

# TruSeq™ DNA PCR-Free

Einfache, optimierte Bibliotheksvorbereitung für die Gesamtgenom-Sequenzierung, die eine genaue und umfassende Abdeckung komplexer Genome bietet.

## Vorteile

- **Optimierte Bibliotheksvorbereitung**  
Protokoll ohne PCR beschleunigt den TruSeq DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Workflow
- **Ausgezeichnete Abdeckungsqualität**  
Äußerst geringe Bibliotheksverzerrungen und Abdeckungslücken ermöglichen tiefe Einblicke in das Genom
- **Hohe Flexibilität**  
Optimierte Workflows ohne PCR unterstützen verschiedene Read-Längen und Anwendungen
- **Umfassende Lösung**  
Die zuverlässige Lösung umfasst Master-Mischungs-Reagenzien, Größenauswahl-Beads und bis zu 96 eindeutige doppelte Indizes (Unique Dual Index, UDI)



**Abbildung 1: TruSeq DNA PCR-Free:** Bei TruSeq DNA PCR-Free handelt es sich um eine effiziente Lösung zur Vorbereitung und Indizierung von Probenbibliotheken. TruSeq DNA PCR-Free bietet bis zu 24 Indizes für Studien mit geringem Durchsatz bzw. bis zu 96 doppelte Indizes oder bis zu 96 eindeutige doppelte Indizes (separat erhältlich) für Studien mit hohem Durchsatz.

## Einleitung

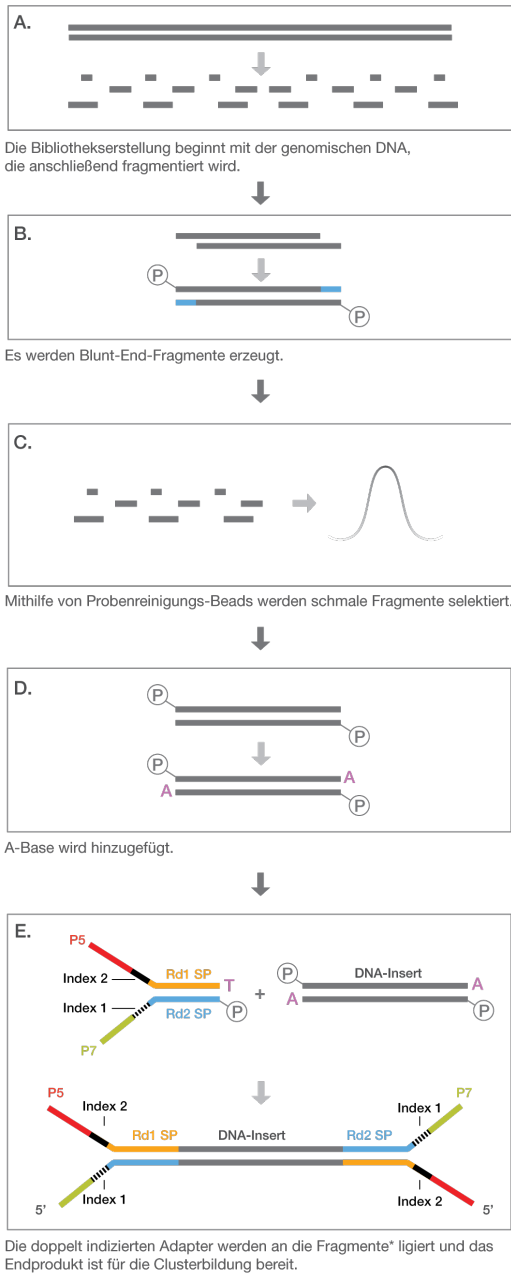
TruSeq DNA PCR-Free bietet zahlreiche Verbesserungen des häufig verwendeten TruSeq DNA-Workflows und eine optimierte Bibliotheksvorbereitung für Gesamtgenom-Sequenzierungsanwendungen (Whole-Genome Sequencing, WGS). Durch den Wegfall der PCR-Amplifikationsschritte reduziert das Protokoll ohne PCR typische, PCR-bedingte Verzerrungen in erheblichem Maße und liefert detaillierte Sequenzinformationen für üblicherweise schwierige Genombereiche. Es sind Niedrigdurchsatz- und Hochdurchsatz-Protokolle für zahlreiche Studiendesigns erhältlich (Abbildung 1).

## Beschleunigte Bibliotheksvorbereitung

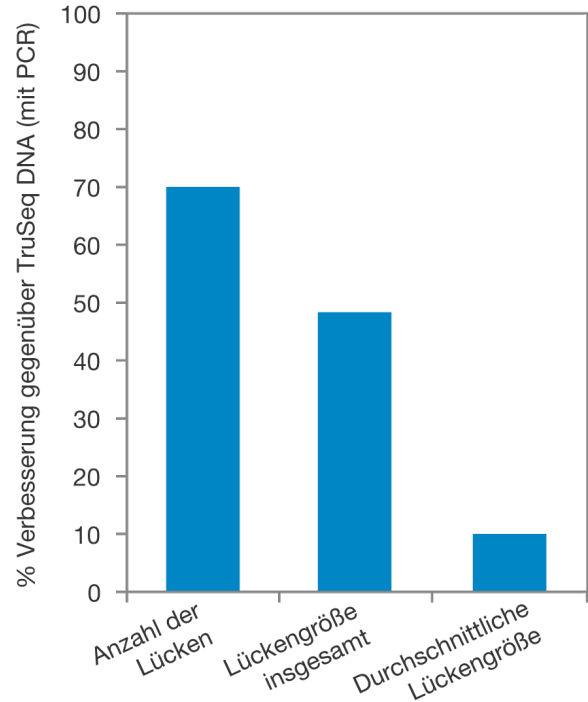
Der TruSeq DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Workflow wurde optimiert, indem der PCR-Amplifikationsschritt entfernt und die gelbasierte Größenauswahl durch eine Bead-basierte Auswahl ersetzt wurde (Abbildung 2). Dieser Workflow bietet eine herausragende Flexibilität mit zwei Protokolloptionen für die Generierung von entweder großen (550 bp) oder kleinen (350 bp) Insertgrößen, um verschiedene Anwendungen zu unterstützen. Master-Mischungs-Reagenzien, mitgelieferte Probenreinigungs-Beads zur Reinigung und Größenauswahl, zuverlässige TruSeq-Indizes und optimierte Protokolle tragen zu einem vereinfachten Bibliotheksvorbereitungs-Workflow bei, der wenige Reinigungsschritte zur Verarbeitung einer großen Anzahl an Proben erfordert. TruSeq DNA PCR-Free verringert die Bibliotheksvorbereitungsdauer und ermöglicht es Forschern, Anwendungen von der mikrobiellen Sequenzierung bis hin zur Sequenzierung humaner Gesamtgenome durchzuführen.

## Innovative Chemie zur Bibliotheksvorbereitung

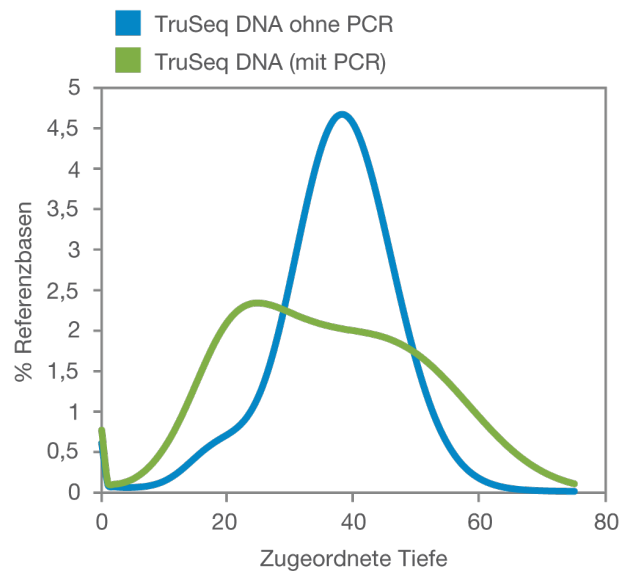
TruSeq DNA PCR-Free ist zur Vorbereitung von DNA-Bibliotheken für Single-Read-, Paired-End- und indizierte Sequenzierungen bestimmt. TruSeq DNA PCR-Free unterstützt das Schneiden durch Covaris-Ultraschall und erfordert 1 µg Zugabe-DNA für eine durchschnittliche Insertgröße von 350 bp bzw. 2 µg DNA für eine durchschnittliche Insertgröße von 550 bp. Die Bibliothekserstellung beginnt mit der fragmentierten genomischen DNA (gDNA) (Abbildung 2A). Blunt-End-DNA-Fragmente werden mithilfe einer Kombination aus Fill-in-Reaktionen und Exonuklease-Aktivität (Abbildung 2B) generiert und die Größenauswahl erfolgt mithilfe bereitgestellter Probenreinigungs-Beads (Abbildung 2C). Anschließend wird eine A-Base zu den Blunt-Enden jedes Strangs hinzugefügt, um sie auf die Ligation an die indizierten Adapter vorzubereiten (Abbildung 2D). Jeder Adapter enthält einen T-Base-Überhang zur Ligation des Adapters an die A-tailed, fragmentierte DNA. Diese Adapter enthalten die vollständigen Gegenstücke zu Sequenzierungs-Primerhybridisierungsstellen für Single-, Paired-End- und Index-Reads. Dadurch, dass keine zusätzliche PCR-Amplifikation erforderlich ist, können einfach oder doppelt indizierte Adapter an die Fragmente ligiert werden und die Produkte sind bereit zur Clusterbildung (Abbildung 2E).



**Abbildung 2: TruSeq DNA PCR-Free Workflow** – The TruSeq DNA PCR-Free-Workflow beinhaltet die Adapterligation, sodass sequenzierfähige Produkte ohne PCR-Amplifikation generiert werden. \*Die TruSeq DNA PCR-Free LT-Indizierungslösung beinhaltet in Schritt E einen einfach indizierten Adapter.



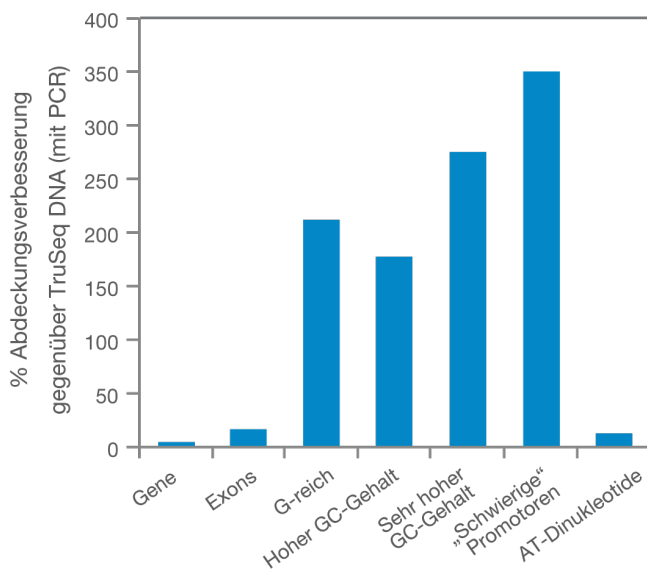
**Abbildung 3: Weniger Abdeckungslücken:** TruSeq DNA Nano-Bibliotheken weisen eine deutlich geringere Anzahl und Gesamtgröße der Lücken im Vergleich zu Bibliotheken auf, die mit dem TruSeq DNA-Protokoll (mit PCR) vorbereitet wurden. Eine Lücke ist eine Region mit einer Länge von  $\geq 10$  bp, deren Genotyp aufgrund der geringen Tiefe, niedrigen Alignment-Scores oder geringen Basenqualität nicht präzise ermittelt werden kann.



**Abbildung 4: Größere Abdeckungseinheitlichkeit:** TruSeq DNA PCR-Free-Bibliotheken bieten im Vergleich zu Bibliotheken, die mit dem TruSeq DNA-Protokoll (mit PCR) generiert wurden, eine größere Abdeckungseinheitlichkeit über das gesamte Genom hinweg.

## Ausgezeichnete Abdeckungsqualität

TruSeq DNA PCR-Free reduziert die Anzahl und Durchschnittsgröße der typischen PCR-bedingten Abdeckungslücken (Abbildung 3) und gewährleistet somit eine hervorragende Datenqualität. Durch den Wegfall der PCR-Amplifikation aus dem TruSeq DNA PCR-Free-Workflow treten auch weniger Bibliotheksverzerrungen auf und es wird eine bessere Abdeckungseinheitlichkeit über das gesamte Genom hinweg erzielt (Abbildung 4). Dieser Workflow bietet zudem eine hervorragende Abdeckung von üblicherweise schwierigem genomischem Inhalt, darunter GC-reiche Regionen, Promotoren und repetitive Regionen (Abbildung 5). Die hohe Datenqualität bietet Basenpaarauflösung, was eine detaillierte Ansicht von somatischen und *De-novo*-Mutationen ermöglicht und die genaue Identifikation verursachender Varianten unterstützt. TruSeq DNA PCR-Free gewährt einen tiefen Einblick in das Genom, einschließlich codierender, regulatorischer und intronischer Regionen, was es Forschern ermöglicht, mehr genomische Informationen aus jedem Sequenzierungslauf zu gewinnen (Abbildung 6).



**Abbildung 5: Größere Abdeckung von schwierigen Bereichen:** TruSeq DNA PCR-Free-Bibliotheken weisen eine verbesserte Abdeckung von üblicherweise schwierigem genomischem Inhalt auf. Zu diesen Regionen zählen bekannte proteincodierende und nicht proteincodierende humane Exons und Gene, die im RefSeq-Gendetektor des UCSC Genome Browsers definiert sind. G-reiche Regionen entsprechen 30 Basen mit  $\geq 80\%$  G. Regionen mit hohem GC-Gehalt werden als 100 Basen mit einem GC-Gehalt von  $\geq 75\%$  definiert. Regionen mit sehr hohem GC-Gehalt werden als 100 Basen mit einem GC-Gehalt von  $\geq 85\%$  definiert. „Schwierige“ Promotoren weisen rund 100 unzureichend abgedeckte Promotorregionen auf, die vom Broad Institute of MIT and Harvard empirisch definiert wurden. AT-Dinukleotide weisen auf 30 Basen mit wiederkehrenden AT-Dinukleotiden hin.

## Effizientes Proben-Multiplexing

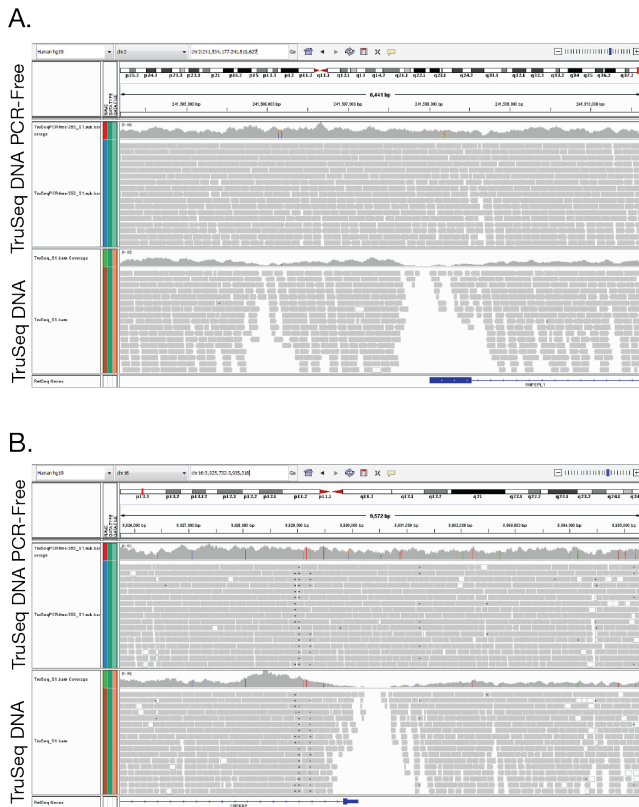
Die Indizes werden zur Bereitstellung einer innovativen Proben-Multiplexing-Lösung in einem einfachen Verfahren ohne PCR zu den gDNA-Fragmenten der Probe hinzugefügt. Für eine bessere Betriebseffizienz können bis zu 96 vorgefüllte, eindeutig indizierte Proben gepoolt und zusammen in eine einzige Fließzellen-Lane auf einer beliebigen Illumina-Sequenzierungsplattform sequenziert werden. Nach der Sequenzierung werden die Indizes verwendet, um die Daten zu demultiplexieren und Reads den richtigen Proben im Pool zuzuweisen. TruSeq DNA PCR-Free kann eine Strategie mit einfachem Index oder eine Strategie mit doppeltem Index verwenden, die eine eindeutige Kombination aus zwei Indizes zum Demultiplexieren nutzt. Die (separat erhältlichen) Adapter mit eindeutigem doppeltem Index (Unique Dual Index, UDI) wurden im Rahmen der Zusammenarbeit von Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) und Illumina entwickelt, damit eindeutige Paare von Indizes zum Demultiplexieren verwendet werden können.

Die TruSeq DNA Single Indexes umfassen bis zu 24 Indizes mit zwei Sets von je 12 Indizes und die TruSeq DNA CD Indexes beinhalten 96 Indizes. Versuche mit mehreren Proben können bequem mit Illumina Experiment Manager verwaltet werden, einer kostenlosen Software zur einfachen Reaktionseinrichtung für plattenbasierte Probenverarbeitungen. Sie ermöglicht es Forschern, das Index-Probenblatt (z. B. Proben-Multiplexing-Matrix) für den Gerätelauf zu konfigurieren, um das Demultiplexing automatisch durchzuführen.



Weitere Informationen über Illumina Experiment Manager finden Sie unter

[www.illumina.com/informatics/research/experimental-design/illumina-experiment-manager.html](http://www.illumina.com/informatics/research/experimental-design/illumina-experiment-manager.html).



**Abbildung 6: TruSeq DNA PCR-Free reduziert Anzahl von Abdeckungslücken:** Die größere Abdeckung der TruSeq DNA PCR-Free-Bibliotheken resultiert in weniger Abdeckungslücken, hier veranschaulicht anhand der GC-reichen, codierenden Regionen des *RINPEPL1*-Promotors (A) und des *CREBBP*-Promotors (B). Die mit TruSeq DNA PCR-Free generierten Sequenzinformationen werden in den oberen Bereichen von (A) und (B) gezeigt, während die Sequenzdaten, die mit dem TruSeq DNA-Protokoll generiert wurden, in den unteren Bereichen gezeigt werden.

## Flexible und umfassende Bibliotheksvorbereitung

Die TruSeq-Familie der Bibliotheksvorbereitungslösungen umfasst mehrere Optionen für Sequenzierungsanwendungen, die für zahlreiche Forschungsanforderungen und Studiendesigns geeignet sind (Tabelle 1). Alle TruSeq-Produkte unterstützen Studien mit hohem und niedrigem Durchsatz. Diese Workflows bieten zahlreiche Verbesserungen bei der TruSeq DNA-Bibliotheksvorbereitungsmethode und eröffnen neue Möglichkeiten für verschiedene Sequenzierungsanwendungen.

Bibliotheksvorbereitungsreagenzien und Sequenzierungsindizes sind ab sofort separat erhältlich, sodass Forscher diese Workflows auf die jeweiligen Experimente abstimmen können.

## Eine optimierte Lösung

TruSeq DNA PCR-Free umfasst Bibliotheksvorbereitungsreagenzien, Probenreinigungs-Beads und zuverlässige TruSeq-Indizes für das Multiplexing und stellt somit eine umfassende, für hohe Leistung optimierte Vorbereitungsmethode auf allen Illumina-Sequenzierungsplattformen dar. TruSeq DNA PCR-Free bietet dank der zwei Optionen (24 und 96 Proben) die Flexibilität für Versuchsdesigns von unterschiedlichem Umfang. Mit dem vereinfachten Protokoll und den flexiblen Multiplexingoptionen bietet TruSeq DNA PCR-Free eine optimierte Bibliotheksvorbereitungsmethode, die hervorragende Sequenzierungsdaten liefert.

**Tabelle 1: TruSeq DNA-Bibliotheksvorbereitung**

Spezifikation	TruSeq DNA Nano	TruSeq DNA PCR-Free	TruSeq DNA
Beschreibung	Basiert auf der häufig angewandten TruSeq-Bibliotheksvorbereitung mit geringerer Zugabemenge und verbesserter Datenqualität	Ausgezeichnete genomische Abdeckung mit drastisch reduzierten Bibliotheksverzerrungen und Lücken	Original-TruSeq-Bibliotheksvorbereitungsmethode für die Sequenzierung der nächsten Generation
Zugabemenge	100–200 ng	1–2 µg	1 µg
Umfasst PCR	Ja	Nein	Ja
Assay-Dauer	ca. 6 Stunden	ca. 5 Stunden	1–2 Tage
Manueller Aufwand	ca. 5 Stunden	ca. 4 Stunden	ca. 8 Stunden
Target-Insertgröße	350 bp oder 550 bp	350 bp oder 550 bp	300 bp
Gelfrei	Ja	Ja	Nein
Anzahl der unterstützten Proben	24 (LT) oder 96 (HT) <sup>a</sup>	24 (LT) oder 96 (HT) <sup>a</sup>	48 (LT) oder 96 (HT) <sup>a</sup>
Unterstützt Anreicherung	Nein <sup>b</sup>	Nein <sup>b</sup>	Ja
Größenauswahl-Beads	Enthalten	Enthalten	Nicht enthalten
Anwendungen	WGS, einschließlich Gesamtgenom-Resequenzierung, <i>De-novo</i> -Assemblierung und Metagenomik-Studien		
Proben-Multiplexing	24 einfache Indizes, 96 kombinierte doppelte Indizes, 24 und 96 eindeutige doppelte Indizes (UDIs)		
Kompatible Illumina-Sequenzierungssysteme	HiSeq™, HiScanSQ™, Genome Analyzer- sowie MiSeq™- und MiniSeq™-Systeme		

a. LT, Niedrigdurchsatz, HT, Hochdurchsatz.

b. Nextera™ Rapid Capture-Produkte unterstützen zahlreiche Anreicherungsanwendungen. Weitere Informationen finden Sie unter [www.illumina.com/NRC](http://www.illumina.com/NRC).



## Zusammenfassung

TruSeq DNA PCR-Free optimiert den TruSeq-Workflow und bietet so für jede Sequenzierungsanwendung eine passende Bibliotheksvorbereitungsmethode. Optionen für geringen und hohen Durchsatz sowie verschiedene Insertgrößen bieten größere Flexibilität und unterstützen eine Vielzahl von Anwendungen und genomischen Studien. Die Workflow-Innovationen reduzieren PCR-bedingte Verzerrungen, um detaillierte und präzise Erkenntnisse über das Genom zu ermöglichen. Dank des schnelleren Workflows und der besseren Datenqualität bietet TruSeq DNA PCR-Free eine umfassende Probenvorbereitungsmethode für Genomsequenzierungsanwendungen.

## Weitere Informationen

Weitere Informationen über TruSeq DNA PCR-Free finden Sie unter [www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-dna-pcr-free.html](http://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-dna-pcr-free.html)

## Quellen

1. Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, et al. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci Translational Med.* 2012;4(154):154ra135.
2. Aird D, Ross MG, Chen WS, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 2011;12:R18.
3. University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu). Aufgerufen im Juli 2013.
4. The Broad Institute of MIT and Harvard. [www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org). Aufgerufen im Juli 2013.

## Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep (24 Proben)	20015962
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep (96 Proben)	20015963
TruSeq DNA Single Indexes Set A	20015960
TruSeq DNA Single Indexes Set B	20015961
TruSeq DNA CD Indexes	20015949
IDT for Illumina–TruSeq DNA UD Indexes (24 Indizes, 96 Proben)	20020590
IDT for Illumina–TruSeq DNA UD Indexes (96 Indizes, 96 Proben)	20022370

**Illumina, Inc.** • Tel. USA (gebührenfrei) 1.800.809.4566 • Tel. außerhalb Nordamerikas +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2017 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Weitere Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pub. No. 770-2013-001-D DEU QB #

**illumina**<sup>®</sup>