

TruSeq™ DNA Nano

Eine Methode mit geringer Zugabemenge, die bei praktisch allen Sequenzierungsanwendungen eine zuverlässige, umfassende Untersuchung des Genoms ermöglicht.

Vorteile

- **Geringe Probenzugabe**
Hervorragende Datenqualität mit Zugabemengen von nur 100 ng zur Untersuchung von Proben mit begrenzt verfügbarer DNA
- **Ausgezeichnete Coverage-Qualität**
Umfassende Untersuchung des Genoms dank besonders geringer Bibliotheksverzerrung und weniger Coverage-Lücken
- **Hohe Flexibilität**
Für zahlreiche Read-Längen geeigneter optimierter Workflow, mit dem sich Bibliotheken in weniger als einem Tag vorbereiten lassen
- **Umfassende Lösung**
Zuverlässige Lösung mit Master-Mischungs-Reagenzien, Größenauswahl-Beads und bis zu 96 eindeutigen doppelten Indizes (Unique Dual Indexes, UDIs)

Bibliotheken in weniger als einem Tag vorbereiten können. TruSeq DNA Nano ist für verschiedene Read-Längen zwischen 2 × 101 bp und 2 × 151 bp optimiert. Master-Mischungs-Reagenzien, Probenreinigungs-Beads zur Bereinigung und Größenauswahl, zuverlässige TruSeq-Indizes und optimierte Protokolle tragen zu einem vereinfachten Workflow bei, der wenige Reinigungsschritte zur Verarbeitung einer großen Anzahl an Proben erfordert.



Einleitung

Dank des gängigen TruSeq-Bibliotheksvorbereitungs-Workflows, der nur eine geringe Zugabemenge erfordert, ermöglicht TruSeq DNA Nano die effiziente Untersuchung von Proben mit begrenzt verfügbarer DNA. Der Workflow reduziert die typischen PCR-bedingten Verzerrungen erheblich und liefert detaillierte Sequenzdaten zu Genombereichen, die sich herkömmlicherweise nur schwer analysieren lassen. Es sind Niedrigdurchsatz- und Hochdurchsatz-Protokolle für zahlreiche Studiendesigns erhältlich ([Abbildung 1](#)).

Geringe Probenzugabe

TruSeq DNA Nano erfordert weniger Mikrogramm DNA, sodass Forscher auch Proben mit begrenzt verfügbarer DNA (z. B. Tumormaterial) untersuchen können. Außerdem vereinfacht dies die Aufbewahrung von Proben für die spätere Verwendung oder alternative Studien. Dieser Workflow bietet mit zwei Protokollen zur Generierung großer (550 bp) bzw. kleiner (350 bp) Insertgrößen die notwendige Flexibilität für ein breites Anwendungsspektrum. Die einfache Bead-basierte Größenauswahl beschleunigt den Workflow. Zusätzlich entfällt der bei der gelbasierten Auswahl typische Probenverlust. TruSeq DNA Nano zeichnet sich bei einer Vielzahl von Illumina-Gesamtenom-Sequenzierungsanwendungen (Whole-Genome Sequencing, WGS) nachweislich durch hohe genomische Coverage aus.

Beschleunigte Bibliotheksvorbereitung

Der Wechsel von gel- auf Bead-basierte Größenauswahl ([Abbildung 2](#)) optimiert das TruSeq DNA-Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung, sodass Forscher hochwertige

Abbildung 1: TruSeq DNA Nano: Bei TruSeq DNA Nano handelt es sich um eine Lösung zur Vorbereitung und Indizierung von Probenbibliotheken, die nur eine geringe Probenzugabe erfordert. TruSeq DNA Nano 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.

Innovative Chemie zur Bibliotheksvorbereitung

TruSeq DNA Nano ist zur Vorbereitung von DNA-Bibliotheken für Single-Read-, Paired-End- und indizierte Sequenzierungen bestimmt. TruSeq DNA Nano ist für das Schneiden mit dem Covaris-Ultraschallverfahren geeignet und erfordert 100 ng Zugabe-DNA für eine durchschnittliche Insertgröße von 350 bp oder 200 ng 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. Einfach oder doppelt indizierte Adapter werden an die Fragmente ligiert ([Abbildung 2E](#)) und die Produkte werden mit einer geringeren PCR-Verzerrung amplifiziert ([Abbildung 2F](#)).

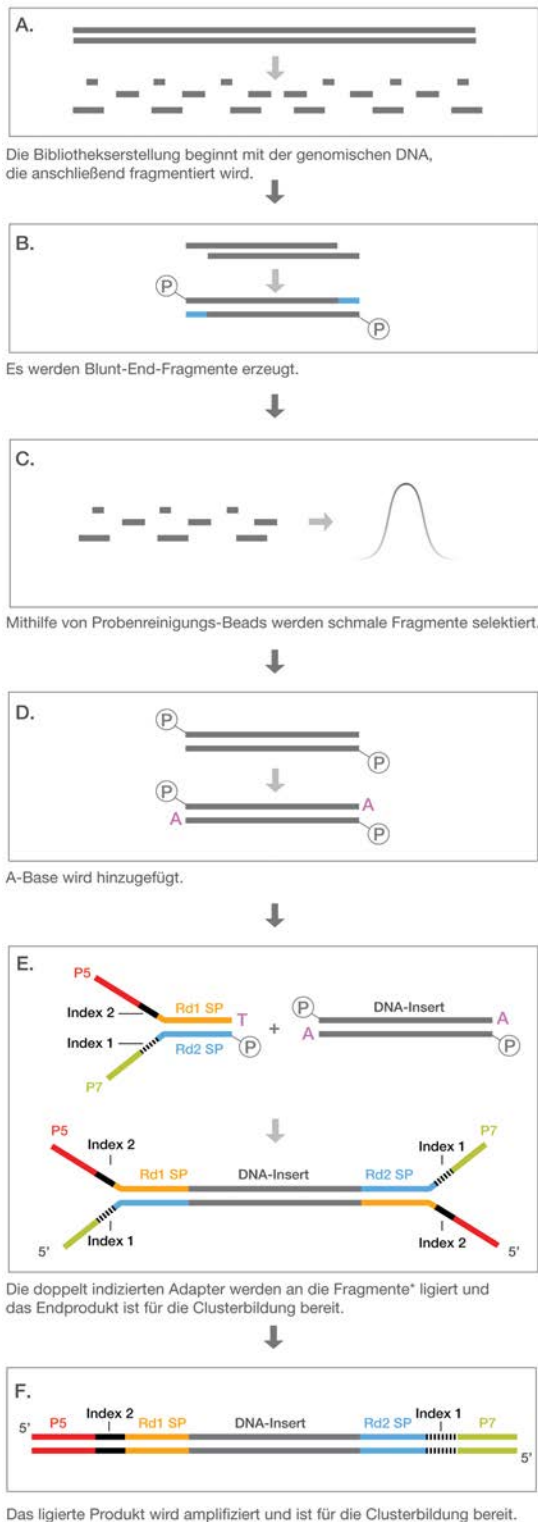


Abbildung 2: TruSeq DNA Nano-Workflow: Der TruSeq DNA Nano-Workflow beinhaltet die Adapterligation, sodass sequenzierfähige Produkte mit minimalen PCR-bedingten Verzerrungen generiert werden. * Die TruSeq Nano DNA LT-Indizierungslösung beinhaltet in Schritt E einen einfach indizierten Adapter.

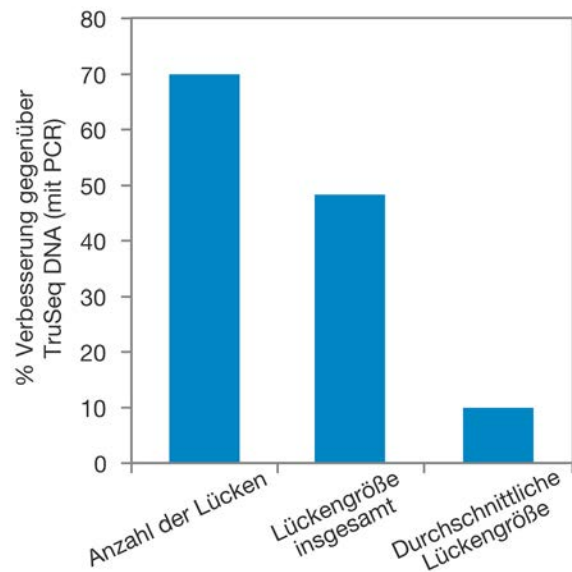


Abbildung 3: Weniger Coverage-Lücken: TruSeq DNA Nano-Bibliotheken weisen eine deutlich geringere Anzahl und Gesamtgröße der Lücken im Vergleich zu Bibliotheken auf, die mit dem TruSeq DNA-Protokoll (mit PCR) vorbereitet wurden. Eine Lücke ist eine Region mit einer Länge von ≥ 10 bp, deren Genotyp aufgrund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

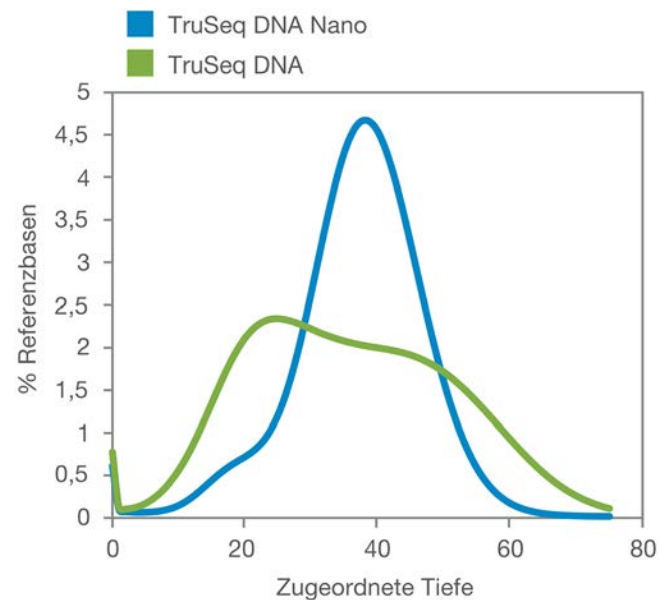


Abbildung 4: Größere Coverage-Einheitlichkeit: TruSeq DNA Nano-Bibliotheken bieten im Vergleich zu Bibliotheken, die mit dem TruSeq DNA-Protokoll (mit PCR) generiert wurden, eine größere Coverage-Einheitlichkeit über das gesamte Genom hinweg.

Tabelle 1: TruSeq DNA-Bibliotheksvorbereitung

Spezifikation	TruSeq DNA Nano	TruSeq DNA PCR-Free	TruSeq DNA (ursprüngliche Version)
Beschreibung	Basiert auf der gängigen TruSeq-Bibliotheksvorbereitung mit geringerer Zugabemenge und verbesserter Datenqualität	Ausgezeichnete genomische Coverage mit deutlich weniger Bibliotheksverzerrung 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) ^a	24 (LT) oder 96 (HT) ^a	48 (LT) oder 96 (HT) ^a
Größenauswahl-Beads	Enthalten	Enthalten	Nicht enthalten
Anwendungen	WGS-Anwendungen, 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), (demnächst erhältlich)		
Kompatible Illumina-Sequenziersysteme	HiSeq™ 1000, HiSeq 1500, HiSeq 2000, HiSeq 2500, HiSeq 3000, HiSeq 4000, HiSeq X Five, HiSeq X Ten, MiniSeq™, MiSeq™, MiSeqDx im Forschungsmodus, NextSeq™ 500, NextSeq 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000 und NovaSeq™ 6000		HiSeq, HiScanSQ, Genome Analyzer, MiSeq und MiniSeq

a. LT = Low-Throughput (Niedrigdurchsatz), HT = High-Throughput (Hochdurchsatz)

Ausgezeichnete Coverage-Qualität

TruSeq DNA Nano reduziert die Anzahl und Durchschnittsgröße der typischen PCR-bedingten Coverage-Lücken ([Abbildung 3](#)) und gewährleistet somit eine hervorragende Datenqualität. Der verbesserte Workflow reduziert die Bibliotheksverzerrung und verbessert die Coverage-Einheitlichkeit über das gesamte Genom hinweg ([Abbildung 4](#)). Er bietet zudem eine hervorragende Coverage 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 Charakterisierung verursachender Varianten unterstützt. TruSeq DNA Nano gewährt eine umfassende Untersuchung des Genoms, einschließlich codierender, regulatorischer und intronischer Regionen, was es Forschern ermöglicht, mehr genomische Informationen aus jedem Sequenzierungslauf zu gewinnen ([Abbildung 6](#)).

Flexible und umfassende Bibliotheksvorbereitung

Die TruSeq-Familie der Bibliotheksvorbereitungslösungen umfasst mehrere Workflows für Sequenzierungsanwendungen, die für zahlreiche Forschungsanforderungen und Studiendesigns geeignet sind ([Tabelle 1](#)). Alle TruSeq-Workflows eignen sich für Studien mit hohem und niedrigem Durchsatz. TruSeq DNA Nano eignet sich zudem für die Gesamtgenom-Sequenzierung (Whole Genome Sequencing, WGS) und ist ideal für Sequenzierungsanwendungen mit spärlich verfügbarer DNA. 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.

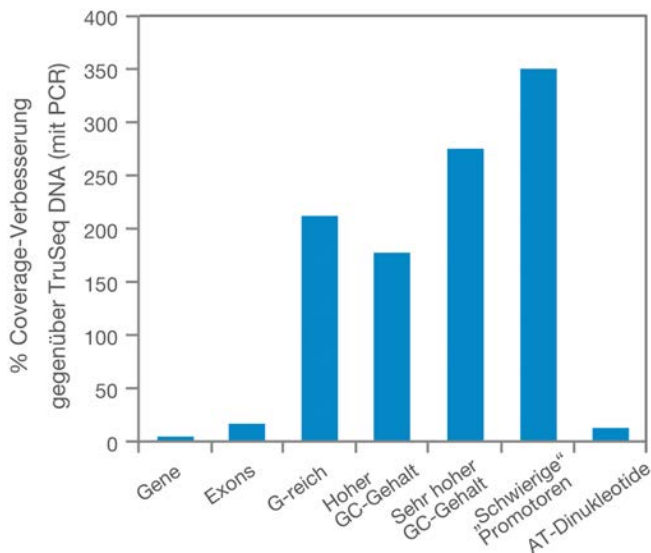


Abbildung 5: Erhöhte Coverage schwieriger Bereiche: TruSeq DNA Nano-Bibliotheken weisen eine verbesserte Coverage von üblicherweise schwierigem genomischem Inhalt auf. Zu diesen Regionen zählen bekannte proteincodierende und nicht proteincodierende humane Exons und Gene, die im RefSeq-Genetektor des UCSC Genome Browsers definiert sind.¹ 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.² AT-Dinukleotide weisen auf 30 Basen mit wiederkehrenden AT-Dinukleotiden hin.

Effizientes Proben-Multiplexing

Die Indizes werden für eine innovative Lösung zum Proben-Multiplexing in einem einfachen Verfahren zu den gDNA-Fragmenten der Probe hinzugefügt. Für eine bessere Betriebseffizienz können bis zu 96 vorgefüllte, eindeutig indizierte Proben gepoolt und zusammen in einer einzigen 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 Nano kann eine Strategie mit einfachem Index oder eine Strategie mit doppeltem Index verwenden, die eine eindeutige Kombination aus zwei Indizes zum Demultiplexieren nutzt.

Die 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 neu eingeführten UDIs (24 und 96, separat erhältlich) bieten eine größere Plexität, die die präzise Zuordnung von Reads und den effizienten Einsatz von Fließzellen ermöglicht. Die Verwendung von UDI-Kombinationen ist eine bewährte Methode, mit der sich sicherstellen lässt, dass Reads mit falschen Indizes das Varianten-Calling nicht beeinflussen.

Eine optimierte Lösung

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

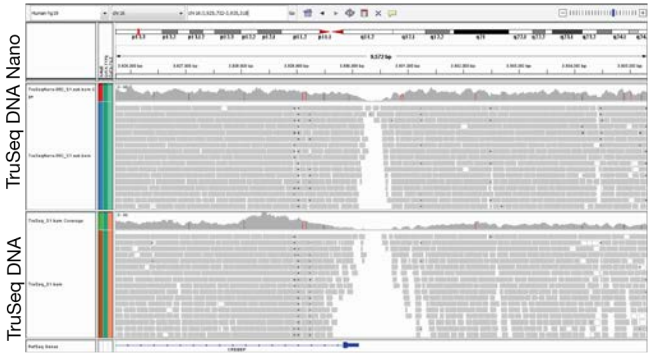
Zusammenfassung

TruSeq DNA Nano optimiert das TruSeq-Protokoll und bietet so für praktisch jede Sequenzierungsanwendung eine Bibliotheksvorbereitungsmethode, die nur eine geringe Probenzugabe erfordert. Optionen für geringen und hohen Durchsatz sowie verschiedene Insertgrößen bieten größere Flexibilität und unterstützen eine Vielzahl von Anwendungen und genomischen Studien. Workflow-Innovationen reduzieren PCR-bedingte Verzerrungen und ermöglichen so detaillierte und präzise Einblicke in das Genom. Dank des schnelleren Workflows und der besseren Datenqualität bietet TruSeq DNA Nano eine umfassende Probenvorbereitungsmethode für Genomsequenzierungsanwendungen.

Weitere Informationen

Weitere Informationen über TruSeq DNA Nano finden Sie unter www.illumina.com/products/truseq-nano-dna-sample-prep-kits.html.

A.



B.

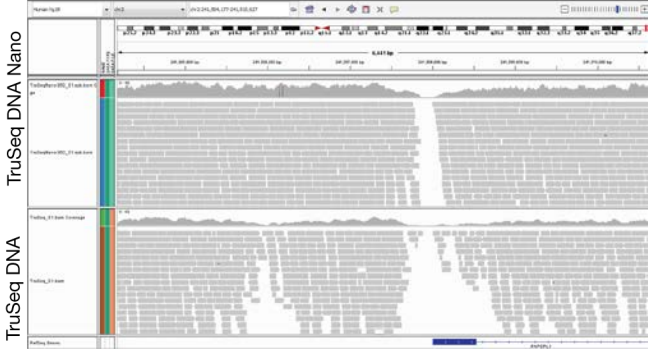


Abbildung 6: TruSeq DNA Nano reduziert die Anzahl von Coverage-Lücken:
Die größere Coverage der TruSeq DNA Nano-Bibliotheken resultiert in weniger Coverage-Lücken, hier veranschaulicht anhand der GC-reichen, codierenden Regionen des *RNPEPL1*-Promotors (A) und des *ZBTB34*-Promotors (B). Die anhand der TruSeq DNA Nano-Vorbereitung gewonnenen 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.

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSeq DNA Nano Low Throughput Library Prep Kit (24 Proben)	20015964
TruSeq DNA Nano High Throughput Library Prep Kit (96 Proben)	20015965
TruSeq DNA Single Indexes Set A (12 Indizes, 24 Proben)	20015960
TruSeq DNA Single Indexes Set B (12 Indizes, 24 Proben)	20015961
TruSeq DNA CD Indexes (96 Proben)	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

Quellen

1. University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. genome.ucsc.edu. Aufgerufen im Juli 2013.
2. The Broad Institute of MIT and Harvard. www.broadinstitute.org. Aufgerufen im Juli 2013.