

# Performance von TruPath™ Genome bei Proben unterschiedlicher Art und Qualität

Geeignet für zahlreiche  
Probentypen wie Blut,  
isolierte Zellen, Speichel,  
Trockenblutspots und  
Wangenschleimhautabstriche

Hochwertige Ergebnisse  
bei unterschiedlichen  
Probenqualitäten, einschließlich  
bei DNA aus Standard- und  
HMW(High Molecular Weight,  
hohes Molekulargewicht)-  
Extraktionskits

Robuste Performance  
mit DNA-Zugabemengen  
zwischen 175 ng und 550 ng

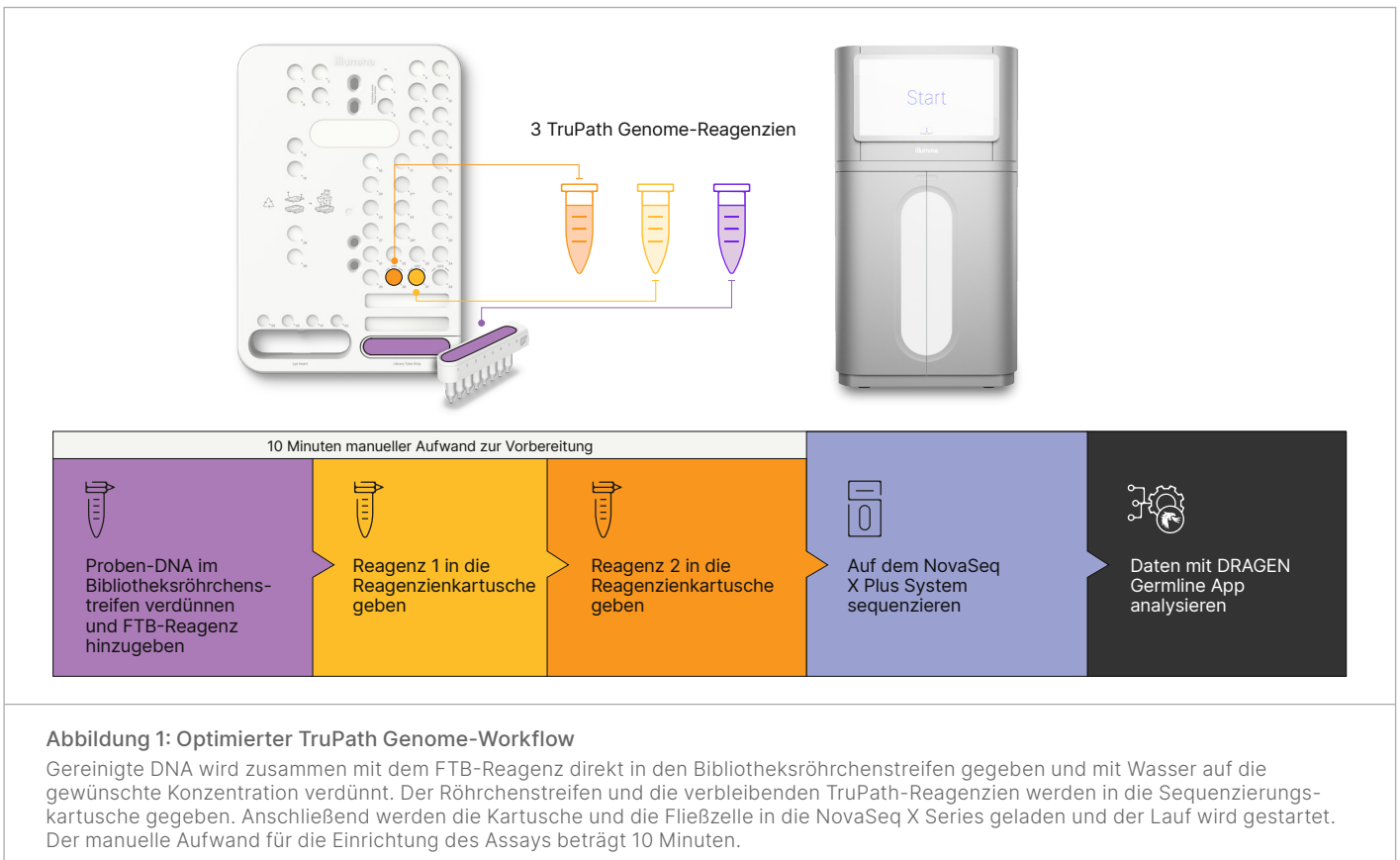
## Einleitung

Die Short-Read-Sequenzierung ist ein flexibles, zuverlässiges Verfahren für die hochpräzise Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing). Ein kleiner Anteil des menschlichen Genoms bleibt jedoch weiterhin schwer zu mappen (z. B. Regionen mit hoher Sequenzhomologie oder repetitiven Sequenzen sowie bestimmten Variantentypen wie strukturellen Varianten (Inversionen, Translokationen, Insertionen und Deletionen sowie komplexe Rearrangements usw.)). Long-Read-Sequenzierungsverfahren können zur Analyse dieser Regionen und Variantentypen beitragen, unterliegen jedoch Einschränkungen aufgrund des Bedarfs an hohen DNA-Zugabemengen sowie aufgrund strikter Anforderungen an die Zugabequalität, komplexer Workflows und variabler Ergebnisse.<sup>1-4</sup>

Illumina TruPath Genome revolutioniert den NGS-Workflow (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) und ermöglicht damit die umfassende Genomsequenzierung mit bislang unerreichter Anwenderfreundlichkeit.<sup>5</sup> TruPath Genome bietet einen hochgradig vereinfachten Workflow, bei dem der herkömmliche Bibliotheksvorbereitungsschritt im Wesentlichen entfällt. Dank dieser Rationalisierung sind von der gereinigten DNA bis zum Laden ins Sequenziersystem nur ca. 10 Minuten erforderlich (**Abbildung 1**).

Neben dem Paradigmenwechsel beim WGS-Workflow zeichnet sich TruPath Genome durch fortschrittliche Informatik aus, die hochpräzise Short-Read-Daten mit Nanowell-Proximity-Informationen aus DNA-Matrizen auf der Fließzelle kombiniert. Diese Proximity-Informationen ermöglichen Laboren die Generierung von Long-Distance-Erkenntnissen zu Genomsequenzen, die durch Millionen von Basen getrennt sein können. Durch die Kombination dieser Long-Distance-Erkenntnisse zum Genom mit den Stärken der Short-Read-Sequenzierung macht TruPath Genome umfassende Genome zugänglich.

Der vorliegende technische Hinweis zeigt die extrem robusten Fähigkeiten von TruPath Genome zur Analyse bislang schwer zu mappender Genomregionen und den umfassenden Variantennachweis bei unterschiedlichen Probenentypen, DNA-Qualitäten und DNA-Zugabemengen.



## Tests für verschiedene Probenotypen

### Methoden

#### Proben

Die Performance von TruPath Genome wurde anhand einer Reihe von Probenotypen bewertet, darunter Blut, isolierte Zellen, Speichel, Wangenschleimhautabstriche und Trockenblutspots (Tabelle 1). Die DNA-Extraktion wurde mit mehreren Reinigungsverfahren (Silicamembran-Spin-Säulen, magnetische Beads, Alkoholpräzipitation usw.) durchgeführte und umfasst HMW(High Molecular Weight, hohes Molekulargewicht)- und Standard-Extraktionsmethoden (Tabelle 2).

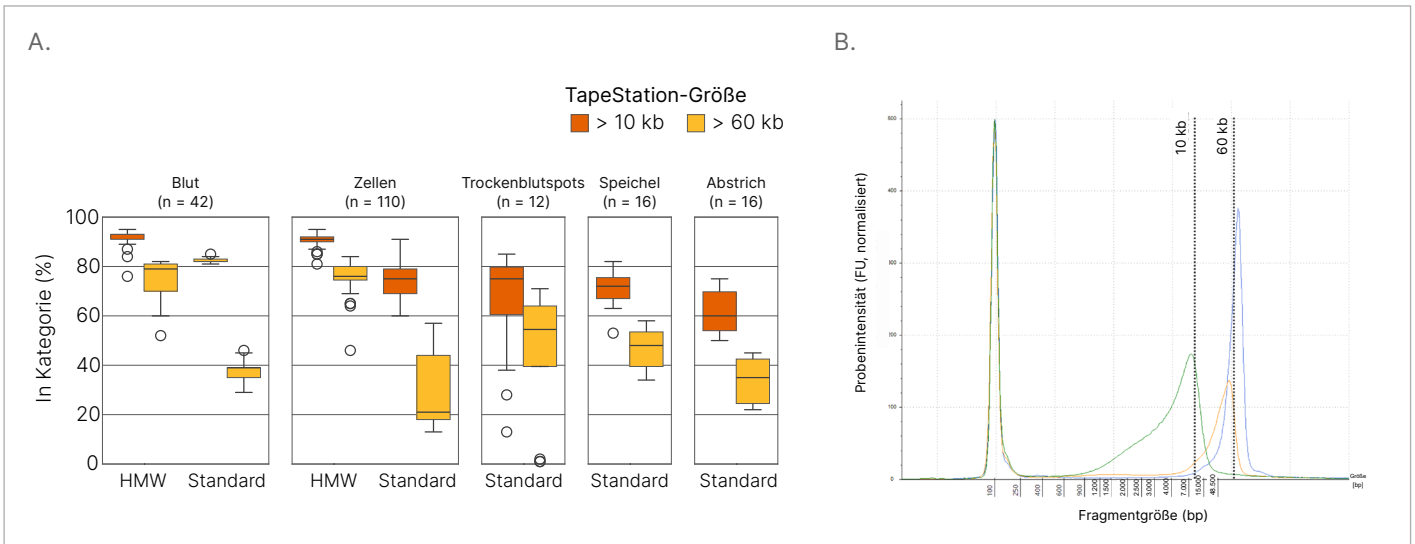
Die DNA-Menge wurde mit dem Qubit dsDNA High Sensitivity Assay auf dem Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q32851) bestimmt. Die DNA-Qualität wurde mit einem 4200 TapeStation System (Agilent, Katalog-Nr. G2991BA) beurteilt (Abbildung 2).

Tabelle 1: Im TruPath Genome-Assay verwendete Proben

| Probenotyp                | Quelle   |
|---------------------------|--|
| Vollblut                  | In K <sub>2</sub> EDTA aufbewahrte Blutproben gesunder Spender, die bei Research Donors (London, Vereinigtes Königreich) erworben wurden   |
| Zellpellets               | Mehrere Kulturen lymphoblastoider oder fibroblastischer Zelllinien, die beim Coriell Institute for Medical Research bestellt wurden<br><br>HMW- und Standard-DNA-Proben, einschließlich der Referenzproben des Genome in a Bottle-Konsortium (GIAB) HG001, HG002, HG003, HG004, HG005, HG006 und HG007 (Coriell Institute for Medical Research; NJ, USA) |
| Speichel                  | Speichelproben von gesunden Spendern, die bei Research Donors (London, Vereinigtes Königreich) erworben wurden   |
| Wangenschleimhautabstrich | Wangenschleimhautabstrich-Proben von gesunden Spendern, die bei Research Donors (London, Vereinigtes Königreich) erworben wurden   |
| Trockenblutspots          | Auf Whatman 903 Protein Saver Cards mit 50 µl weniger als 3 Tage altem K <sub>2</sub> EDTA-Vollblut von Research Donors (London, Vereinigtes Königreich) vorbereitete Trockenblutspots   |

Tabelle 2: Im TruPath Genome-Assay verwendete DNA-Extraktionskits

| Probenotyp: Entnahmeverfahren  | Extraktionskits   |
|--|---|
| Blut: K <sub>2</sub> EDTA  | Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood (NEB, Katalog-Nr. T3050S)          |
|  | Wizard HMW DNA Extraction Kit (Promega, Katalog-Nr. A2920)                          |
|  | MagAttract HMW DNA Kit (48) (Qiagen, Katalog-Nr. 67563)                             |
|  | chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, Katalog-Nr. CMG-718)                       |
|  | Mag-Bind Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit (OmegaBiotek, Katalog-Nr. M6399)             |
|  | QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, Katalog-Nr. 51104)                          |
| Zellen: Trockenpellet  | Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood (NEB, Katalog-Nr. T3050S)          |
|  | QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, Katalog-Nr. 51104)                          |
| Trockenblutspots: Whatman 903  | chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, Katalog-Nr. CMG-718)                       |
|  | sparQ Lysis Kit (Quantabio, Katalog-Nr. 95220)                                      |
|  | MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (Thermo Fisher Scientific Katalog-Nr. A36570) |
| Speichel: GFX-02   | GeneFix Saliva-Prep 2 DNA Isolation Kit (Isohelix, Katalog-Nr. GSPN)                |
|  | chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, Katalog-Nr. CMG-718)                       |
| Speichel: OGD-600  | prepIT•L2P DNA extraction reagent (DNAGenotek, Katalog-Nr. PT-L2P)                  |
|  | chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, Katalog-Nr. CMG-718)                       |
|  | MagMAX Saliva gDNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. A39059)     |
| Abstriche: OCR-100   | prepIT•L2P DNA extraction reagent (DNAGenotek, Katalog-Nr. PT-L2P)                  |
|  | chemagic DNA Universal Kit H96 (Revvity, Katalog-Nr. CMG-718)                       |
| Whatman 903, Protein saver cards (Millipore Sigma, Katalog-Nr. WHA10534612); GFX-02, GeneFix Saliva DNA/RNA Collector GFX-02 (Isohelix, Katalog-Nr. GFX-02); Oragene•Dx saliva collection device (DNA Genotek, Katalog-Nr. OGD-600); OCR100, ORAcollect•DNA (DNA Genotek, Katalog-Nr. OCR-100) |   |



**Abbildung 2: DNA-Qualität nach Probenotyp.**

(A) Bei unterschiedlichen Probenotypen und Extraktionskits ergibt sich ein breites Spektrum an DNA-Qualitäten. Die DNA wurde aus Blut- und Zellproben sowohl mit HMW- als auch mit im Handel erhältlichen Standard-Kits extrahiert. Die DNA wurde mit im Handel erhältlichen Standard-Kits aus Trockenblutspots, Speichel und Wangenschleimhautabstrich extrahiert. Die Analyse der DNA-Qualität wurde mit dem Genomic DNA ScreenTape Assay (Agilent, Katalog-Nr. 5067-5366 und 5067-5365) auf der Agilent 4200 TapeStation durchgeführt, indem der Anteil der Fragmente größer als 10 kb und 60 kb bestimmt wurde. (B) Bei der Analyse der DNA-Qualität mit dem Genomic DNA ScreenTape Assay (Agilent, Katalog-Nr. 5067-5366 und 5067-5365) auf der Agilent 4200 TapeStation für Zellen zeigt sich abhängig vom Probenotyp eine unterschiedliche Qualität. Blut-HMW- (blau), Abstrich- (orangefarben) und Trockenblutspot-Proben (grün).

## Laufkonfiguration und Sequenzierung

Die DNA wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers zusammen mit TruPath Genome-Reagenzien in einen Röhrchenstreifen für Probenbibliotheken (Illumina, Katalog-Nr. 20157406) gegeben. Die Standardzugabemenge betrug 350 ng DNA. Bei Trockenblutspot-Proben wurde jedoch die gesamte extrahierte Menge verwendet. Die minimale DNA-Zugabe betrug 175 ng. Bibliotheksröhrchenstreifen, TruPath Genome-Reagenzien und eine NovaSeq™ X C8-Fließzelle wurden zur Sequenzierung gemäß dem Benutzerhandbuch in das NovaSeq X Plus System (Illumina, Katalog-Nr. 20084804) geladen.

## Analyse

Im Anschluss an die Sequenzierung wurden die Short-Read-Sequenzierungsdaten mithilfe der DRAGEN™ Germline-Pipeline mit Nanowell-Proximity-Informationen kombiniert. Das Referenzgenom GRCh38 wurde für das Varianten-Calling anhand von phasierten Reads verwendet.

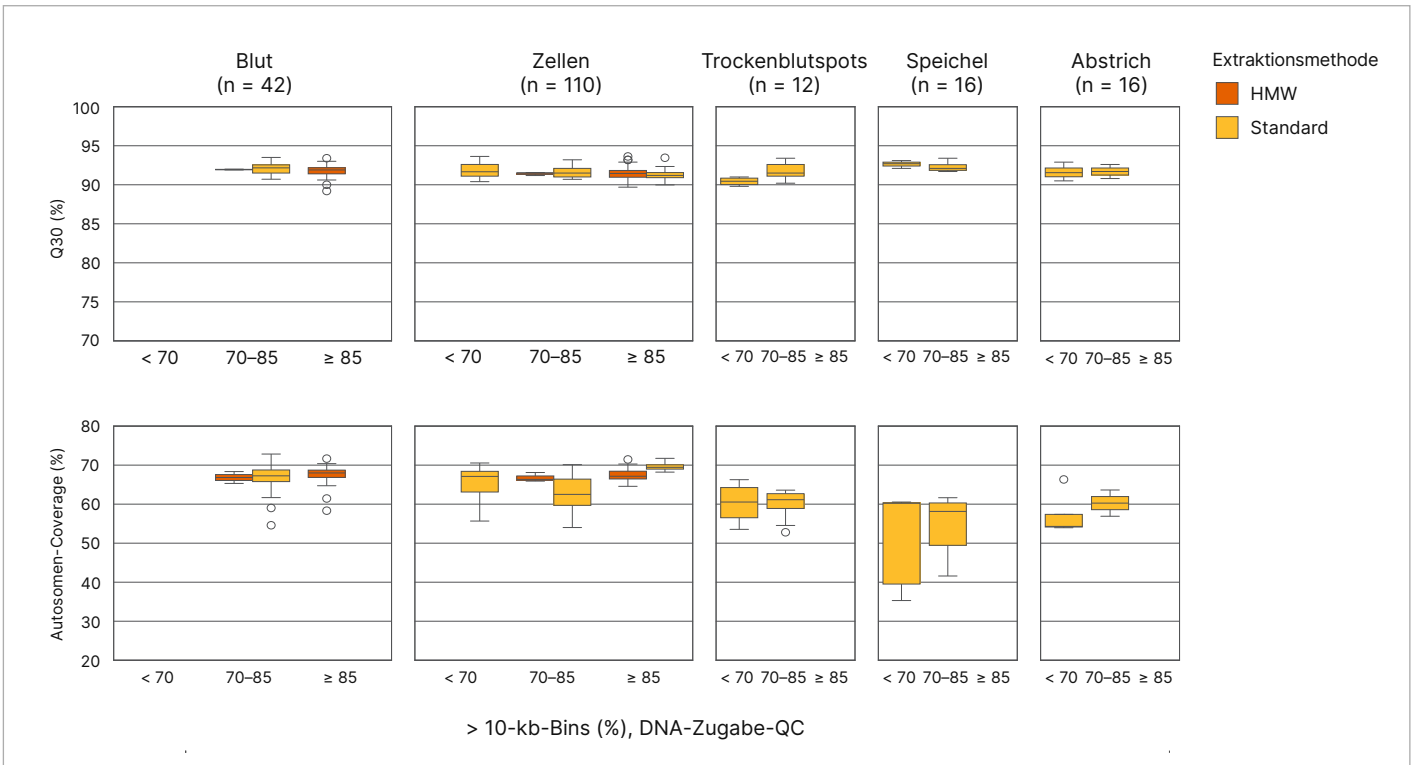
## Ergebnisse

### TruPath Genome liefert bei Proben unterschiedlicher Qualität hochwertige Ergebnisse

Die mit TruPath Genome erzielten Standardgenometrien, einschließlich Autosomen-Coverage und Base-Call-Genauigkeit, waren unabhängig von der DNA-Qualität und für alle Probenotypen zeigte sich eine robuste Performance ([Abbildung 3](#)). Die durchschnittliche Autosomen-Coverage betrug ca. 64-fach und der durchschnittliche Q30-Wert lag bei 92 %. Bei bestimmten Speichel- und Abstrichproben war die geringere Coverage auf das natürliche Vorhandensein von Bakterien-Reads in den Proben zurückzuführen, das den prozentualen Anteil an das Humangenom gemappter Reads verringert.

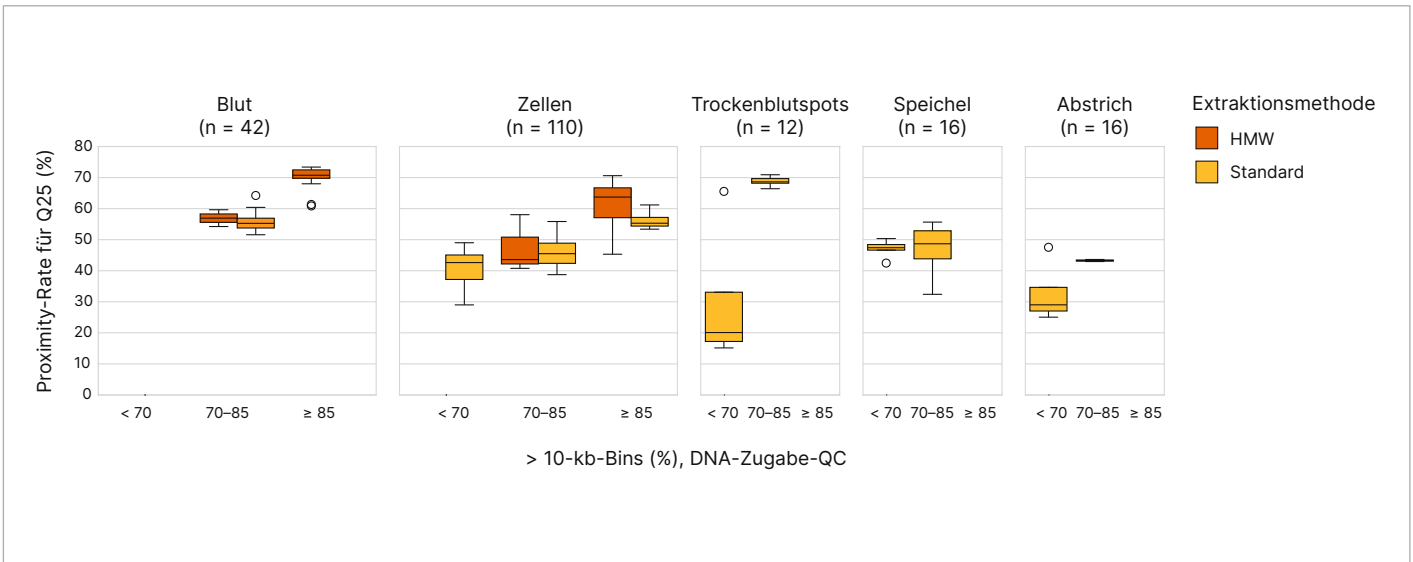
Die Proximity-Metriken von TruPath Genome waren stark von der DNA-Probenqualität abhängig ([Abbildung 4](#)). Für die meisten Probenotypen handelt es sich beim prozentualen Anteil der DNA-Fragmente über 10 kb um einen starken Prädiktor für die Performance hinsichtlich der Proximity-Rate, wobei ein höherer prozentualer Anteil der Fragmente über 10 kb eine höhere Proximity-Rate für Q25 (d. h. einen Prozentsatz der Reads, bei denen mindestens ein anderer Read in unmittelbarer Nähe mit einem Qualitäts-Score über Q25 vorliegt\*) lieferte.

\* Der Proximity-Qualitäts-Score ist die mithilfe des DRAGEN-Proximity-Modells berechnete Phred-skalierte Wahrscheinlichkeit, dass zwei Reads aus derselben Region des Genoms zufällig in dieselbe Fließzellenumgebung gelangen. Ein höherer Proximity-Qualitäts-Score weist auf eine höhere Konfidenz hin, dass zwei Reads, die sich auf dem Genom und auf der Fließzelle nahe nebeneinander befinden, aus demselben Zugabe-DNA-Molekül stammen.



**Abbildung 3: Die Autosomen-Coverage und der durchschnittliche Prozentsatz Q30 waren bei allen Probenotypen nicht von der DNA-Qualität abhängig.**

Die DNA wurde mit HMW- und Standardverfahren aus Blut und Zellen extrahiert. Die DNA wurde mit Standardverfahren aus Trockenblutspots, Speichel und Wangenschleimhautabstrichen extrahiert. Bei allen Proben zeigte sich unabhängig von der DNA-Reinigungsmethode eine starke Performance hinsichtlich Coverage und Qualitäts-Scores. Die Intaktheit der DNA wurde auf der Agilent 4200 TapeStation mit einer regionalen Analyse und einem prozentualen Anteil der Fragmente von > 10-kb-Bins bestimmt, der entlang der X-Achse dargestellt ist.



**Abbildung 4: Auswirkung der DNA-Qualität auf die Proximity-Rate für Q25**

DNA wurde mit HMW- und Standardverfahren aus Blut und Zellen extrahiert. Die DNA wurde mit Standardverfahren aus Trockenblutspots, Speichel und Wangenschleimhautabstrichen extrahiert. Die Proximity-Raten für Q25 weisen einen starken Zusammenhang mit der DNA-Qualität auf, insbesondere mit dem prozentualen Anteil der Fragmente von > 10-kb-Bins, der auf der Agilent 4200 TapeStation bestimmt und entlang der X-Achse dargestellt ist.

## TruPath Genome eignet sich für die phasierte Sequenzierung

Das Vorhandensein größerer DNA-Fragmente ist ein starker Prädiktor für die Phasierungsperformance: je höher der prozentuale Anteil der DNA-Fragmente über 60 kb, desto größer der Phasierungsblock NG50<sup>†</sup> und desto höher die Performance beim Calling kleiner Varianten. TruPath Genome ermöglicht die Untersuchung von DNA-Matrizen in voller Länge und eignet sich somit gut für Phasierungsstudien des Humangenoms (Abbildung 5).

## TruPath Genome zeigt die höchste Performance mit hochwertigen, frischen Proben

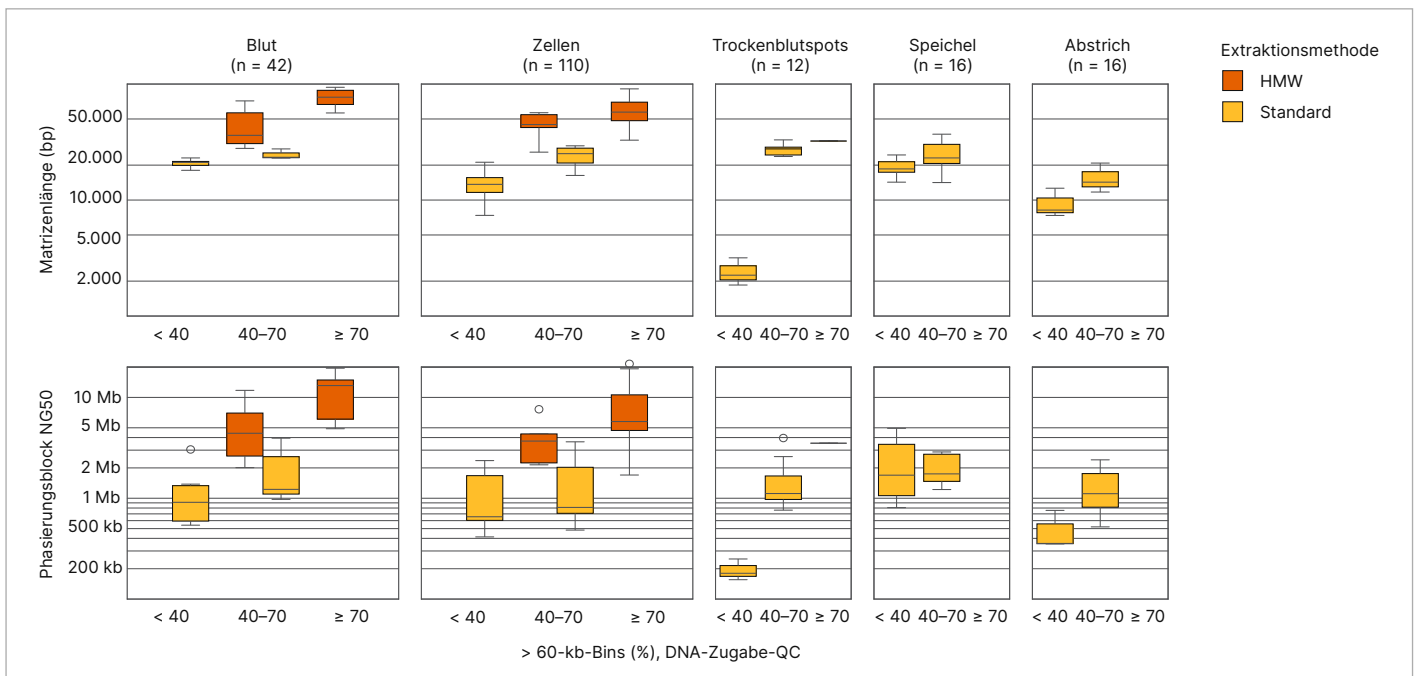
Zur Beurteilung der Auswirkungen des Probenalters auf die Performance von TruPath Genome wurde DNA zu zwei bestimmten Zeitpunkten aus Blut- und Trockenblutspot-Proben extrahiert. Bei Blutproben wurde die DNA innerhalb von drei Tagen nach der Blutentnahme und nach siebentägiger Lagerung bei 4 °C extrahiert. Trockenblutspot-Proben wurden für einen Monat bzw. ein Jahr bei Raumtemperatur gelagert.

<sup>†</sup> Der Phasierungsblock NG50 entspricht der Länge des Phasierungsblocks, sobald 50 % der Zielregion (Genom usw.) phasiert wurden.

Sowohl bei Blut- als auch bei Trockenblutspot-Proben änderte sich die Größe des Phasierungsblocks NG50 im Verhältnis zum prozentualen Anteil der DNA-Fragmente über 60 kb (Abbildung 6). Beide Metriken waren für ältere Proben niedriger als für frische. Bei Blutproben, aus denen die DNA mit einer HMW-Methode extrahiert wurde, wurden über 40 % der Fragmente > 60 kb gewonnen, selbst wenn die DNA nach einer Woche isoliert wurde.

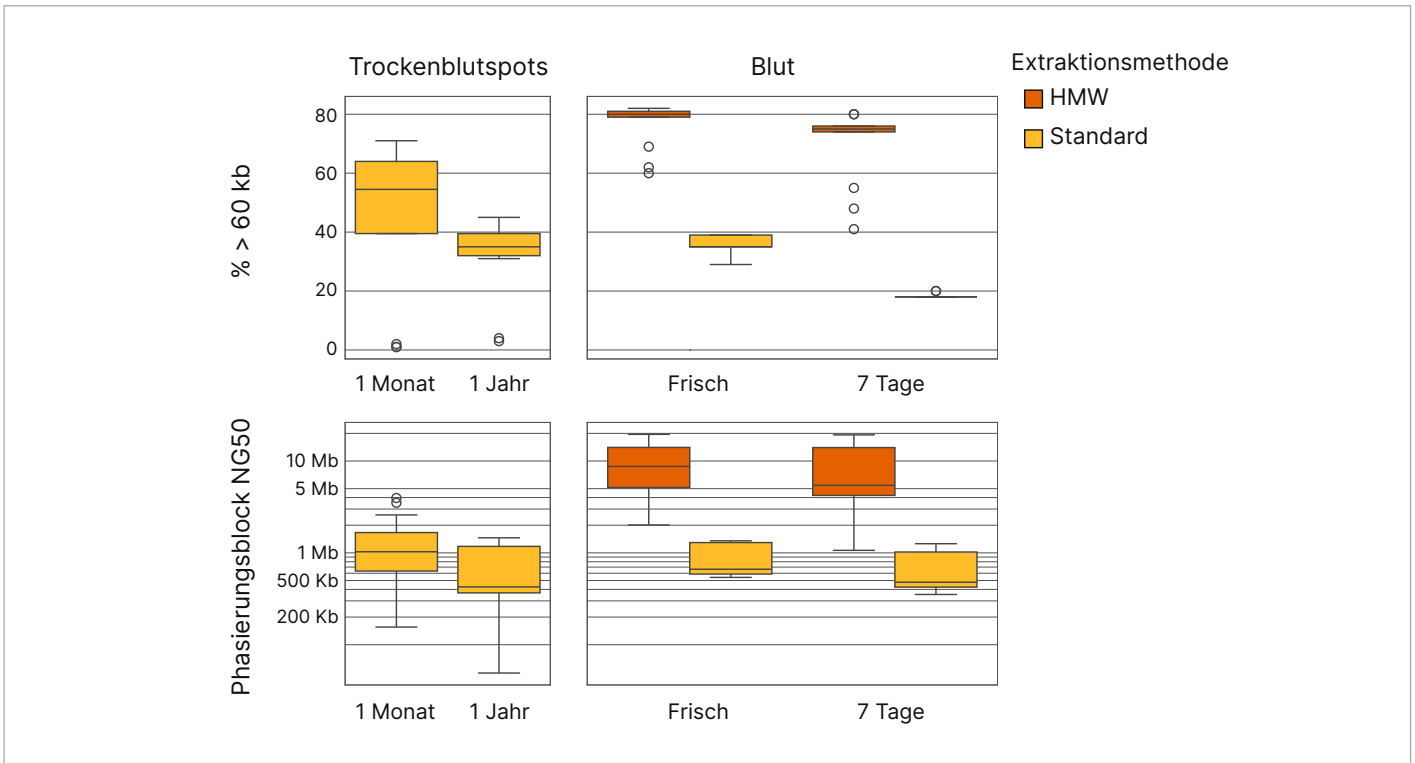
## TruPath Genome zeigt eine robuste Performance bei einer Reihe von DNA-Zugabemengen

Die Performance des TruPath Genome-Assays wurde anhand einer Reihe von DNA-Zugabemengen beurteilt: 175, 200, 350 und 550 ng. Die Sequenzierungsergebnisse mit einer Zugabemenge von 175 ng zeigten hochwertige Standardgenom- (z. B. Autosomen-Coverage und prozentualer Anteil > Q30) und Proximity-Metriken (z. B. Proximity-Rate für Q25 und Phasierungsblock NG50). Obwohl die empfohlene Zugabemenge 350 ng beträgt, können auch niedrigere Zugabemengen verwendet werden (Abbildung 7).



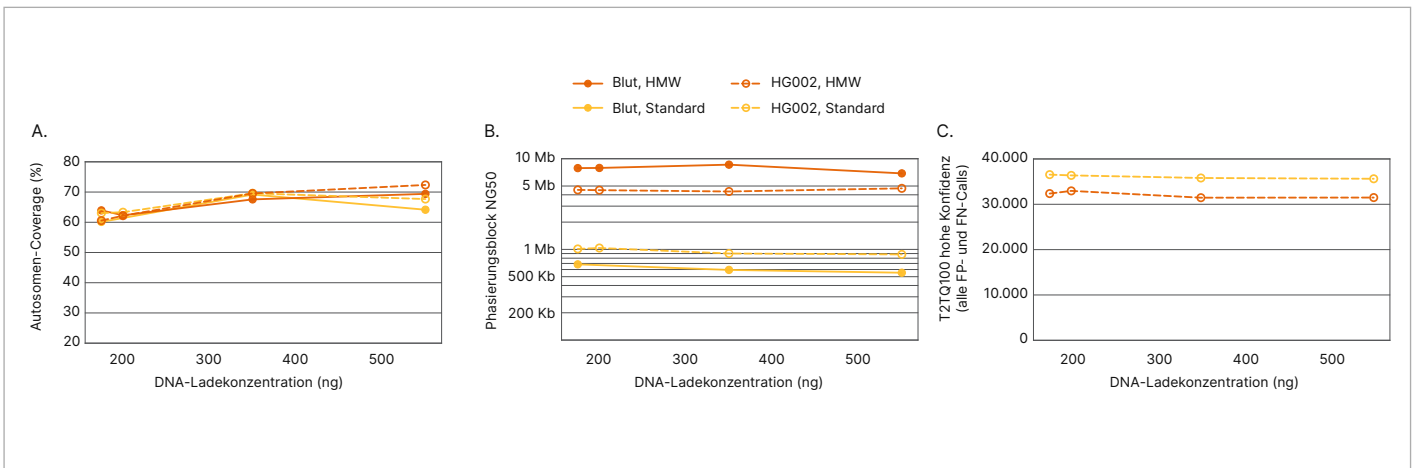
**Abbildung 5: Extrem robuste Performance von TruPath Genome bei der Phasierung mit unterschiedlichen Proben**

DNA wurde mit HMW- und Standardverfahren aus Blut und Zellen extrahiert. Die DNA wurde mit Standardverfahren aus Trockenblutspots, Speichel und Wangenschleimhautabstrichen extrahiert. Die Intaktheit der DNA wurde auf der Agilent 4200 TapeStation mit einer regionalen Analyse und einem prozentualen Anteil der Fragmente von > 60-kb-Bins bestimmt, der entlang der X-Achse dargestellt ist. Die Matrizenlänge auf der Y-Achse stellt das 75. Perzentil in Bezug auf die Größe des Matrizenmoleküls dar. Eine höhere DNA-Qualität mit einem größeren prozentualen Anteil > 60 kb korreliert mit einer höheren Matrizenlänge und einem größeren Phasierungsblock NG50.



**Abbildung 6: Auswirkung der Lagerung von Blutproben auf die DNA-Qualität und den Phasierungsblock NG50**

Die Blutproben wurden weniger als 3 Tage (frisch) oder 7 Tage lang bei 4 °C gelagert. Die Trockenblutspot-Proben wurden weniger als 30 Tage oder ca. 1 Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert. Die DNA wurde mit HMW- und Standardverfahren aus Blut extrahiert. Die DNA wurde mit Standardverfahren aus Trockenblutspot-Proben extrahiert. Auswirkung des Alters der Primärproben auf die DNA-Qualität (prozentualer Anteil > 60 kb) und den Phasierungsblock NG50. Der prozentuale Anteil > 60 kb wird mit genomischer DNA im ScreenTape Assay auf der Agilent 4200 TapeStation bestimmt. Bei beiden Probenarten sind der prozentuale Anteil der Fragmente über 60 kb und die Größe des Phasierungsblocks NG50 bei Proben geringer, die vor der Extraktion länger gelagert wurden.



**Abbildung 7: Gute Performance von TruPath Genome bei einer Reihe von Zugabemengen**

Die Sequenzierungsergebnisse für TruPath Genome bei Vorbereitung mit Zugabemengen von 175, 200, 350 und 550 ng zeigen eine vergleichbare Datenqualität für Standard-Genom- und TruPath Genome-Proximity-Metriken, einschließlich (A) Autosomen-Coverage, (B) Phasierungsblock NG50 und (C) Performance beim Calling kleiner Varianten (alle FP- und FN-Calls). Die Performance beim Calling kleiner Varianten (SNP + Indel) wurde mit dem Referenzdatensatz T2T-Q100 V1.1 V0.019 bestimmt.

## Zusammenfassung

TruPath Genome bietet anhand von Proximity-Read-Mapping eine umfassende Genomsequenzierungslösung, die sich durch bislang unerreichte Anwenderfreundlichkeit auszeichnet. Der einzigartige Workflow liefert anhand einer Kombination der Vorteile von Short-Read-Sequenzierungsverfahren und Proximity-Informationen auf der Fließzelle Long-Distance-Erkenntnisse. Der vorliegende technische Hinweis zeigt die hochwertige, robuste Performance, die TruPath Genome bei Proben unterschiedlicher Typen, Quantitäten, Qualitäten und Lagerungsbedingungen erzielt.

## Quellen

1. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. [pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-forPacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf](https://pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-forPacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf). Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 8. Dezember 2025.
2. Pacific Biosciences. Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. [pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genomeand-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf](https://pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genomeand-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf). Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 8. Dezember 2025.
3. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. [store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit-v14.html](https://store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit-v14.html). Aufgerufen am 8. Dezember 2025.
4. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. [pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf](https://pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf). Veröffentlicht 2018. Aufgerufen am 8. Dezember 2025.
5. Illumina. TruPath Genome data sheet. [illumina.com//content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trupath-genome-data-sheet-m-gl-03931/trupath-genome-data-sheet-m-gl-03931.pdf](https://illumina.com//content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trupath-genome-data-sheet-m-gl-03931/trupath-genome-data-sheet-m-gl-03931.pdf). Veröffentlicht im Februar 2026. Aufgerufen am 24. Februar 2026.



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

© 2026 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](https://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-03932 DEU v1.0