

Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

Leistungsstarker, schneller,
integrierter Workflow für
Genomsequenzierungs-
anwendungen

- Optimierte Bibliotheksvorbereitung für hochgenaue, zuverlässige Ergebnisse
- Flexibles Protokoll für eine Vielzahl von Probenotypen bei sensitiven Sequenzierungsanwendungen
- Schneller, automatisierungsgerechter Workflow mit einer Gesamtdauer von ca. 1,5 Stunden bei geringen DNA-Zugabemengen



Einleitung

Die Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) hat die Arbeitsweise von Wissenschaftlern bei genomischen Studien revolutioniert, da pro Lauf wesentlich mehr und wesentlich hochwertigere Daten generiert werden können – und zwar bei geringeren Kosten und kürzeren Laufzeiten. Während sich die Sequenzierungstechnologie von Illumina in den letzten Jahren mit großer Geschwindigkeit weiterentwickelt hat, sind bei PCR-abhängigen Protokollen zur Bibliotheksvorbereitung immer noch entscheidende Herausforderungen zu bewältigen. PCR-bedingte Verzerrungen können zu einer ungleichmäßigen Coverage im Genom führen, besonders bei Regionen mit uneinheitlicher Basenzusammensetzung. Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) begegnet diesen Herausforderungen mit einer einzigartigen Kombination aus On-Bead-Tagmentation und PCR-freiem Workflow (Abbildung 1).

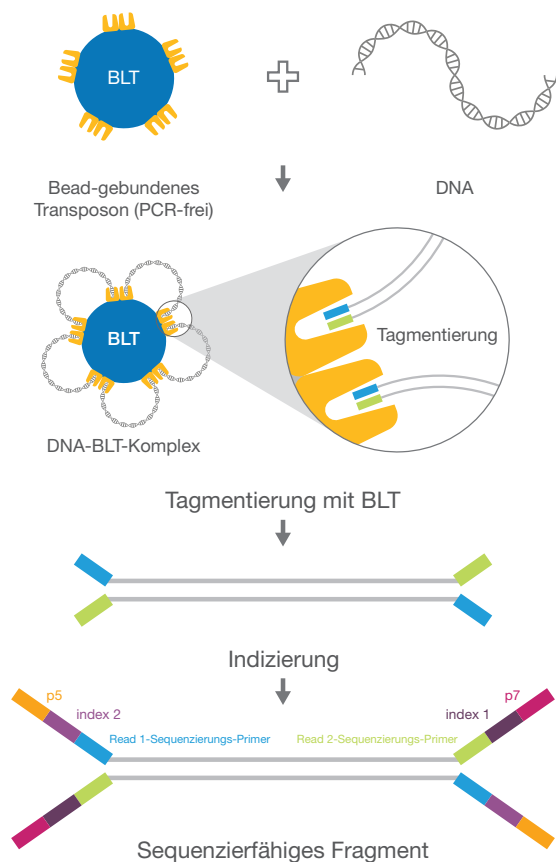


Abbildung 1: Illumina DNA PCR-Free-Chemie: Eine effiziente Lösung zur Vorbereitung und Indizierung von Probenbibliotheken.

Funktionsweise

Bei der Tagmentation handelt es sich um eine Transposon-vermittelte Reaktion, die Tagging und DNA-Fragmentierung in einer einzelnen, schnellen Reaktion vereint. Bei der On-Bead-Tagmentation sorgen Bead-gebundene Transposons dafür, dass die Tagmentierungsreaktion im Vergleich zur In-Lösung-Tagmentation einheitlicher verläuft. Nach der Sättigung der Bead-gebundenen Transposons mit DNA ist keine weitere Tagmentation möglich, woraus sich einheitliche Bibliotheksergebnisse und einheitliche Bibliotheksinsertgrößen ergeben.^{1,2} Da die PCR-Amplifikationsschritte entfallen, beseitigt die DNA PCR-Free-Chemie von Illumina darüber hinaus PCR-bedingte Verzerrungen und liefert hochpräzise Sequenzinformationen für Anwendungen mit hoher Sensitivität wie beispielsweise die Tumor-Normal-Variantenerkennung oder die Human-Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing). Der Illumina DNA PCR-Free-Assay kann aus extrahierter genomischer DNA (gDNA) in 90 Minuten oder aus Rohproben wie Blut oder Speichel in nur 2,5 Stunden durchgeführt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Illumina DNA PCR-Free – Spezifikationen

Parameter	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
DNA-Zugabetyp	gDNA, Blut, Speichel, Plasmide, Trockenblutspots	gDNA
DNA-Zugabemenge	25–300 ng ^a	1–2 µg
Fragmentierungsmethode	On-Bead-Tagmentation	Covaris-Beschallung
Proben-Multiplexing	384 doppelte Indizes ^b	96 doppelte Indizes
Unterstützte Sequenziersysteme	MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000, NovaSeq™ 6000, NovaSeq X	Alle Sequenziersysteme von Illumina
Gesamtdauer des Workflows ^c	ca. 90 min ^d bei extrahierter gDNA ca. 2,5 h bei Rohproben wie Blut oder Speichel	ca. 11 h
Insertgröße ^e	450 bp	350 bp oder 550 bp

a. Die maximale Zugabemenge für Illumina DNA PCR-Free beträgt 2 µg.
b. Informationen zu Strategien für die Indexkorrektur zur Verringerung der Variabilität zwischen multiplexierten Bibliotheken finden Sie im technischen Hinweis [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Abstimmung der Proben-Coverage für die Genomsequenzierung\)](#).
c. Die Dauer des gesamten Workflows umfasst DNA-Extraktion und -Quantifizierung, Tagmentation und Bibliothekspoolingschritte.
d. Workflowdauer für die Sättigung der Zugabe-gDNA (300 ng).
e. Weitere Informationen zum Anpassen der Insertgrößen auf 350 oder 550 bp finden Sie im Anwendungshinweis [Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation \(Anpassbare Insertgrößen mit Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation\)](#).

Besonders einheitliche Genom-Coverage für die Human-WGS

Über die Coverage-Einheitlichkeit wird die Vollständigkeit der Daten für einen Sequenzierungslauf über das gesamte Genom hinweg gemessen. Die einheitliche Coverage ermöglicht ein genaueres Calling von Varianten abseits der mittleren Tiefe.³ Die Coverage-Leistung über einen Bereich von GC-Gehalten hinweg wurde durch den Vergleich von normalisierten, mit Illumina DNA PCR-Free und TruSeq™ DNA PCR-Free ermittelten Coverage-Daten mit dem Gehalt des Humangenoms nach GC-Prozentsatz bestimmt. Die meisten Humangenomdaten weisen einen Anteil von 20–70 % GC-Sequenz auf. Beide Kits bieten gleichmäßige Coverage-Niveaus über einen breiten Bereich an GC-Gehalten hinweg, wie anhand von Human-WGS-Daten dargestellt ([Abbildung 2](#)), was belegt, dass Illumina DNA PCR-Free für Human-WGS-Anwendungen außerordentlich gut geeignet ist.

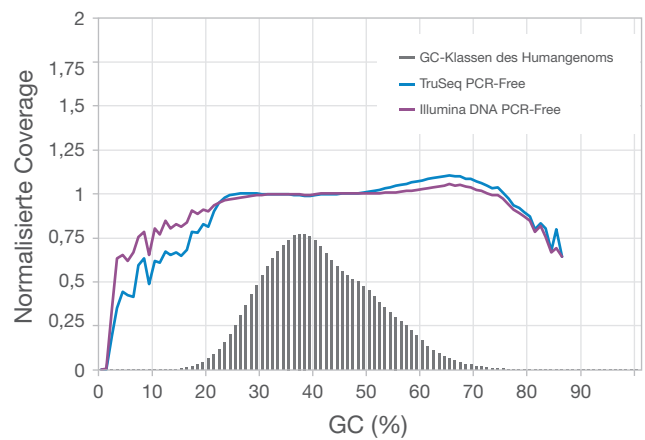


Abbildung 2: Einheitliche Coverage mit Illumina DNA PCR-Free: Illumina DNA PCR-Free bietet eine einheitliche Coverage über ein breites Spektrum an GC-Gehalten im Humangenom.

Gleichmäßige Coverage über Regionen mit hohem GC- oder AT-Gehalt

Aufgrund von strukturellen Elementen in der Humangenomtranskription weisen Promotorregionen von humanen Genen oft einen hohen oder niedrigen GC-Gehalt auf, was die Amplifizierung mit der PCR erschweren kann.⁴ Bei humanen WGS-Bibliotheken, die mit Kits ohne PCR vorbereitet werden, zeigt sich in bestimmten Promotorregionen mit hohem GC-Gehalt u. U. eine verbesserte Coverage. Um die Coverage-Performance von Illumina DNA PCR-Free, TruSeq DNA PCR-Free und TruSeq DNA Nano (mit PCR) zu vergleichen, wurden Bibliotheken aus der humanen Zelllinie NA12878 gDNA (Coriell Institute) vorbereitet. Alle Bibliotheken wurden auf einem HiSeq™ System* mit einer Laufkonfiguration von 2 × 150 bp sequenziert. Die Daten wurden per Downsampling auf eine 32–40-fache Coverage gebracht. Verglichen mit den Daten von TruSeq DNA Nano weisen die Datensätze von Illumina DNA PCR-Free und TruSeq DNA PCR-Free eine bessere Coverage über die Region mit hohem GC-Gehalt im humanen Gen *RNPEPL1* auf ([Abbildung 3](#)). Der Einsatz von Illumina DNA PCR-Free verbessert die Coverage in schwierigen Regionen.

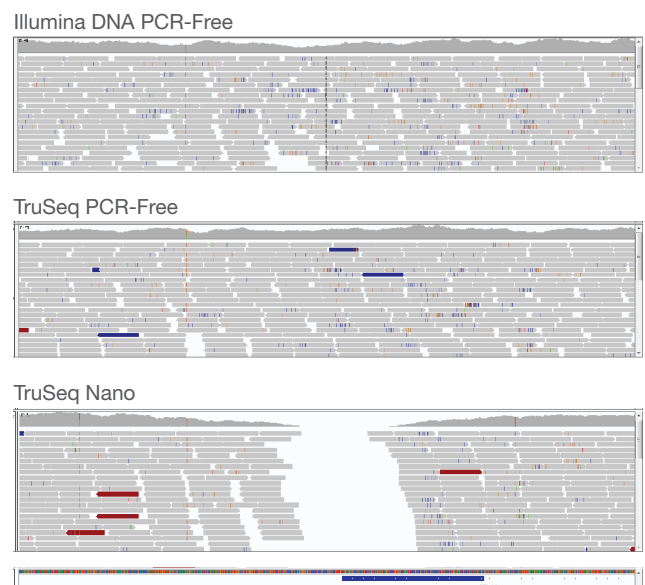


Abbildung 3: Vergleich der Read-Coverage über Regionen mit hohem GC-Gehalt: Illumina DNA PCR-Free bietet im Vergleich zu den Bibliotheksvorbereitungskits TruSeq DNA PCR-Free und TruSeq DNA Nano eine überragende Read-Coverage über Promotorregionen mit hohem GC-Gehalt des humanen *RNPEPL1*-Gens. Gemappte Reads werden mit der in BaseSpace™ Sequence Hub verfügbaren Integrative Genomics Viewer (IGV)-App visualisiert.

* Das HiSeq System ist nicht mehr verfügbar. Die angegebenen Informationen gelten jedoch auch für andere in [Tabelle 1](#) aufgeführte Systeme.

Herausragende Performance über eine breite Palette an DNA-Zugabemengen

ILLUMINA DNA PCR-FREE wurde hinsichtlich der Performance über einen weiten Bereich an DNA-Zugabemengen geprüft. Bibliotheken wurden aus DNA einer humanen Zelllinie (Coriell Institute, Katalog-Nr. NA12878) bei Zugabemengen von 600 ng und 20–200 ng[†] mit TruSeq DNA PCR-Free bzw. ILLUMINA DNA PCR-FREE vorbereitet. Die Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq™ 6000 System mit einer Laufkonfiguration von 2 × 150 bp sequenziert und per Downsampling auf eine im Mittel 40-fache Coverage gebracht. Es wurden die Kennzahlen von Qualitäts-Scores, Base-Calling und Varianten-Calling verglichen. Die Daten der einzelnen Bibliothekstypen sind hochpräzise, wobei mehr als 85 % der Basen auf dem NovaSeq 6000 System mit Q30 oder höher bewertet wurden ([Abbildung 4A](#)). Die Datensätze weisen bei Autosomen und Exons eine gleiche Base-Calling-Performance und ein gleiches Varianten-Calling auf ([Abbildung 4B](#)). Außerdem waren bei allen DNA-Zugabemengen Datenqualität, Base-Calling-Performance und Varianten-Calling gleich, auch bei einer geringen Zugabe von nur 20 ng*.

On-Bead-Taggmentierung und PCR-freies Protokoll

ILLUMINA DNA PCR-FREE bietet eine einzigartige, leistungsstarke Kombination der Vorteile von On-Bead-Taggmentierung und PCR-freier Chemie. Der On-Bead-Sättigungspunkt von ILLUMINA DNA PCR-FREE liegt bei ≥ 300 ng gDNA. Die On-Bead-Sättigung ermöglicht eine zuverlässige Insertgrößenkontrolle sowie normalisierte Ergebnisse bei DNA-Zugabemengen über 300 ng. Durch dieses Protokoll lassen sich die Quantifizierungsschritte vor und nach der Bibliotheksvorbereitung minimieren. Normalisierte Bibliotheken können nach Volumen gepoolt werden, wodurch die zeitaufwändige Quantifizierung einzelner Bibliotheken entfällt. Indem die Quantifizierung und die PCR-Schritte entfallen, bietet ILLUMINA DNA PCR-FREE einen optimierten, 90-minütigen Assay ([Abbildung 5](#)). Obwohl die Normalisierung mit Zugaben ≥ 150 ng erreicht wird, lassen sich einsatzfähige und gut funktionierende Bibliotheken mit einer Zugabe von nur 20 ng[†] DNA generieren. Die Möglichkeit, PCR-freie Bibliotheksvorbereitungen aus geringen DNA-Zugabemengen zu nutzen, eröffnet neue Anwendungen wie beispielsweise WGS aus Trockenblutspots.

[†] Die maximale Zugabemenge für ILLUMINA DNA PCR-FREE beträgt 2 µg.

Effizientes Proben-Multiplexing für Anwendungen mit hohem Durchsatz

ILLUMINA DNA PCR-FREE ist mit ILLUMINA DNA Unique Dual Indexes kompatibel, was ein präzises Proben-Demultiplexing auf ILLUMINA-Sequenziersystemen ermöglicht. Bis zu 384 Indizes sorgen bei Sequenzierungsprojekten mit hohem Durchsatz für maximale Flexibilität.

Für die Automatisierung geeignete Workflows

Dank des schnellen und einfachen Workflows ist ILLUMINA DNA PCR-FREE in höchstem Maße für die Automatisierung geeignet. Aufgrund des einheitlichen und selbstnormalisierenden Bead-basierten Workflows können Anwender mit Rohblut- oder Rohspeichelproben beginnen, das ILLUMINA Lysis-Protokoll ausführen und dann mit der Bibliotheksvorbereitung fortfahren, ohne dass Quantifizierungsschritte erforderlich sind. Diese Merkmale ermöglichen einen einfachen Workflow für die automatisierte Batchverarbeitung von Rohproben auf Liquid-Handling-Plattformen.

Um die besondere Eignung zu belegen, wurden automatisierte Workflows für TruSeq DNA PCR-Free sowie zwei enzymbasierte PCR-freie Workflows von Wettbewerbern mit ILLUMINA DNA PCR-FREE verglichen. Für jeden Workflow wurden die manuellen Arbeitsschritte, die Laborausrüstung, die Anzahl der Spitzen und die Zeit berechnet, die für die Bibliotheksvorbereitung von Batches mit 96 Proben mit einem Hamilton-Liquid-Handling-Roboter erforderlich sind. Vergleiche zeigen, dass ILLUMINA DNA PCR-FREE erhebliche Zeiteinsparungen ermöglicht ([Tabelle 2](#)).

Kosteneinsparungen mit ILLUMINA DNA PCR-FREE

Laborausrüstung, Spitzen und qPCR-Reagenzien tragen bei der Vorbereitung von Bibliotheken für NGS zu zusätzlichen Kosten bei. Ein wesentlicher Vorteil der Bead-Technologie ist die automatische Normalisierung aller in einem Batch vorbereiteten Bibliotheken anhand von Beads. Diese Selbstnormalisierung macht die Quantifizierung einzelner Bibliotheken überflüssig und ermöglicht das einfache Poolen von Bibliotheken mit gleichem Volumen. Strategien zur Korrektur indexspezifischer Leistungsabweichungen in multiplexierten Bibliotheken finden Sie im technischen Hinweis [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing](#) (Abstimmung der Proben-Coverage für die Genomsequenzierung).

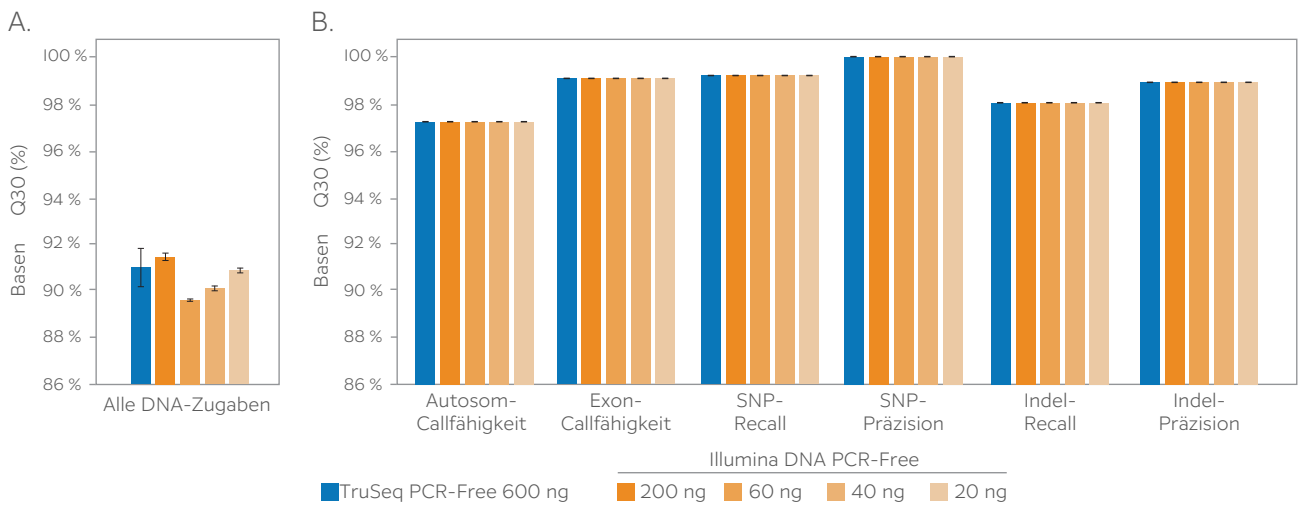


Abbildung 4: Performance von Illumina DNA PCR-Free Prep am Beispiel einer Reihe von DNA-Zugaben: Anhand einer Reihe von DNA-Zugaben vorbereitete Illumina DNA PCR-Free-Bibliotheken (A) entsprechen für alle DNA-Zugaben den Qualitätsvorgaben und (B) weisen hinsichtlich der Callfähigkeit eine gleichwertige Performance auf. Q30-Score: eine bestimmte Base-Call-Genauigkeit von 99,9 %, Autosomen-Callfähigkeit: der Prozentsatz an nicht-N-Referenzpositionen in autosomalen Chromosomen mit einem Genotyp-Call mit dem Wert PASS, Exon-Callfähigkeit: der Prozentsatz an nicht-N-Referenzpositionen in Exons mit einem Genotyp-Call mit dem Wert PASS, SNPs: Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms), Indel = Insertion-Deletion-Mutation, Präzision (Genauigkeit): berechnet als das Verhältnis von [Anzahl der richtig positiven Calls/(Anzahl der richtig positiven Calls + Anzahl der falsch positiven Calls)], Recall (Sensitivität): berechnet als das Verhältnis von [Anzahl der richtig positiven Calls/(Anzahl der richtig positiven Calls + Anzahl der falsch negativen Calls)].

TruSeq DNA PCR-Free

Bibliotheksvorbereitung mit Adapter-Ligation und Index-Tagging	Manuelle Bibliotheksquantifizierung und -normalisierung	Manuelles Pooling
5 h	2 h	0,5 h

Unternehmen K

Bibliotheksvorbereitung mit dem Workflow von Unternehmen K	Manuelle Bibliotheksquantifizierung und -normalisierung	Manuelles Pooling
ca. 2,5 h	2 h	0,5 h

Unternehmen N

Bibliotheksvorbereitung mit dem Workflow von Unternehmen N	Manuelle Bibliotheksquantifizierung und -normalisierung	Manuelles Pooling
ca. 2,5 h	2 h	0,5 h

Illumina DNA PCR-Free, Blut oder Speichel

Illumina Lysis Kit	Bibliotheksvorbereitung mit PCR-freier Bead-gebundener Tagmentierung	Pooling nach Volumen
ca. 1,5 h	1,5 h	0,5 h

Illumina DNA PCR-Free, gDNA

Bibliotheksvorbereitung mit PCR-freier Bead-gebundener Tagmentierung	Pooling nach Volumen
1,5 h	0,5 h

Abbildung 5: Illumina DNA PCR-Free-Workflow: Der Illumina DNA PCR-Free-Workflow überzeugt von der Fragmentierung oder Tagmentierung bis hin zur Bibliotheksbereinigung durch eine geringe Assay-Gesamtdauer von 90 Minuten. Archivierte Daten, Illumina Inc., 2019. Hinweis: Unternehmen N verwendet proprietäre Reagenzien in Kombination mit Adaptern von Illumina.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien zur Automatisierung für 96 Proben^a

Methode	Probentyp	Manuelle Eingriffe	Platten mit 96 Proben	Spitzen	Zeit
TruSeq DNA PCR-Free	gDNA	20	20	5.504	10 h 10 min
Unternehmen K	gDNA	13	19	4.076	6 h 21 min
Unternehmen N	gDNA	13	17	3.266	5 h 42 min
Illumina DNA PCR-Free (+ optionale qPCR-Quantifizierung von Pools)	Blut, Speichel	2 (6)	10 (12)	2.016 (2.072)	2 h 32 min (4 h 7 min)
Illumina DNA PCR-Free (+ optionale qPCR-Quantifizierung von Pools)	gDNA	2 (6)	8 (10)	1.604 (1.660)	1 h 32 min (3 h 7 min)

a. Verwendung von Hamilton-Software für Hamilton Star mit 96er CO-RE-Kopf + 8 Kanälen. qPCR wurde bei der Erstellung des Automatisierungsmodells für alle Workflows Probe für Probe berücksichtigt. Bei allen Workflows außer Illumina DNA PCR-Free wird vorausgesetzt, dass jede Probe mithilfe von qPCR bewertet, angepasst und gepoolt wurde. Das Probenpooling erfolgt auf Grundlage von vier Pools mit 24 Proben. Archivierte Daten, Illumina Inc., 2019. Hinweis: Unternehmen N verwendet proprietäre Reagenzien in Kombination mit Adaptern von Illumina.

Da PCR-freie Bibliotheken in der Regel durch qPCR quantifiziert werden, beseitigt Illumina DNA PCR-Free im gesamten Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung die Verwendung von qPCR (z. B. bei der PCR-Bibliotheksamplifikation und der Quantifizierung nach der Bibliotheksvorbereitung) oder verringert den qPCR-Anteil deutlich. Ein Modell zu zusätzlichen Kosten, beispielsweise für qPCR-Reagenzien, Laborausstattung, Spitzen, Quantifizierungsreagenzien und Extraktionskits von Drittanbietern, zeigt, dass der Illumina DNA PCR-Free-Workflow wesentliche Kosteneinsparungen bietet.⁵ Die versteckten Kosten können z. B. beim TruSeq PCR-Free-Workflow ca. 56 % und bei enzymbasierten PCR-freien Kits von Wettbewerbern ca. 44 % der Gesamtkosten ausmachen.‡ Beim Illumina DNA PCR-Free-Workflow belaufen sich die zusätzlichen Kosten auf nur ca. 21 %, was im Vergleich zu anderen Bibliotheksvorbereitungskits eine wesentliche Verringerung darstellt.†

‡ Die Kosten für die Bibliotheksvorbereitungskits wurden für diese Berechnung angeglichen. Die versteckten Kosten sind variabel und werden als Anteil an den Gesamtkosten auf Grundlage der jeweiligen Workflowspezifikationen berechnet (Tabelle 2).

Zusammenfassung

Illumina DNA PCR-Free bietet eine einzigartige Kombination der Vorteile von On-Bead-Tagmentierung und PCR-freier Chemie. Die On-Bead-Tagmentierung ermöglicht die Bead-basierte Normalisierung sowie ein einfaches, volumenbasiertes Bibliothekspooling und macht Quantifizierungsschritte vor und nach der Bibliotheksvorbereitung überflüssig. Der PCR-freie Workflow vereinfacht das Verfahren und verringert die Gesamtdauer des Workflows, während er eine enorm einheitliche Coverage über repetitive oder ungleichmäßige Genomregionen hinweg bietet. Mit dem integrierten Flex Lysis Reagent Kit können Blut, Speichel und Trockenblut als Rohprobenzugabe für den Workflow verwendet werden. Für Anwendungen mit hoher Sensitivität wie die Human-WGS, die *De-novo*-Assemblierung von mikrobiellen Genomen oder das Tumor-Normal-Varianten-Calling bietet Illumina DNA PCR-Free eine herausragende Anwenderfreundlichkeit, eine einheitliche Coverage und äußerst präzise Daten.

Weitere Informationen

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 samples)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 samples)	20041795
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091660
Illumina Lysis Reagent Kit	20042221

Quellen

1. Illumina. Illumina DNA Prep. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf Veröffentlicht 2020. Aufgerufen am 1. September 2023.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722. Veröffentlicht am 1. Oktober 2018. doi:10.1186/s12864-018-5096-9
3. Illumina. Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits. illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote_truseq_comparison.pdf Veröffentlicht 2013. Aufgerufen am 31. Januar 2022.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol.* 2004;4(2):109-125.
5. Archivdaten. Illumina, Inc., 2019.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-00679 DEU v2.0