

Nextera™ DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit

Ein schneller, integrierter Workflow für eine breite Palette von Anwendungen – von der Sequenzierung humaner Gesamtgenome bis hin zu Amplikons, Plasmiden und mikrobiellen Spezies.

Vorteile

- Schneller Bibliotheksvorbereitungs-Workflow**
 Geringerer Zeitaufwand und weniger manuelle Arbeitsschritte mithilfe der On-Bead-Tagmentierung, die die Gesamtbibliotheksvorbereitungszeit auf weniger als 3 Stunden reduziert
- Integrierte Probenzugabe**
 Höhere Effizienz bei der Bibliotheksvorbereitung dank integrierter DNA-Extraktionsprotokolle für Blut, Speichel und Trockenblutspots
- Flexibler Workflow mit großem DNA-Zugabebereich**
 Vereinfachte Tagesabläufe mit einem Kit, das einen großen DNA-Zugabebereich (1–500 ng), mehrere DNA-Zugabetypen sowie kleine und große Genome unterstützt
- Große Anwendungsbreite**
 Sequenzierung von humanen oder anderen großen/komplexen Genomen sowie von Amplikons und mikrobiellen, parasitären oder mykotischen Spezies
- Optimierte Bibliotheksvorbereitungsleistung**
 Konsistente Insertgrößen und eine hohe Abdeckungseinheitlichkeit, unabhängig vom Erfahrungslevel des Benutzers

und die Adapter-Ligation in einer einzigen 15-minütigen Reaktion vereinte und die Bibliotheksvorbereitungszeit auf 90 Minuten reduzierte.¹ Mit der Markteinführung der Nextera XT DNA Library Prep Kits (Nextera XT DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Kits) entfiel die Bibliotheksquantifizierung vor dem Bibliotheks-Pooling und der Sequenzierung.² Nun steht die neueste revolutionäre Weiterentwicklung der Bibliotheksvorbereitungsschemie von Illumina zur Verfügung – das Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit). Die einzigartige Chemie im Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit (Abbildung 1, Tabelle 1) vereint die Schritte der DNA-Extraktion, Fragmentierung, Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormalisierung. Sie liefert die schnellsten und flexibelsten Workflows im Produktportfolio für die Bibliotheksvorbereitung von Illumina (Abbildung 2, Tabelle 2).

Einleitung

Die Weiterentwicklung der NGS-Technologie (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) hat die Genomforschung zwar beschleunigt, in vielen Labors 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 Labors zu erheblichen Verzögerungen, bis der Sequenzierungsprozess 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 den Nextera DNA Library Preparation Kits (Nextera DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Kits) brachte Illumina eine Tagmentierungsschemie auf den Markt, die die DNA-Fragmentierung

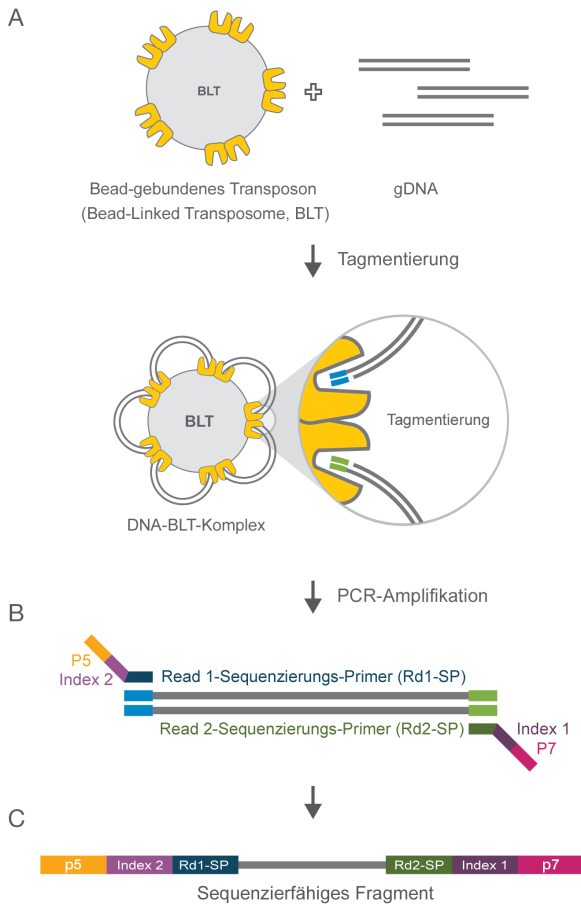


Abbildung 1: Nextera-Chemie mit Bead-gebundenen Transposons: (A) Bead-gebundene Transposons vermitteln die simultane Fragmentierung von gDNA und die Zugabe von Sequenzierungs-Primern von Illumina. (B) Die PCR mit weniger Zyklen amplifiziert die sequenzierfähigen DNA-Fragmente und fügt Indizes und Adapter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

Tabelle 1: Spezifikationen für die Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitung

	Nextera DNA Flex
DNA-Zugabetyp	gDNA, Blut, Speichel, PCR-Amplikons, Plasmide, Trockenblutspots
Erforderliche DNA-Zugabe	1–500 ng, kleine Genome 100–500 ng, große Genome
Proben-Multiplexing	24 einfache Indizes, 96 doppelte Indizes
Unterstützte Sequenzierungssysteme	Alle Illumina-Systeme
Gesamtdauer des Bibliotheksvorbereitungs-Workflows (gDNA)^a	3–4 Stunden

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

Zusätzlich zu einem schnellen Workflow bietet das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit eine herausragende Flexibilität in Bezug auf Zugabetyp und Zugabemenge sowie ein breites Spektrum an

unterstützten Anwendungen. Von der Sequenzierung humaner Gesamtgenome (Whole-Genome Sequencing, WGS) bis hin zu kleinen mikrobiellen Plasmiden – das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit erzielt bei jeder Sequenzierungsanwendung eine gleichmäßige Genomabdeckung mit der bewährten Genauigkeit der Chemie zur Sequenzierung durch Synthese (SBS) von Illumina.³

Schneller und flexibler Bibliotheksvorbereitungs-Workflow

Das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit vereint mehrere Funktionen und bietet den schnellsten Workflow im Illumina-Produktportfolio für die Bibliotheksvorbereitung. Ein bedeutender Fortschritt bei der Nextera DNA Flex-Chemie ist die On-Bead-Tagmentierung. Diese verwendet Bead-gebundene Transposons, um einheitlichere Tagmentierungsreaktionen im Vergleich zu In-Lösung-Tagmentierungsreaktionen zu vermitteln. Nach der Sättigung der Bead-gebundenen Transposons mit DNA ist keine weitere Tagmentierung möglich, sodass ein äußerst einheitliches sättigungs-basiertes Normalisierungsverfahren durchgeführt werden kann. Diese Methode bietet mehrere signifikante Vorteile:

- Bei DNA-Zugaben von 100–500 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 100–500 ng führt die On-Bead-Tagmentierung zu einer sättigungs-basierten 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. Zusammen ermöglichen diese Weiterentwicklungen einen Workflow mit den wenigsten Schritten und der schnellsten Gesamtverarbeitungsdauer 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 Pooling	ca. 11 Stunden GWZ
1 Std.	0,5 Std.	1 Std.	6 Std.	0,5 Std.	2 Std.	

Nextera XT

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

Nextera DNA Flex

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

Nextera DNA Flex (Blut, Speichel)

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

Abbildung 2: Nextera DNA Flex bietet den schnellsten Illumina-Workflow: Die Berechnungen erfolgten unter der Annahme, dass 16 Proben gleichzeitig mit einer Mehrkanalpipette verarbeitet wurden. 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-Lyse-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 Bibliotheksvorbereitungs-Kits nicht enthalten.

Tabelle 2: Vergleich der Vorbereitungs-Workflows von Illumina

	TruSeq Nano	Nextera XT	Nextera DNA Flex ^{a,b}
Integrierte DNA-Lyse enthalten	–	–	✓
Flexibler, großer DNA-Zugabebereich	–	–	✓
Bibliotheksnormalisierung enthalten	–	✓	✓
Erforderliche DNA-Zugabe	100–200 ng	1 ng	1–500 ng
Gesamtdauer der Bibliotheksvorbereitung ^c	11 Stunden	5 Stunden	3–4 Stunden
Insertgröße	350 bp oder 550 bp	< 300	300–350 bp
Proben-Multiplexing	96 doppelte Indizes	384 doppelte Indizes	24 einfache Indizes, 96 doppelte Indizes

a. Integrierte DNA-Extraktionsprotokolle für Blutproben, Speichelproben und Trockenblutspots

b. Bibliotheksnormalisierung erfolgt mit ≥ 100 ng DNA-Zugabe

c. Gesamtdauer der Bibliotheksvorbereitung umfasst DNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung und Bibliotheksnormalisierung/-Pooling

Integrierte DNA-Zugabe

Mit den Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kits und den Flex-Lyse-Reagenzien-Kits kann die DNA-Extraktion direkt aus frischen Blut- oder Speichelproben durchgeführt werden. Die optionalen Nextera DNA Flex-Lyse-Kits wurden für die Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitung 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 Nextera DNA Flex-Tagmentierungsreaktion zugeführt.

Optimierte Bibliotheksvorbereitungsleistung

Dank der Eigenschaften der On-Bead-Tagmentierung konnte die Bibliotheksvorbereitungsleistung deutlich verbessert werden. Das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit generiert äußerst einheitliche und konsistente Insertgrößen (300–350 bp) über einen großen DNA-Zugabebereich (1–500 ng) hinweg (Abbildung 3). Da die On-Bead-Tagmentierung die Generierung einheitlicher Insertgrößen über einen großen Zugabebereich hinweg ermöglicht, ist es nicht mehr erforderlich, die Fragmentlänge durch eine sorgfältige Optimierung des Transposon-zu-DNA-Verhältnisses zu prüfen. Des Weiteren bietet der große DNA-Zugabebereich mehr Flexibilität, da er die Durchführung von Versuchen mit verschiedenen Probenotypen, einschließlich wertvoller Proben, ermöglicht. Zusätzlich zu einheitlichen Insertgrößen erzielt die On-Bead-Tagmentierung auch einheitliche und konsistente Ergebnisse über einen großen DNA-Zugabebereich (100–500 ng) hinweg (Abbildung 4). Bei einer Zugabe von exakt oder ungefähr 100 ng DNA sind die Beads

abgesättigt, was zu konsistenten und normalisierten Ergebnisse führt. Zeitintensive Bibliotheksquantifizierungs- und -normalisierungsschritte vor dem Pooling entfallen. Bei einem Vergleich der Leistung des Nextera DNA Flex- und des TruSeq Nano DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Kits erzielte das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit Ergebnisse, die vergleichbar mit der mechanischen Fragmentierung bzw. bei bestimmten Kennzahlen 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 Abdeckung über das Humangenom und das Genom anderer nicht menschlicher Spezies hinweg (Abbildung 5). Selbst Genome mit hohem oder niedrigem GC-Gehalt zeigen eine bemerkenswert gleichmäßige Abdeckung ohne regionsspezifische Ausrichtung (Abbildung 5B).

Tabelle 3: Leistung der Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitung

Parameter ^a	Nextera DNA Flex	TruSeq Nano
Paired-End-Reads nach Filterung	$3,7 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
Call-Fähigkeit bei Autosomen	96,5 %	96,9 %
Call-Fähigkeit bei Exons von Autosomen	98,4 %	98,4 %
Autosomen-Abdeckung > 10-fach	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-Coriell-Proben) durchgeführt, verteilt auf fünf Läufe, um eine etwa 30-fache Humangenom-Abdeckung 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.

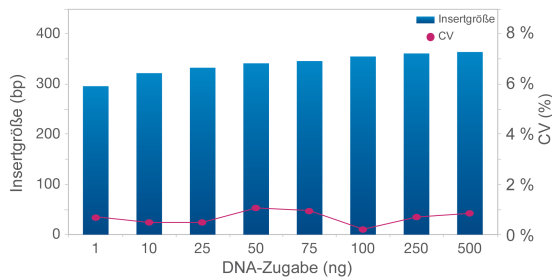


Abbildung 3: Einheitliche und konsistente Insertgrößen: Die On-Bead-Tagmentierung erzielt unabhängig von der DNA-Zugabemenge konsistente Insertgrößen. Bei einer Zugabemenge von 1–500 ng DNA beträgt der Varianzkoeffizient (coefficient of variance, CV) 6,09 %. Die Bibliotheken wurden mit *E. coli*-Replikatproben und dem Nextera DNA Flex-Kit generiert. Der Lauf wurde auf einem MiSeq™-System (2 × 76 bp) durchgeführt.

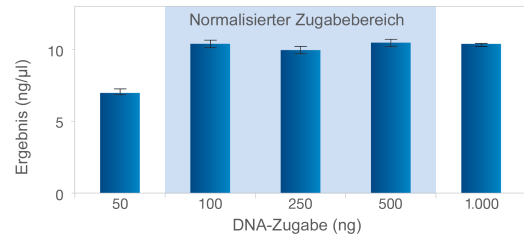


Abbildung 4: Tagmentierte und normalisierte Bibliotheken: Die Beads sind bei 100 ng oder darüber abgesättigt, was zu einem normalisierten Ergebnis tagmentierter DNA führt. Durch die Normalisierung tagmentierter DNA entfallen die Schritte der nachgeschalteten Bibliotheksnormalisierung. Die Bibliotheken wurden mit Human-NA12878-Proben (Coriell Institute) und dem Nextera DNA Flex-Kit generiert. Der Lauf wurde auf einem MiSeq™-System (2 × 76 bp) durchgeführt.

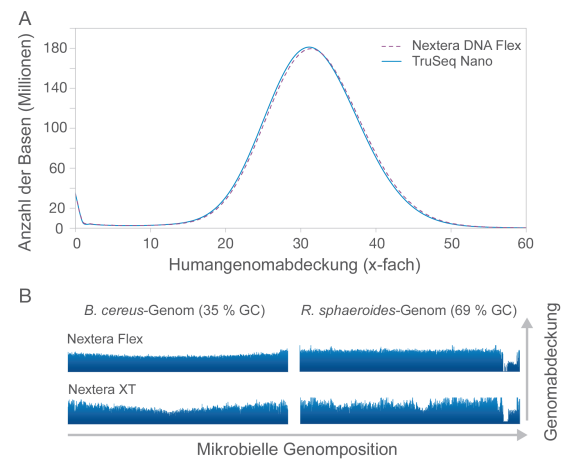


Abbildung 5: Nextera DNA Flex verbessert Abdeckungseinheitlichkeit: (A) Das Nextera DNA Flex-Kit bietet eine einheitliche Abdeckung über das gesamte Genom hinweg, die mit dem TruSeq Nano DNA-Kit vergleichbar ist. Die Bibliotheken wurden mit Human-NA12878-Proben (Coriell Institute) und dem Nextera DNA Flex- oder dem TruSeq Nano-Kit generiert. Die Sequenzierung wurde auf einem HiSeq X™-System (2 × 151 bp) durchgeführt. (B) Die Abdeckung wird für Mikroorganismen mit sehr hohem oder niedrigem GC-Gehalt dargestellt. Angesichts der verbesserten On-Bead-Bibliotheksvorbereitungsschemie erzielte Nextera DNA Flex eine gleichmäßigere Abdeckung als Nextera XT. Die Bibliotheken wurden mit dem Nextera XT- oder dem Nextera DNA Flex-Kit vorbereitet. Die Daten wurden auf einem HiSeq™ 2500-System (Schnelllauf v2, 2 × 151 bp) durchgeführt.

Flexibler Workflow bietet ein breites Anwendungsspektrum

Der wahrscheinlich größte Vorteil des Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kits ist jedoch seine Flexibilität. Es eignet sich für ein breites Spektrum an Forschungsgebieten und -anwendungen. Das Kit unterstützt Anwendungen in der Human-WGS, Krebsgenomforschung, ökologischen Metagenomik, Infektionsforschung, Agrar-genomik und viele mehr (Abbildung 6).



Human-WGS

- Krebsgenomforschung
- Variantenerkennung
- Studien zu genetischen Risiken
- Populationsgenetik



Große, komplexe Genome

- Agrargenomik (Mais, Weizen, Rinder usw.)
- Modellorganismen (Fruchtfliege, Maus, Zebrafisch usw.)
- Pflanzen-/Tierforschung



Kleine Genome

- Humanes Mikrobiom
- Mikrobiologie/Metagenomik
- Gesundheitsforschung
- Amplikon-Sequenzierung

Sequenzierungs-
anwendungen
beispiele

- Humangenom (3,2 Gb), 30-fach, S2-Kit, NovaSeq™, 8 Proben je Fließzelle
- Humangenom (3,2 Gb), > 30-fach, v2.5 HiSeq X®, 8 Proben je Fließzelle

- Genom der Fruchtfliege (175 Mb), 30-fach, v2-Kit, NextSeq® 550-System, 22 Proben je Fließzelle
- Mausgenom (2,7 Gb), 30-fach, v1-Kit, HiSeq® 4000-System, 8 Proben je Fließzelle

- *E. coli*-Genom (4,6 Mb), 30-fach, MiniSeq™-System, 50 Proben je Fließzelle
- Plasmide/Amplikons (650 kb), 1.000-fach, MiSeq®, 11 Proben je Fließzelle

Abbildung 6: Breites Anwendungsspektrum mit Nextera DNA Flex: Das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit eignet sich für eine breite Palette von Anwendungen. Von der Human-WGS über große/komplexe Genome bis hin zu mikrobiellen Genomen bietet das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit eine noch nie dagewesene Flexibilität für Versuche.

Ganz gleich, ob Sie große komplexe Genome, kleine Genome, Plasmide, Amplikons, grampositive bzw. gramnegative Bakterien, Pilz- oder verschiedene Pflanzen- und Tier-Spezies sequenzieren, das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit bietet bei jeder Anwendung eine umfassende genomische Abdeckung. Der flexible und benutzerfreundliche Workflow lässt sich für verschiedene Erfahrungslevel der Benutzer sowie für zahlreiche Anwendungen und Probenzugabetypen anpassen.

Zusammenfassung

Das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit bietet einen revolutionären Workflow, der die DNA-Extraktion, Quantifizierung, Fragmentierung und Bibliotheksnormalisierung vereint. Er ist der schnellste und flexibelste Bibliotheksnormalisierungs-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 unterstützt einen großen DNA-Zugabebereich, verschiedene Probentypen 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 Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Workflow zusammen mit der Leistungsfähigkeit der Illumina-SBS-Chemie Ihren Forschungszielen schneller als bisher näherbringt.

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit) (24 Proben)	20018704
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit) (96 Proben)	20018705
Flex Lysis Reagent Kit (Flex-Lyse-Reagenzien-Kit)	20018706
Nextera DNA CD Indexes (Nextera DNA-CD-Indizes) (24 Indizes, 24 Proben)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (Nextera DNA-CD-Indizes) (96 Indizes, 96 Proben)	20018708

CD-Indizes: kombinatorische doppelte Indizes (Combinatorial Dual Indexes). 24 doppelte Indizes für bis zu 24 Proben oder 96 doppelte Indizes für bis zu 96 Proben. **Einfache Indizes:** 24 einfache Indizes für bis zu 96 Proben.

Weitere Informationen

Weitere Informationen über das Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit finden Sie unter www.illumina.com/nextera-dna-flex.

Weitere Informationen zur Human-WGS mit dem Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit finden Sie im [Anwendungshinweis zur Human-WGS mit Nextera DNA Flex](#).

Weitere Informationen zur Sequenzierung mikrobieller Genome mit dem Nextera DNA Flex-Bibliotheksvorbereitungs-Kit finden Sie im [Anwendungshinweis zur mikrobiellen WGS mit Nextera DNA Flex](#).

Quellen

1. Illumina (2016). [Datenblatt zum Nextera DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Kit](#). Aufgerufen am 10. Juli 2017.
2. Illumina (2014). [Datenblatt zum Nextera XT DNA-Bibliotheksvorbereitungs-Kit](#). Aufgerufen am 10. Juli 2017.
3. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. (2008) [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature* 456:53-59.