

illumina DNA Prep

Ein schneller, integrierter Workflow für eine breite Palette von Anwendungen – von der Sequenzierung humaner Gesamtgenome bis hin zu Amplikons, Plasmiden und mikrobiellen Spezies.

Vorteile

- Schneller Bibliotheksvorbereitungs-Workflow**
 Geringerer Zeitaufwand und weniger manuelle Arbeitsschritte mithilfe der On-Bead-Tagmentierung, die die Gesamtbibliotheksvorbereitungszeit auf weniger als drei Stunden reduziert
- Integrierte Probenzugabe**
 Höhere Effizienz bei der Bibliotheksvorbereitung dank integrierter DNA-Extraktionsprotokolle für Blut, Speichel und Trockenblutspots
- Flexibler Workflow mit großem DNA-Zugabebereich**
 Vereinfachte Tagesabläufe mit einem Kit, das einen großen DNA-Zugabebereich (1–500 ng), mehrere DNA-Zugabetypen sowie kleine und große Genome unterstützt
- Breites Anwendungsspektrum**
 Sequenzierung von humanen oder anderen großen/komplexen Genomen sowie von Amplikons und mikrobiellen, parasitären oder mykotischen Spezies
- Optimierte Bibliotheksvorbereitungsleistung**
 Konsistente Insertgrößen und eine hohe Einheitlichkeit der Coverage, unabhängig vom Erfahrungslevel des Benutzers

Einleitung

Die Weiterentwicklung der NGS-Technologie (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) hat die Genomforschung zwar beschleunigt, in vielen Labors treten in der Bibliotheksvorbereitungsphase des NGS-Workflows aber immer noch Engpässe auf. Da sowohl vor als auch nach der Bibliotheksvorbereitung mehrere Schritte erforderlich sind, kommt es in vielen Labors zu erheblichen Verzögerungen, bis der Sequenzierungsprozess gestartet werden kann. Die Schritte vor der Bibliotheksvorbereitung umfassen die DNA-Extraktion, -Quantifizierung und -Fragmentierung. Im Anschluss an die Bibliotheksvorbereitung erfolgen Bibliotheksqualitätsprüfungen, die Bibliotheksquantifizierung und die Bibliotheksnormalisierung.

Mit den Nextera™ DNA Library Preparation Kits brachte Illumina eine Tagmentierungsschemie auf den Markt, die die DNA-Fragmentierung und die Adapter-Ligation in einer einzigen 15-minütigen Reaktion vereinte und die Bibliotheksvorbereitungszeit auf 90 Minuten reduzierte. Mit der Markteinführung der Nextera XT DNA Library Prep Kits entfiel die Bibliotheksquantifizierung vor dem Bibliotheks-Pooling und der Sequenzierung.¹ Nun steht die neueste revolutionäre Weiterentwicklung der Bibliotheksvorbereitungschemie von Illumina zur Verfügung: das illumina DNA Prep Kit.^{*} Die einzigartige Chemie im illumina DNA Prep Kit (Abbildung 1, Tabelle 1) umfasst die Schritte DNA-Extraktion und -Fragmentierung sowie Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormalisierung und ermöglicht somit Workflows, die schneller und flexibler sind als bei anderen illumina-Produkten zur Bibliotheksvorbereitung (Abbildung 2, Tabelle 2).

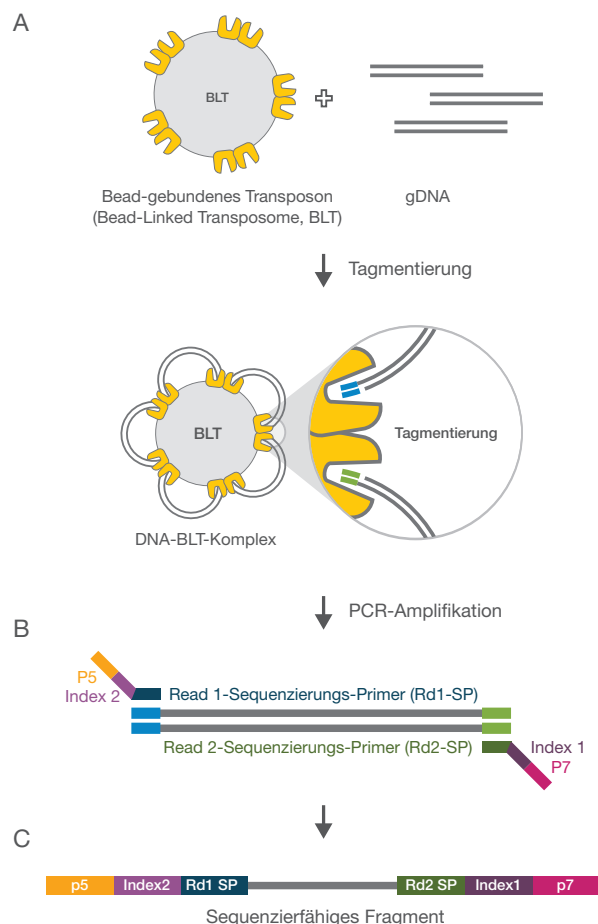


Abbildung 1: illumina-Chemie mit Bead-gebundenen Transposons: (A) Bead-gebundene Transposons vermitteln die simultane Fragmentierung von gDNA und die Zugabe von Sequenzierungs-Primern von illumina. (B) Die PCR mit weniger Zyklen amplifiziert die sequenzierfähigen DNA-Fragmente und fügt Indizes und Adapter hinzu. (C) Die sequenzierfähigen Fragmente werden gewaschen und gepoolt.

Tabelle 1: illumina DNA Prep – Spezifikationen

Parameter	illumina DNA Prep Kit
DNA-Zugabetyp	gDNA, Blut, Speichel, PCR-Amplikons, Plasmide, Trockenblutspots
Erforderliche DNA-Zugabe	1–500 ng (kleine Genome) 100–500 ng (große Genome)
Proben-Multiplexing	24 einfache Indizes, 384 doppelte Indizes
Unterstützte Sequenziersysteme	Alle illumina-Systeme
Gesamtdauer des Bibliotheksvorbereitungs-Workflows (gDNA) ^a	3–4 Stunden

a. Umfasst DNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormalisierung/-Pooling

* Zuvor Nextera DNA Flex Library Preparation Kit

TruSeq Nano						
DNA-Extraktion	DNA-Quant.	DNA-Fragm.	Bibliotheksvorbereitung mit Adapter-Ligation und Index-Tagging	Bibliotheksquant.	Manuelle Normalisierung und Pooling	ca. 11 Stunden GWZ
1 Std.	0,5 Std.	1 Std.	6 Std.	0,5 Std.	2 Std.	

Nextera XT				
DNA-Extraktion	DNA-Quant.	Bibliotheksvorbereitung mit Nextera-Tagmentierung	Bead-basierte Normalisierung und Pooling	ca. 5,5 Stunden GWZ
1 Std.	0,5 Std.	2,5 Std.	1,5 Std.	

Illumina DNA Prep			
DNA-Extraktion	DNA-Quant.	Bibliotheksvorbereitung mit Nextera-Tagmentierung und integrierter Normalisierung	ca. 4 Stunden GWZ
1 Std.	0,5 Std.	2,5 Std.	

Illumina DNA Prep (Blut, Speichel)			
Flex Lysis Kit	Bibliotheksvorbereitung ohne Quantifizierung mit Nextera-Tagmentierung und integrierter Normalisierung	ca. 3 Stunden GWZ	
0,5 Std.	2,5 Std.		

Abbildung 2: Illumina DNA Prep bietet den schnellsten Illumina-Workflow: Die Berechnungen erfolgten unter der Annahme, dass 16 Proben gleichzeitig mit einer Mehrkanalpipette verarbeitet werden. GWZ = Gesamt-Workflow-Zeit von der DNA-Extraktion bis zur Bibliotheksnormalisierung und dem Pooling. Die Dauer der Workflow-Schritte wurde unter Zugrundelegung von spezifischen Methoden berechnet: DNA-Extraktion (QIAamp DNA Mini Kit oder Flex Lysis Kit), DNA-Quantifizierung (Qubit), DNA-Fragmentierung (Covaris) sowie manuelle Bibliotheksnormalisierung und Pooling (Bioanalyzer). Die Dauer kann abhängig von den verwendeten Gerätschaften, der Anzahl der verarbeiteten Proben sowie den Automatisierungsverfahren oder der Erfahrung des Benutzers variieren. Die grau dargestellten Workflow-Schritte sind in den Bibliotheksvorbereitungs-Kits nicht enthalten.

Tabelle 2: Vergleich der Vorbereitungs-Workflows von Illumina für DNA-Bibliotheken

	TruSeq Nano	Nextera XT	Illumina DNA Prep ^{a,b}
Integrierte DNA-Lyse enthalten	–	–	✓
Flexibler, großer DNA-Zugabebereich	–	–	✓
Bibliotheksnormierung enthalten	–	✓	✓
DNA-Zugabe	100–200 ng	1 ng	1–500 ng
Gesamtdauer der Bibliotheksvorbereitung ^c	11 Stunden	5 Stunden	3–4 Stunden
Insertgröße	350 bp oder 550 bp	< 300 bp	300–350 bp
Proben-Multiplexing	96 doppelte Indizes	384 doppelte Indizes	24 einfache Indizes 384 doppelte Indizes

a. Integrierte DNA-Extraktionsprotokolle für Blutproben, Speichelproben und Trockenblutspots
 b. Bibliotheksnormierung erfolgt mit ≥ 100 ng DNA-Zugabe
 c. Gesamtdauer der Bibliotheksvorbereitung umfasst DNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormierung/-Pooling

Zusätzlich zu einem schnellen Workflow bietet das Illumina DNA Prep Kit eine herausragende Flexibilität in Bezug auf Zugabebetyp und Zugabemenge sowie ein breites Spektrum an unterstützten Anwendungen. Von der Sequenzierung humaner Gesamtgenome (Whole-Genome Sequencing, WGS) bis hin zu kleinen mikrobiellen Plasmiden – das Illumina DNA Prep Kit erzielt bei jeder Sequenzierungsanwendung eine gleichmäßige Genom-Coverage mit der bewährten Genauigkeit der Chemie zur Sequenzierung durch Synthese (SBS) von Illumina.²

Schneller, flexibler Bibliotheksvorbereitungs-Workflow

Das Illumina DNA Prep Kit vereint mehrere Funktionen und bietet den schnellsten Workflow im Illumina-Produktportfolio für die Bibliotheksvorbereitung. Ein bedeutender Fortschritt bei der Illumina-Chemie ist die On-Bead-Tagmentierung.

Diese verwendet Bead-gebundene Transposons, um einheitlichere Tagmentierungsreaktionen im Vergleich zu In-Lösung-Tagmentierungsreaktionen zu ermöglichen. Nach der Sättigung der Bead-gebundenen Transposons mit DNA ist keine weitere Tagmentierung möglich, sodass ein äußerst einheitliches sättigungsbasiertes Normalisierungsverfahren durchgeführt werden kann. Diese Methode bietet mehrere signifikante Vorteile:

- Bei DNA-Zugaben von 100 bis 500 ng ist eine genaue Quantifizierung der anfänglichen DNA-Probe nicht erforderlich. In diesem Bereich wird die DNA-Insert-Fragmentgröße nicht durch die DNA-Zugabe beeinträchtigt, wodurch Zeit und Kosten für mühsame Quantifizierungsverfahren eingespart werden.
- Die On-Bead-Tagmentierung erfordert keine separate mechanische oder enzymatische DNA-Fragmentierung, wodurch Zeit und Kosten für Geräte zum Scheren oder für enzymatische Kits entfallen.
- Bei DNA-Zugaben von 100–500 ng führt die On-Bead-Tagmentierung zu einer sättigungsbasierten DNA-Normalisierung, sodass vor dem Pooling keine individuelle Bibliotheksquantifizierung und -normalisierung durchgeführt werden müssen.

Der benutzerfreundliche Workflow umfasst außerdem weniger manuelle Arbeitsschritte und unterstützt Liquid-Handling-Systeme für die Automatisierung der Bibliotheksvorbereitung. Diese Weiterentwicklungen ermöglichen einen Workflow mit den wenigsten Schritten und der kürzesten Gesamtverarbeitungsdauer im Portfolio von Illumina (Abbildung 2).

Integrierte DNA-Zugabe

Mit Illumina DNA Prep Kits und Flex Lysis Reagent Kits kann die DNA-Extraktion direkt aus frischen Blut- oder Speichelproben durchgeführt werden. Die optionalen Flex Lysis Reagent Kits wurden für Illumina DNA Prep optimiert und validiert. Die Workflow-Schritte, Reagenzien und Anweisungen im Benutzerhandbuch wurden vollständig integriert, um maximale Effizienz zu erzielen. Die Lyseprotokolle werden mit praktischen Bead-basierten Reagenzien durchgeführt und erfordern weniger als 30 Minuten manuellen Aufwand. Sie werden direkt der Illumina DNA Prep-Tagmentierungsreaktion zugeführt.

Optimierte Bibliotheksvorbereitungsleistung

Dank der Eigenschaften der On-Bead-Tagmentierung konnte die Bibliotheksvorbereitungsleistung deutlich verbessert werden. Das Illumina DNA Prep Kit generiert äußerst einheitliche und konsistente Insertgrößen (300–350 bp) über einen großen DNA-Zugabebereich (1–500 ng) hinweg (Abbildung 3). Die On-Bead-Tagmentierung ermöglicht die Generierung einheitlicher Insertgrößen über einen großen Zugabebereich hinweg. Daher ist es nicht mehr erforderlich, die Fragmentlänge durch eine sorgfältige Optimierung des Transposon-zu-DNA-Verhältnisses zu prüfen. Des Weiteren bietet der große DNA-Zugabebereich mehr Flexibilität, da er die Durchführung von Versuchen mit verschiedenen Probentypen, einschließlich wertvoller Proben, ermöglicht. Zusätzlich zu einheitlichen Insertgrößen erzielt die On-Bead-Tagmentierung auch einheitliche und konsistente Ergebnisse über einen großen DNA-Zugabebereich (100–500 ng) hinweg (Abbildung 4). Bei einer Zugabe von exakt oder ungefähr 100 ng DNA sind die Beads abgesättigt, was zu konsistenten und normalisierten Ergebnissen führt. Zeitintensive Bibliotheksquantifizierungs- und -normalisierungsschritte vor dem Pooling entfallen. Bei einem Vergleich der Leistung des Illumina DNA Prep Kit und des TruSeq™ Nano DNA Library Prep Kit erzielte das Illumina DNA Prep Kit Ergebnisse, die vergleichbar mit der mechanischen Fragmentierung bzw. bei bestimmten Metriken besser als diese waren (Tabelle 3).

Neben einem verbesserten Workflow aufgrund der Bead-basierten Technologie besteht der größte Vorteil von konsistenten und einheitlichen Insertgrößen und Bibliotheksergebnissen in einer gleichmäßigeren und einheitlichen Coverage über das Humangenom und das Genom anderer nicht menschlicher Spezies hinweg (Abbildung 5). Selbst Genome mit hohem oder niedrigem GC-Gehalt zeigen eine bemerkenswert gleichmäßige Coverage ohne regionsspezifische Ausrichtung (Abbildung 5B).

Tabelle 3: Illumina DNA Prep – Leistung

Parameter ^a	Illumina DNA Prep	TruSeq Nano
Paired-End-Reads nach Filterung	3,7 × 10 ⁸	3,7 × 10 ⁸
Call-Fähigkeit bei Autosomen	96,5 %	96,9 %
Call-Fähigkeit bei Exons von Autosomen	98,4 %	98,4 %
Autosomen-Coverage > 10x	98,5 %	98,6 %
SNV-Recall	98,7 %	98,7 %
SNV-Präzision	99,8 %	99,7 %
Indel-Recall	93,7 %	92,9 %
Indel-Präzision	97,0 %	94,9 %

a. Die Analyse wurde mit 20 Proben (alle NA12878-Coriell-Proben) durchgeführt, verteilt auf fünf Läufe, um eine etwa 30-fache Humangenom-Coverage zu erzielen. Die Datenanalyse erfolgte mit den BaseSpace™-Apps Whole Genome Sequencing v6.0.0 und Variant Calling Assessment Tool v3.0.0. SNV = Single Nucleotide Variant (Einzelnukleotid-Variante), Indel = Insertion-Deletion-Variante.

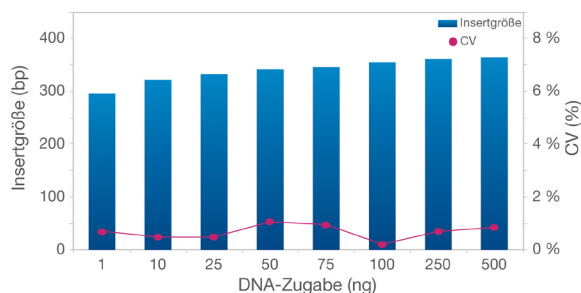


Abbildung 3: einheitliche und konsistente Insertgrößen: Die On-Bead-Tagmentierung erzielt unabhängig von der DNA-Zugabemenge konsistente Insertgrößen. Bei einer Zugabemenge von 1 bis 500 ng DNA beträgt der Varianzkoeffizient (Coefficient of Variance, CV) 6,09 %. Die Bibliotheken wurden mit *E. coli*-Replikatproben und Illumina DNA Prep generiert. Der Lauf wurde auf einem MiSeq™ System (2 × 76 bp) durchgeführt.

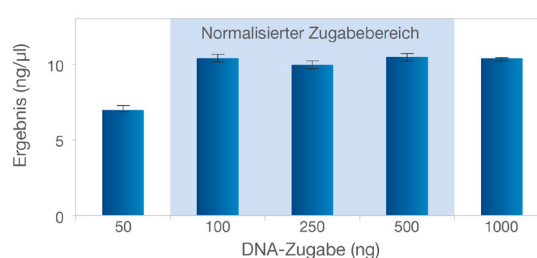


Abbildung 4: tagmentierte und normalisierte Bibliotheken: Die Beads sind bei 100 ng oder darüber abgesättigt, was zu einem normalisierten Ergebnis tagmentierter DNA führt. Durch die Normalisierung tagmentierter DNA entfallen die Schritte der nachgeschalteten Bibliotheksnormalisierung. Die Bibliotheken wurden mit Human-NA12878-Proben (Coriell Institute) und Illumina DNA Prep generiert. Der Lauf wurde auf einem MiSeq-System (2 × 76 bp) durchgeführt.

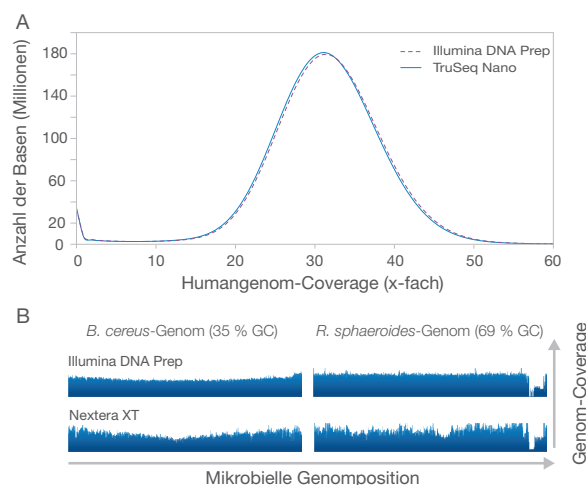


Abbildung 5: Illumina DNA Prep verbessert die Einheitlichkeit der Coverage: (A) Illumina DNA Prep bietet eine einheitliche Coverage über das gesamte Genom hinweg, die mit dem TruSeq Nano DNA Kit vergleichbar ist. Die Bibliotheken wurden mit Human-NA12878-Proben (Coriell Institute) und dem Illumina DNA Prep Kit oder dem TruSeq Nano Kit generiert. Die Sequenzierung wurde auf einem HiSeqX™-System (2 × 151 bp) durchgeführt. (B) Die Coverage wird für Mikroorganismen mit sehr hohem oder niedrigem GC-Gehalt dargestellt. Angesichts der verbesserten On-Bead-Bibliotheksvorbereitungsschemie erzielte Illumina DNA Prep eine gleichmäßigere Coverage als Nextera XT. Die Bibliotheken wurden mit dem Nextera XT Kit oder dem Illumina DNA Prep Kit vorbereitet. Die Daten wurden auf einem HiSeq™ 2500-System (Rapid Run v2, 2 × 151 bp) durchgeführt.



	Human-WGS	Große, komplexe Genome	Kleine Genome
Sequenzierungs- anwendungen	<ul style="list-style-type: none"> • Krebsgenomforschung • Variantenerkennung • Studien zu genetischen Risiken • Populationsgenetik 	<ul style="list-style-type: none"> • Agrargenomik (Mais, Weizen, Rinder usw.) • Modellorganismen (Fruchtfliege, Maus, Zebrafisch usw.) • Pflanzen-/Tierforschung 	<ul style="list-style-type: none"> • Humanes Mikrobiom • Mikrobiologie/Metagenomik • Gesundheitsforschung • Amplikon-Sequenzierung
Sequenzierungs- beispiele	<ul style="list-style-type: none"> • Humangenom (3,2 Gb), 30-fach, S2-Kit, NovaSeq™-System, 8 Proben je Fließzelle • Humangenom (3,2 Gb), > 30-fach, v2.5 HiSeq X-System, 8 Proben je Fließzelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Genom der Fruchtfliege (175 Mb), 30-fach, v2-Kit, NextSeq™ 550-System, 22 Proben je Fließzelle • Mausgenom (2,7 Gb), 30-fach, v1-Kit, HiSeq 4000-System, 8 Proben je Fließzelle 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>-Genom (4,6 Mb), 30-fach, MiniSeq™-System, 50 Proben je Fließzelle • Plasmide/Amplikons (650 kb), 1.000-fach, MiSeq-System, 11 Proben je Fließzelle

Abbildung 6: Breites Anwendungsspektrum von Illumina DNA Prep: Von der Human-WGS über große/komplexe Genome bis hin zu mikrobiellen Genomen bietet Illumina DNA Prep Flexibilität für Versuche.

Flexibler Workflow bietet ein breites Anwendungsspektrum

Der wahrscheinlich größte Vorteil von Illumina DNA Prep ist die Flexibilität. Es eignet sich für ein breites Spektrum an Forschungsgebieten und -anwendungen. Das Kit unterstützt Anwendungen in der Human-WGS, Krebsgenomforschung, ökologischen Metagenomik, Infektionsforschung, Agrargenomik und viele mehr (Abbildung 6). Ganz gleich, ob Sie große komplexe Genome, kleine Genome, Plasmide, Amplikons, grampositive bzw. gramnegative Bakterien, Pilz- oder verschiedene Pflanzen- und Tier-Spezies sequenzieren, Illumina DNA Prep bietet bei jeder Anwendung eine umfassende genomische Coverage. Der flexible und benutzerfreundliche Workflow lässt sich für verschiedene Erfahrungslevel der Benutzer sowie für zahlreiche Anwendungen und Probenzugabetypen anpassen.

Zusammenfassung

Das Illumina DNA Prep Kit bietet einen revolutionären Workflow, der die DNA-Extraktion, -Quantifizierung, -Fragmentierung und Bibliotheksnormalisierung vereint. Er ist der schnellste und flexibelste Bibliotheksvorbereitungs-Workflow im Produktportfolio von Illumina. Der benutzerfreundliche und automatisierbare Workflow eignet sich für Benutzer aller Erfahrungslevel und bietet einen gängigen Workflow für zahlreiche Versuchsdesigns. On-Bead-Tagmentierungsschemie unterstützt einen großen DNA-Zugabebereich, verschiedene Probenotypen und eine breite Palette an Anwendungen, darunter unter anderem die Human-WGS, ökologische Metagenomik, Pflanzen- und Tierforschung sowie das Tumor-Profilierung. Erleben Sie selbst, wie Sie der innovative Illumina DNA Prep-Workflow zusammen mit der Leistungsfähigkeit der Illumina-SBS-Chemie Ihren Forschungszielen schneller als bisher näherbringt.

Weitere Informationen

Weitere Informationen über Illumina DNA Prep finden Sie unter www.illumina.com/illumina-dna-prep.

Weitere Informationen zur WGS mit Illumina DNA Prep finden Sie im [Anwendungshinweis zur Human-WGS](#) und im [Anwendungshinweis zur Mikroben-WGS](#).

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 Proben)	20018704
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (96 Proben)	20018705
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
IDT® for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben)	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben)	20027214
IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set C (96 Indizes, 96 Proben)	20027215
IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set D (96 Indizes, 96 Proben)	20027216
IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set A–D (384 Indizes, 384 Proben)	20027217
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben)	20042666 Demnächst erhältlich
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben)	20042667 Demnächst erhältlich
Nextera DNA CD Indexes (24 Indizes, 24 Proben)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (96 Indizes, 96 Proben)	20018708

„IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes“ ist die neue Bezeichnung für „IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes“. Der Kit-Inhalt ist identisch.

Quellen

1. Illumina (2014). [Datenblatt zum Nextera XT DNA Library Preparation Kit](#). Abgerufen am 14. April 2020.
2. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456:53–59.