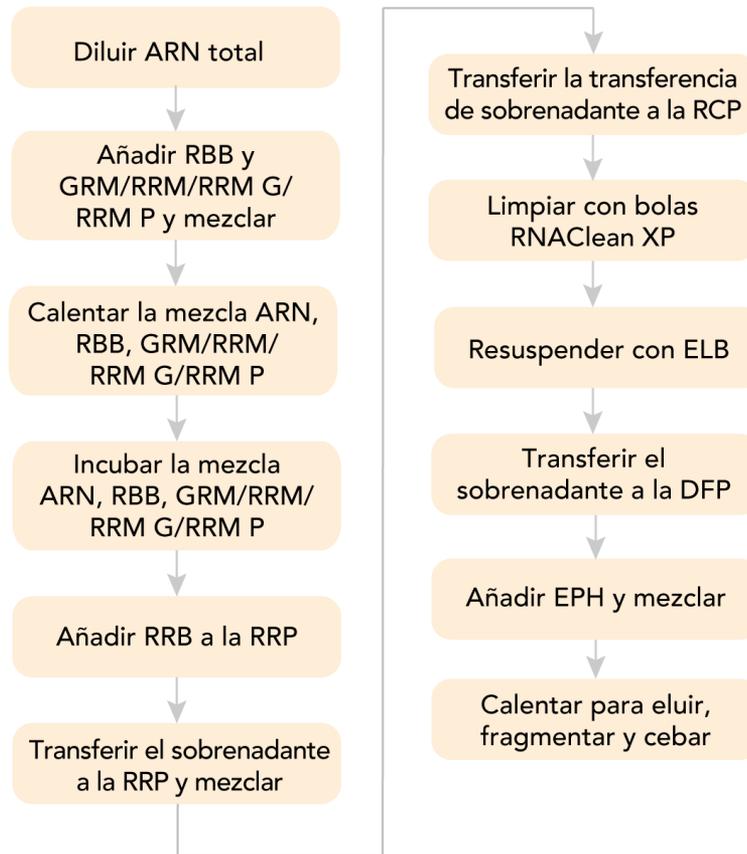
Figura 2 Flujo de trabajo de LS de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq



Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero

Con este proceso, se elimina el ARNr del ARN total. Tras eliminar el ARNr, el ARN restante se purifica, se fragmenta y se ceba para la síntesis de ADNc. Es importante seguir este procedimiento de purificación al pie de la letra para garantizar la reproducibilidad. Consulte el siguiente diagrama mientras realiza los procedimientos:

Figura 3 Flujo de trabajo de purificación para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq





NOTA

Illumina recomienda utilizar para este proceso entre 0,1 µg y 1 µg de ARN total y placas de PCR con un soporte magnético de placas.



NOTA

Deje que las bolas de eliminación de ARNr y las bolas RNAClean XP formen un pellet completo sobre el soporte magnético durante 1 y 5 minutos respectivamente. Extraiga el sobrenadante de las bolas inmediatamente mientras siguen sedimentadas sobre el soporte magnético. No deje que se sequen los pellets de las bolas de eliminación de ARNr.



NOTA

En los pasos de lavado con bolas RNAClean XP, se utiliza etanol al 70 % y, en los de lavado con bolas AMPure XP, etanol al 80 %.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución (EPH)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de elución (ELB)	1 tubo para 48 reacciones	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
<p>En función del kit utilizado, uno de los siguientes elementos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mezcla de eliminación de globinas (GRM) (contenido del kit Ribo-Zero Globin) • Mezcla de eliminación de ARNr (RRM) (contenido del kit Ribo-Zero para humano/ratón/rata) • Mezcla de eliminación de ARNr: Gold (RRM G) (contenido del kit Ribo-Zero Gold) • Mezcla de eliminación de ARNr: Plant (RRM P) (contenido del kit Ribo-Zero Plant) 	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de ligadura de ARNr (RBB)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Bolas de eliminación de ARNr (RRB)	1 tubo para 48 reacciones	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • BRP (placa de ligadura de ARNr) • DFP (placa de fragmentación de ARN sometido a eliminación) • RCP (placa de limpieza de ARN) • RRP (placa de eliminación de ARNr) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Ilumina
Placas de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml	4	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Etanol (EtOH) al 70 % recién preparado	200 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas RNAClean XP	99 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	6	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	6	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Agua ultrapura	Suficiente para diluir cada muestra de ARN total hasta obtener un volumen definitivo de 10 µl	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongélelos a temperatura ambiente:
 - Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución
 - En función del kit utilizado, uno de los siguientes elementos:
 - Mezcla de eliminación de globinas
 - Mezcla de eliminación de ARNr
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Gold
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Plant
 - Tampón de ligadura de ARNr
 - Tampón de resuspensión



NOTA

El tampón de resuspensión se puede almacenar a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras la descongelación inicial.

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcancen la temperatura ambiente:
 - Tampón de elución
 - Bolas de eliminación de ARNr
- ▶ Retire las bolas RNAClean XP del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con los siguientes programas:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos: guardar como **RNA Denaturation** (Desnaturalización de ARN)
 - $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 minutos, mantener la temperatura a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: guardar como **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar)



NOTA

En el caso de los fragmentos superiores a 120-200 pb con una mediana de tamaño de 150 pb o en caso de que se empiece con ARN total degradado, consulte Apéndice B Protocolos de fragmentación alternativos para ver los ajustes apropiados del programa **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar).

- ▶ Ajuste la centrifugadora en una temperatura de entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, en caso de estar refrigerados los elementos.

- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras BRP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras DFP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras RCP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras RRP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.

Realización de BRP

- 1 Diluya el ARN total con agua ultrapura exenta de nucleasas para lograr un volumen definitivo de 10 μ l en la nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml etiquetada con el código de barras BRP.
- 2 Añada 5 μ l de tampón de ligadura de ARNr en cada pocillo de la placa BRP.
- 3 Añada 5 μ l de uno de los reactivos siguientes en cada pocillo de la placa BRP en función del kit que esté usando:
 - Mezcla de eliminación de globinas
 - Mezcla de eliminación de ARNr
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Gold
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Plant
- 4 Pipetee con cuidado todo el volumen de cada pocillo de la placa BRP arriba y abajo seis veces para mezclarlo completamente.
- 5 Selle la placa BRP con un sello adhesivo Microseal "B".
- 6 Vuelva a almacenar los siguientes elementos a una temperatura de entre -15°C y -25°C :
 - Tampón de ligadura de ARNr
 - En función del kit utilizado, uno de los siguientes elementos:
 - Mezcla de eliminación de globinas
 - Mezcla de eliminación de ARNr
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Gold
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Plant

Incubación de BRP 1

- 1 Coloque la placa BRP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute el programa **RNA Denaturation** (Desnaturalización de ARN).
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - b 68 °C durante 5 minutos
- 2 Pasados 5 minutos de incubación, coloque la placa BRP en la mesa e incúbela a temperatura ambiente durante 1 minuto.

Realización de RRP

- 1 Mezcle en un mezclador vorticial el tubo de bolas de eliminación de ARNr enérgicamente a temperatura ambiente para resuspender las bolas.
- 2 Añada 35 µl de bolas de eliminación de ARNr en cada pocillo de la nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml etiquetada con el código de barras RRP.



NOTA

Es importante no omitir este paso añadiendo las bolas a la muestra de la placa BRP. Al añadirse la muestra de la placa BRP a las bolas de la placa RRP en el paso 3, se garantizará un rendimiento óptimo.

- 3 Retire el sello adhesivo de la placa BRP.
- 4 Transfiera todo el contenido (20 µl) de cada pocillo de la placa BRP al pocillo correspondiente de la placa RRP que contiene las bolas de eliminación de ARNr.
- 5 Ajuste la pipeta a 45 µl y, a continuación, con la punta de la pipeta en el fondo del pocillo, pipetee rápidamente arriba y abajo 20 veces para mezclar el contenido completamente.



NOTA

Es importante pipetear arriba y abajo rápidamente para garantizar una mezcla completa. Si la mezcla es insuficiente, habrá menores niveles de eliminación de ARNr.

El pipeteo con las puntas en el fondo del pocillo, y no el pipeteo de todo el volumen de la solución, ayuda a evitar que se forme espuma en la solución. Un exceso de espuma provocaría la pérdida de muestra, ya que la espuma no se transfiere de manera eficiente fuera de la placa.

- 6 Incube la placa RRP a temperatura ambiente durante 1 minuto.

- 7 Coloque la placa RRP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 8 Transfiera todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa RRP al pocillo correspondiente de la nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml etiquetada con el código de barras RCP.
- 9 Coloque la placa RCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 1 minuto.



NOTA

Si queda alguna bola en los pocillos de la placa RCP, coloque dicha placa en el soporte magnético durante 1 minuto y, a continuación, transfiera el sobrenadante a una nueva placa de PCR de 0,3 ml. Repita esto tantas veces como sea necesario hasta que no queden bolas. La última placa de PCR de 0,3 ml será la placa RCP utilizada durante la limpieza de RCP.

- 10 Vuelva a almacenar las bolas de eliminación de ARNr a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

Limpieza de RCP

- 1 Mezcle en un mezclador vorticial las bolas RNAClean XP hasta que estén bien dispersas y, a continuación, añada 99 µl de bolas RNAClean XP bien mezcladas en cada pocillo de la placa RCP que contiene ARN cuya parte ribosómica se ha eliminado. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.



NOTA

Si se empieza con ARN total degradado, añada 193 µl de bolas RNAClean XP bien mezcladas en cada pocillo de la placa RCP que contiene ARN cuya parte ribosómica se ha eliminado.

- 2 Incube la placa RCP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 3 Coloque la placa RCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurarse de que todas las bolas se han fijado en el lado de los pocillos.
- 4 Extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa RCP y deséchelo.



NOTA

Deje la placa RCP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 70 % (5-6).

- 5 Mientras permanece la placa RCP en el soporte magnético, añada 200 μ l de EtOH al 70 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 6 Incube la placa RCP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo.
- 7 Deje que la placa RCP repose a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se seque y, a continuación, retírela del soporte magnético.
- 8 Centrifugue el tampón de elución descongelado a temperatura ambiente a 600 \times g durante 5 segundos.
- 9 Añada 11 μ l de tampón de elución en cada pocillo de la placa RCP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 10 Incube la placa RCP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 11 Coloque la placa RCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 12 Vuelva a almacenar el tampón de elución a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 13 Transfiera 8,5 μ l de sobrenadante de la placa RCP a la nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml etiquetada con el código de barras DFP.
- 14 Añada 8,5 μ l de mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución en cada pocillo de la placa DFP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 15 Selle la placa DFP con un sello adhesivo Microseal "B".
- 16 Vuelva a almacenar la mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y el tubo de bolas RNAClean XP a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

Incubación de DFP 1

- 1 Coloque la placa DFP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute el programa **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar).



NOTA

En el caso de los fragmentos superiores a 120-200 pb con una mediana de tamaño de 150 pb o en caso de que se empiece con ARN total degradado, asegúrese de haber definido los ajustes adecuados del programa **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar). Consulte Apéndice B Protocolos de fragmentación alternativos para obtener más información.

- a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - b 94 °C durante 8 minutos
 - c Mantenga la temperatura a 4 °C
- 2 Retire la placa DFP del ciclador térmico cuando alcance los 4 °C y centrifúguela durante unos breves instantes.
 - 3 Proceda inmediatamente a *Síntesis de ADNc de la primera cadena*, en la página 29.

Síntesis de ADNc de la primera cadena

En este proceso, se realiza una transcripción inversa de los fragmentos de ARN segmentados que se han cebado con hexámeros aleatorios en el ADNc de la primera cadena mediante la transcriptasa inversa y cebadores aleatorios. La adición de dactinomicina a la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena (FSA) evita una síntesis falsa dependiente de ADN a la vez que permite la síntesis dependiente de ARN, lo que mejora la especificidad de la cadena.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla Act D de síntesis de la primera cadena (FSA)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Sello adhesivo Microseal "B"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Transcriptasa inversa SuperScript II	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Usuario



ADVERTENCIA

La mezcla Act D de síntesis de la primera cadena contiene una toxina llamada dactinomicina. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Deseche los contenedores y el contenido no utilizado de conformidad con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Consulte la hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS) de los productos para obtener información ambiental, de higiene y de seguridad y detallada. Las MSDS de este kit están disponibles en el sitio web de Illustrina, en www.illustrina.com/msds.

Preparación

- ▶ Retire un tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que se descongele a temperatura ambiente.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el siguiente programa y guárdelo como **Synthesize 1st Strand** (Síntesis de la primera cadena):
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos
 - $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos
 - $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos
 - Mantenga la temperatura a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$



NOTA

La mezcla Act D de síntesis de la primera cadena a la que se le ha añadido SuperScript II es estable frente a ciclos de congelación-descongelación adicionales y puede utilizarse para experimentos posteriores. Si se prevé la realización de más de seis ciclos de congelación-descongelación, divida la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena y SuperScript II en alícuotas más pequeñas y almacénelas a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Adición de FSA

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa DFP.
- 2 Centrifugue el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena descongelada a $600 \times g$ durante 5 segundos.
- 3 Añada $50\text{ }\mu\text{l}$ de SuperScript II en el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena. Si no va a utilizar todo el contenido del tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena, añada SuperScript II en una proporción de $1\text{ }\mu\text{l}$ de SuperScript por cada $9\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla Act D de síntesis de la primera cadena. Mezcle los componentes con cuidado, pero concienzudamente, y centrifugue durante unos breves instantes. Etiquete el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena para indicar que se le ha añadido SuperScript II.
- 4 Añada $8\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla Act D de síntesis de la primera cadena y de mezcla SuperScript II en cada pocillo de la placa DFP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo seis veces para mezclarlo completamente.

- 5 Selle la placa DFP con un sello adhesivo Microseal "B" y centrifugue durante unos breves instantes.
- 6 Vuelva a almacenar el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena inmediatamente después de utilizarlo a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.

Incubación de DFP 2

- 1 Coloque la placa DFP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute el programa **Synthesize 1st Strand** (Sintetizar primera cadena).
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - b 25 °C durante 10 minutos
 - c 42 °C durante 15 minutos
 - d 70 °C durante 15 minutos
 - e Mantenga la temperatura a 4 °C
- 2 Cuando el ciclador térmico alcance los 4 °C, retire la placa DFP del ciclador y proceda inmediatamente a *Síntesis de ADNc de la segunda cadena*, en la página 32.

Síntesis de ADNc de la segunda cadena

En este proceso, se elimina la plantilla de ARN y se sintetiza una cadena de sustitución, que incorpora dUTP en lugar de dTTP para generar ADNc bicatenario. Al incorporarse el dUTP, se desactiva la segunda cadena durante la amplificación, ya que no se incorpora la polimerasa pasado este nucleótido. Las bolas AMPure XP se utilizan para separar el ADNc bicatenario de la mezcla de la reacción de la segunda cadena. Al final del proceso, tiene como resultado ADNc con extremos romos.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
(Opcional) Control de reparación de extremos (CTE)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena (SMM)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Etiqueta de código de barras ALP (placa de ligadura de adaptadores)	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illustra
Placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas AMPure XP	90 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Etol (EtOH) al 80 % recién preparado	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y descongélelos a temperatura ambiente:
 - Control de reparación de extremos



NOTA

El uso del control de reparación de extremos es opcional y puede sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

- Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena
- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire las bolas AMPure XP del lugar de almacenamiento y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.
- ▶ Consulte las Best Practices (Prácticas óptimas) de *Handling Magnetic Beads* (Manipulación de bolas magnéticas). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
- ▶ Caliente previamente el ciclador térmico a 16 °C.
- ▶ Seleccione la opción de precalentar la tapa del ciclador térmico y establézcala en 30 °C
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras ALP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.

Adición de SMM

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa DFP.
- 2 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se está utilizando el reactivo de control en línea:
 - Centrifugue el tubo de control de reparación de extremos descongelado a $600 \times g$ durante 5 segundos.
 - Diluya el control de reparación de extremos en un tampón de resuspensión en una proporción de 1/50 (por ejemplo, 2 μl de control de reparación de extremos + 98 μl de tampón de resuspensión) antes de utilizarlo. Deseche el control de reparación de extremos diluido después de utilizarlo.
 - Añada 5 μl de control de reparación de extremos diluido en cada pocillo de la placa DFP.
 - Si no se está utilizando el reactivo de control en línea, añada 5 μl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa DFP.
- 3 Centrifugue la mezcla maestra de marcación de la segunda cadena descongelada a $600 \times g$ durante 5 segundos.
- 4 Añada 20 μl de mezcla maestra de marcación de la segunda cadena descongelada en cada pocillo de la placa DFP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo seis veces para mezclarlo completamente.
- 5 Selle la placa DFP con un sello adhesivo Microseal “B”.
- 6 Vuelva a almacenar el tubo de la mezcla maestra de marcación de la segunda cadena a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ después de utilizarlo.

Incubación de DFP 3

- 1 Coloque la placa DFP sellada en el ciclador térmico precalentado. Cierre la tapa e incúbela a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora.
- 2 Retire la placa DFP del ciclador térmico y colóquela en la mesa.
- 3 Retire el sello adhesivo de la placa DFP.
- 4 Deje reposar la placa DFP para que alcance la temperatura ambiente.

Limpieza de DFP

- 1 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial hasta que estén bien dispersas.
- 2 Añada 90 μ l de bolas AMPure XP bien mezcladas en cada pocillo de la placa DFP que contiene 50 μ l de ADNc bicatenario. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 3 Incube la placa DFP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 4 Coloque la placa DFP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurarse de que todas las bolas se han fijado en el lado los pocillos.
- 5 Extraiga 135 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa DFP y deséchelo.



NOTA

Deje la placa DFP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (6-8).

- 6 Mientras permanece la placa DFP en el soporte magnético, añada 200 μ l de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 7 Incube la placa DFP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo.
- 8 Repita los pasos 6 y una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 9 Deje que la placa DFP repose a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se seque y, a continuación, retírela del soporte magnético.
- 10 Centrifugue el tampón de resuspensión descongelado a temperatura ambiente a 600 \times g durante 5 segundos.
- 11 Añada 17,5 μ l de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa DFP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 12 Incube la placa DFP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 13 Coloque la placa DFP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 14 Transfiera 15 μ l de sobrenadante (ADNc bicatenario) de la placa DFP a la nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml etiquetada con el código de barras ALP.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente a *Adenilación de extremos 3'*, en la página 37, puede detener con seguridad el protocolo en este punto. Si va a detenerse, selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre -15°C y -25°C durante 7 días como máximo.

Adenilación de extremos 3'

Se agrega un solo nucleótido “A” a los extremos 3’ de los fragmentos romos para evitar que ligen unos con otros durante la reacción de ligadura de adaptadores. Un único nucleótido “T” correspondiente en el extremo 3’ del adaptador proporciona una protuberancia complementaria para ligar el adaptador al fragmento. Esta estrategia garantiza un bajo índice de formación de quimeras (cadena molde concatenada).

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
(Opcional) Control de A-Tailing (CTA)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Mezcla de A-Tailing (ATL)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Sello adhesivo Microseal “B”	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongélelos a temperatura ambiente:

- Control de A-Tailing



NOTA

El uso del control de A-Tailing es opcional y puede sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

- Mezcla de A-Tailing
- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire la placa ALP del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caso de que se almacenara al concluir la *Limpieza de DFP*, en la página 35.
 - Deje que se descongele a temperatura ambiente.
 - Centrifugue la placa ALP descongelada a $280 \times \text{g}$ durante 1 minuto.
 - Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el siguiente programa y guárdelo como **ATAIL70**:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos
 - $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos
 - Mantenga la temperatura a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Adición de ATL

- 1 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se está utilizando el reactivo de control en línea:
 - Centrifugue el tubo del control de A-Tailing descongelado a $600 \times \text{g}$ durante 5 segundos.
 - Diluya el control de A-Tailing en un tampón de resuspensión en una proporción de 1/100 (por ejemplo, $1\text{ }\mu\text{l}$ de control de A-Tailing + $99\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de resuspensión) antes de utilizarlo. Deseche el control de A-Tailing diluido después de utilizarlo.
 - Añada $2,5\text{ }\mu\text{l}$ del control de A-Tailing diluido en cada pocillo de la placa ALP.

- Si no se está utilizando el reactivo de control en línea, añada 2,5 μ l de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa ALP.
- 2 Añada 12,5 μ l de mezcla de A-Tailing descongelada en cada pocillo de la placa ALP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
 - 3 Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal "B".

Incubación de ALP 1

- 1 Coloque la placa ALP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute el programa **ATAIL70**.
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - b 37 °C durante 30 minutos
 - c 70 °C durante 5 minutos
 - d Mantenga la temperatura a 4 °C
- 2 Cuando el ciclador térmico alcance los 4 °C, retire la placa ALP del ciclador y proceda inmediatamente a *Ligadura de adaptadores*, en la página 40.

Ligadura de adaptadores

En este proceso, se ligan varios adaptadores de indexación a los extremos de los fragmentos de ADN ds y se preparan para la hibridación en una celda de flujo.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
(Opcional) Control de ligadura (CTL)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
En función del kit utilizado, elija uno de los siguientes elementos: <ul style="list-style-type: none"> Contenido del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq: <ul style="list-style-type: none"> Índices de adaptadores de ARN (AR001-AR016, AR018-AR023, AR025, AR027) Contenido del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq: <ul style="list-style-type: none"> RAP (placa adaptadora de ARN) 	1 tubo de cada índice utilizado, por columna de 8 reacciones o 1 RAP	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Mezcla de ligadura (LIG)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Tampón de parada de ligadura (STL)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • CAP (placa ALP de limpieza) • PCR (placa de reacción en cadena de la polimerasa) • RAP (placa adaptadora de ARN) (si se usa el kit HT) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Ilumina
Placas de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas AMPure XP	92 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Etanol (EtOH) al 80 % recién preparado	800 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	4-28	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	4-28	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y descongélelos a temperatura ambiente:
 - Tubos adaptadores de ARN apropiados (dependiendo de los índices de adaptadores de ARN utilizados) o la RAP.



NOTA

- Revise la *TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq)* (n.º de referencia 15042173). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo descargar la guía desde el sitio web de Illumina.
- Al indexar bibliotecas con tubos de índices de adaptadores, Illumina recomienda organizar las muestras que van a combinarse en un grupo común en la misma fila. Además, incluya un índice común en cada columna. Esto facilitará las operaciones de pipeteo cuando se dispensen adaptadores indexados y al agrupar bibliotecas indexadas en un paso posterior del protocolo.
- Al indexar bibliotecas con la RAP, organice las muestras que se van a agrupar en la misma orientación que los índices en la RAP.



NOTA

Al indexar bibliotecas con RAP:

- Revise la sección *Handling Adapter Plate (Manipulación de la placa adaptadora)* en la *TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq)* (n.º de referencia 15042173). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo descargar la guía desde el sitio web de Illumina.
- Illumina recomienda no someter la RAP a más de cuatro ciclos de congelación-descongelación. Para aumentar al máximo el uso de la RAP, procese más de 24 muestras a la vez. A continuación, estas muestras pueden agruparse en cualquier configuración compatible.

- Tampón de parada de ligadura



NOTA

No retire el tubo de mezcla de ligadura del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se le indique hacerlo en los procedimientos.

- Control de ligadura



NOTA

El uso del control de ligadura es opcional y puede sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire las bolas AMPure XP del lugar de almacenamiento y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.

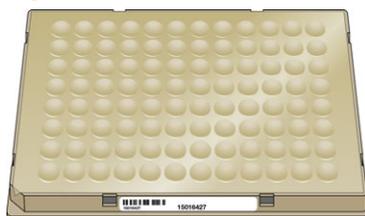
- ▶ Consulte las Best Practices (Prácticas óptimas) de *Handling Magnetic Beads* (Manipulación de bolas magnéticas). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
- ▶ Caliente previamente el ciclador térmico a 30 °C.
- ▶ Seleccione la opción de precalentar la tapa del ciclador térmico y establézcala en 100 °C
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras CAP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras PCR en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.

Adición de LIG

- 1 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se están utilizando tubos adaptadores de ARN, centrifugue los tubos descongelados a 600 × g durante 5 segundos.
 - Si se está utilizando una RAP:
 - Deje que se descongele la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente en la mesa. Inspeccione visualmente los pocillos para asegurarse de que están todos descongelados.
 - Retire el sello adhesivo de la placa adaptadora.
 - Centrifugue la placa a 280 × g durante 1 minuto para recoger todo el contenido del adaptador hasta el fondo del pocillo.
 - Retire la cubierta de plástico. Guarde la cubierta si no va a procesar toda la placa de una vez.
 - Si es la primera vez que usa esta RAP, adhiera la etiqueta de código de barras RAP en la placa.
- 2 Centrifugue los tubos del control de ligadura (en caso de que esté utilizando uno) y del tampón de parada de ligadura a 600 × g durante 5 segundos.
- 3 Inmediatamente antes de usarlo, retire el tubo de la mezcla de ligadura del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.
- 4 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.

- 5 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se está utilizando el reactivo de control en línea:
 - Diluya el control de ligadura en un tampón de resuspensión en una proporción de 1/100 (por ejemplo, 1 μ l de control de ligadura + 99 μ l de tampón de resuspensión) antes de utilizarlo. Deseche el control de ligadura diluido después de utilizarlo.
 - Añada 2,5 μ l del control de ligadura diluido en cada pocillo de la placa ALP.
 - Si no se está utilizando el reactivo de control en línea, añada 2,5 μ l de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa ALP.
- 6 Añada 2,5 μ l de mezcla de ligadura en cada pocillo de la placa ALP.
- 7 Vuelva a almacenar el tubo de la mezcla de ligadura inmediatamente después de utilizarlo a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.
- 8 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se están utilizando tubos adaptadores de ARN, añada 2,5 μ l de índice de adaptador de ARN descongelado en cada pocillo de la placa ALP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
 - Si se está utilizando una RAP:
 - Coloque la RAP en la mesa de manera que el código de barras del número de referencia, que se encuentra en el lado largo de la placa, esté orientado hacia usted y la esquina recortada se encuentre en la parte inferior izquierda.

Figura 4 Orientación correcta de la RAP



- Realice una de las siguientes acciones para perforar el cierre metálico:
 - Si va a emplear toda la placa de una vez, utilice la parte inferior de una placa de PCR con semi faldón de 96 pocillos limpia para realizar un agujero en todos los precintos de los pocillos a la vez. Con cuidado, pero con firmeza, presione la placa limpia sobre el cierre metálico.
 - Si va a emplear solo una parte de la placa, utilice la parte inferior de una gradilla de ocho tubos limpia con las tapas puestas para realizar agujeros en los precintos de los pocillos que se van a utilizar para la ligadura. Repita el proceso con una nueva gradilla de ocho tubos limpia con las tapas puestas en cada una de las filas o columnas de adaptadores que se vayan a utilizar para la ligadura.
 - Mediante una pipeta multicanal de ocho puntas, transfiera 2,5 μ l del adaptador de ARN descongelado desde el pocillo de la RAP a cada pocillo de la placa ALP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 9 Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - 10 Centrifugue la placa ALP a $280 \times g$ durante 1 minuto.

Incubación de ALP 2

- 1 Coloque la placa ALP sellada en el ciclador térmico precalentado. Cierre la tapa e incúbela a 30 °C durante 10 minutos.
- 2 Retire la placa ALP del ciclador térmico.

Adición de STL

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
- 2 Añada 5 μ l de tampón de parada de ligadura en cada pocillo de la placa ALP para desactivar la ligadura. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.

Limpieza de ALP

- 1 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial durante al menos 1 minuto o hasta que estén bien dispersas.

- 2 Añada 42 μl de bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la placa ALP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 3 Incube la placa ALP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 4 Coloque la placa ALP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 5 Extraiga 79,5 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa ALP y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.

**NOTA**

Deje la placa ALP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (6-8).

- 6 Mientras permanece la placa ALP en el soporte magnético, añada 200 μl de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 7 Incube la placa ALP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
- 8 Repita los pasos 6 y 7 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 9 Deje que las muestras se sequen al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras permanece la placa ALP en el soporte magnético.
- 10 Retire la placa ALP del soporte magnético.
- 11 Añada 52,5 μl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa ALP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente o hasta que las bolas se resuspendan totalmente.
- 12 Incube la placa ALP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 13 Coloque la placa ALP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 14 Transfiera 50 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa ALP al pocillo correspondiente de la nueva placa de PCR de 0,3 ml etiquetada con el código de barras CAP. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
- 15 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial hasta que estén bien dispersas.

- 16 Añada 50 μl de bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la placa CAP para llevar a cabo una segunda limpieza. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 17 Incube la placa CAP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 18 Coloque la placa CAP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 19 Extraiga 95 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa CAP y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.

**NOTA**

Deje la placa CAP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (20-22).

- 20 Mientras permanece la placa CAP en el soporte magnético, añada 200 μl de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
- 21 Incube la placa CAP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
- 22 Repita los pasos 20 y 21 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 23 Deje que las muestras se sequen al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras permanece la placa CAP en el soporte magnético y, a continuación, retírela del soporte.
- 24 Añada 22,5 μl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa CAP. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente o hasta que las bolas se resuspendan totalmente.
- 25 Incube la placa CAP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 26 Coloque la placa CAP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 27 Transfiera 20 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa CAP al pocillo correspondiente de la nueva placa de PCR de 0,3 ml etiquetada con el código de barras PCR. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente a *Enriquecimiento de fragmentos de ADN*, en la página 49, puede detener con seguridad el protocolo en este punto. Si va a detenerse, selle la placa de PCR con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete días como máximo.

Enriquecimiento de fragmentos de ADN

En este proceso, se utiliza la PCR para enriquecer de manera selectiva aquellos fragmentos de ADN que tienen moléculas adaptadoras en ambos extremos y para amplificar la cantidad de ADN en la biblioteca. La PCR se lleva a cabo con una mezcla de cebadores de PCR que se hibrida con los extremos de los adaptadores. Reduzca al mínimo el número de ciclos de PCR para evitar desviaciones en la representación de la biblioteca.



NOTA

La PCR enriquece los fragmentos que tienen adaptadores ligados en ambos extremos. Los fragmentos con uno o ningún adaptador en sus extremos son subproductos de ineficiencias en la reacción de ligadura. Ninguno puede utilizarse para realizar grupos. Los fragmentos sin ningún adaptador no pueden hibridarse con cebadores unidos a la superficie en la celda de flujo. Los fragmentos con un adaptador en un solo extremo pueden hibridarse con cebadores unidos a la superficie, pero no pueden formar grupos.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla maestra de PCR (PMM)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Mezcla de cebadores de PCR (PPC)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Etiqueta de código de barras TSP1 (placa de muestras objetivo)	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illumina
Placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas AMPure XP	50 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Etanol (EtOH) al 80 % recién preparado	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire la mezcla maestra de PCR y la mezcla de cebadores de PCR del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y deje que se descongelen a temperatura ambiente.
- ▶ Centrifugue la mezcla maestra de PCR y los tubos de mezcla de cebadores de PCR descongelados a 600 × g durante 5 segundos.
- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire las bolas AMPure XP del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.
- ▶ Consulte las Best Practices (Prácticas óptimas) de *Handling Magnetic Beads* (Manipulación de bolas magnéticas). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
- ▶ Retire la placa de PCR del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C en caso de que se almacenara al concluir la *Limpieza de ALP*, en la página 45.
 - Deje que se descongele a temperatura ambiente.
 - Centrifugue la placa de PCR descongelada a 280 × g durante 1 minuto.
 - Retire el sello adhesivo de la placa de PCR descongelada.

- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el siguiente programa y guárdelo como **PCR**:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - 98 °C durante 30 segundos
 - 15 ciclos de:
 - 98 °C durante 10 segundos
 - 60 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 5 minutos
 - Mantenga la temperatura a 4 °C
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras TSP1 en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.

Realización de PCR

- 1 Añada 5 µl de la mezcla de cebadores de PCR descongelada en cada pocillo de la placa de PCR.
- 2 Añada 25 µl de la mezcla maestra de PCR descongelada en cada pocillo de la placa de PCR. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 3 Selle la placa de PCR con un sello adhesivo Microseal “B”.

Amplificación de PCR

- 1 Coloque la placa de PCR sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute **PCR** para amplificar la placa.
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - b 98 °C durante 30 segundos
 - c 15 ciclos de:
 - 98 °C durante 10 segundos
 - 60 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 30 segundos
 - d 72 °C durante 5 minutos
 - e Mantenga la temperatura a 4 °C

Limpieza de PCR

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa de PCR.
- 2 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial hasta que estén bien dispersas.
- 3 Realice una de las siguientes acciones en función del tipo de adaptador utilizado:
 - En caso de utilizar los tubos adaptadores de ARN, añada 50 μl de las bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la placa de PCR que contiene 50 μl de la biblioteca amplificada de PCR. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
 - En caso de utilizar la RAP, añada 47,5 μl de las bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la placa de PCR que contiene 50 μl de la biblioteca amplificada de PCR. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 4 Incube la placa de PCR a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 5 Coloque la placa de PCR en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 6 Extraiga 95 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa de PCR y deséchelo.



NOTA

Deje la placa de PCR en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (7-9).

- 7 Mientras permanece la placa de PCR en el soporte magnético, añada 200 μl de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 8 Incube la placa de PCR a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo.
- 9 Repita los pasos 7 y 8 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 10 Deje que las muestras se sequen al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras permanece la placa de PCR en el soporte magnético y, a continuación, retírela del soporte.
- 11 Añada 32,5 μl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa de PCR. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.

- 12 Incube la placa de PCR a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 13 Coloque la placa de PCR en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 14 Transfiera 30 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa de PCR al pocillo correspondiente de la nueva placa de PCR de 0,3 ml etiquetada con el código de barras TSP1.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente a *Validación de bibliotecas*, en la página 54, puede detener con seguridad el protocolo en este punto. Si va a detenerse, selle la placa TSP1 con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre -15°C y -25°C durante 7 días como máximo.

Validación de bibliotecas

Ilumina recomienda realizar los siguientes procedimientos para el análisis del control de calidad de la biblioteca de muestras y la cuantificación de las plantillas de bibliotecas de ADN.

Cuantificación de bibliotecas

Para lograr que los datos tengan la máxima calidad posible en las plataformas de secuenciación de Illumina, es importante crear densidades de grupos óptimas en cada carril de la celda de flujo. Para optimizar las densidades de grupos, es necesario realizar una cuantificación exacta de las plantillas de bibliotecas de ADN. Cuantifique sus bibliotecas mediante qPCR de conformidad con la *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* (Guía de cuantificación de bibliotecas de secuenciación mediante qPCR) (n.º de referencia 11322363) de Illumina.

Control de calidad

- 1 Cargue 1 µl de la construcción resuspendida en un bioanalizador Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer utilizando un chip específico para ADN como el Agilent DNA 1000.
- 2 Compruebe el tamaño y la pureza de la muestra. El producto final debe ser una banda de aproximadamente 260 pb.

Figura 5 Ejemplo de la distribución del tamaño de la biblioteca para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq

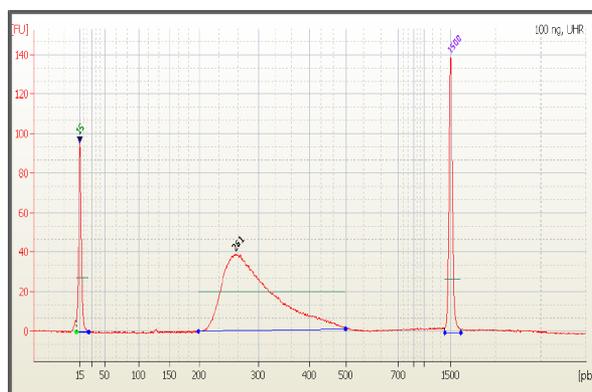
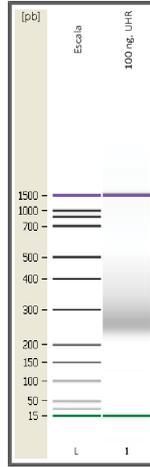


Figura 6 Producto de la PCR de 260 pb para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq



Normalización y agrupación de bibliotecas

En este proceso, se describe cómo preparar plantillas de ADN para la generación de grupos. Las bibliotecas de ADN indexadas se normalizan a 10 nM en la placa de DCT y, a continuación, se agrupan en volúmenes iguales en la placa PDP. Las bibliotecas de ADN que no haya que agrupar se normalizan a 10 nM en la placa de DCT.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • DCT (plantilla de grupos diluidos) • PDP (placa de DCT agrupada) (solo para agrupación) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Ilumina
Placas MIDI de 96 pocillos	2 (la segunda placa sirve solo para agrupación si se agrupan >40 muestras)	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml (sirve solo para agrupación si se agrupan ≤40 muestras)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 con Tween 20 al 0,1 %	Suficiente para normalizar la concentración de cada biblioteca de muestras a 10 nM	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire la placa TSP1 del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caso de que se almacenara al concluir la *Limpieza de PCR*, en la página 52.
 - Deje que se descongele a temperatura ambiente.
 - Centrifugue la placa TSP1 descongelada a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - Retire el sello adhesivo de la placa TSP1 descongelada.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras DCT en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.
- ▶ [Solo en caso de agrupación] Adhiera una etiqueta de código de barras PDP en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml si se van a agrupar ≤ 40 muestras o en una placa MIDI de 96 pocillos si se van a agrupar > 40 muestras.

Realización de DCT

- 1 Transfiera 10 μl de la biblioteca de muestras de cada pocillo de la placa TSP1 al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras DCT.
- 2 Normalice la concentración de la biblioteca de muestras de cada pocillo de la placa de DCT a 10 nM utilizando Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 con Tween 20 al 0,1 %.



NOTA

En función de los datos de cuantificación del rendimiento de cada biblioteca de muestras, el volumen definitivo de la placa de DCT puede ir de 10 a 400 μl .

- 3 Pipetee con cuidado todo el volumen de la biblioteca de muestras normalizada arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
- 4 Realice una de las siguientes acciones en función del tipo de biblioteca que desee generar:
 - En el caso de las bibliotecas no agrupadas, el protocolo termina en este punto. Realice una de las siguientes acciones:
 - Proceda con la generación de grupos. Para obtener más información, consulte la sección de generación de grupos de la guía del usuario de su plataforma de Illumina.
 - Selle la placa de DCT con un sello adhesivo Microseal “B” y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - En el caso de las bibliotecas agrupadas, proceda a *Realización de PDP (solo en caso de agrupación)*.

Realización de PDP (solo en caso de agrupación)



NOTA

No realice una placa PDP si no está agrupando muestras.

- 1 Determine el número de muestras que desea combinar para cada agrupación.



NOTA

Tenga en cuenta la muestra que hay en cada pocillo para evitar agrupar dos muestras con el mismo índice.

- 2 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si va a agrupar entre 2 y 24 muestras:
 - Transfiera 10 μ l de cada biblioteca de muestras normalizada que va a agruparse de la placa de DCT a un pocillo de la nueva placa de PCR de 0,3 ml etiquetada con el código de barras PDP.

El volumen total en cada pocillo de la placa PDP es 10 veces el número de las bibliotecas de muestras combinadas y de 20-240 μ l (2-24 bibliotecas). Por ejemplo, el volumen para dos muestras es de 20 μ l, para 12 muestras, de 120 μ l y para 24 muestras, de 240 μ l.
 - Si va a agrupar entre 25 y 96 muestras:
 - Mediante una pipeta multicanal, transfiera 5 μ l de cada biblioteca de muestras normalizada de la columna 1 de la placa de DCT a la columna 1 de la nueva placa MIDI o de PCR de 0,3 ml etiquetada con el código de barras PDP.
 - Transfiera 5 μ l de cada biblioteca de muestras normalizada de la columna 2 de la placa de DCT a la columna 1 de la placa PDP.
 - Repita la transferencia tantas veces como columnas queden en la placa de DCT. El resultado es una placa PDP con las muestras agrupadas en la columna 1. Pipetee con cuidado todo el volumen de cada pocillo de la columna 1 arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.
 - Combine el contenido de cada pocillo de la columna 1 en el pocillo A2 de la placa PDP para la agrupación definitiva.
- 3 Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo 10 veces para mezclarlo completamente.

- 4 Realice una de las siguientes acciones:
 - Proceda con la generación de grupos. Para obtener más información, consulte la guía del usuario de su secuenciador de Illumina.
 - Selle la placa PDP con un sello adhesivo Microseal “B” y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Protocolo de alto número de muestras (HS)

Introducción	62
Flujo de trabajo de la preparación de muestras	64
Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero	65
Síntesis de ADNc de la primera cadena	74
Síntesis de ADNc de la segunda cadena	77
Adenilación de extremos 3'	82
Ligadura de adaptadores	85
Enriquecimiento de fragmentos de ADN	94
Validación de bibliotecas	99
Normalización y agrupación de bibliotecas	101



Introducción

En este capítulo, se describe el protocolo HS de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. Illumina recomienda las siguientes combinaciones de protocolo, número de muestras y kits:

Tabla 7 Recomendaciones sobre el número de muestras y el kit

Número de muestras procesadas a la vez	Kit recomendado
<24	LT
24-48	LT o HT
>48	HT

Tabla 8 Recomendaciones sobre kits y protocolos

Kit	Número de muestras admitidas por kit	Número de muestras procesadas a la vez	Protocolo
LT	48	≤48	Bajo número de muestras, LS
		>48	Alto número de muestras, HS
HT	96	≤24	Bajo número de muestras, LS
		>24	Alto número de muestras, HS

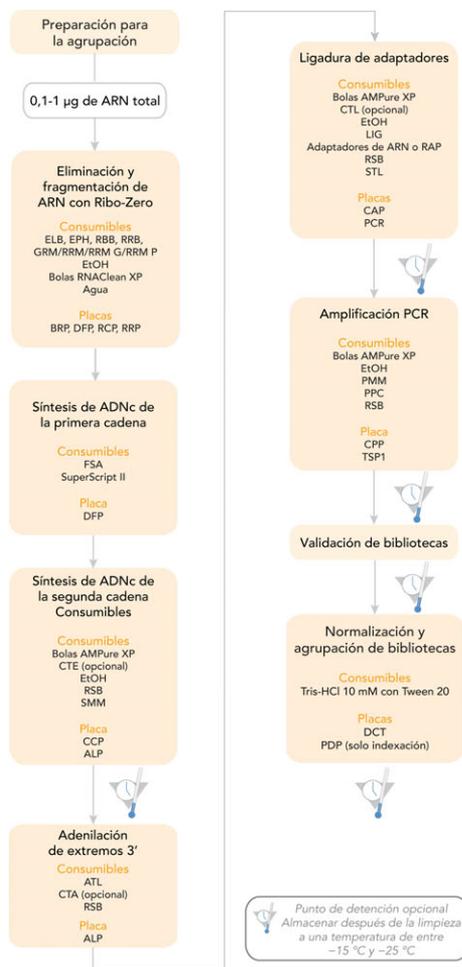
- ▶ Siga el protocolo en el orden descrito, con los volúmenes y los parámetros de incubación especificados.

- ▶ Antes de proceder, revise los siguientes documentos:
 - Best Practices (Prácticas óptimas): consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
 - *TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq)* (n.º de referencia 15042173): consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo descargar la guía desde el sitio web de Illumina.
 - Apéndice A Información de apoyo: sirve para confirmar el contenido del kit y asegurarse de que ha obtenido todos los consumibles y equipos necesarios para el protocolo HS.

Flujo de trabajo de la preparación de muestras

A continuación, se ilustran los procesos del protocolo HS de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq para preparar plantillas mediante 24 tubos adaptadores indexados o una placa adaptadora de ARN (RAP, RNA Adapter Plate).

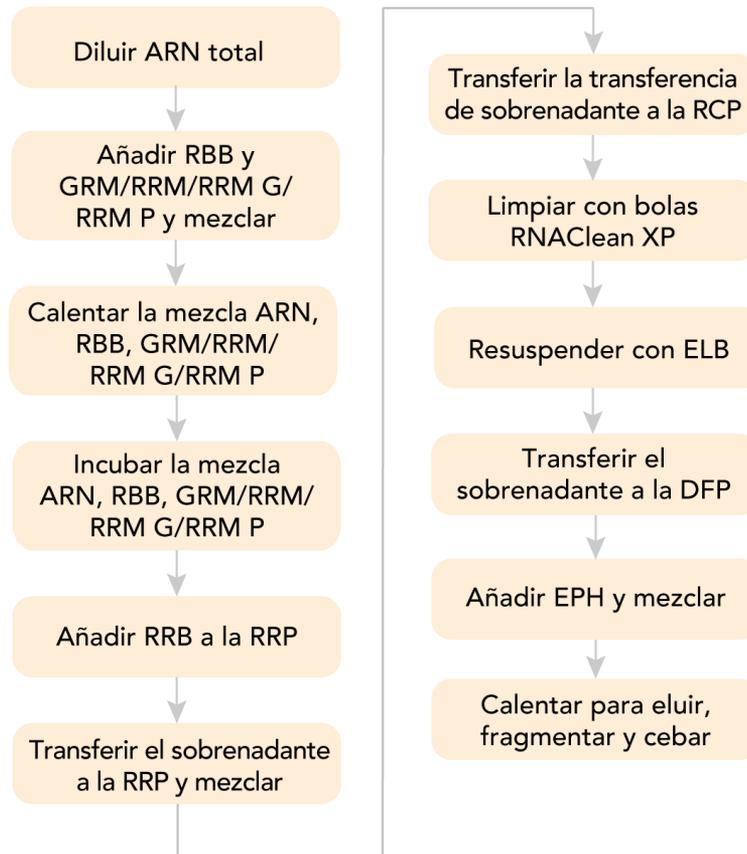
Figura 7 Flujo de trabajo de HS de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq



Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero

Con este proceso, se elimina el ARNr del ARN total. Tras eliminar el ARNr, el ARN restante se purifica, se fragmenta y se ceba para la síntesis de ADNc. Es importante seguir este procedimiento de purificación al pie de la letra para garantizar la reproducibilidad. Consulte el siguiente diagrama mientras realiza los procedimientos:

Figura 8 Flujo de trabajo de purificación para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq




NOTA

Illumina recomienda utilizar para este proceso entre 0,1 µg y 1 µg de ARN total y placas de PCR con un soporte magnético de placas.


NOTA

Deje que las bolas de eliminación de ARNr y las bolas RNAClean XP formen un pellet completo sobre el soporte magnético durante 1 y 5 minutos respectivamente. Extraiga el sobrenadante de las bolas inmediatamente mientras siguen sedimentadas sobre el soporte magnético. No deje que se sequen los pellets de las bolas de eliminación de ARNr.


NOTA

En los pasos de lavado con bolas RNAClean XP, se utiliza etanol al 70 % y, en los de lavado con bolas AMPure XP, etanol al 80 %.

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución (EPH)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de elución (ELB)	1 tubo para 48 reacciones	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
En función del kit utilizado, uno de los siguientes elementos: <ul style="list-style-type: none"> • Mezcla de eliminación de globinas (GRM) (contenido del kit Ribo-Zero Globin) • Mezcla de eliminación de ARNr (RRM) (contenido del kit Ribo-Zero para humano/ratón/rata) • Mezcla de eliminación de ARNr: Gold (RRM G) (contenido del kit Ribo-Zero Gold) • Mezcla de eliminación de ARNr: Plant (RRM P) (contenido del kit Ribo-Zero Plant) 	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Tampón de ligadura de ARNr (RBB)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Bolas de eliminación de ARNr (RRB)	1 tubo para 48 reacciones	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • BRP (placa de ligadura de ARNr) • DFP (placa de fragmentación de ARN sometido a eliminación) • RCP (placa de limpieza de ARN) • RRP (placa de eliminación de ARNr) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illustra
Placas HSP de 96 pocillos	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placas MIDI de 96 pocillos	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Etolol (EtOH) al 70 % recién preparado	200 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas RNAClean XP	99 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	6	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	6	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Agua ultrapura	Suficiente para diluir cada muestra de ARN total hasta obtener un volumen definitivo de 10 µl	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y descongéelos a temperatura ambiente:
 - Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución
 - En función del kit utilizado, uno de los siguientes elementos:
 - Mezcla de eliminación de globinas
 - Mezcla de eliminación de ARNr
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Gold
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Plant
 - Tampón de ligadura de ARNr
 - Tampón de resuspensión



NOTA

El tampón de resuspensión se puede almacenar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C tras la descongelación inicial.

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcancen la temperatura ambiente:
 - Tampón de elución
 - Bolas de eliminación de ARNr
- ▶ Retire las bolas RNAClean XP del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.

- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con los siguientes programas:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - 68 °C durante 5 minutos: guardar como **RNA Denaturation** (Desnaturalización de ARN)
 - 94 °C durante 8 minutos, mantener la temperatura a 4 °C: guardar como **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar)



NOTA

En el caso de los fragmentos superiores a 120-200 pb con una mediana de tamaño de 150 pb o en caso de que se empiece con ARN total degradado, consulte Apéndice B Protocolos de fragmentación alternativos para ver los ajustes apropiados del programa **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar).

- ▶ Ajuste la centrifugadora en una temperatura de entre 15 °C y 25 °C, en caso de estar refrigerados los elementos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras BRP en una nueva placa HSP de 96 pocillos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras DFP en una nueva placa HSP de 96 pocillos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras RCP en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras RRP en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.

Realización de BRP

- 1 Diluya el ARN total con agua ultrapura exenta de nucleasas para lograr un volumen definitivo de 10 µl en la nueva placa HSP de 96 pocillos etiquetada con el código de barras BRP.
- 2 Añada 5 µl de tampón de ligadura de ARNr en cada pocillo de la placa BRP.
- 3 Añada 5 µl de uno de los reactivos siguientes en cada pocillo de la placa BRP en función del kit que esté usando:
 - Mezcla de eliminación de globinas
 - Mezcla de eliminación de ARNr
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Gold
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Plant

- 4 Mezcle el contenido de la placa BRP completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa BRP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa BRP en un agitador de microplacas continuamente a 1600 r/min durante 20 segundos.
- 5 Centrifugue la placa BRP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 6 Vuelva a almacenar los siguientes elementos a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$:
 - Tampón de ligadura de ARNr
 - En función del kit utilizado, uno de los siguientes elementos:
 - Mezcla de eliminación de globinas
 - Mezcla de eliminación de ARNr
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Gold
 - Mezcla de eliminación de ARNr: Plant

Incubación de BRP 1

- 1 Coloque la placa BRP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute el programa **RNA Denaturation** (Desnaturalización de ARN).
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - b $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos
- 2 Pasados 5 minutos de incubación, coloque la placa BRP en la mesa e incúbela a temperatura ambiente durante 1 minuto.

Realización de RRP

- 1 Mezcle en un mezclador vorticial el tubo de bolas de eliminación de ARNr enérgicamente a temperatura ambiente para resuspender las bolas.
- 2 Añada $35\text{ }\mu\text{l}$ de bolas de eliminación de ARNr en cada pocillo de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada con el código de barras RRP.



NOTA

Es importante no omitir este paso añadiendo las bolas a la muestra de la placa BRP. Al añadirse la muestra de la placa BRP a las bolas de la placa RRP en el paso 3, se garantizará un rendimiento óptimo.

- 3 Retire el sello adhesivo de la placa BRP.
- 4 Transfiera todo el contenido (20 μ l) de cada pocillo de la placa BRP al pocillo correspondiente de la placa RRP que contiene las bolas de eliminación de ARNr.
- 5 Mezcle el contenido de la placa RRP completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa RRP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - b Agite la placa RRP en un agitador de microplacas continuamente a 1000 r/min durante 1 minuto.
- 6 Retire el sello adhesivo de la placa RRP.
- 7 Coloque la placa RRP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 8 Transfiera todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa RRP al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada con el código de barras RCP.
- 9 Coloque la placa RCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 1 minuto.



NOTA

Si queda alguna bola en los pocillos de la placa RCP, coloque dicha placa en el soporte magnético durante 1 minuto y, a continuación, transfiera el sobrenadante a una nueva placa MIDI. Repita esto tantas veces como sea necesario hasta que no queden bolas. La última placa MIDI será la placa RCP utilizada durante la limpieza de RCP.

- 10 Vuelva a almacenar las bolas de eliminación de ARNr a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

Limpieza de RCP

- 1 Mezcle en un mezclador vorticial las bolas RNAClean XP hasta que estén bien dispersas y, a continuación, añada 99 μ l de bolas RNAClean XP bien mezcladas en cada pocillo de la placa RCP que contiene ARN cuya parte ribosómica se ha eliminado. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:



NOTA

Si se empieza con ARN total degradado, añada 193 μ l de bolas RNAClean XP bien mezcladas en cada pocillo de la placa RCP que contiene ARN cuya parte ribosómica se ha eliminado.

- a Selle la placa RCP con un sello adhesivo Microseal “B”.
- b Agite la placa RCP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.

- 2 Incube la placa RCP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 3 Retire el sello adhesivo de la placa RCP.
- 4 Coloque la placa RCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurarse de que todas las bolas se han fijado en el lado de los pocillos.
- 5 Extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa RCP y deséchelo.



NOTA

Deje la placa RCP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 70 % (6-7).

- 6 Mientras permanece la placa RCP en el soporte magnético, añada 200 μ l de EtOH al 70 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 7 Incube la placa RCP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo.
- 8 Deje que la placa RCP repose a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se seque y, a continuación, retírela del soporte magnético.
- 9 Centrifugue el tampón de elución descongelado a temperatura ambiente a 600 \times g durante 5 segundos.
- 10 Añada 11 μ l de tampón de elución en cada pocillo de la placa RCP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa RCP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa RCP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 11 Incube la placa RCP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 12 Centrifugue la placa RCP a 280 \times g durante 1 minuto.
- 13 Retire el sello adhesivo de la placa RCP.
- 14 Coloque la placa RCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 15 Vuelva a almacenar el tampón de elución a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 16 Transfiera 8,5 μ l de sobrenadante de la placa RCP a la nueva placa HSP de 96 pocillos etiquetada con el código de barras DFP.

- 17 Añada 8,5 μ l de mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución en cada pocillo de la placa DFP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa DFP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa DFP en un agitador de microplacas continuamente a 1600 r/min durante 20 segundos.
- 18 Vuelva a almacenar la mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución a una temperatura de entre -15°C y -25°C y el tubo de bolas RNAClean XP a una temperatura de entre 2°C y 8°C .

Incubación de DFP 1

- 1 Coloque la placa DFP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y seleccione **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar) para fragmentar y cebar el ARN.



NOTA

Si se empieza con ARN total degradado, asegúrese de que se han definido los ajustes adecuados del programa **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar). Consulte Apéndice B Protocolos de fragmentación alternativos para obtener más información.

- a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100°C
 - b 94°C durante 8 minutos
 - c Mantenga la temperatura a 4°C
- 2 Retire la placa DFP del ciclador térmico cuando alcance los 4°C y centrifúguela durante unos breves instantes.
 - 3 Proceda inmediatamente a *Síntesis de ADNc de la primera cadena*, en la página 74.

Síntesis de ADNc de la primera cadena

En este proceso, se realiza una transcripción inversa de los fragmentos de ARN segmentados que se han cebado con hexámeros aleatorios en el ADNc de la primera cadena mediante la transcriptasa inversa y cebadores aleatorios. La adición de dactinomicina a la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena (FSA) evita una síntesis falsa dependiente de ADN a la vez que permite la síntesis dependiente de ARN, lo que mejora la especificidad de la cadena.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla Act D de síntesis de la primera cadena (FSA)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Sello adhesivo Microseal "B"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Transcriptasa inversa SuperScript II	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Usuario



ADVERTENCIA

La mezcla Act D de síntesis de la primera cadena contiene una toxina llamada dactinomicina. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Deseche los contenedores y el contenido no utilizado de conformidad con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Consulte la hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS) de los productos para obtener información ambiental, de higiene y de seguridad y detallada. Las MSDS de este kit están disponibles en el sitio web de Illustrina, en www.illustrina.com/msds.

Preparación

- ▶ Retire un tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y deje que se descongele a temperatura ambiente.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el siguiente programa y guárdelo como **Synthesize 1st Strand** (Síntesis de la primera cadena):
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - 25 °C durante 10 minutos
 - 42 °C durante 15 minutos
 - 70 °C durante 15 minutos
 - Mantenga la temperatura a 4 °C
- ▶ Asegúrese de que el agitador de microplacas está correctamente calibrado a 1000 r/min mediante un estroboscopio.



NOTA

La mezcla Act D de síntesis de la primera cadena a la que se le ha añadido SuperScript II es estable frente a ciclos de congelación-descongelación adicionales y puede utilizarse para experimentos posteriores. Si se prevé la realización de más de seis ciclos de congelación-descongelación, divida la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena y SuperScript II en alícuotas más pequeñas y almacénelas a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C .

Adición de FSA

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa DFP.
- 2 Centrifugue el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena descongelada a $600 \times g$ durante 5 segundos.
- 3 Añada $50\text{ }\mu\text{l}$ de SuperScript II en el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena. Mezcle los componentes con cuidado, pero concienzudamente, y centrifugue durante unos breves instantes. Si no va a utilizar todo el contenido del tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena, añada SuperScript II en una proporción de $1\text{ }\mu\text{l}$ de SuperScript por cada $9\text{ }\mu\text{l}$ de mezcla Act D de síntesis de la primera cadena. Etiquete el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena para indicar que se le ha añadido SuperScript II.

- 4 Añada 8 μ l de mezcla Act D de síntesis de la primera cadena y de mezcla SuperScript II en cada pocillo de la placa DFP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa DFP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa DFP en un agitador de microplacas continuamente a 1600 r/min durante 20 segundos.
- 5 Vuelva a almacenar el tubo de la mezcla Act D de síntesis de la primera cadena inmediatamente después de utilizarlo a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Incubación de DFP 2

- 1 Coloque la placa DFP sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y seleccione **Synthesize 1st Strand** (Sintetizar primera cadena).
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - b $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos
 - c $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos
 - d $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos
 - e Mantenga la temperatura a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 2 Cuando el ciclador térmico alcance los $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, retire la placa DFP del ciclador y proceda inmediatamente a *Síntesis de ADNc de la segunda cadena*, en la página 77.

Síntesis de ADNc de la segunda cadena

En este proceso, se elimina la plantilla de ARN y se sintetiza una cadena de sustitución, que incorpora dUTP en lugar de dTTP para generar ADNc bicatenario. Al incorporarse el dUTP, se desactiva la segunda cadena durante la amplificación, ya que no se incorpora la polimerasa pasado este nucleótido. Las bolas AMPure XP se utilizan para separar el ADNc bicatenario de la mezcla de la reacción de la segunda cadena. Al final del proceso, tiene como resultado ADNc con extremos romos.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
(Opcional) Control de reparación de extremos (CTE)	1 tubo para 48 reacciones	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena (SMM)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • ALP (placa de ligadura de adaptadores) • CCP (placa de limpieza de ADNc) • IMP (placa de modificación de fragmentos) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illustra
Placas MIDI de 96 pocillos	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas AMPure XP	90 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Etanol (EtOH) al 80 % recién preparado	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Sellos adhesivos Microseal "B"	4	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y descongélelos a temperatura ambiente:

- Control de reparación de extremos



NOTA

El uso del control de reparación de extremos es opcional y puede sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

- Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena
- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire las bolas AMPure XP del lugar de almacenamiento y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.
- ▶ Consulte las Best Practices (Prácticas óptimas) de *Handling Magnetic Beads* (Manipulación de bolas magnéticas). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
- ▶ Caliente previamente el ciclador térmico a 16 °C.
- ▶ Seleccione la opción de precalentar la tapa del ciclador térmico y establézcala en 30 °C
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras ALP en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras CCP en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.

Adición de SMM

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa DFP.
- 2 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se está utilizando el reactivo de control en línea:
 - Centrifugue el tubo de control de reparación de extremos descongelado a $600 \times g$ durante 5 segundos.
 - Diluya el control de reparación de extremos en un tampón de resuspensión en una proporción de 1/50 (por ejemplo, 2 μl de control de reparación de extremos + 98 μl de tampón de resuspensión) antes de utilizarlo. Deseche el control de reparación de extremos diluido después de utilizarlo.
 - Añada 5 μl de control de reparación de extremos diluido en cada pocillo de la placa DFP.
 - Si no se está utilizando el reactivo de control en línea, añada 5 μl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa DFP.
- 3 Centrifugue la mezcla maestra de marcación de la segunda cadena descongelada a $600 \times g$ durante 5 segundos.
- 4 Añada 20 μl de mezcla maestra de marcación de la segunda cadena descongelada en cada pocillo de la placa DFP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa DFP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - b Agite la placa DFP en un agitador de microplacas continuamente a 1600 r/min durante 20 segundos.
- 5 Vuelva a almacenar el tubo de la mezcla maestra de marcación de la segunda cadena a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ después de utilizarlo.

Incubación de DFP 3

- 1 Coloque la placa DFP sellada en el ciclador térmico precalentado. Cierre la tapa e incúbela a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora.
- 2 Retire la placa DFP del ciclador térmico y colóquela en la mesa.
- 3 Retire el sello adhesivo de la placa DFP.
- 4 Deje reposar la placa DFP para que alcance la temperatura ambiente.

Limpieza de DFP

- 1 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial hasta que estén bien dispersas.
- 2 Añada 90 μ l de bolas AMPure XP bien mezcladas en cada pocillo de la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras CCP.
- 3 Transfiera todo el contenido de cada pocillo de la placa DFP al pocillo correspondiente de la placa CCP que contiene las bolas AMPure XP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa CCP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa CCP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 4 Incube la placa CCP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 5 Centrifugue la placa CCP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 6 Retire el sello adhesivo de la placa CCP.
- 7 Coloque la placa CCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurarse de que todas las bolas se han fijado en el lado de los pocillos.
- 8 Extraiga 135 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa CCP y deséchelo.



NOTA

Deje la placa CCP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (9-11).

- 9 Mientras permanece la placa CCP en el soporte magnético, añada 200 μ l de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 10 Incube la placa CCP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo.
- 11 Repita los pasos 9 y 10 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 12 Deje que la placa CCP repose a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se seque y, a continuación, retírela del soporte magnético.
- 13 Centrifugue el tampón de resuspensión descongelado a temperatura ambiente a $600 \times g$ durante 5 segundos.

- 14 Añada 17,5 μ l de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa CCP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa CCP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa CCP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 15 Incube la placa CCP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 16 Centrifugue la placa CCP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 17 Retire el sello adhesivo de la placa CCP.
- 18 Coloque la placa CCP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 19 Transfiera 15 μ l de sobrenadante (ADNc bicatenario) de la placa CCP a la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras ALP.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente a *Adenilación de extremos 3'*, en la página 82, puede detener con seguridad el protocolo en este punto. Si va a detenerse, selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre -15°C y -25°C durante 7 días como máximo.

Adenilación de extremos 3'

Se agrega un solo nucleótido “A” a los extremos 3’ de los fragmentos romos para evitar que ligen unos con otros durante la reacción de ligadura de adaptadores. Un único nucleótido “T” correspondiente en el extremo 3’ del adaptador proporciona una protuberancia complementaria para ligar el adaptador al fragmento. Esta estrategia garantiza un bajo índice de formación de quimeras (cadena molde concatenada).

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
(Opcional) Control de A-Tailing (CTA)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Ilumina
Mezcla de A-Tailing (ATL)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Ilumina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Ilumina
Hielo	El que sea necesario para establecer la temperatura de la placa	Entre -15 °C y -25 °C	Usuario
Sello adhesivo Microseal “B”	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongélelos a temperatura ambiente:

- Control de A-Tailing



NOTA

El uso del control de A-Tailing es opcional y puede sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

- Mezcla de A-Tailing
- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire la placa ALP del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caso de que se almacenara al concluir la *Limpieza de DFP*, en la página 80.
 - Deje que se descongele a temperatura ambiente.
 - Centrifugue la placa ALP descongelada a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
- ▶ Precaliente dos sistemas de microcalentamiento: el sistema 1 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el sistema 2 a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ▶ Prepare hielo para enfriar la placa.

Adición de ATL

- 1 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se está utilizando el reactivo de control en línea:
 - Centrifugue el tubo del control de A-Tailing descongelado a $600 \times g$ durante 5 segundos.
 - Diluya el control de A-Tailing en un tampón de resuspensión en una proporción de 1/100 (por ejemplo, $1\text{ }\mu\text{l}$ de control de A-Tailing + $99\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de resuspensión) antes de utilizarlo. Deseche el control de A-Tailing diluido después de utilizarlo.
 - Añada $2,5\text{ }\mu\text{l}$ del control de A-Tailing diluido en cada pocillo de la placa ALP.
 - Si no se está utilizando el reactivo de control en línea, añada $2,5\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa ALP.

- 2 Añada 12,5 µl de mezcla de A-Tailing descongelada en cada pocillo de la placa ALP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa ALP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 3 Centrifugue la placa ALP a $280 \times g$ durante 1 minuto.

Incubación de ALP 1

- 1 Coloque la placa ALP sellada en el sistema de microcalentamiento 1 calentado previamente. Cierre la tapa e incube a 37 °C durante 30 minutos.
- 2 Inmediatamente después de la incubación a 37 °C, retire la placa ALP del sistema 1 y colóquela en el sistema de microcalentamiento 2 calentado previamente. Cierre la tapa e incube a 70 °C durante 5 minutos.
- 3 Establezca la temperatura del sistema de microcalentamiento 1 en 30 °C para preparar la *Ligadura de adaptadores*.
- 4 Retire inmediatamente la placa ALP del sistema de microcalentamiento 2 y colóquela en hielo durante 1 minuto.
- 5 Proceda inmediatamente a la *Ligadura de adaptadores*, en la página 85.

Ligadura de adaptadores

En este proceso, se ligan adaptadores de indexación a los extremos de los fragmentos de ADNc bicatenario y se preparan para la hibridación en una celda de flujo.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
(Opcional) Control de ligadura (CTL)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
En función del kit utilizado, elija uno de los siguientes elementos: <ul style="list-style-type: none"> Contenido del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq: <ul style="list-style-type: none"> Índices de adaptadores de ARN (AR001-AR016, AR018-AR023, AR025, AR027) Contenido del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq: <ul style="list-style-type: none"> RAP (placa adaptadora de ARN) 	1 tubo de cada índice utilizado, por columna de 8 reacciones o 1 RAP	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Mezcla de ligadura (LIG)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Tampón de parada de ligadura (STL)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • CAP (placa ALP de limpieza) • PCR (placa de reacción en cadena de la polimerasa) • RAP (placa adaptadora de ARN) (si se usa el kit HT) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Ilumina
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas AMPure XP	92 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Etanol (EtOH) al 80 % recién preparado	800 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	7	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	4-28	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	4-28	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire los siguientes elementos del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y descongéelos a temperatura ambiente:
 - Tubos adaptadores de ARN apropiados (dependiendo de los índices de adaptadores de ARN utilizados) o la RAP.



NOTA

- Revise la *TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq)* (n.º de referencia 15042173). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo descargar la guía desde el sitio web de Illumina.
- Al indexar bibliotecas con tubos de índices de adaptadores, Illumina recomienda organizar las muestras que van a combinarse en un grupo común en la misma fila. Además, incluya un índice común en cada columna. Esto facilitará las operaciones de pipeteo cuando se dispensen adaptadores indexados y al agrupar bibliotecas indexadas en un paso posterior del protocolo.
- Al indexar bibliotecas con la RAP, organice las muestras que se van a agrupar en la misma orientación que los índices en la RAP.



NOTA

Al indexar bibliotecas con RAP:

- Revise la sección *Handling Adapter Plate (Manipulación de la placa adaptadora)* en la *TruSeq Sample Preparation Pooling Guide (Guía de agrupación para la preparación de muestras TruSeq)* (n.º de referencia 15042173). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo descargar la guía desde el sitio web de Illumina.
 - Illumina recomienda no someter la RAP a más de cuatro ciclos de congelación-descongelación. Para aumentar al máximo el uso de la RAP, procese más de 24 muestras a la vez. A continuación, estas muestras pueden agruparse en cualquier configuración compatible.
- Tampón de parada de ligadura



NOTA

No retire el tubo de mezcla de ligadura del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se le indique hacerlo en los procedimientos.

- Control de ligadura



NOTA

El uso del control de ligadura es opcional y puede sustituirse por el mismo volumen de tampón de resuspensión.

- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire las bolas AMPure XP del lugar de almacenamiento y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.

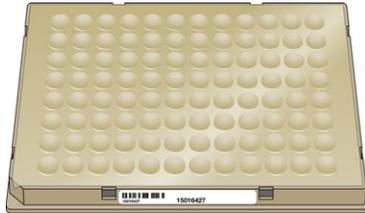
- ▶ Consulte las Best Practices (Prácticas óptimas) de *Handling Magnetic Beads* (Manipulación de bolas magnéticas). Consulte *Recursos adicionales*, en la página 10 para obtener información sobre cómo acceder a las prácticas óptimas de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq en el sitio web de Illumina.
- ▶ Caliente previamente el sistema de microcalentamiento 1 a 30 °C.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras CAP en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras PCR en una nueva placa HSP de 96 pocillos.

Adición de LIG

- 1 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se están utilizando tubos adaptadores de ARN, centrifugue los tubos descongelados a $600 \times g$ durante 5 segundos.
 - Si se está utilizando una RAP:
 - Deje que se descongele la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente en la mesa. Inspeccione visualmente los pocillos para asegurarse de que están todos descongelados.
 - Retire el sello adhesivo de la placa adaptadora.
 - Centrifugue la placa a $280 \times g$ durante 1 minuto para recoger todo el contenido del adaptador hasta el fondo del pocillo.
 - Retire la cubierta de plástico. Guarde la cubierta si no va a procesar toda la placa de una vez.
 - Si es la primera vez que usa esta RAP, adhiera la etiqueta de código de barras RAP en la placa.
- 2 Centrifugue los tubos del control de ligadura (en caso de que esté utilizando uno) y del tampón de parada de ligadura a $600 \times g$ durante 5 segundos.
- 3 Inmediatamente antes de usarlo, retire el tubo de la mezcla de ligadura del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C .
- 4 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.

- 5 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se está utilizando el reactivo de control en línea:
 - Diluya el control de ligadura en un tampón de resuspensión en una proporción de 1/100 (por ejemplo, 1 μ l de control de ligadura + 99 μ l de tampón de resuspensión) antes de utilizarlo. Deseche el control de ligadura diluido después de utilizarlo.
 - Añada 2,5 μ l del control de ligadura diluido en cada pocillo de la placa ALP.
 - Si no se está utilizando el reactivo de control en línea, añada 2,5 μ l de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa ALP.
- 6 Añada 2,5 μ l de mezcla de ligadura en cada pocillo de la placa ALP.
- 7 Vuelva a almacenar el tubo de la mezcla de ligadura inmediatamente después de utilizarlo a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.
- 8 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si se están utilizando tubos adaptadores de ARN, añada 2,5 μ l de índice de adaptador de ARN descongelado en cada pocillo de la placa ALP.
 - Si se está utilizando una RAP:
 - Coloque la RAP en la mesa de manera que el código de barras del número de referencia, que se encuentra en el lado largo de la placa, esté orientado hacia usted y la esquina recortada se encuentre en la parte inferior izquierda.

Figura 9 Orientación correcta de la RAP



- Realice una de las siguientes acciones para perforar el cierre metálico:
 - Si va a emplear toda la placa de una vez, utilice la parte inferior de una placa de PCR con semi faldón de 96 pocillos limpia para realizar un agujero en todos los precintos de los pocillos a la vez. Con cuidado, pero con firmeza, presione la placa limpia sobre el cierre metálico.
 - Si va a emplear solo una parte de la placa, utilice la parte inferior de una gradilla de ocho tubos limpia con las tapas puestas para realizar agujeros en los precintos de los pocillos que se van a utilizar para la ligadura. Repita el proceso con una nueva gradilla de ocho tubos limpia con las tapas puestas en cada una de las filas o columnas de adaptadores que se vayan a utilizar para la ligadura.
 - Mediante una pipeta multicanal de ocho puntas, transfiera 2,5 μ l del adaptador de ARN correspondiente descongelado desde el pocillo de la placa RAP a cada pocillo de la placa ALP.
- 9 Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - b Agite la placa ALP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
 - 10 Centrifugue la placa ALP a $280 \times g$ durante 1 minuto.

Incubación de ALP 2

- 1 Coloque la placa ALP sellada en el sistema de microcalentamiento precalentado. Cierre la tapa e incúbela a 30 °C durante 10 minutos.
- 2 Retire la placa ALP del sistema de microcalentamiento.

Adición de STL

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
- 2 Añada 5 μ l de tampón de parada de ligadura en cada pocillo de la placa ALP para desactivar la mezcla de ligadura. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - b Agite la placa ALP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 3 Centrifugue la placa ALP a $280 \times g$ durante 1 minuto.

Limpieza de ALP

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
- 2 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial durante al menos 1 minuto o hasta que estén bien dispersas.
- 3 Añada 42 μ l de bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la placa ALP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa ALP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 4 Incube la placa ALP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 5 Centrifugue la placa ALP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 6 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
- 7 Coloque la placa ALP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 8 Extraiga 79,5 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa ALP y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



NOTA

Deje la placa ALP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (9-11).

- 9 Mientras permanece la placa ALP en el soporte magnético, añada 200 μ l de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 10 Incube la placa ALP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
- 11 Repita los pasos 9 y 10 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 12 Deje que las muestras se sequen al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras permanece la placa ALP en el soporte magnético.
- 13 Retire la placa ALP del soporte magnético.

- 14 Añada 52,5 μ l de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa ALP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa ALP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa ALP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
 - 15 Incube la placa ALP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
 - 16 Centrifugue la placa ALP a 280 \times g durante 1 minuto.
 - 17 Retire el sello adhesivo de la placa ALP.
 - 18 Coloque la placa ALP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
 - 19 Transfiera 50 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa ALP al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras CAP. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
 - 20 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial hasta que estén bien dispersas.
 - 21 Añada 50 μ l de bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la placa CAP para llevar a cabo una segunda limpieza. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa CAP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa CAP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
 - 22 Incube la placa CAP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
 - 23 Centrifugue la placa CAP a 280 \times g durante 1 minuto.
 - 24 Retire el sello adhesivo de la placa CAP.
 - 25 Coloque la placa CAP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
 - 26 Extraiga 95 μ l de sobrenadante de cada pocillo de la placa CAP y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
-  **NOTA**
Deje la placa CAP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (27-29).
- 27 Mientras permanece la placa CAP en el soporte magnético, añada 200 μ l de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.

- 28 Incube la placa CAP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
- 29 Repita los pasos 27 y 28 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 30 Deje que las muestras se sequen al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras permanece la placa CAP en el soporte magnético.
- 31 Retire la placa CAP del soporte magnético.
- 32 Añada 22,5 µl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa CAP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa CAP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - b Agite la placa CAP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 33 Incube la placa CAP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 34 Centrifugue la placa CAP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 35 Retire el sello adhesivo de la placa CAP.
- 36 Coloque la placa CAP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 37 Transfiera 20 µl de sobrenadante de cada pocillo de la placa CAP al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada con el código de barras PCR. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente a *Enriquecimiento de fragmentos de ADN*, en la página 94, puede detener con seguridad el protocolo en este punto. Si va a detenerse, selle la placa de PCR con un sello adhesivo Microseal “B” y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete días como máximo.

Enriquecimiento de fragmentos de ADN

En este proceso, se utiliza la PCR para enriquecer de manera selectiva aquellos fragmentos de ADN que tienen moléculas adaptadoras en ambos extremos y para amplificar la cantidad de ADN en la biblioteca. La PCR se lleva a cabo con una mezcla de cebadores de PCR que se hibrida con los extremos de los adaptadores. Reduzca al mínimo el número de ciclos de PCR para evitar desviaciones en la representación de la biblioteca.



NOTA

La PCR enriquece los fragmentos que tienen adaptadores ligados en ambos extremos. Los fragmentos con uno o ningún adaptador en sus extremos son subproductos de ineficiencias en la reacción de ligadura. Ninguno puede utilizarse para realizar grupos. Los fragmentos sin ningún adaptador no pueden hibridarse con cebadores unidos a la superficie en la celda de flujo. Los fragmentos con un adaptador en un solo extremo pueden hibridarse con cebadores unidos a la superficie, pero no pueden formar grupos.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla maestra de PCR (PMM)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Mezcla de cebadores de PCR (PPC)	1 tubo para 48 reacciones	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • Etiqueta de código de barras CPP (placa de PCR de limpieza) • Etiqueta de código de barras TSP1 (placa de muestras objetivo) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illumina

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Bolas AMPure XP	50 µl por muestra	Entre 2 °C y 8 °C	Usuario
Etanol (EtOH) al 80 % recién preparado	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Película Microseal "A"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (si se usan pipetas multicanal)	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire la mezcla maestra de PCR y la mezcla de cebadores de PCR del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y deje que se descongelen a temperatura ambiente.
- ▶ Centrifugue la mezcla maestra de PCR y los tubos de mezcla de cebadores de PCR descongelados a 600 × g durante 5 segundos.
- ▶ Retire el tampón de resuspensión del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcance la temperatura ambiente.
- ▶ Retire las bolas AMPure XP del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y déjelas reposar durante al menos 30 minutos para que alcancen la temperatura ambiente.

- ▶ Retire la placa de PCR del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caso de que se almacenara al concluir la *Limpieza de ALP*, en la página 91.
 - Deje que se descongele a temperatura ambiente.
 - Centrifugue la placa de PCR descongelada a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - Retire el sello adhesivo de la placa de PCR descongelada.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el siguiente programa y guárdelo como **PCR**:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
 - 15 ciclos de:
 - $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos
 - $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos
 - Mantenga la temperatura a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras CPP en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras TSP1 en una nueva placa de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml.

Realización de PCR

- 1 Añada $5\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla de cebadores de PCR descongelada en cada pocillo de la placa de PCR.
- 2 Añada $25\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla maestra de PCR descongelada en cada pocillo de la placa de PCR.
 - a Selle la placa de PCR con una película Microseal “A”.

ADVERTENCIA

Siga las instrucciones de aplicación de películas selladoras Microseal “A” del proveedor. Un uso indebido podría hacer que el sellado no fuera eficiente (evaporación de la muestra o contaminación cruzada) o que fuera demasiado eficiente (que queden piezas del sello en el pocillo tras retirarlo al completo).
 - b Agite la placa de PCR en un agitador de microplacas a 1600 r/min durante 20 segundos.
- 3 Centrifugue la placa de PCR a $280 \times g$ durante 1 minuto.

Amplificación de PCR

- 1 Coloque la placa de PCR sellada en el ciclador térmico programado previamente. Cierre la tapa y, a continuación, seleccione y ejecute **PCR** para amplificar la placa.
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala en 100 °C
 - b 98 °C durante 30 segundos
 - c 15 ciclos de:
 - 98 °C durante 10 segundos
 - 60 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 30 segundos
 - d 72 °C durante 5 minutos
 - e Mantenga la temperatura a 4 °C

Limpieza de PCR

- 1 Retire el sello adhesivo de la placa de PCR.
- 2 Mezcle las bolas AMPure XP en un mezclador vorticial hasta que estén bien dispersas.
- 3 Realice una de las siguientes acciones en función del tipo de adaptador utilizado:
 - En caso de utilizar los tubos adaptadores de ARN, añada 50 µl de las bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras CPP.
 - En caso de utilizar la RAP, añada 47,5 µl de las bolas AMPure XP mezcladas en cada pocillo de la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras CPP.
- 4 Transfiera todo el contenido de cada pocillo de la placa de PCR al pocillo correspondiente de la placa CPP que contiene 50 µl de bolas AMPure XP mezcladas. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa CPP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - b Agite la placa CPP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 5 Incube la placa CPP a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 6 Centrifugue la placa CPP a 280 × g durante 1 minuto.
- 7 Retire el sello adhesivo de la placa CPP.

- 8 Coloque la placa CPP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 9 Extraiga 95 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa CPP y deséchelo.



NOTA

Deje la placa CPP en el soporte magnético mientras realiza los siguientes pasos de lavado con EtOH al 80 % (10-12).

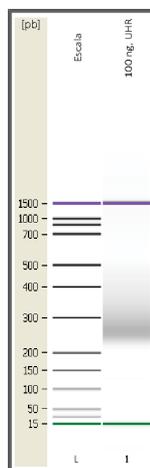
- 10 Mientras permanece la placa CPP en el soporte magnético, añada 200 μl de EtOH al 80 % recién preparado en cada pocillo sin alterar las bolas.
- 11 Incube la placa CPP a temperatura ambiente durante 30 segundos y, a continuación, extraiga todo el sobrenadante de cada pocillo y deséchelo.
- 12 Repita los pasos 10 y 11 una vez para llevar a cabo un total de dos lavados con EtOH al 80 %.
- 13 Deje que las muestras se sequen al aire a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras permanece la placa CPP en el soporte magnético y, a continuación, retírela del soporte.
- 14 Añada 32,5 μl de tampón de resuspensión en cada pocillo de la placa CPP. Mezcle el contenido completamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa CPP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa CPP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 15 Incube la placa CPP a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 16 Centrifugue la placa CPP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 17 Retire el sello adhesivo de la placa CPP.
- 18 Coloque la placa CPP en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 19 Transfiera 30 μl de sobrenadante de cada pocillo de la placa CPP al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada con el código de barras TSP1.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente a *Validación de bibliotecas*, en la página 99, puede detener con seguridad el protocolo en este punto. Si va a detenerse, selle la placa TSP1 con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días como máximo.

Figura 11 Producto de la PCR de 260 pb para la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq



Normalización y agrupación de bibliotecas

En este proceso, se describe cómo preparar plantillas de ADN para la generación de grupos. Las bibliotecas de ADN indexadas se normalizan a 10 nM en la placa de DCT y, a continuación, se agrupan en volúmenes iguales en la placa PDP. Las bibliotecas de ADN que no haya que agrupar se normalizan a 10 nM en la placa de DCT.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Etiquetas de código de barras para: <ul style="list-style-type: none"> • DCT (plantilla de grupos diluidos) • PDP (placa de DCT agrupada) (solo para agrupación) 	1 etiqueta por placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illustra
(Placa HSP de 96 pocillos) (solo para agrupación)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	5	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 con Tween 20 al 0,1 %	Suficiente para normalizar la concentración de cada biblioteca de muestras a 10 nM	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire la placa TSP1 del lugar de almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C en caso de que se almacenara al concluir la *Limpieza de PCR*, en la página 97.
 - Deje que se descongele a temperatura ambiente.

- Centrifugue la placa TSP1 descongelada a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- Retire el sello adhesivo de la placa TSP1 descongelada.
- ▶ Adhiera una etiqueta de código de barras DCT en una nueva placa MIDI de 96 pocillos.
- ▶ [Solo en caso de agrupación] Adhiera una etiqueta de código de barras PDP en una nueva placa HSP de 96 pocillos.

Realización de DCT

- 1 Transfiera 10 μ l de la biblioteca de muestras de cada pocillo de la placa TSP1 al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI etiquetada con el código de barras DCT.
- 2 Normalice la concentración de la biblioteca de muestras de cada pocillo de la placa de DCT a 10 nM utilizando Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 con Tween 20 al 0,1 %.



NOTA

En función de los datos de cuantificación del rendimiento de cada biblioteca de muestras, el volumen definitivo de la placa de DCT puede ir de 10 a 400 μ l.

- 3 Mezcle la placa de DCT como se indica a continuación:
 - a Selle la placa de DCT con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa de DCT en un agitador de microplacas a 1000 r/min durante 2 minutos.
- 4 Centrifugue la placa de DCT a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 5 Retire el sello adhesivo de la placa de DCT.
- 6 Realice una de las siguientes acciones en función del tipo de biblioteca que desee generar:
 - En el caso de las bibliotecas no agrupadas, el protocolo termina en este punto. Realice una de las siguientes acciones:
 - Proceda con la generación de grupos. Para obtener más información, consulte la sección de generación de grupos de la guía del usuario de su plataforma de Illumina.
 - Selle la placa de DCT con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - En el caso de las bibliotecas agrupadas, proceda a *Realización de PDP (solo en caso de agrupación)*.

Realización de PDP (solo en caso de agrupación)



NOTA

No realice una placa PDP si no está agrupando muestras.

- 1 Determine el número de muestras que desea combinar para cada agrupación.



NOTA

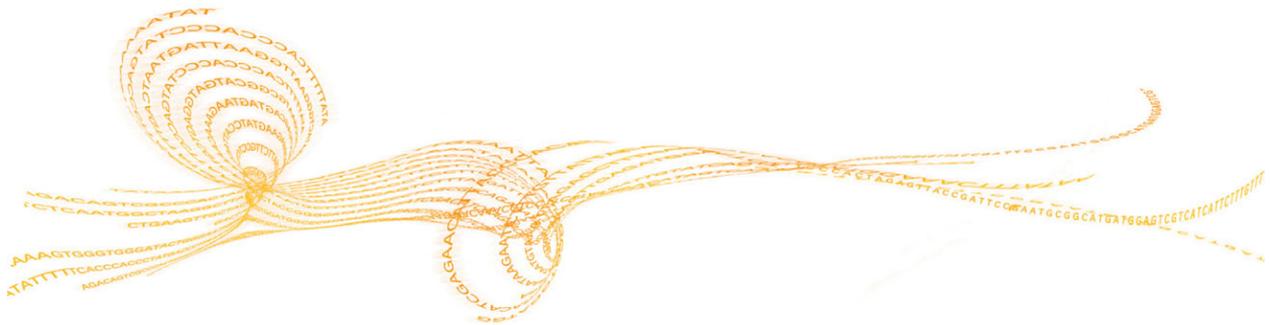
Tome nota de la correspondencia de las muestras y los pocillos para evitar agrupar dos muestras con el mismo índice.

- 2 Realice una de las siguientes acciones:
 - Si va a agrupar entre 2 y 24 muestras:
 - Transfiera 10 μ l de cada biblioteca de muestras normalizada que va a agruparse de la placa de DCT a un pocillo de la nueva placa HSP etiquetada con el código de barras PDP.
 - El volumen total en cada pocillo de la placa PDP debe ser 10 veces el número de las bibliotecas de muestras combinadas y de 20-240 μ l (2-24 bibliotecas). Por ejemplo, el volumen para dos muestras es de 20 μ l, para 12 muestras, de 120 μ l y para 24 muestras, de 240 μ l.
 - Si va a agrupar entre 25 y 96 muestras:
 - Mediante una pipeta multicanal, transfiera 5 μ l de cada biblioteca de muestras normalizada de la columna 1 de la placa de DCT a la columna 1 de la nueva placa HSP etiquetada con el código de barras PDP.
 - Transfiera 5 μ l de cada biblioteca de muestras normalizada de la columna 2 de la placa de DCT a la columna 1 de la placa PDP.
 - Repita la transferencia tantas veces como columnas queden en la placa de DCT. El resultado es una placa PDP con las muestras agrupadas en la columna 1. Mezcle la placa PDP como se indica a continuación:
 - Selle la placa PDP con un sello adhesivo Microseal “B”.
 - Agite la placa PDP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
 - Centrifugue la placa PDP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - Retire el sello adhesivo de la placa PDP.
 - Combine el contenido de cada pocillo de la columna 1 en el pocillo A2 de la placa PDP para la agrupación definitiva.

- 3 Mezcle la placa PDP como se indica a continuación:
 - a Selle la placa PDP con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa PDP en un agitador de microplacas a 1800 r/min durante 2 minutos.
- 4 Centrifugue la placa PDP a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 5 Realice una de las siguientes acciones:
 - Proceda con la generación de grupos. Para obtener más información, consulte la sección de generación de grupos de la guía del usuario de su plataforma de Illumina.
 - Almacene la placa PDP sellada a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Información de apoyo

Introducción	106
Acrónimos	107
Contenido de los kits	110
Consumibles y equipos	123
Secuencias de adaptadores indexados	127



Introducción

En los protocolos descritos en esta guía se asume que ha revisado el contenido del presente apéndice, que ha confirmado el contenido del kit y que ha obtenido todos los consumibles y el equipo necesarios.

Acronimos

Tabla 9 Acrónimos de la preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq

Acrónimo	Definición
ALP	Placa de ligadura de adaptadores
ATL	Mezcla de A-Tailing
BRP	Placa de ligadura de ARNr
CAP	Placa ALP de limpieza
CCP	Placa de limpieza de ADNc
ADNc	ADN complementario
CPP	Placa de PCR de limpieza
CTA	Control de A-Tailing
CTE	Control de reparación de extremos
CTL	Control de ligadura
DCT	Plantilla de grupos diluidos
DFP	Placa de fragmentación de ARN sometido a eliminación
ADNc ds	ADN complementario bicatenario
ELB	Tampón de elución
EPH	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución
EUC	Tarjeta de usuario experimentado
FFPE	Fijado en formol y embebido en parafina

Acrónimo	Definición
FSA	Mezcla Act D de síntesis de la primera cadena
GRM	Mezcla de eliminación de globinas
H/M/R	Humano/ratón/rata
HS	Alto número de muestras
HSP	Placa rígida
HT	Alto rendimiento
IEM	Illumina Experiment Manager
LIG	Mezcla de ligadura
LS	Bajo número de muestras
LT	Bajo rendimiento
LTF	Formulario de seguimiento de laboratorio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDP	Placa de dilución agrupada
PMM	Mezcla maestra de PCR
PPC	Mezcla de cebadores de PCR
RAP	Placa adaptadora de ARN
RBB	Tampón de ligadura de ARNr
RCP	Placa de limpieza de ARN
RRB	Bolas de eliminación de ARNr
RRM	Mezcla de eliminación de ARNr
RRM G	Mezcla de eliminación de ARNr: Gold

Acónimo	Definición
RRMP	Mezcla de eliminación de ARNr: Plant
ARNr	ARN ribosómico
RRP	Placa de eliminación de ARNr
RSB	Tampón de resuspensión
SMM	Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena
STL	Tampón de parada de ligadura
TSP	Placa de muestras objetivo

Contenido de los kits

Compruebe que cuenta con todos los reactivos identificados en esta sección antes de iniciar el protocolo de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. Los kits de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq están disponibles en juegos A y B. Cada kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq contiene suficientes reactivos para preparar hasta 24 muestras. Al utilizarse de forma conjunta, los kits A y B de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq permiten agrupar hasta 24 muestras utilizando 12 índices diferentes en cada kit.

Tabla 10 Kits de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq

Nombre del kit	N.º de catálogo	Número de muestras admitidas	Número de índices
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq; juego A (con Ribo-Zero para humano/ratón/rata)	RS-122-2201	48	12
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq; juego B (con Ribo-Zero para humano/ratón/rata)	RS-122-2202	48	12
Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq; juego B (con Ribo-Zero para humano/ratón/rata)	RS-122-2203	96	96
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq; juego A (con Ribo-Zero Gold)	RS-122-2301	48	12
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq; juego B (con Ribo-Zero Gold)	RS-122-2302	48	12
Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq (con Ribo-Zero Gold)	RS-122-2303	96	96

Nombre del kit	N.º de catálogo	Número de muestras admitidas	Número de índices
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq: juego A (con Ribo-Zero Plant)	RS-122-2401	48	12
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq: juego B (con Ribo-Zero Plant)	RS-122-2402	48	12
Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq (con Ribo-Zero Plant)	RS-122-2403	96	96
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq: juego A (con Ribo-Zero Globin)	RS-122-2501	48	12
Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq: juego B (con Ribo-Zero Globin)	RS-122-2502	48	12
Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq (con Ribo-Zero Globin)	RS-122-2503	96	96

Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq

El kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq contiene cuatro cajas: una caja A o B, caja 1, caja 2 y la caja de PCR para síntesis de ADNc.

48 muestras, juego A y B de 12 índices

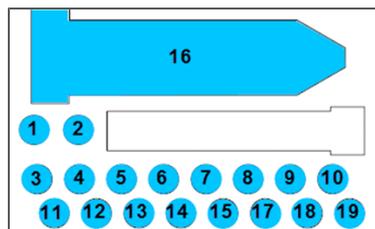
Recibirá la caja A o B en el kit, en función del juego que haya pedido.

Almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Estas cajas se envían en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los siguientes componentes a una temperatura entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Juego A

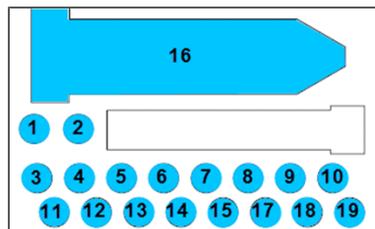
Figura 12 Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq, 48 muestras, juego A de 12 índices, n.º de referencia 15032612



Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
1	LIG	15026773	Mezcla de ligadura
2	ATL	15012495	Mezcla de A-Tailing
3	STL	15012546	Tampón de parada de ligadura
4	AR013	15024655	Índice 13 de adaptador de ARN
5	AR014	15024656	Índice 14 de adaptador de ARN
6	AR015	15024657	Índice 15 de adaptador de ARN
7	AR016	15024658	Índice 16 de adaptador de ARN
8	AR018	15024660	Índice 18 de adaptador de ARN
9	AR019	15024661	Índice 19 de adaptador de ARN
10	AR002	15026634	Índice 2 de adaptador de ARN
11	AR004	15026636	Índice 4 de adaptador de ARN
12	AR005	15026637	Índice 5 de adaptador de ARN
13	AR006	15026638	Índice 6 de adaptador de ARN
14	AR007	15026640	Índice 7 de adaptador de ARN
15	AR012	15026645	Índice 12 de adaptador de ARN
16	RSB	15026770	Tampón de resuspensión
17	CTE	15026774	Control de reparación de extremos
18	CTA	15026775	Control de A-Tailing
19	CTL	15026776	Control de ligadura

Juego B

Figura 13 Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq, 48 muestras, juego B de 12 índices, n.º de referencia 15032613



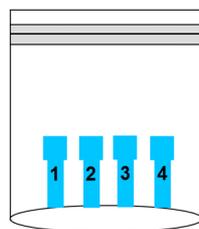
Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
1	ATL	15012495	Mezcla de A-Tailing
2	STL	15012546	Tampón de parada de ligadura
3	AR020	15024662	Índice 20 de adaptador de ARN
4	AR021	15024663	Índice 21 de adaptador de ARN
5	AR022	15024664	Índice 22 de adaptador de ARN
6	AR023	15024665	Índice 23 de adaptador de ARN
7	AR025	15024667	Índice 25 de adaptador de ARN
8	AR027	15024668	Índice 27 de adaptador de ARN
9	AR001	15026633	Índice 1 de adaptador de ARN
10	AR003	15026635	Índice 3 de adaptador de ARN
11	AR008	15026641	Índice 8 de adaptador de ARN
12	AR009	15026642	Índice 9 de adaptador de ARN
13	AR010	15026643	Índice 10 de adaptador de ARN
14	AR011	15026644	Índice 11 de adaptador de ARN
15	RSB	15026770	Tampón de resuspensión
16	LIG	15026773	Mezcla de ligadura
17	CTE	15026774	Control de reparación de extremos
18	CTA	15026775	Control de A-Tailing
19	CTL	15026776	Control de ligadura

48 muestras (caja 1 de 2)

Almacenar según lo especificado

Esta caja se envía en paquetes de gel refrigerado. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes según lo especificado.

Figura 14 Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq, 48 muestras (caja 1 de 2), n.º de referencia 15032615



Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1	DTE	15026766	Tubo de dilución de CTE	Temperatura ambiente
2	DTA	15026805	Tubo de dilución de CTA	Temperatura ambiente
3	DTL	15026807	Tubo de dilución de CTL	Temperatura ambiente
4	RRB	15031727	Bolas de eliminación de ARNr	Entre 2 °C y 8 °C

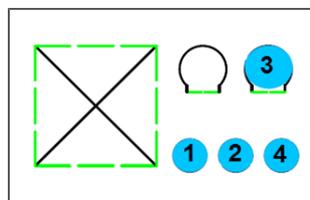
Caja de Ribo-Zero de 48 muestras

Recibirá una de las siguientes cajas, en función del kit que haya pedido. Estas cajas también contienen etiquetas de código de barras para las placas.

Almacenar según lo especificado

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes según lo especificado.

Figura 15 Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq, 48 muestras Ribo-Zero



Ribo-Zero H/M/R, n.º de referencia 15032618

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
2	RRM	15031738	Mezcla de eliminación de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
3	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
4	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Ribo-Zero Gold, n.º de referencia 15032619

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
2	RRM G	15033133	Mezcla de eliminación de ARNr: Gold	Entre -15 °C y -25 °C
3	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
4	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Ribo-Zero Plant, n.º de referencia 15035748

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
2	RRM P	15033135	Mezcla de eliminación de ARNr: Plant	Entre -15 °C y -25 °C
3	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
4	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Ribo-Zero Globin, n.º de referencia 15035750

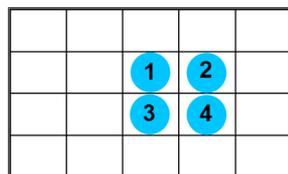
Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
2	GRM	15037137	Mezcla de eliminación de globinas	Entre -15 °C y -25 °C
3	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
4	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

48 muestras, caja de PCR para síntesis de ADNc

Almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes a una temperatura entre -15 °C y -25 °C.

Figura 16 Kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq, 48 muestras, caja de PCR para síntesis de ADNc, n.º de referencia 15032611



Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
1	PMM	15026785	Mezcla maestra de PCR
2	PPC	15031748	Mezcla de cebadores de PCR
3	FSA	15031094	Mezcla Act D de síntesis de la primera cadena
4	SMM	15031098	Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena

Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq

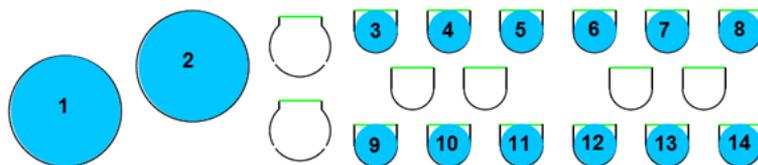
El kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq contiene cinco cajas: una caja de reactivos comunes, una caja de PCR para síntesis de ADNc, una caja de placa adaptadora, una caja 1 y una caja 2.

96 muestras, caja principal

Almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes a una temperatura entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 17 Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq, 96 muestras, caja principal, n.º de referencia 15032620



Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
1-2	RSB	15026770	Tampón de resuspensión
3-4	ATL	15012495	Mezcla de A-Tailing
5-6	LIG	15026773	Mezcla de ligadura

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
7-8	CTE	15026774	Control de reparación de extremos
9-10	CTA	15026775	Control de A-Tailing
11-12	CTL	15026776	Control de ligadura
13-14	STL	15012546	Tampón de parada de ligadura

96 muestras, caja de PCR para síntesis de ADNc

Almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes a una temperatura entre -15 °C y -25 °C.

Figura 18 Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq, 96 muestras, caja de PCR para síntesis de ADNc, n.º de referencia 5032621

	1	2	3	4
	5	6	7	8

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
1-2	PMM	15026785	Mezcla maestra de PCR
3-4	PPC	15031748	Mezcla de cebadores de PCR
5-6	FSA	15031094	Mezcla Act D de síntesis de la primera cadena
7-8	SMM	15031098	Mezcla maestra de marcación de la segunda cadena

96 muestras: caja de placa adaptadora

Almacenamiento a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto la reciba, almacene su contenido a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.

Figura 19 Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq, 96 muestras, caja de placa adaptadora, n.º de referencia 15032622



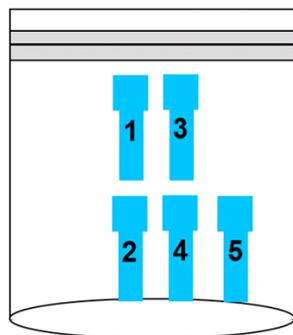
Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción
1	RAP	15016427	Placa adaptadora de ARN, 96 unidades

96 muestras (caja 1 de 2)

Almacenar según lo especificado

Esta caja se envía en paquetes de gel refrigerado. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes según lo especificado.

Figura 20 Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq, 96 muestras (caja 1 de 2), n.º de referencia 15032625



Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1-2	RRB	15031727	Bolas de eliminación de ARNr	Entre 2 °C y 8 °C
3	DTL	15026807	Tubo de dilución de CTL	Temperatura ambiente
4	DTE	15026766	Tubo de dilución de CTE	Temperatura ambiente
5	DTA	15026805	Tubo de dilución de CTA	Temperatura ambiente

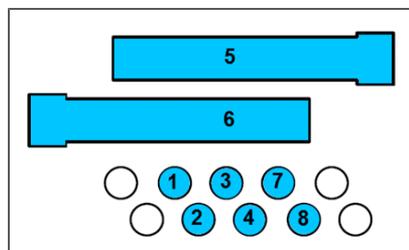
Caja de Ribo-Zero de 96 muestras

Recibirá una de las siguientes cajas, en función del kit que haya pedido. Estas cajas también contienen etiquetas de código de barras para las placas.

Almacenar según lo especificado

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto la reciba, almacene los siguientes componentes según lo especificado.

Figura 21 Kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq, Ribo-Zero de 96 muestras



Ribo-Zero H/M/R, n.º de referencia 15032626

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1-2	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
3-4	RRM	15031738	Mezcla de eliminación de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
5-6	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
7-8	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Ribo-Zero Gold, n.º de referencia 15032627

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1-2	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
3-4	RRM G	15033133	Mezcla de eliminación de ARNr: Gold	Entre -15 °C y -25 °C
5-6	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
7-8	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Ribo-Zero Plant, n.º de referencia 15035749

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1-2	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
3-4	RRM P	15033135	Mezcla de eliminación de ARNr: Plant	Entre -15 °C y -25 °C
5-6	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
7-8	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Ribo-Zero Globin, n.º de referencia 15035751

Ranura	Reactivo	N.º de referencia	Descripción	Temperatura de almacenamiento
1-2	RBB	15031737	Tampón de ligadura de ARNr	Entre -15 °C y -25 °C
3-4	GRM	15037137	Mezcla de eliminación de globinas	Entre -15 °C y -25 °C
5-6	ELB	15026780	Tampón de elución	Entre 2 °C y 8 °C
7-8	EPH	15029211	Mezcla de alto rendimiento para fragmentación, cebado y elución	Entre -15 °C y -25 °C

Consumibles y equipos

Compruebe que cuenta con todos los consumibles y equipos necesarios que debe suministrar el usuario antes de iniciar el protocolo de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. La exigencia de contar con algunos de estos artículos depende del protocolo realizado (LS o HS) y se especifican en tablas distintas.

Tabla 11 Consumibles suministrados por el usuario

Consumible	Proveedor
Tubos de 1,5 ml sin ARNasa/ADNasa antiadherentes	Life Technologies, n.º de referencia AM12450
Puntas de pipeta de barrera de 10 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 10 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas monocanal de 10 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas monocanal de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas monocanal de 200 µl	Proveedor de laboratorio general

Consumible	Proveedor
Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml, pocillo redondo (placa "MIDI")	Fisher Scientific, n.º de referencia AB-0859
Placas de 96 pocillos de 2 ml de profundidad (opcional: para dividir reactivos en alícuotas)	Thomson Instrument Company, n.º de referencia 951652
Kit de Agencourt AMPure XP de 60 ml	Beckman Coulter Genomics, n.º de referencia A63881
Kit de Agencourt RNAClean XP de 40 ml	Beckman Coulter Genomics, n.º de referencia A63987
Kit Agilent RNA 6000 Nano o Kit Agilent RNA 6000 Pico (opcional: solo para fragmentación alternativa)	Agilent Technologies, n.º de referencia 5067-1511 o n.º de referencia 5067-1513
Etanol puro (absoluto) para biología molecular (500 ml)	Sigma-Aldrich, n.º de referencia E7023
Sellos adhesivos Microseal "B"	Bio-Rad, n.º de referencia MSB-1001
Microtubo MicroTube (6 × 16 mm), fibra AFA con reborde magnético (opcional: solo para fragmentación alternativa)	Covaris, n.º de referencia 520052
Kit de extracción de gel MinElute (opcional: si se empieza con ARNm previamente aislado)	QIAGEN, n.º de referencia 28604
Agua ultrapura exenta de nucleasas	Proveedor de laboratorio general
RNaseZap (para descontaminar superficies)	Proveedor de laboratorio general
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa	Proveedor de laboratorio general

Consumible	Proveedor
Depósitos de reactivos multicanal, desechables, sin ARNasa/ADNasa	VWR, n.º de referencia 89094-658
Transcriptasa inversa SuperScript II	Invitrogen, n.º de referencia 18064-014
Tris-HCl 10 mM, pH 8,5	Proveedor de laboratorio general
Tween 20	Sigma, n.º de referencia P7949

Tabla 12 Consumibles suministrados por el usuario: artículos adicionales para el procesamiento LS

Consumible	Proveedor
Placas de PCR de 96 pocillos de 0,3 ml	Proveedor de laboratorio general

Tabla 13 Consumibles suministrados por el usuario: artículos adicionales para el procesamiento HS

Consumible	Proveedor
Placas de PCR de 96 pocillos de microsellado Microseal (placa "HSP")	Bio-Rad, n.º de referencia HSP-9601
Película Microseal "A"	Bio-Rad, n.º de referencia MSA-5001

Tabla 14 Equipo suministrado por el usuario

Equipo	Proveedor
Ciclador térmico de 96 pocillos (con tapa caliente)	Proveedor de laboratorio general
Sistema de escritorio 2100 Bioanalyzer	Agilent, n.º de referencia G2940CA

Equipo	Proveedor
Kit Agilent DNA 1000	Agilent, n.º de referencia 5067-1504
Soporte magnético para 96 pocillos	Life Technologies, n.º de referencia AM10027
Centrifugadora para microplacas	Proveedor de laboratorio general
Mezclador vorticial	Proveedor de laboratorio general

Tabla 15 Equipos suministrados por el usuario: artículos adicionales para el procesamiento HS

Consumible	Proveedor
Agitador de microplacas de alta velocidad	VWR, n.º de catálogo • 13500-890 (110 V/120 V) o • 14216-214 (230 V)
Inserción de placa MIDI para sistema de calentamiento Nota: se recomienda contar con dos inserciones para facilitar la realización procesos de calentamiento consecutivos.	llumina, n.º de catálogo BD-60-601
Estroboscopio	Proveedor de laboratorio general
Uno de los siguientes artículos: Nota: se recomienda contar con dos sistemas para facilitar la realización de procesos de calentamiento consecutivos. • Sistema de calentamiento SciGene TruTemp • Incubadora de micromuestras Hybex	• Illumina, n.º de catálogo • SC-60-503 (115 V) o • SC-60-504 (220 V) • SciGene, n.º de catálogo • 1057-30-0 (115 V) o • 1057-30-2 (230 V)

Secuencias de adaptadores indexados

En esta sección, se describe las secuencias de los adaptadores indexados.

Secuencias del adaptador indexado del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq

El kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq contiene las siguientes secuencias de adaptador indexado.



NOTA

- La numeración de los índices no es contigua. No hay índice 17, 24 ni 26.
- La base entre paréntesis () indica la base del séptimo ciclo y no se considera parte de la secuencia de índice. Registre el índice en la hoja de muestras con seis bases únicamente. En el caso de los índices 13 y superiores, la séptima base (entre paréntesis) podría no ser A, vista en el séptimo ciclo de la lectura del índice.
- Para obtener más información sobre el número de ciclos utilizados para secuenciar la lectura del índice, consulte la guía del usuario del instrumento.

Tabla 16 Secuencias del adaptador indexado del juego A del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq

Adaptador	Secuencia	Adaptador	Secuencia
AR002	CGATGT(A)	AR013	AGTCAA(C)
AR004	TGACCA(A)	AR014	AGTTCC(G)
AR005	ACAGTG(A)	AR015	ATGTCA(G)
AR006	GCCAAT(A)	AR016	CCGTCC(C)
AR007	CAGATC(A)	AR018	GTCCGC(A)
AR012	CTTGTA(A)	AR019	GTGAAA(C)

Tabla 17 Secuencias del adaptador indexado del juego B del kit de preparación de muestras LT de ARN total monocatenario TruSeq

Adaptador	Secuencia	Adaptador	Secuencia
AR001	ATCACG(A)	AR020	GTGGCC(T)
AR003	TTAGGC(A)	AR021	GTTTCG(G)
AR008	ACTTGA(A)	AR022	CGTACG(T)
AR009	GATCAG(A)	AR023	GAGTGG(A)
AR010	TAGCTT(A)	AR025	ACTGAT(A)
AR011	GGCTAC(A)	AR027	ATTCCT(T)

Secuencias de los adaptadores indexados del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq

La RAP del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq contiene las siguientes secuencias de adaptadores indexados:



NOTA

El índice registrado en la hoja de muestras corresponde a las ocho bases completas y estas ocho bases se secuencian por lectura indexada.

Tabla 18 Secuencias del adaptador indexado 1 del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq

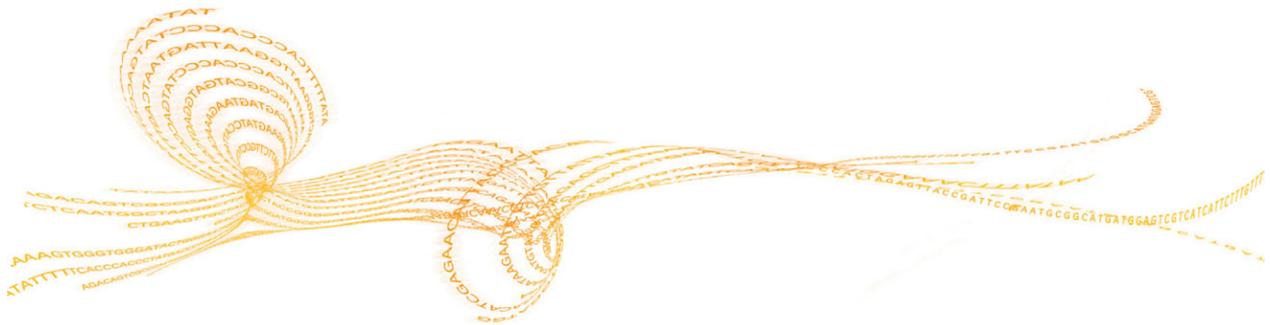
Adaptador	Secuencia	Adaptador	Secuencia
D701	ATTACTCG	D707	CTGAAGCT
D702	TCCGGAGA	D708	TAATGCGC
D703	CGCTCATT	D709	CGGCTATG
D704	GAGATTCC	D710	TCCGCGAA
D705	ATTCAGAA	D711	TCTCGCGC
D706	GAATTCGT	D712	AGCGATAG

Tabla 19 Secuencias del adaptador indexado 2 del kit de preparación de muestras HT de ARN total monocatenario TruSeq

Adaptador	Secuencia	Adaptador	Secuencia
D501	TATAGCCT	D505	AGGCGAAG
D502	ATAGAGGC	D506	TAATCTTA
D503	CCTATCCT	D507	CAGGACGT
D504	GGCTCTGA	D508	GTA CTGAC

Protocolos de fragmentación alternativos

Introducción	132
Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN intacto	133
Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN degradado	135



Introducción

La fragmentación de los ácidos nucleicos es necesaria para poder llevar a cabo una preparación, agrupación y secuenciación óptimas de la biblioteca. Al comenzar con ARN intacto, se realiza en el ARN el protocolo de fragmentación de ARN total monocatenario TruSeq para el análisis de transcriptoma después de haber eliminado el ARNr utilizando altas temperaturas. Como consecuencia, se generan bibliotecas con fragmentos de tamaño variable entre 120 pb y 200 pb y con una mediana de tamaño de 150 pb. El protocolo de fragmentación de ARN total monocatenario TruSeq garantiza la mejor cobertura del transcriptoma junto con una producción de bibliotecas eficiente.

Illumina reconoce que algunos clientes tienen objetivos diferentes en sus experimentos de secuenciación. La necesidad de obtener fragmentos más grandes es mayor que la de contar con la mejor cobertura de aplicaciones como los estudios de análisis de variantes de empalme. Para modificar el tamaño de los fragmentos de su biblioteca, consulte *Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN intacto*, en la página 133.

Illumina también reconoce que no siempre es posible extraer el ARN total intacto. Por ejemplo, el ARN extraído de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina se suele degradar. Para modificar el tiempo de fragmentación del ARN degradado, consulte *Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN degradado*, en la página 135.

Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN intacto

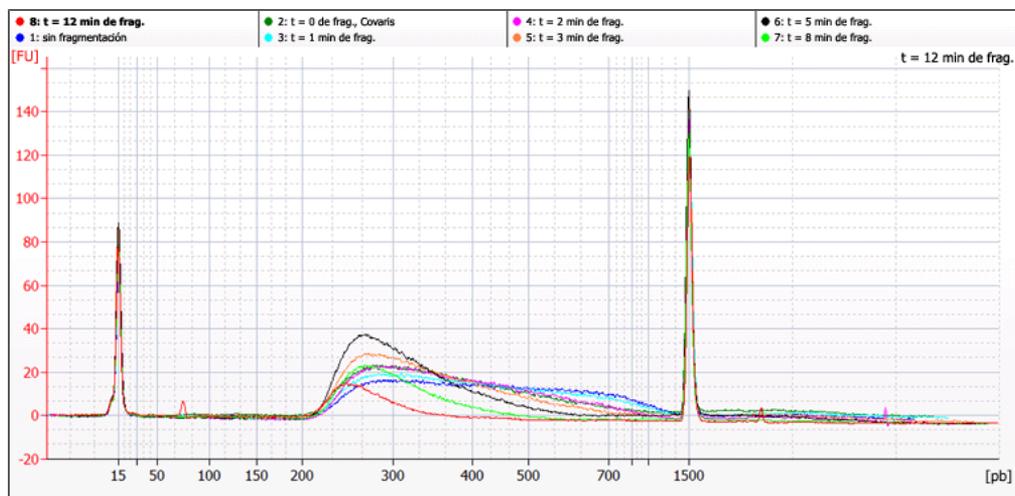
Para modificar la fragmentación del ARN a fin de permitir que haya fragmentos de ARN con mayor longitud, puede acortarse el tiempo de fragmentación. Esto se consigue durante los procedimientos de *Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero* al modificar el programa del ciclador térmico **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar): 94 °C durante X minutos, seguidos de un tiempo de reposo a 4 °C en el ciclador térmico. La X queda determinada por la longitud del ARN deseada. En la Tabla 20, se describen una serie de tiempos y tamaños sugeridos.

Tabla 20 Tiempo de fragmentación para los fragmentos de bibliotecas

Tiempo a 94 °C (minutos)	Intervalo de longitud de fragmento ^a (pb)	Mediana de longitud de fragmento ^a (pb)	Tamaño medio de biblioteca definitiva (bioanalizador pb)
0 ^b	130-350	200	467
1	130-310	190	439
2	130-290	185	410
3	125-250	165	366
4	120-225	160	326
8	120-210	155	309
12	115-180	140	272

- Longitud de fragmento determinada después de la agrupación y secuenciación con un experimento de secuenciación "paired-end".
- En lugar de llevar a cabo una incubación de 94 °C, incube a 65 °C durante 5 minutos, seguidos de un reposo a 4 °C. Así se eluirá el ARNm de las bolas sin fragmentación. Los fragmentos de ADNc resultantes son más pequeños que el ARNm debido al cebado interno de los hexámeros aleatorios en la EPH.

Figura 22 Resultados de tiempo de fragmentación acortado



NOTA

La discrepancia entre el tamaño de fragmento notificado utilizando el bioanalizador Agilent y el tamaño de fragmento determinado después de la agrupación y secuenciación con un experimento de secuenciación “paired end” se debe al sesgo a favor de agrupar de fragmentos más pequeños. Para conseguir un tamaño de fragmento específico, se necesita realizar un paso de selección de tamaño con gel después de la ligadura de adaptadores.

Modificación del tiempo de fragmentación de ARN en el caso del ARN degradado

En el caso de las muestras de ARN degradado, el tiempo de fragmentación deberá ajustarse para evitar una sobrefragmentación de las muestras de ARN. Esto se consigue durante los procedimientos de *Eliminación y fragmentación de ARN con Ribo-Zero* al omitir la fragmentación de *Incubación de DFP 1* o al modificar el programa del ciclador térmico **Elution 2 - Frag - Prime** (Elución 2: fragmentar y cebar) a 94 °C durante X minutos, seguidos de un tiempo de reposo a 4 °C.

Si las muestras deben sufrir o no fragmentación y la cantidad de tiempo utilizada para la fragmentación (X) queda determinado por el intervalo de tamaño del material de partida del ARN total. Para determinar qué ajustes de fragmentación utilizar, en caso de que sea necesaria, proceda de la siguiente manera:

- 1 Mida el intervalo de tamaño del material de partida del ARN total ejecutándolo en un chip Agilent RNA 6000 Nano o Pico.
- 2 Compare el electroferograma resultante de las Figura 23 a la Figura 27, que muestran el ARN de referencia universal humano que ha sido fragmentado en varios intervalos de tamaño.
- 3 Determine qué figura de muestra se parece más al intervalo de tamaño de su material de partida.
- 4 Utilice los ajustes recomendados del ciclador térmico que aparecen en el título la figura de ese intervalo de tamaño para fragmentar sus muestras de ARN degradado. En caso de contar con un material de partida más pequeño que el mostrado en la Figura 27, no es necesaria la fragmentación. Omita el paso *Incubación de DFP 1* y proceda inmediatamente a *Síntesis de ADNc de la primera cadena*.

Figura 23 Incubación de las muestras a 94 °C durante 8 minutos, seguidos de un reposo de 4 °C

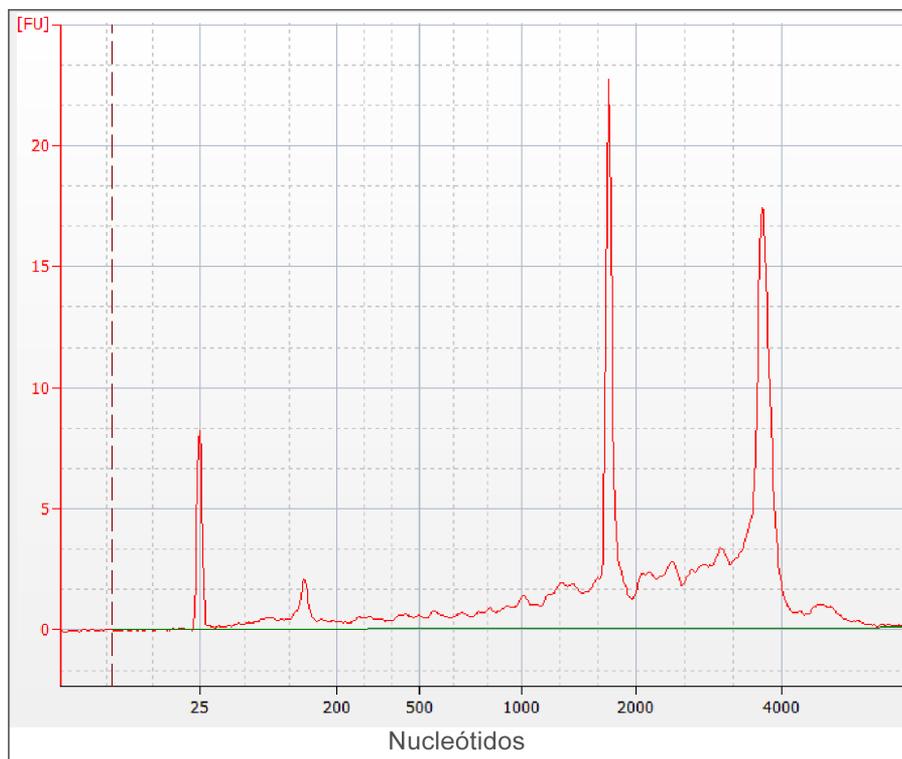


Figura 24 Incubación de las muestras a 94 °C durante 7 minutos, seguidos de un reposo de 4 °C

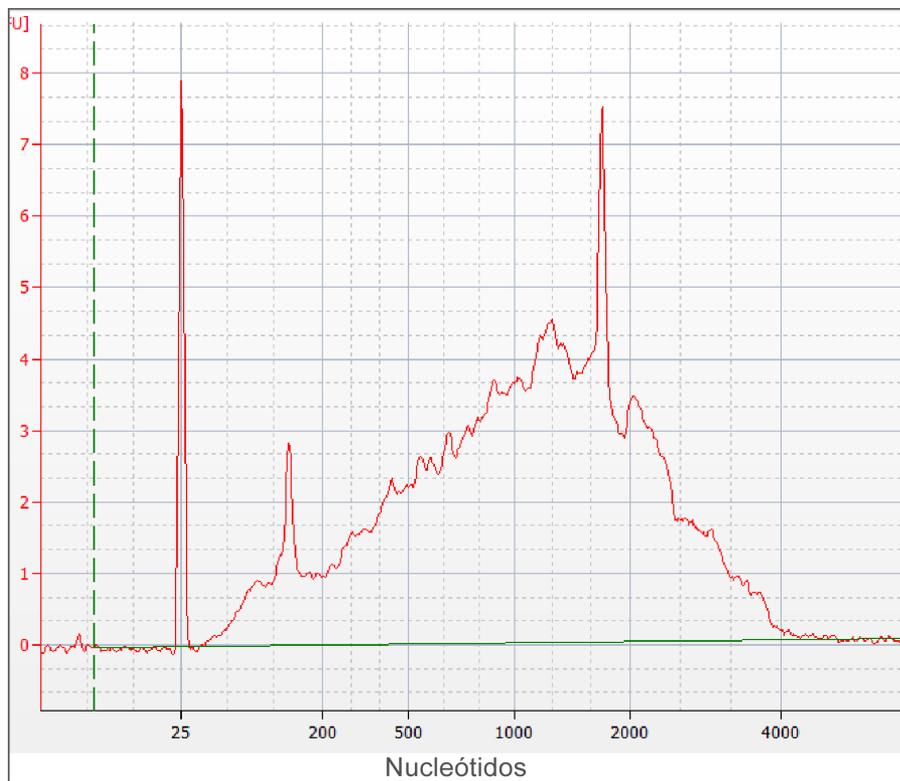


Figura 25 Incubación de las muestras a 94 °C durante 6 minutos, seguidos de un reposo de 4 °C

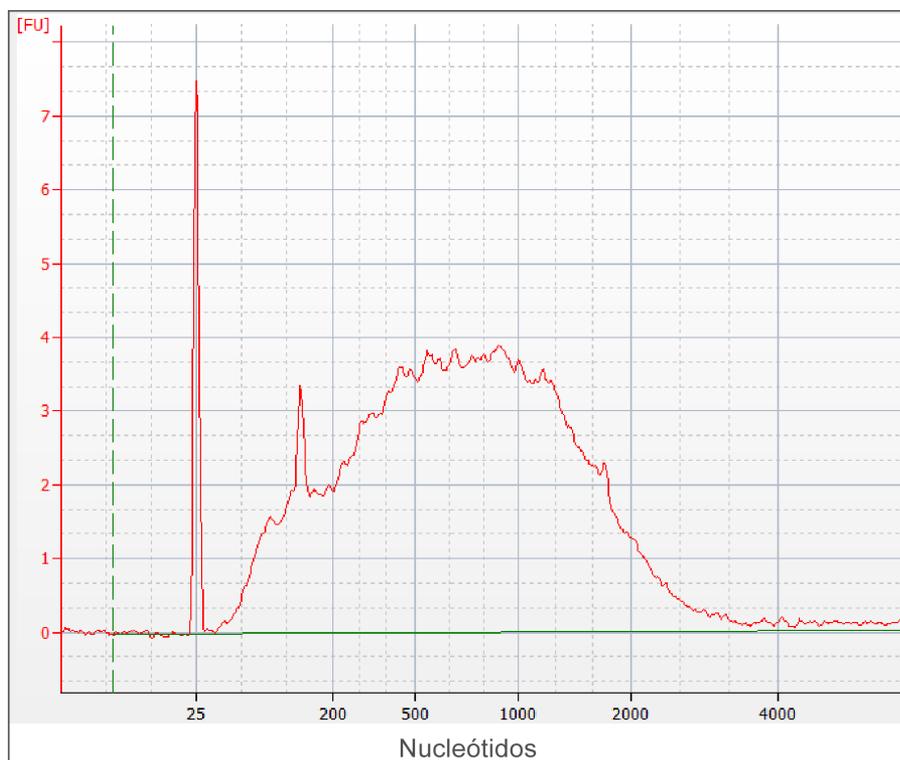


Figura 26 Incubación de las muestras a 94 °C durante 4 minutos, seguidos de un reposo de 4 °C

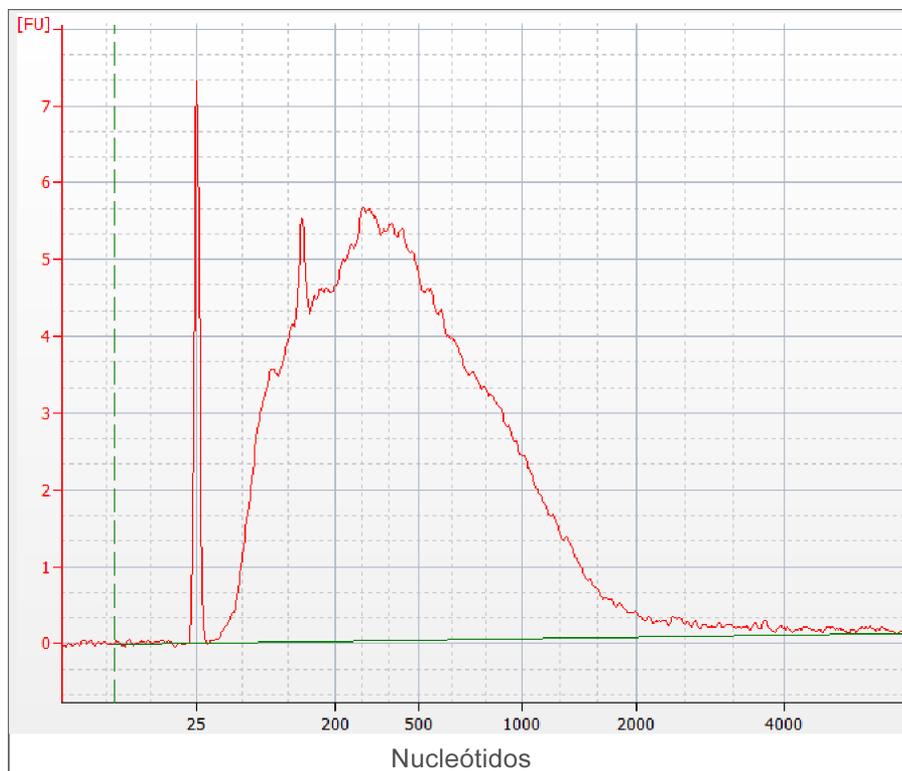
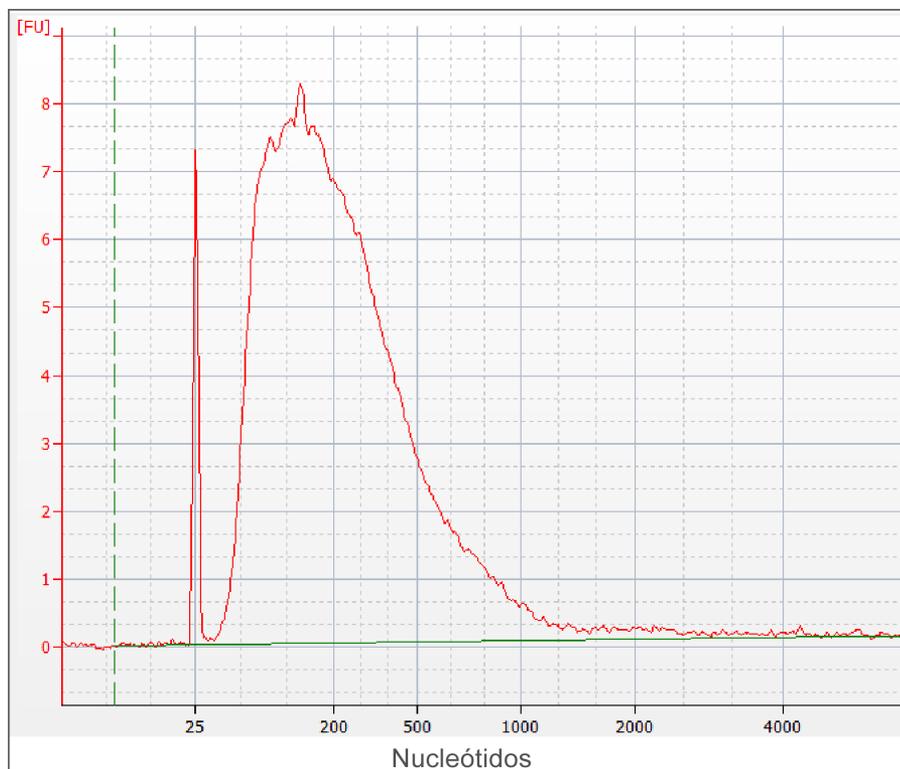


Figura 27 No es necesario realizar la fragmentación. Omita *Incubación de DFP 1* y proceda a *Síntesis de ADNc de la primera cadena*



A

Acrónimos 107
 adaptador de índice 2
 adaptador indexado 127, 129
 Adición de ATL 38, 83
 Adición de LIG 43, 88
 Adición de SMM 34, 79
 Adición de STL 45, 90
 ADN de control en línea 8
 ADNc de la primera cadena 2
 ADNc de la segunda cadena 2
 ADNc ds 32, 77
 agitador de microplacas 4
 agua ultrapura 22, 68
 ALP 32, 77
 Alto número de muestras (HS) 4
 Amplificación de PCR 51, 97
 ARN degradado 23, 26, 69, 71, 132, 135
 ARN total 2
 asistencia al cliente 143
 asistencia técnica 143
 ATL 37, 82
 ayuda, técnica 143

B

Bajo número de muestras (LS) 4
 Bolas AMPure XP 32, 41, 49, 77, 86, 95
 Bolas RNAClean XP 22, 67
 BRB 22, 67

C

CAP 41, 86
 CCP 77
 ciclador térmico 4
 control de calidad 54, 99
 CPP 94
 CTA 37, 82
 CTE 32, 77

CTL 40, 85
 cuantificación de bibliotecas 54, 99

D

Dactinomicina 30
 DCT 56, 101
 Depósitos de reactivos 22, 29, 33, 37, 41, 50, 68, 74, 78, 82, 86, 95
 desnaturalización del ARNm 25, 70
 DFP 22, 67
 diagrama de flujo de trabajo 18, 64
 directrices de agrupación 12
 documentación 143

E

ELB 20, 66
 Elución 2
 fragmentar y cebar 133
 EPH 20, 66

F

FFPE 23, 26, 69, 71, 132, 135
 Formación 10
 FSA 29, 74

G

generación de grupos 2, 59, 104
 GRM 21, 66

H

HSP 4

I

IEM 13
 IMP 77
 Incubación de ALP 1 39, 84
 Incubación de ALP 2 45, 90

Incubación de BRP 1 25, 70
 Incubación de DFP 1 28, 73
 Incubación de DFP 2 31, 76
 Incubación de DFP 3 34, 79

Í

Índices de adaptadores de ARN 40, 85

L

LIG 40, 85
 Limpieza de ALP 46, 91
 Limpieza de DFP 35, 80
 Limpieza de PCR 52, 97
 Limpieza de RCP 26, 71

M

MIDI 4

P

PCR 3, 41, 86
 PDP 56, 101
 PMM 49, 94
 PPC 49, 94
 Prácticas óptimas 11

R

RAP 40, 85
 RBB 21, 67
 RCP 22, 67
 Realización de BRP 24, 69
 Realización de DCT 57, 102
 Realización de PCR 51, 96
 Realización de PDP vii, 58, 103
 Realización de RRP 25, 70
 Ribo-Zero 2, 19, 21, 24, 65-66, 69, 110,
 114, 120
 RRB 21, 67
 RRM 21, 66
 RRM G 21, 66
 RRM P 21, 66
 RRP 22, 67
 RSB 21, 32, 37, 40, 49, 67, 77, 82, 85, 94

S

SAV 8-9
 Síntesis de ADNc 19, 65

sistema de microcalentamiento 4
 SMM 32, 77
 STL 40, 85
 SuperScript II 29, 74

T

tapas y gradillas de tubos 22, 29, 33,
 37, 41, 50, 67, 74, 78, 82, 86, 95
 tarjeta de usuario experimentado (EUC)
 11-12
 tiempo de fragmentación 132
 Tris-HCl 56, 101
 TSP1 49, 57, 94, 101

V

volúmenes de muestra agrupados 58,
 103

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Tabla 21 Información de contacto general de Illumina

Sitio web de Illumina	www.illumina.com
Correo electrónico	techsupport@illumina.com

Tabla 22 Números del Servicio de asistencia al cliente de Illumina

Zona	Número de contacto	Zona	Número de contacto
Norteamérica	18008094566	Irlanda	1.800.812949
Alemania	0800.180.8994	Italia	800874909
Austria	0800296575	Noruega	80016836
Bélgica	080081102	Países Bajos	0800.0223859
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
España	900812168	Suecia	020790181
Finlandia	0800.918363	Suiza	0800.563118
Francia	0800.911850	Otros países	+44.1799.534000

MSDS

Las hojas de datos de seguridad de materiales (MSDS) están disponibles en el sitio web de Illumina, en www.illumina.com/msds.

Documentación del producto

En el sitio web de Illumina es posible descargar documentos en PDF sobre el producto. Vaya a www.illumina.com/support, seleccione un producto y, a continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación y bibliografía).

