

illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

Ausgezeichnete Leistung für Anwendungen mit hoher Sensitivität wie beispielsweise die Human-Gesamtgenomsequenzierung.

Vorteile

- Hochpräzise Gesamtgenom-Coverage**
 Weniger Lücken bei der Coverage, selbst in genomischen Regionen mit hohem GC- oder AT-Gehalt
- Vereinfachter Workflow mit kürzerer Gesamtdauer**
 Unterstützt einfaches volumenbasiertes Bibliothekspooling und reduziert die Quantifizierungsschritte vor und nach der Bibliotheksvorbereitung
- Bestens geeignet für Automatisierung**
 Weniger manuelle Eingriffe und entscheidende Zeiteinsparungen durch den Einsatz zusammen mit Liquid-Handling-Robotern zur Automatisierung von Workflows
- Ausgezeichnete Leistung bei geringen DNA-Zugabemengen**
 Präzision bei Base-Calling und Variantenerkennung für eine Vielzahl an DNA-Zugabemengen

Einleitung

Die Sequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation Sequencing, NGS) hat die Arbeitsweise von Wissenschaftlern bei genomischen Studien revolutioniert. Die Menge und die Qualität der Daten, die je Lauf generiert werden können, haben enorm zugenommen. Gleichzeitig konnten die Kosten reduziert und die Reaktionszeiten verringert werden. Während sich die Sequenzierungstechnologie von Illumina in den letzten Jahren mit großer Geschwindigkeit weiterentwickelt hat, sind bei PCR-abhängigen Bibliotheksvorbereitungsprotokollen immer noch entscheidende Herausforderungen zu bewältigen. PCR-bedingte Verzerrungen können zu einer ungleichmäßigen Coverage über die einzelnen Genomregionen führen, besonders bei Regionen mit einer sehr unterschiedlichen 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).

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-Gesamtgenomsequenzierung (Whole-Genome Sequencing, WGS). 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).

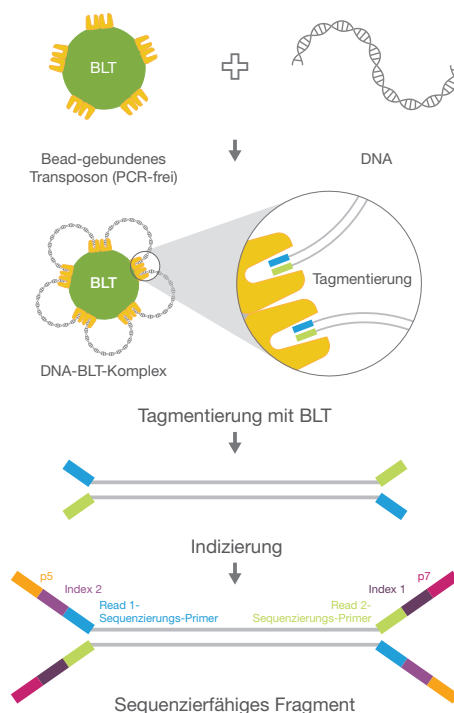


Abbildung 1: Illumina DNA PCR-Free-Chemie: Eine effiziente Lösung zur Vorbereitung und Indizierung von Probenbibliotheken.

Tabelle 1: Illumina DNA PCR-Free – Spezifikationen

| Parameter | Illumina DNA PCR-Free | TruSeq DNA PCR-Free |
|---|--|-------------------------------------|
| DNA-Zugabetyp | gDNA, Blut, Speichel, Plasmide, Trockenblut | gDNA |
| DNA-Zugabemenge | 25 ng–2 µg | 1–2 µg |
| Fragmentierungsmethode | On-Bead-Tagmentation | Covaris-Beschallung |
| Proben-Multiplexing | 384 doppelte Indizes | 96 doppelte Indizes |
| Unterstützte Sequenziersysteme | MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, HiSeq 2500, HiSeq 3000/4000, NovaSeq 6000 | Alle Sequenziersysteme von Illumina |
| Dauer des gesamten Workflows ^a | ca. 90 Minuten bei extrahierter gDNA ca. 2,5 Stunden bei Rohproben wie Blut oder Speichel | ca. 11 Stunden |
| Insertgröße | 450 bp | 350 bp oder 550 bp |

a. Die Dauer des gesamten Workflows umfasst DNA-Extraktion und -Quantifizierung (oder Flex Lysis), Tagmentation und Bibliothekspoolingsschritte.
 b. Informationen zur Anpassung von Insertgrößen auf 350 bp oder 550 bp sind dem Anwendungshinweis „Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation“ zu entnehmen.

Außerordentlich einheitliche Gesamtgenom-Coverage für Human-WGS

Über die Coverage-Einheitlichkeit wird die Vollständigkeit der Daten für einen Sequenzierungslauf über das gesamte Genom hinweg gemessen. Eine einheitliche Coverage ermöglicht ein präziseres Calling von Varianten abseits der mittleren Tiefe.³ Um die Coverage-Performance über einen Bereich mit niedrigem, mittlerem und hohem GC-Gehalt hinweg bewerten zu können, werden normalisierte Coverage-Daten aus Illumina DNA PCR-Free und TruSeq™ DNA PCR-Free mit dem Humangenomgehalt nach GC-Anteil abgeglichen. Die meisten Humangenomdaten weisen einen Anteil von 20–70 % GC-Sequenz auf. Beide Kits bieten gleichmäßige Coverage-Niveaus über einen breiten Bereich an GC-Inhalten 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.

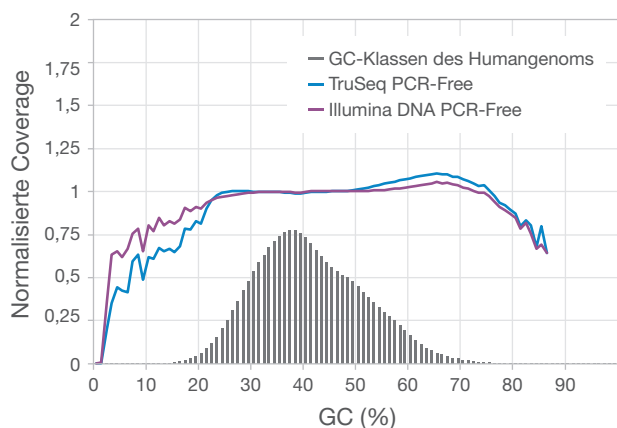
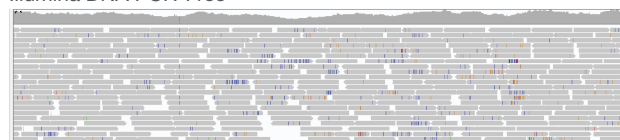


Abbildung 2: Einheitliche Coverage mit Illumina DNA PCR-Free: Illumina DNA PCR-Free bietet eine einheitliche Coverage über ein breites Spektrum an GC-Inhalten im Humangenom.

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 PCR erschweren kann.⁴ Daher zeigt sich bei humanen WGS-Bibliotheken, die mit Kits ohne PCR vorbereitet werden, 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 32fache bis 40fache 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.

Illumina DNA PCR-Free



TruSeq PCR-Free



TruSeq Nano

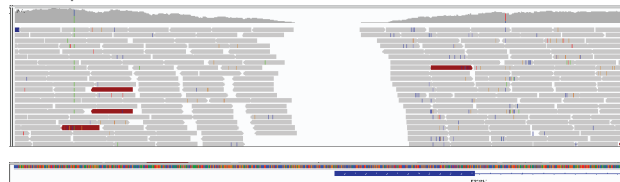


Abbildung 3: Vergleich der Read-Coverage über Regionen mit hohem GC-Gehalt: Das Illumina DNA PCR-Free-Bibliotheksvorbereitungskit bietet im Vergleich zum TruSeq DNA Nano-Bibliotheksvorbereitungskit eine überragende Read-Coverage über Promotorregionen mit hohem GC-Gehalt des humanen *RNPEPL1*-Gens. Gemappte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

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, 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 mittlere Coverage von 40x gebracht. Es wurden die Kennzahlen von Qualitäts-Scores, Base-Calling und Varianten-Calling verglichen. Die Daten jedes Bibliothekstyps liegen über der Qualitätsspezifikation von 75 % > Q30 für das NovaSeq 6000-System (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*.

PCR-Schritten 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 Trockenblut.

On-Bead-Tagmentierung und PCR-freies Protokoll

Illumina DNA PCR-Free bietet eine einzigartige, leistungsstarke Kombination der Vorteile von On-Bead-Tagmentierung 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. Dadurch lassen sich die Quantifizierungsschritte vor und nach der Bibliotheksvorbereitung minimieren. Normalisierte Bibliotheken können nach Volumen gepoolt werden, wodurch die zeitaufwändige Quantifizierung einzelner Bibliotheken entfällt. Durch die Vermeidung von Quantifizierung und

Effizientes Proben-Multiplexing für Anwendungen mit hohem Durchsatz

Illumina DNA PCR-Free ist mit IDT for 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.

* Der empfohlene Zugabebereich für Illumina DNA PCR-Free liegt zwischen 25 und 300 ng.

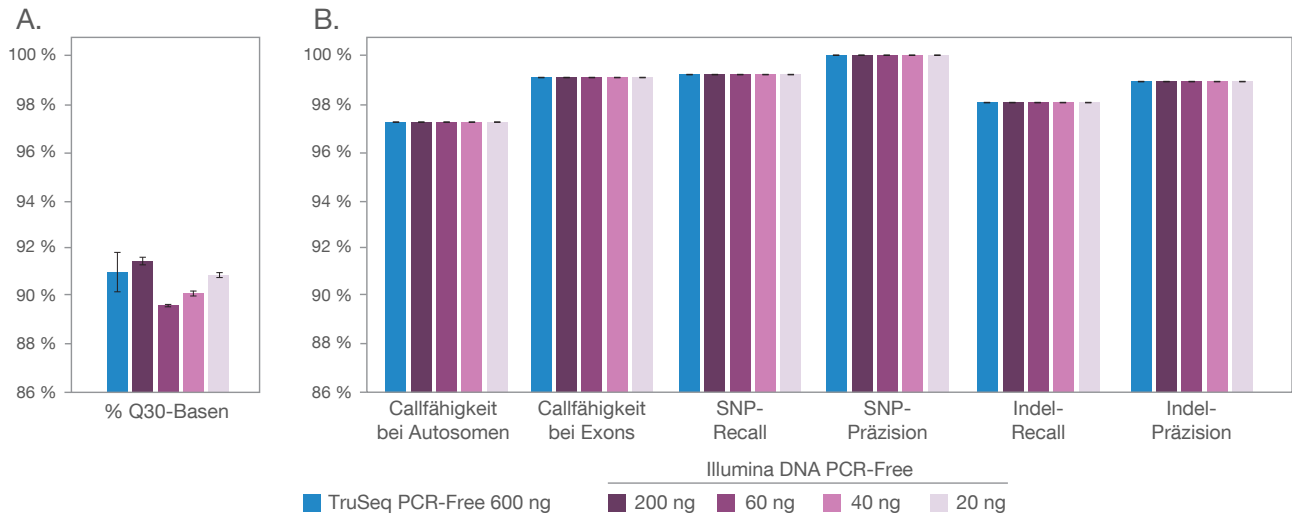


Abbildung 4: Performance von Illumina DNA PCR-Free am Beispiel einer Reihe von DNA-Zugaben: Anhand einer Reihe von DNA-Zugaben vorbereitete Illumina DNA PCR-Free-Bibliotheken (A) entsprechen für alle DNA-Zugaben den Qualitätsvorgaben und (B) weisen hinsichtlich der Callfähigkeit eine gleichwertige Performance 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)]. Hinweis: Die Spezifikationen für den unteren Grenzwert der Probenzugabe für Illumina DNA PCR-Free sind noch nicht endgültig.

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 Nextera-Tagmentierung | Pool nach Volumen |
| ca. 1,5 h | 1,5 h | 0,5 h |

Illumina DNA PCR-Free, gDNA

| | |
|--|-------------------|
| Bibliotheksvorbereitung mit PCR-freier Bead-gebundener Tagmentierung | Pool 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 Bibliotheksreinigung durch eine geringe Assay-Gesamtdauer von 90 Minuten. Archivierte Daten, Illumina Inc., 2019 Hinweis: Unternehmen N verwendet proprietäre Reagenzien in Kombination mit gegabelten Adaptoren von Illumina.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien zur Automatisierung für 96 Proben

| Methode | Probentyp | Manuelle Eingriffe | Platten mit 96 Proben | Spitzen | Dauer |
|--|----------------|--------------------|-----------------------|---------------|---------------------------|
| 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 Std. 7 min) |

Verwendung von Hamilton-Software für Hamilton Star mit 96-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 4 Pools mit 24 Proben. Archivierte Daten, Illumina Inc., 2019 Hinweis: Unternehmen N verwendet proprietäre Reagenzien in Kombination mit gegabelten Adaptern von Illumina.

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 Flex Lysis-Protokoll ausführen und dann mit der Bibliotheksvorbereitung fortfahren, ohne dass Quantifizierungsschritte erforderlich sind. Diese Merkmale ermöglichen einen einfachen Workflow für die automatisierte Chargenverarbeitung 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 Laborausstattung, die Anzahl der Spitzen und die Zeit berechnet, die für die Bibliotheksvorbereitung von 96 Probenchargen mit einem Hamilton-Liquid-Handling-Roboter erforderlich sind. Das Ergebnis: Illumina DNA PCR-Free bietet eine signifikante Zeitersparnis (Tabelle 2).

Kosteneinsparungen mit Illumina DNA PCR-Free

Laborausstattung, Spitzen und qPCR-Reagenzien tragen bei der Vorbereitung von Bibliotheken für NGS zu versteckten Kosten bei. Ein wesentlicher Vorteil der Bead-basierten Technologie ist die automatische, Bead-basierte Normalisierung aller in einer Charge vorbereiteten Bibliotheken, durch die die Quantifizierung einzelner Bibliotheken nicht mehr erforderlich ist und die ein einfaches Bibliothekspooling bei gleichen Volumen ermöglicht.

Da PCR-freie Bibliotheken in der Regel durch qPCR quantifiziert werden, beseitigt Illumina DNA PCR-Free im gesamten Bibliotheksvorbereitungsprotokoll 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 versteckten 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 versteckten 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 1).

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 Genomeregionen 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

Unter www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.html erfahren Sie mehr.

Bestellinformationen

| Produkt | Katalog-Nr. |
|--|-------------------------------|
| Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 Proben) | 20041794 |
| Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 Proben) | 20041795 |
| 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 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 |
| Illumina DNA PCR-Free R1 Sequencing Primer | 20041796 |
| Illumina Lysis Reagent Kit | 20042221 |

„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 (2018). [Nextera DNA Flex Library Preparation Kit](#). Aufgerufen am 10. April 2020.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, Czyz A, Morrell N, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722.
3. Illumina (2013). [Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits Technical Note](#). Aufgerufen am 10. Mai 2020.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol*. 2004;4(2):109–25.
5. Archivierte Datenberechnungen. Illumina, Inc., 2019.