

# TruSeq™ DNA Exome

Eine kostengünstige Bibliotheksvorbereitungs- und Exomanreicherungslösung mit herausragender Genauigkeit.

## Vorteile

- Bewährte TruSeq-Datenqualität**  
 Mechanisches Schneiden und die TruSeq-Anreicherungschemie erzielen eine einheitliche Abdeckung und  $\geq 80\%$  On-Target-Sequenzierungs-Reads.
- Kostengünstige Exomsequenzierung**  
 Das Bibliotheks-Pooling vor der Anreicherung und die optimale Abdeckung führen zu einer kostengünstigen Exomsequenzierung.
- Genau, zuverlässige Ergebnisse**  
 Die Datenanalyse per Knopfdruck sorgt für eine zuverlässige Identifizierung exonischer Varianten.
- Integrierte Workflow-Lösung**  
 Der umfassende Workflow optimiert die Exomsequenzierung von der Bibliotheksvorbereitung bis zur Datenanalyse.

## Einleitung

Die Exomsequenzierung ist wissenschaftlich als leistungsstarke Methode zur Erkennung von Varianten anerkannt, die ursächlich für genetisch bedingte Erkrankungen sein können.<sup>1–3</sup> TruSeq DNA Exome bietet eine kostengünstige Exomsequenzierungs-Lösung, mit der Forscher mehr Exome pro Studie sequenzieren und ihre Forschung beschleunigen können. Das Kit kombiniert die bewährte TruSeq-Technologie mit einer außerordentlichen Genauigkeit, sogar bei komplizierten Proben. Im Rahmen eines integrierten Workflows mit Bibliotheksvorbereitung, Exomanreicherung, Sequenzierung und Datenanalyse liefert TruSeq DNA Exome genaue Varianten-Calls und ermöglicht so ein tiefgreifenderes Verständnis der Codierungsmutationen.

## Bewährte TruSeq-Datenqualität

Das Erzielen von hochgradig zuverlässigen Varianten-Calls ist ebenso von der Sequenzierungsgenauigkeit abhängig wie von der hochwertigen Bibliotheksvorbereitung und -anreicherung. TruSeq DNA Exome ist kompatibel mit den Sequenzierungssystemen der Serien MiSeq™, NextSeq™, HiSeq™ und NovaSeq™ (Tabelle 1). Diese Systeme von Illumina verwenden die SBS-Methode (Sequencing by Synthesis), mit der mehr als 90 % der Sequenzierungsdaten weltweit generiert werden.\* SBS-Chemie von Illumina liefert einen hohen Prozentsatz an sequenzierten Basen über Q30. Durch die Kombination von TruSeq DNA Exome mit SBS-Chemie können Forscher eine hohe Anzahl echter Coding-Varianten identifizieren und falsch positive wie falsch negative Calls minimieren.

## Fokussierter exonischer Inhalt

TruSeq DNA Exome ist im Hinblick auf eine einheitliche und spezifische Abdeckung von 45 Mb exonischer Inhalte optimiert. Das Sonden-Set ist für die Anreicherung von 214.405 Exons konzipiert (Tabelle 2). Diese Kombination aus fokussiertem Design sowie gleichmäßiger und spezifischer Anreicherung bietet eine umfassende Exomsequenzierung und eine zuverlässige Identifikation echter, codierender Varianten.

Table 1: Vergleich für Durchsatz mit TruSeq DNA Exome<sup>a</sup>

Sequenzierungssystem	Anzahl der Exome pro Lauf bei 50x	Anzahl der Exome pro Lauf bei 100x
<b>MiSeq-Serie</b>	1	n. z.
<b>NextSeq-Serie</b>		
Fließzelle mit mittlerer Leistung	3	2
Fließzelle mit hoher Leistung	12	6
<b>HiSeq-Serie</b>		
HiSeq 2500-System Schnelllauf-Modus (zwei Fließzellen)	24	12
HiSeq 2500-System Hochleistungs-Modus (zwei Fließzellen)	156	78
HiSeq 3000-System	96	48
HiSeq 4000-System (zwei Fließzellen)	192	96

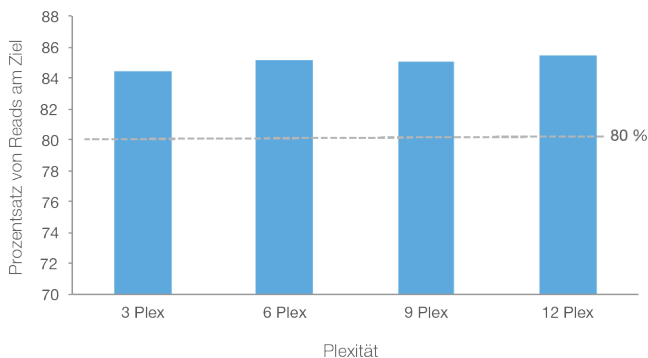
a. Die geschätzte Anzahl der pro Lauf sequenzierten Exome wird mit einer mittleren Abdeckung von 50x bzw. 100x berechnet. Illumina empfiehlt bei der Verwendung von TruSeq DNA Exome für alle Sequenzierer eine Read-Länge von  $2 \times 75$  bp.

Table 2: Exominhalte mit TruSeq DNA Exome und Nextera™ Exome

Abdeckung	TruSeq DNA Exome oder Nextera Exome
Größe des Zielbereichs	45 Mb
Anzahl an Zielexonon	214.405
Target-Inhalt	Codierende Exons
<b>Anteil der Abdeckung des Exoms (nach Datenbank)</b>	
RefSeq <sup>a</sup>	99,45 %
CCDS <sup>b</sup>	98,83 %
ENSEMBL <sup>c</sup>	99,68 %
GENCODE v19 <sup>d</sup>	99,68 %

- RefSeq - NCBI Reference Sequence Database. [www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- CCDS - Consensus CDS (CCDS) Database. [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- ENSEMBL - Ensembl Genome Browser. [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html). Abgerufen: 11. Februar 2015.
- GENCODE - GENCODE-Projekt: Encyclopedia of genes and gene variants. [www.gencodegenes.org/](http://www.gencodegenes.org/). Abgerufen: 11. Februar 2015.

\*Archivierte Datenberechnungen. Illumina, Inc., 2015.



**Abbildung 1: On-Target-Anreicherung:** TruSeq DNA Exome liefert  $\geq 80\%$  der On-Target-Sequenzierungsreads und ermöglicht so eine effiziente, kostengünstige Sequenzierung.

### Effiziente Exomsequenzierung

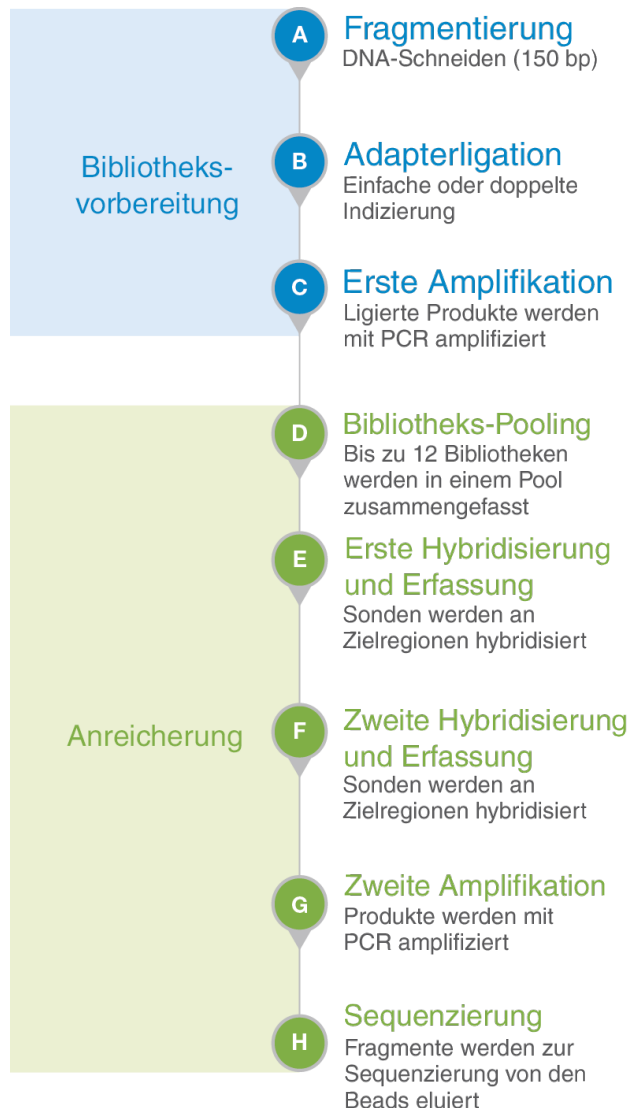
TruSeq Exome unterstützt 12-Plex-Pooling. Forscher sind daher in der Lage, den Sequenzierungsdurchsatz zu maximieren und Varianten in kürzerer Zeit zu identifizieren, da bis zu 12 Bibliotheken pro Fließzellen-Lane sequenziert werden können. TruSeq DNA Exome liefert  $\geq 80\%$  der On-Target-Sequenzierungsreads (Abbildung 1) und bietet eine gute Abdeckungseinheitlichkeit, was zu äußerst zuverlässigen Ergebnissen führt. Es können außerdem mehr Exome pro Lauf sequenziert werden, wodurch Forscher ihre Budgets maximieren können.

### Effiziente Anreicherungsschemie

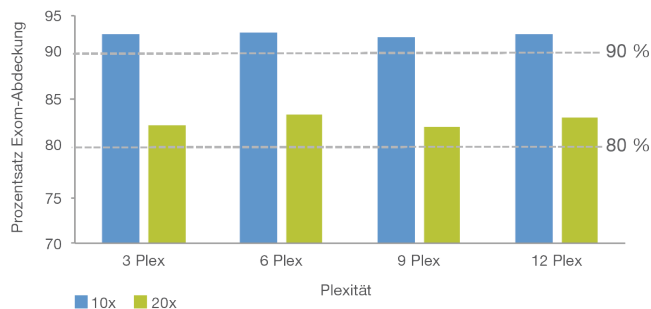
TruSeq DNA Exome ist im Hinblick auf eine einheitliche Leistung bei vielen verschiedenen Probenotypen optimiert. Der Bibliotheksvorbereitungs-Workflow (Abbildung 2) beginnt mit der mechanischen Fragmentierung, bei der einheitliche Fragmentgrößen generiert werden, die eine maximale Reproduzierbarkeit zwischen Bibliotheken sicherstellen (Abbildung 2A). Dieses mechanische Schneiden mit Covaris-Sonifikation oder einer ähnlichen Methode unterstützt die Verwendung mit beeinträchtigten Proben, z. B. solchen, die kurze DNA-Fragmente enthalten. Blunt-End-DNA-Fragmente werden mit einer Kombination aus Fill-in-Reaktionen und Exonukleaseaktivität generiert, gefolgt von einer Größenauswahl anhand bereitgestellter AMPure-SPRI-Beads (Solid Phase Reversible Immobilization) (Beckman Coulter). An die Fragmente werden Adapter mit vollständigen Gegenstücken zu Sequenzierungs-Primerhybridisierungsstellen für Single-, Paired-End- und Index-Reads ligiert (Abbildung 2B). Die ligierten Produkte werden mittels PCR amplifiziert (Abbildung 2C).

Anschließend werden die Bibliotheken zusammengefasst und denaturiert (Abbildung 2D). Biotinylierte Sonden werden an die Zielbereiche hybridisiert (Abbildung 2E und 2F), die mit Streptavidin-Beads angereichert werden. Nach einer weiteren PCR-Reaktion (Abbildung 2G) werden Fragmente von den Beads eluiert und sind nun für die Sequenzierung bereit (Abbildung 2H). Bei dem optimierten Workflow wird eine Target-Insert-Größe von ca. 150 bp generiert. Er kann in  $< 2,5$  Tagen abgeschlossen werden. TruSeq DNA Exome

reichert Exominhalte effizient für die Sequenzierung an und bietet eine hohe Abdeckungseinheitlichkeit mit einer Abdeckung von  $> 85\%$  der Basen bei einer 10-fachen Tiefe (Abbildung 3).



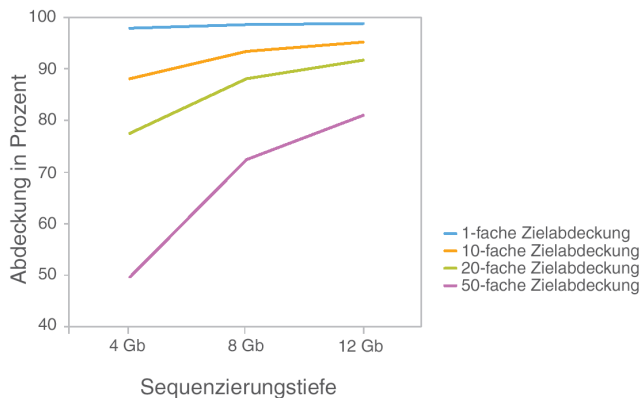
**Abbildung 2: TruSeq DNA Exome-Workflow:** TruSeq DNA Exome kombiniert die Bibliotheksvorbereitung mit der Exomanreicherung. Der Workflow kann in weniger als 2,5 Tagen abgeschlossen werden.



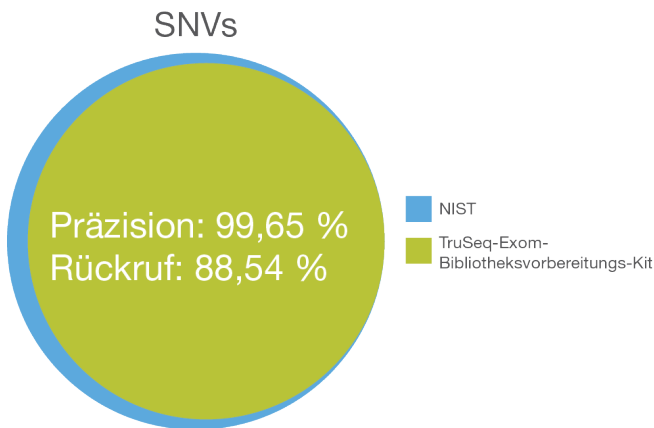
**Abbildung 3: Hohe Abdeckungseinheitlichkeit:** TruSeq DNA Exome bietet eine einheitliche Abdeckung von  $> 85\%$  der Basen bei 10-facher Tiefe.

## Genau, zuverlässige Ergebnisse

TruSeq DNA Exome liefert eine außergewöhnliche Target-Abdeckung bei einer Vielzahl von Read-Tiefen (Abbildung 4). Zusammen führen die Reproduzierbarkeit von TruSeq DNA Exome, die hohe Abdeckungseinheitlichkeit und die SBS-Chemie zu sehr genauen Varianten-Calls. Mehr als 99,65 % der im Zuge von TruSeq DNA Exome und einer Illumina-Sequenzierung erzeugten Varianten-Calls entsprechen den Referenzdaten in der Datenbank des National Institute of Standards and Technology (NIST) (Abbildung 5).<sup>4,5</sup>



**Abbildung 4: Abdeckungseffizienz bei unterschiedlicher Tiefe:** TruSeq DNA Exome bietet eine außerordentliche Abdeckung bei unterschiedlicher Sequenzierungstiefe. Bei bis zu 20-facher Tiefe werden > 80 % der Ziele abgedeckt.



**Abbildung 5: Hohe Korrelation mit NIST-Datenbank:** Mit TruSeq DNA Exome durchgeführte Varianten-Calls weisen eine hohe Übereinstimmung mit Standardreferenzdaten auf. Die DNA-Probe NA12878 des Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) wurde auf eine Abdeckungstiefe von 100x sequenziert. SNV-Calls (Single Nucleotide Variant) werden gemeldet. **Präzision** wird als die Wahrscheinlichkeit definiert, dass ein Varianten-Call korrekt ist. **Recall** wird als die Wahrscheinlichkeit des Calls einer validierten Variante definiert.

## Integrierter Sequenzierungsworkflow

TruSeq DNA Exome ist Teil einer zusammenhängenden, unterstützten Lösung, die Forscher durch den gesamten Prozess von der Bibliotheksvorbereitung bis zur Datenanalyse führt (Abbildung 7). Das Kit kombiniert Bibliotheksvorbereitung und Exomanreicherung, daher müssen keine Indizes, Probenreinigungs-Beads oder andere zusätzliche Materialien angeschafft werden. Alle Komponenten von TruSeq DNA Exome wurden zusammen entwickelt, optimiert und analytisch validiert. Dadurch ist die Überprüfung einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten überflüssig. Wissenschaftliche Experten von Illumina bieten eine einzige Anlaufstelle für technischen und Vor-Ort-Support in jeder Phase des Workflows. Durch den Beitritt zur Illumina-Community können Forscher die Expertise des Illumina-Support-Teams nutzen und mit dem großen Netzwerk an Forschern zusammenarbeiten, die die Technologie von Illumina verwenden.

Die Sequenzierungsdaten werden automatisch vom Illumina-System an BaseSpace® Sequence Hub, die Computerumgebung für Genomik von Illumina, übertragen. Durch BaseSpace Sequence Hub werden Datenanalyse und biologische Interpretation vereinfacht, wodurch dem typischen Analyse-Workflow ein Großteil seiner Komplexität genommen wird. BaseSpace Sequence Hub bietet ein etabliertes Ökosystem von integrierten Datenanalysetools für Biologen. Bei BaseSpace Apps wurden die von Experten bevorzugten Analysetools in einer intuitiven, benutzerfreundlichen Oberfläche vereint, sodass Forscher auch ohne Erfahrung im Bereich Bioinformatik auf bewährte Analysepipelines zugreifen können (Abbildung 6). Forscher können die Exomdaten mit der BWA Enrichment App, die die BWA/GATK-Methode (Industriestandard) verwendet, oder mit der Isaac™ Enrichment App analysieren, die die schnelle und genaue Illumina-Pipeline nutzt.<sup>6</sup>

Für Biologen, die die genetische Basis von Krankheiten untersuchen, bietet die VariantStudio App eine Identifizierung und funktionale Interpretation von mit Krankheiten assoziierten Einzelnukleotidvarianten (SNVs) sowie Insertionen und Deletionen (Indels). Forscher können daraus resultierende Varianten schnell filtern und isolieren, um Sequenzierungsdaten mit biologischem Kontext anzureichern. Signifikante Ergebnisse werden in kurze, prägnante Berichte exportiert. Mit der VariantStudio App können Forscher biologische Signifikanz in wenigen einfachen Schritten entdecken.

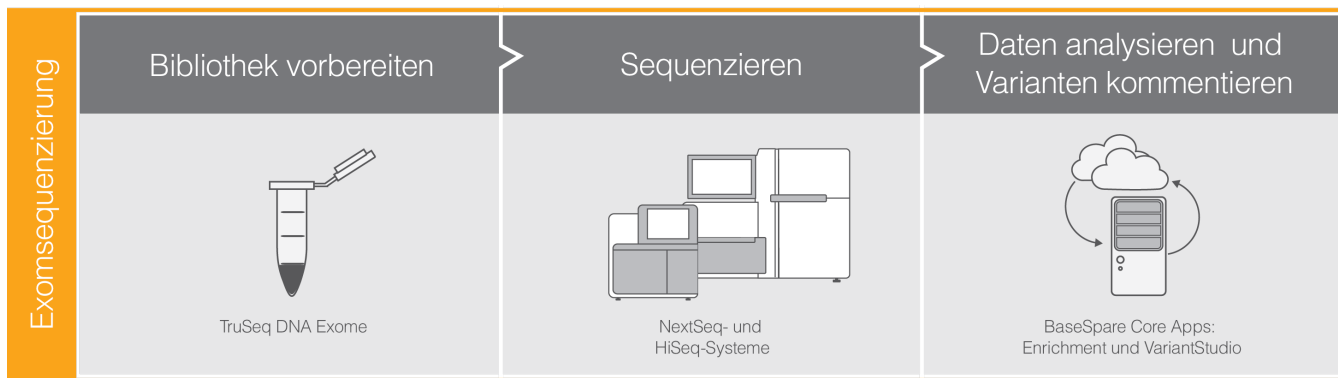


Abbildung 7: Exomsequenzierungs-Workflow: TruSeq DNA Exome ist Teil eines integrierten Exomsequenzierungs-Workflows, der die Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung und die Datenanalyse umfasst.

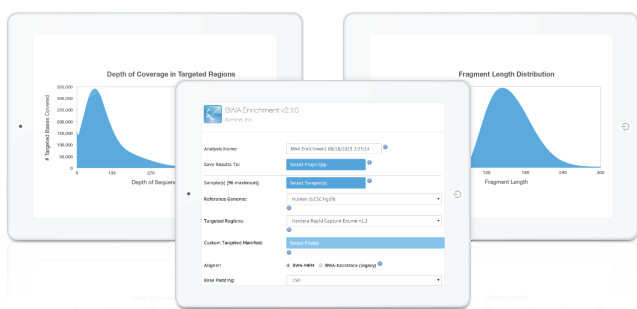


Abbildung 6: Vereinfachte Datenanalyse mit BaseSpace Apps: Sequenzierungsdaten von TruSeq DNA Exome können einfach und sicher in den BaseSpace Sequence Hub hochgeladen und mit der BWA Enrichment App analysiert werden. Die Ergebnisse werden in einfach lesbaren Formaten bereitgestellt.

### Vergleich der Exomsequenzierungsleistung

Illumina bietet zwei integrierte Workflow-Lösungen zur Exomsequenzierung. Außerdem stehen Workflows zur Verfügung, die die Illumina-Bibliotheksvorbereitung mit TruSeq DNA Exome oder Nextera DNA Exome und die Exomanreicherung mithilfe von xGen® Universal Blockers, xGen Lockdown Reagents und xGen Exome Research Panel v1.0, erhältlich von IDT, miteinander kombinieren (Tabelle 3).

Table 3: Vergleich der Exom-Workflowleistung

Metrik	TruSeq-xGen <sup>a</sup>	Nextera-xGen <sup>a</sup>	TruSeq Exome	Nextera Exome
DNA-Zugabe	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng
Probentypen	DNA	DNA	DNA und FFPE	DNA
Manueller Aufwand	5 Stunden	2 Stunden	6 Stunden	3 Stunden
Assay-Zeit insgesamt	2,5 Tage	2 Tage	2,5 Tage	2 Tage
Hybridisierungszeit	4 Stunden	4 Stunden	16 Stunden	2 Stunden
On-Target %	> 91 %	> 92 %	> 80 %	> 75 %
% Abdeckung bei 20x <sup>b</sup>	> 95 %	> 85 %	> 90 %	> 85 %

a. Die Angaben zu den Illumina-IDT-Exomanreicherungs-Workflows basieren auf vorläufigen Daten des BaseSpace Sequence Hub.  
 b. Die Angaben zur Abdeckung bei 20x wurden für TruSeq-xGen- und Nextera-xGen-Kits mit 3,5-Gb-Sequenzierung ermittelt. Die Angaben zur Abdeckung bei 20x wurden für TruSeq DNA Exome und Nextera DNA Exome mit 8-Gb-Sequenzierung ermittelt.

### Zusammenfassung

TruSeq DNA Exome bietet eine optimierte, kostengünstige Methode zur Identifizierung und Analyse von codierenden Varianten, die eine außerordentliche Datengenauigkeit gewährleistet. Die Integration in einen vollständigen Workflow aus führender Sequenzierungstechnologie und benutzerfreundlichen Analysetools bietet Forschern eine einzige Quelle für all ihre Exomsequenzierungsanforderungen.

### Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Exomsequenzierung finden Sie unter [www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html](http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html).

### Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSeq Exome Kit (24 Proben)	20020614
TruSeq Exome Kit (96 Proben)	20020615
IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes (24 Indizes, 96 Proben)	20020590
IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes (96 Indizes, 96 Proben)	20022370

## Quellen

1. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun*. 2015;6:5973.
2. Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol*. 2014;76:473–483.
3. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med*. 2011;13:255-262.
4. Standardreferenzdaten ([www.nist.gov/srd](http://www.nist.gov/srd)). Abgerufen: 11. Februar 2015.
5. Genome in a Bottle Consortium | Advances in Biological and Medical Measurement Science ([sites.stanford.edu/abms/giab](http://sites.stanford.edu/abms/giab)). Abgerufen: 20. Februar 2015.
6. Racz C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041–2043.

**Illumina, Inc.** • Tel. USA (gebührenfrei) 1.800.809.4566 • Tel. außerhalb Nordamerikas +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2017 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Weitere Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pub. No. 770-2015-007-C DEU QB #

**illumina**<sup>®</sup>