

Illumina DNA Prep

Schneller, integrierter
Bibliotheksvorbereitungsworkflow
für eine breite Palette von
Sequenzierungsanwendungen

- Bibliotheksvorbereitung in weniger als drei Stunden mit minimalem manuellem Aufwand
- Geeignet für ein breites Spektrum an DNA-Zugabemengen (1–500 ng) und zahlreiche Arten von DNA-Zugaben
- Zugang zu einer breiten Palette von Anwendungen mit der Möglichkeit zur Sequenzierung großer und kleiner Genome und Amplikons



Einleitung

Die Weiterentwicklung der NGS-Technologie (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) hat die Genomforschung zwar beschleunigt, in vielen Laboren 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 Laboren zu erheblichen Verzögerungen, bis der Sequenzierungslauf 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 dem Nextera™ DNA Library Preparation Kit hat Illumina eine Tagmentierungsschemie auf den Markt gebracht, die die DNA-Fragmentierung und die Adapter-Ligation in einer einzigen 15-minütigen Reaktion vereint und die Bibliotheksvorbereitungszeit auf 90 Minuten reduziert hat. Dank dem Nextera XT DNA Library Prep Kit entfiel die Bibliotheksquantifizierung vor dem Bibliotheks-Pooling und der Sequenzierung.¹ Ausgehend von diesen Innovationen bietet das Illumina DNA Prep Kit* eine einzigartige Chemie (Abbildung 1, Tabelle 1), die die Schritte DNA-Extraktion und -Fragmentierung sowie Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormalisierung umfasst und somit die schnellsten und flexibelsten Workflows aller Illumina-Produkte zur Bibliotheksvorbereitung ermöglicht (Abbildung 2, Tabelle 2).

Zusätzlich zu einem schnellen Workflow bietet das Illumina DNA Prep Kit eine herausragende Flexibilität in Bezug auf Zugabetyp und Zugabemenge sowie ein breites Spektrum an unterstützten Anwendungen. Von der Humangenomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing) bis hin zu kleinen mikrobiellen Plasmiden – das Illumina DNA Prep Kit zeichnet sich durch eine gleichmäßige Genom-Coverage und eine herausragende Datenqualität aus.

Schneller Bibliotheks-vorbereitungs-Workflow

Das Illumina DNA Prep Kit vereint mehrere Funktionen und bietet den schnellsten Workflow im Illumina-Produktportfolio für die Bibliotheksvorbereitung. Ein bedeutender Fortschritt 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.

* Zuvor Nextera DNA Flex Library Preparation Kit.

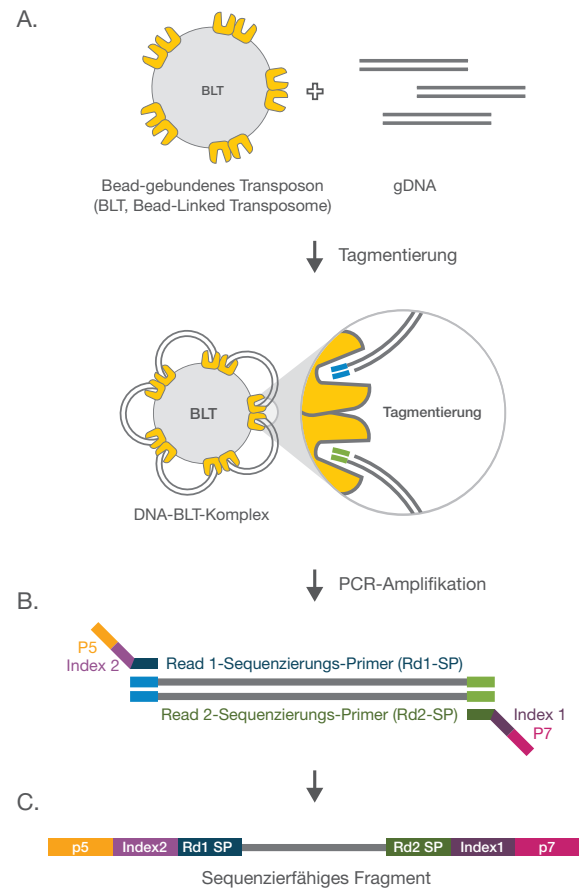


Abbildung 1: Illumina-Chemie mit Bead-gebundenen Transposons: (A) Bead-gebundene Transposons vermitteln die simultane Fragmentierung von gDNA und die Zugabe von Sequenzierungs-Primern. (B) Die PCR mit weniger Zyklen amplifiziert die sequenzierfähigen DNA-Fragmente und fügt Indizes und Adapter hinzu.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

Tabelle 1: Illumina DNA Prep – Spezifikationen

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

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

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 bis 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 Gesamtverarbeitungszeit im Portfolio von Illumina ([Abbildung 2](#)).

TruSeq Nano

DNA-Extraktion	DNA-Quant.	DNA-Fragm.	Bibliotheksvorbereitung mit Adapter-Ligation und Index-Tagging	Bibliotheksquant.	Manuelle Normalisierung und manuelles Pooling	
1 h	0,5 h	1 hr	6 h	0,5 h	2 h	ca. 11 h GWZ

Nextera XT

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

Illumina DNA Prep

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

Illumina DNA Prep (Blut)

Flex Lysis Kit	Bibliotheksvorbereitung ohne Quantifizierung mit Nextera-Tagmentierung und integrierter Normalisierung	
0,5 h	2,5 h	ca. 3 h GWZ

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 Bibliotheksvorbereitungskits nicht enthalten.

Tabelle 2: Vergleich der Bibliotheksvorbereitungs-Workflows von Illumina

	TruSeq DNA 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 h	5 h	3–4 h
Insertgröße	350 bp oder 550 bp	< 300 bp	300–350 bp
Proben-Multiplexing	96 doppelte Indizes	384 doppelte Indizes	384 doppelte Indizes

a. Integrierte DNA-Extraktionsprotokolle sind für Blutproben und Trockenblut verfügbar.

b. Bibliotheksnormierung erfolgt mit ≥ 100 ng DNA-Zugabe.

c. Umfasst DNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormierung/-Pooling.

Integrierte DNA-Zugabe

Mit Illumina DNA Prep Kits und Flex Lysis Reagent Kits kann die DNA-Extraktion direkt aus frischen Blutproben durchgeführt werden. Die optionalen Flex Lysis Reagent Kits sind 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 Leistung

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. Daher ist es nicht mehr erforderlich, die Fragmentlänge durch eine sorgfältige Optimierung des Transposon-zu-DNA-Verhältnisses zu steuern. Des Weiteren bietet der große DNA-Zugabebereich mehr Flexibilität, da er die Durchführung von Versuchen mit verschiedenen Probentypen ermöglicht. Zusätzlich zu einheitlichen Insertgrößen erzielt die On-Bead-Tagmentierung auch einheitliche und konsistente Ergebnisse (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™ DNA Nano 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 5A). Selbst Genome mit hohem oder niedrigem GC-Gehalt zeigen eine bemerkenswert gleichmäßige Coverage ohne regionsspezifische Ausrichtung (Abbildung 5B).

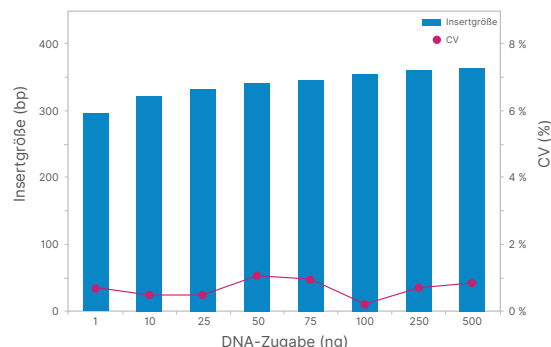


Abbildung 3: Einheitliche und konsistente Insertgrößen: Die On-Bead-Tagmentierung erzielt unabhängig von der DNA-Zugabemenge konsistente Insertgrößen. Bei einer Zugabemenge von 1 bis 500 ng DNA beträgt der Varianzkoeffizient (CV, Coefficient of Variance) 6,09 %. Die Bibliotheken wurden unter Verwendung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

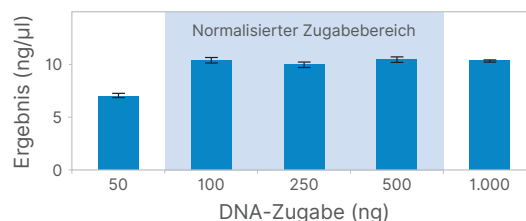


Abbildung 4: Tagmentierte und normalisierte Bibliotheken: Die Beads sind bei 100 ng oder darüber abgesättigt, was zu einem normalisierten Ergebnis tagmentierter DNA führt, wodurch keine nachgeschalteten Schritte zur Bibliotheksnormalisierung mehr erforderlich sind. Mit Human-NA12878-Proben generierte Bibliotheken (Coriell Institute), die auf einem MiSeq System (2 × 76 bp) sequenziert wurden.

Tabelle 3: Illumina DNA Prep – Leistung

Parameter ^a	Illumina DNA Prep	TruSeq Nano
Paired-End-Reads (PF)	$3,7 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
Callfähigkeit bei Autosomen	96,5 %	96,9 %
Call-Fähigkeit bei Exons von Autosomen	98,4 %	98,4 %
Autosomen-Coverage > 10×	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-Corriell-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.

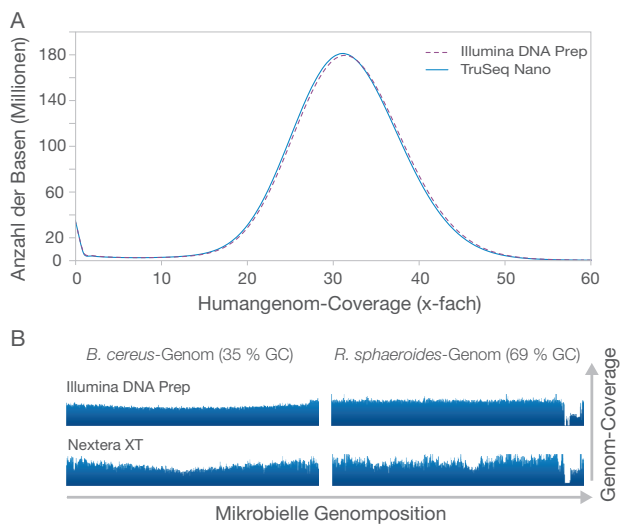


Abbildung 5: Verbesserte Einheitlichkeit der Coverage:

(A) Illumina DNA Prep bietet eine einheitliche Coverage über das gesamte Genom hinweg, die mit der des TruSeq DNA Nano Kit vergleichbar ist. Die Bibliotheken wurden mit Human-NA12878-Proben (Coriell Institute) und dem Illumina DNA Prep Kit oder dem TruSeq DNA Nano Kit generiert. Die Sequenzierung wurde auf einem HiSeq X™ System (2 × 151 bp) durchgeführt.

(B) Die Coverage wird für Mikroorganismen mit sehr hohem oder sehr 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.

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 vielen Bereichen 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.

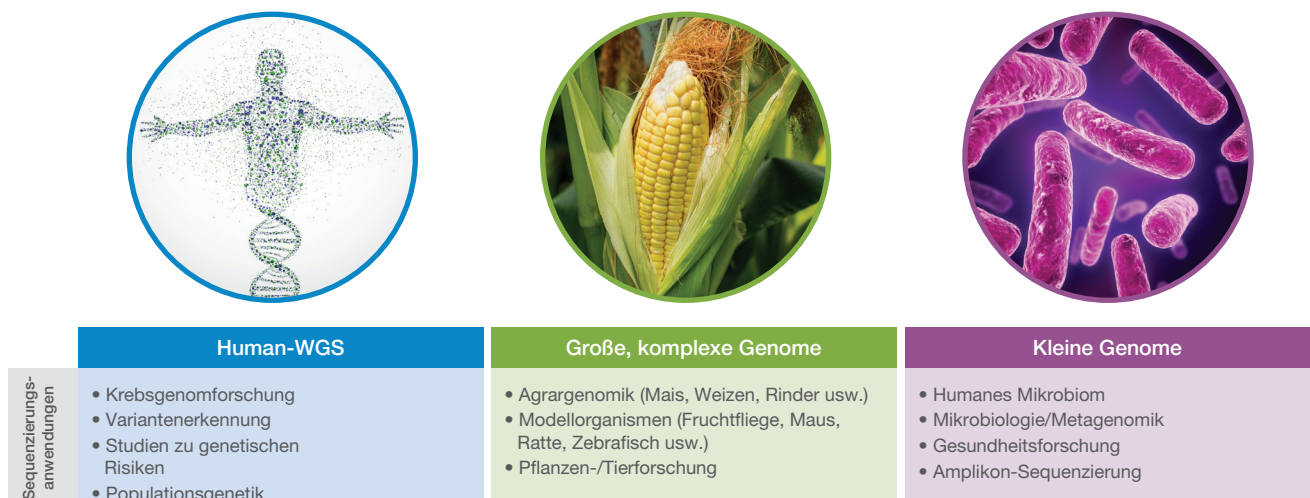


Abbildung 6: Breites Anwendungsspektrum von Illumina DNA Prep: Von der Human-WGS über große/komplexe Genome bis hin zu mikrobiellen Genomen bietet Illumina DNA Prep Flexibilität für Versuche.

Zusammenfassung

Das Illumina DNA Prep Kit bietet einen optimierten Workflow, der die DNA-Extraktion, -Quantifizierung, -Fragmentierung und die 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 eignet sich für 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

[Illumina DNA Prep](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 samples, IPB)	20060060
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (96 samples, IPB)	20060059
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660
Nextera DNA CD Indexes (96 indexes, 96 samples)	20018708

Quellen

1. Illumina. [Datenblatt zum Nextera XT DNA Library Preparation Kit](#). Veröffentlicht am 2. November 2016. Aufgerufen am 28. August 2023.



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

© 2023 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-01373 DEU v1.0