

ILLUMINA Complete Long Read Prep, Human

Eine skalierbare
Hochleistungslösung
für die Long-Read-
Humangenomsequenzierung

- Umfassende Humangenomsequenzierung mit Long- und Short-Reads auf demselben Gerät
- Optimierte Bibliotheksvorbereitung und Analyseleistung für hochgenaue, zuverlässige Ergebnisse
- Für die Automatisierung geeigneter eintägiger Workflow mit geringer DNA-Zugabe



Einleitung

Die Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) ermöglicht Wissenschaftlern tiefgreifendere biologische Erkenntnisse durch die Entschlüsselung des Genoms. Bewährte Illumina-SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) liefert in Kombination mit der preisgekrönten DRAGEN™-Sekundäranalyse Genomsequenzierungsdaten (WGS, Whole-Genome Sequencing) von herausragender Genauigkeit.¹ Die jüngsten Fortschritte bei der DRAGEN-Analyse schließen die letzten Lücken in den am schwierigsten zu mappenden Genen.^{2,3} Dennoch profitieren einige wenige genetische Regionen von größeren Readlängen, da diese eine geeignete Auflösung und das genaue Mapping ermöglichen. Viele Long-Read-Sequenzierungslösungen sind jedoch beschränkt in puncto Anwendbarkeit und Verbreitung. Die erforderlichen DNA-Zugabemengen sind hoch, die Workflows sind komplex und weisen nur einen geringen Durchsatz auf und zudem ist die Varianz der Ergebnisse groß.⁴⁻⁷

Illumina Complete Long Reads macht die Long-Read-Sequenzierung für Genomiklabore zugänglich und vereinfacht diese. Illumina Complete Long Prep, Human ist das erste Produkt dieser neuartigen Long-Read-Technologie. Der WGS-Hochleistungsassay generiert anhand eines herkömmlichen NGS-Workflows zusammenhängende Long-Read-Sequenzen auf dem NovaSeq™ 6000 System und der NovaSeq X Series (Abbildung 1). Das effiziente, in einem Tag durchführbare Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung lässt sich leicht auf Hochdurchsatzstudien abstimmen und erfordert eine DNA-Zugabe von nur 50 ng ohne spezielle Extraktionen, Scherung oder Größenauswahl.

Generieren hochwertiger Long-Reads auf NovaSeq-Plattformen

Illumina Complete Long Read Prep, Human ist mit den Sequenziersystemen NovaSeq X Plus, NovaSeq X sowie NovaSeq 6000 kompatibel und ermöglicht Anwendern, auf demselben Gerät sowohl Long-Read- als auch Short-Read-Daten zu generieren (Tabelle 1). Der flexible Assay liefert bei Proben unterschiedlicher Qualität konsistente Ergebnisse und kommt dabei mit einer um 90 % geringeren DNA-Zugabe aus als andere Long-Read-Lösungen (Abbildung 2). Da der Assay unempfindlich gegenüber gängigen Inhibitoren und Verunreinigungen ist, eignet er sich für aus Blut, Speichel oder Gewebe gewonnene DNA.

Illumina Complete Long Reads vereint einen proprietären Assay zur Bibliotheksvorbereitung, die bewährte Illumina-SBS-Chemie und die leistungsstarke DRAGEN-Sekundäranalyse zur Generierung hochgenauer Long-Read-Daten (Abbildung 3). Lange Einzelmolekül-DNA-Fragmente werden enzymatisch mit eindeutigen Mustern (sogenannten „Land-Marks“) gekennzeichnet und anschließend amplifiziert sowie sequenziert. Die „Land-Marks“ ermöglichen es der Software, sich wiederholende oder schwer zu mappende Regionen zu unterscheiden und Long-Reads mit einer N50 von 5–7 kb zu generieren (Abbildung 2). Durch die Kombination von Long-Read-Daten mit einer WGS-Bibliothek mit Short-Read-Daten ohne Kennzeichnung werden zusammenhängende Long-Reads generiert, bei denen es sich um eine vollständige und genaue Repräsentation des ursprünglichen Einzelmolekülfragments handelt.

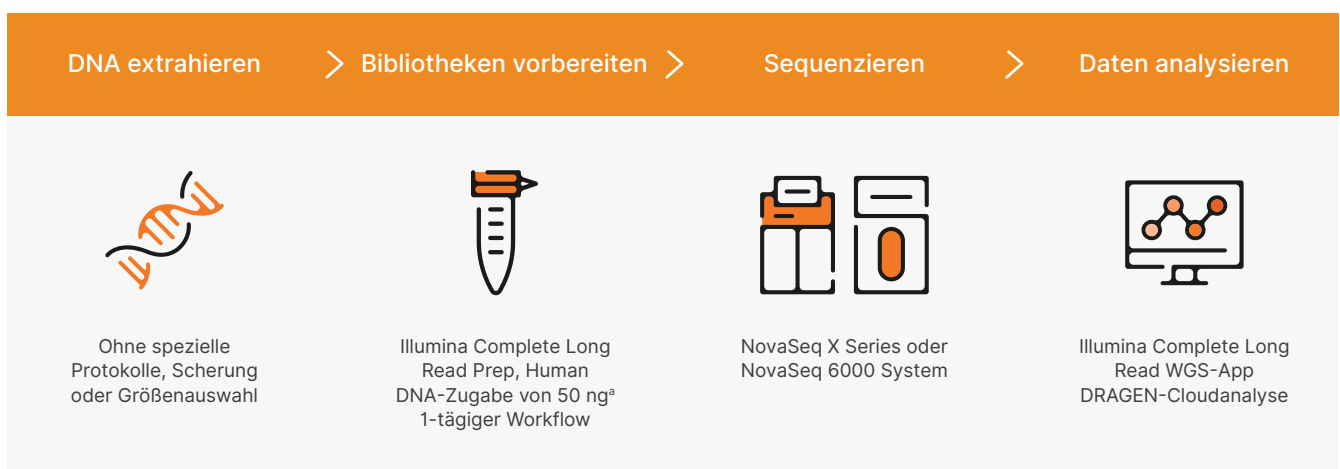


Abbildung 1: Illumina Complete Long Read-Workflow: Zugriff auf umfassende Long-Read-WGS-Daten anhand eines skalierbaren, optimierten Protokolls für die Bibliotheksvorbereitung, der Sequenzierung auf dem NovaSeq 6000 System oder der NovaSeq X Series und der DRAGEN-Sekundäranalyse. Eine herkömmliche WGS-Bibliothek mit 30-facher Coverage sollte mit der Illumina Complete Long Read-Bibliothek vorbereitet, sequenziert und analysiert werden.

a. Zugabemengen von nur 10 ng sind zwar möglich, Illumina empfiehlt jedoch die Verwendung von 50 ng DNA.

Tabelle 1: Empfohlener Probendurchsatz für den Illumina Complete Long Read-Assay^{a, b, c}

Reagenzien-Kits für 300 Zyklen	Proben pro Fließzelle	Ausgabe pro Fließzelle	Laufzeit
NovaSeq 6000 S4 Reagents	4	ca. 3 Tb	ca. 44 h
NovaSeq X Series 10B Reagents	4	ca. 3 Tb	ca. 24 h
NovaSeq X Series 25B Reagents	11	ca. 8 Tb	ca. 48 h

- a. Erfordert einen Sequenzierunslauf mit 2 × 150 bp. Dieser sorgt für die ca. 30-fache Coverage von Illumina Complete Long Reads.
- b. Erfordert standardmäßige Short-Read-Humangenomdaten mit 30-facher Coverage aus derselben Probe für die Analyse. [Illumina DNA PCR-Free Prep](#) wird empfohlen. WGS-Kits von Drittanbietern sind ebenfalls geeignet. Die Bibliothek ohne Kennzeichnung muss nicht parallel vorbereitet oder sequenziert werden. Die Verwendung von FASTQ-Dateien einer Probe aus einem vorherigen Lauf ist möglich.
- c. Bei der Sequenzierung von Illumina Complete Long Read-Bibliotheken auf NovaSeq-Geräten kann der gemeldete Q30-Score eines Laufs unter der NovaSeq-Spezifikation liegen. Dies deutet nicht auf Leistungsprobleme in Zusammenhang mit dem Sequenzierunslauf oder der Bibliothek hin.

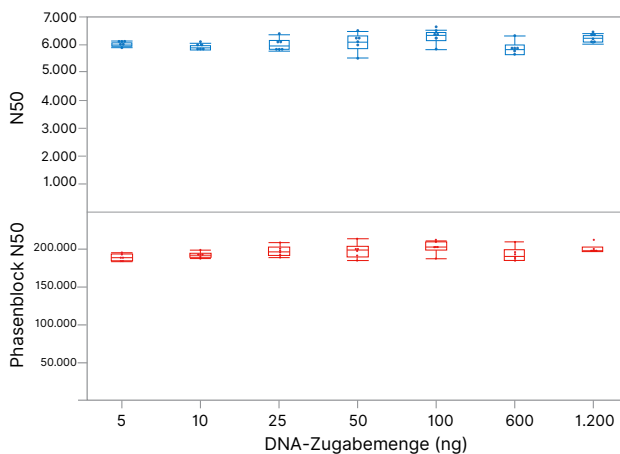


Abbildung 2: Der Illumina Complete Long Read-Assay liefert konsistente Ergebnisse für unterschiedliche DNA-Zugabemengen: DNA-Zugaben von 5 ng bis 1.200 ng ergeben für N50 und Phasenblock N50 eine vergleichbare Datenqualität. N50 ist definiert als die Sequenzlänge des kürzesten Contigs bei 50 % der Gesamt-Assembly-Länge. Der Wert kann auch als Maß für die Größe von Phasierungsblöcken verwendet werden.

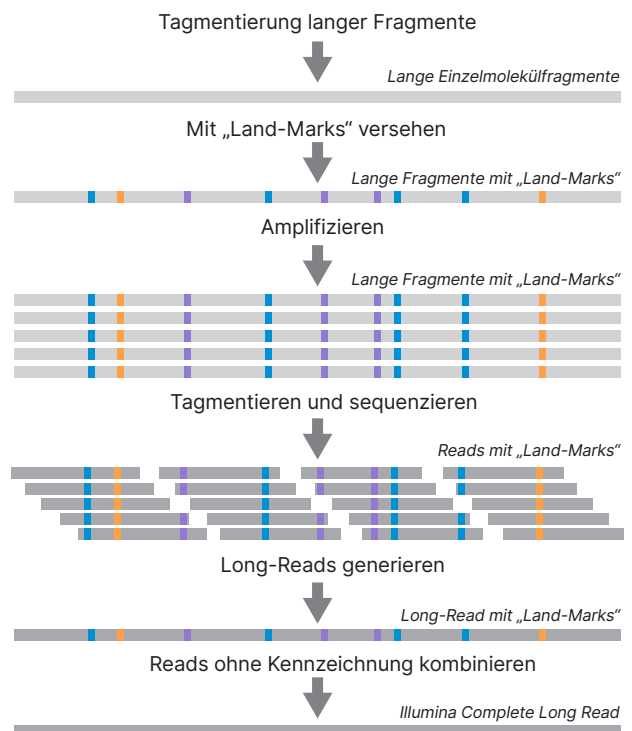


Abbildung 3: Funktionsweise des Illumina Complete Long Reads-Assays: Der Assay generiert anhand von Tagmentierung⁸ lange DNA-Fragmente (> 10 kb), wodurch die Notwendigkeit der Scherung oder Größenauswahl entfällt. Lange Fragmente werden auf Einzelmolekülebene mit „Land-Marks“ versehen, sodass Long-Read-Informationen innerhalb des Fragments erfasst werden und erhalten bleiben können (ohne komplexe Barcodes oder Adapter). Die langen, mit „Land-Marks“ versehenen Fragmente werden amplifiziert. In einem zweiten Schritt, der Tagmentierung, werden die Bibliotheken für die Sequenzierung vorbereitet. Während der Analyse generiert die leistungsstarke DRAGEN-Software Long-Reads und kombiniert die Daten mit einer herkömmlichen WGS-Bibliothek ohne Kennzeichnung (aus derselben, separat sequenzierten Probe), was hochpräzise vollständige Long-Reads ergibt.

Zugang zu hochpräziser WGS

Illumina Complete Long Read-Daten ergänzen herkömmliche Short-Read-WGS-Daten und liefern umfassendere Genominformationen durch:

- Calling von Varianten in schwer zu mappenden Regionen mit hoher Homologie bzw. in repetitiven Regionen
- Auflösung von komplexen strukturellen Varianten, Pseudogenen und großen Insertionen/Deletionen (Indels)
- Phasierung von Varianten und Bestimmung von Haplotypen

Illumina Complete Long Read-Daten zeichnen sich im Vergleich zu hochgenauen Humangenomsequenzierungsdaten, die mit Illumina DNA PCR-Free Prep für die Bibliotheksvorbereitung und der DRAGEN-Sekundäranalyse³ generiert wurden, bei sämtlichen Variantentypen durch eine höhere Genauigkeit des Varianten-Callings aus (Abbildung 4). Mit den PrecisionFDA Truth Challenge v2-Datensätzen betrug der F1-Score, der die Präzision und den Recall für WGS mit dem Illumina Complete Long Read-Assay angibt, 99,90 % (Abbildung 5).^{9,10}

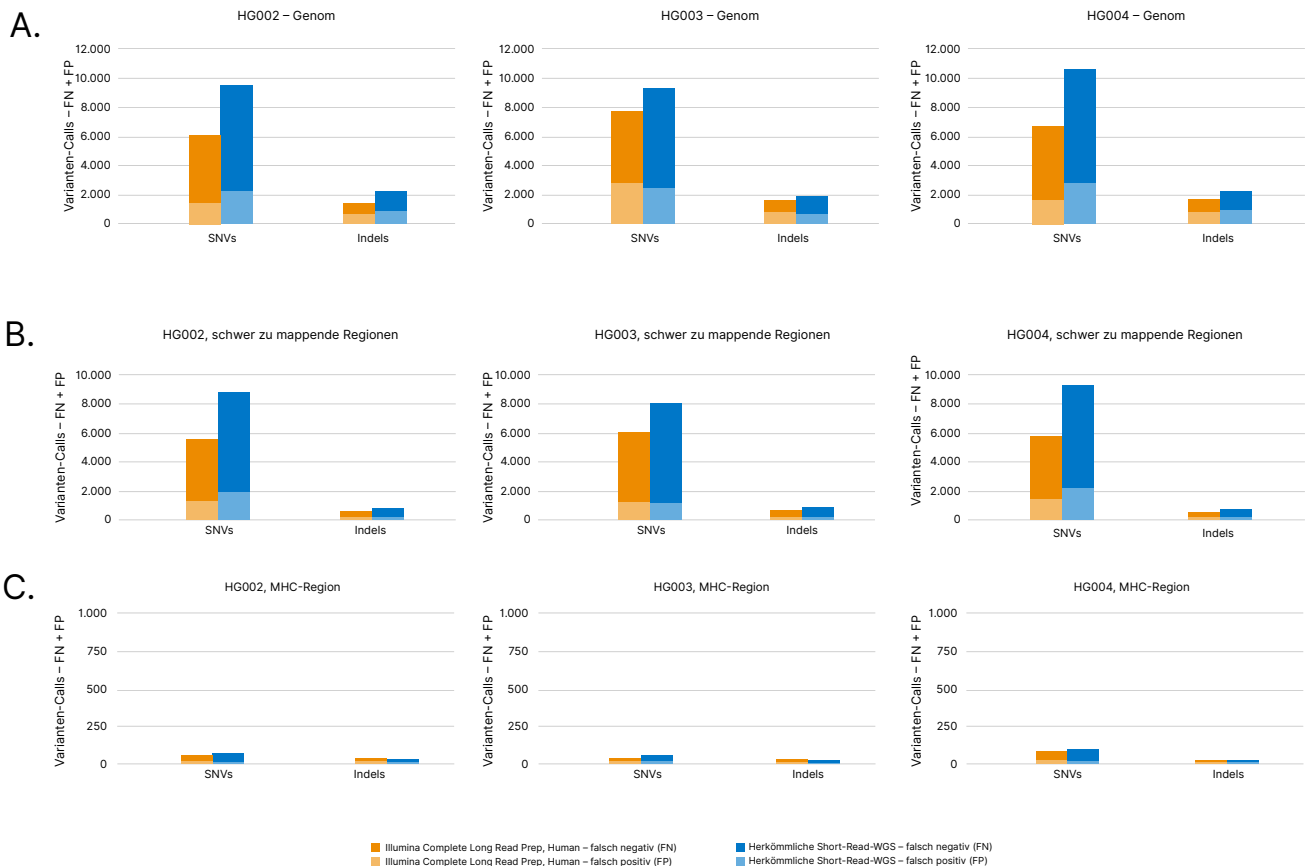


Abbildung 4: Der Illumina Complete Long Read-Assay leistet hochpräzises Varianten-Calling für anspruchsvolle Genregionen: Genauigkeit des Varianten-Callings für Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) und Indels, gemessen als falsch positive (FP) und falsch negative (FN) Ergebnisse für die „Genome in a Bottle“-Humanreferenzproben HG002, HG003 und HG004.¹¹ Vergleich von WGS-Daten aus dem Illumina Complete Long Read-Assay (orange) und Illumina DNA PCR-Free Prep (blau) über (A) das gesamte Genom, (B) schwer zu mappende Regionen und (C) die Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, Major Histocompatibility Complex).

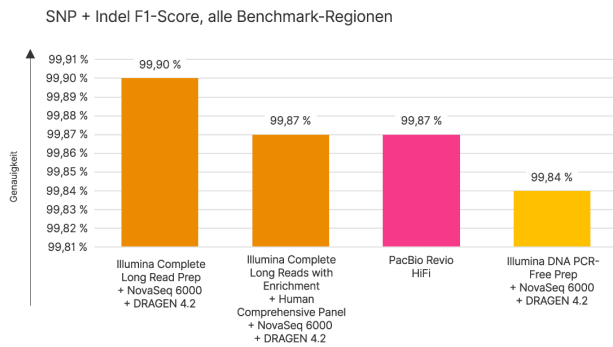


Abbildung 5: Ein neuer Maßstab für Genauigkeit: Illumina Complete Long Read Prep, Human zeichnet sich durch beispiellose Genauigkeit beim Varianten-Calling aus. Diese wird als F1-Score (%) gemessen, der aus Präzisions- und Recall-Werten in Bezug auf die Genomsequenzierung gebildet wird. Mit der PrecisionFDA Challenge v2-Benchmark-Probe HG002 generierte Daten.

Skalierbarer, optimierter Workflow für Hochdurchsatzstudien

Der Illumina Complete Long Read Prep-Workflow ist hochgradig skalierbar und eignet sich so für die umfassende WGS bei mehr Proben. Das einfache Bibliotheksvorbereitungsprotokoll nimmt ca. acht Stunden in Anspruch (mit ca. vier Stunden manuellem Aufwand), erfordert lediglich Standardlaborausrüstung und lässt sich leicht automatisieren. Mit dem NovaSeq X Plus System können Anwender bis zu 3.000 hochgenaue Genome pro Jahr generieren.* Illumina Complete Long Reads kann zur Ergänzung vorhandener WGS-Datensätze oder als Reflex-Tool für eine weitreichendere Variantenerkennung verwendet werden.

Zusammenfassung

Long-Read-Informationen tragen zur Entschlüsselung der anspruchsvollsten Genregionen bei. Illumina Complete Long Read Prep, Human ermöglicht Genomiklaboren die unkomplizierte Durchführung umfassender WGS-Studien, da sich sowohl Long- als auch Short-Reads auf demselben Gerät generieren lassen. Der optimierte, vertraute Workflow und die Synergieeffekte bei Verwendung der bewährten Illumina-SBS-Chemie sowie der DRAGEN-Analyse bilden gemeinsam die skalierbarste und genaueste für die Genomsequenzierung erhältliche Lösung.

* Potenzieller Durchsatz bei Verwendung von Illumina Complete Long Read Prep, Human mit dem NovaSeq X Plus System und einem Lauf mit zwei 25B-Fließzellen.

Weitere Informationen

[Illumina Complete Long Read Prep, Human](#)

[Technologie für die Long-Read-Sequenzierung](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina Complete Long Read Prep, Human (24 samples)	20089108
Illumina Complete Long Read Prep, Human (8 samples)	20086823
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
Illumina Analytics – 1 iCredit	20042038

Quellen

1. Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN wins at Precision- FDA Truth Challenge V2 showcase accuracy gains from alt-aware mapping and graph reference genomes. <https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/dragen-wins-precisionfda-challenge-accuracy-gains.html>. Veröffentlicht am 9. November 2020. Aufgerufen am 12. Januar 2023.
2. Illumina. Datenblatt zur DRAGEN Bio-IT Plattform. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680.pdf). Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 1. Februar 2023.
3. Illumina. Accuracy improvements in germline small variant calling with the DRAGEN Bio-IT Plattform. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf). Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 1. Februar 2023.
4. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. [pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-for-PacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-for-PacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf). Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 12. Januar 2023.
5. Pacific Biosciences. Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genome-and-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf>. Veröffentlicht 2022. Aufgerufen am 12. Januar 2023.
6. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. [store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html](https://www.store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html). Aufgerufen am 12. Januar 2023.
7. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. [pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf). Veröffentlicht 2018. Aufgerufen am 12. Januar 2023.
8. Illumina. Tagmentation. [illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html](https://www.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html). Aufgerufen am 12. Januar 2023.
9. Illumina. Archivdaten. 2022.
10. PrecisionFDA. Truth Challenge V2: Calling Variants from Short and Long Reads in Difficult-to-Map Regions. precision.fda.gov/challenges/10. Aufgerufen am 12. Januar 2023.
11. Genome in a Bottle. National Institute of Standards and Technology. [nist.gov/programs-projects/genome-bottle](https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle). Aufgerufen am 12. Januar 2023.



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

© 2024 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.
M-GL-01420 DEU v2.0