

# Maximierung der Performance auf der MiSeq™ i100 Series

Schritte zur Optimierung des Ladens von Bibliotheken zur Gewährleistung erfolgreicher Läufe

## Optimierung des Ladens von Bibliotheken

Bestimmung der optimalen Ladekonzentration für Fließzellen der MiSeq i100 Series

## Maximierung der Performance

Verbesserte Repräsentation der Insert-Größe zur Maximierung der Sequenzierungsperformance

## Eignung für geringe Diversität

Sequenzierung von Bibliotheken mit geringer Diversität durch Abstimmung der Bibliothekskomplexität anhand von PhiX

## Einleitung


Die MiSeq i100 Series ist das unkomplizierteste und schnellste Tischsequenziersystem. Bahnbrechende Fortschritte bei Systemdesign, XLEAP-SBS™-Chemie und integrierter Datenanalyse sorgen für eine verbesserte Bedienung, hohe Datengenauigkeit und außergewöhnliche Geschwindigkeit mit einer bis zu viermal schnelleren Bereitstellung der Ergebnisse im Vergleich zum ursprünglichen MiSeq System. Als Teil einer NGS-Komplettlösung liefert die MiSeq i100 Series Ergebnisse am selben Tag für unterschiedliche Anwendungen, darunter Transkriptomik, mikrobielle Genomik und gezielte Gensequenzierungsstudien in wichtigen Bereichen wie Mikrobiologie, Infektionskrankheiten, Onkologie und vielen mehr.

Wenn Projekte von einem anderen Sequenziersystem auf die MiSeq i100 Series übertragen werden, lassen sich durch Optimierung des Ladens von Bibliotheken die Menge und Qualität der Daten maximieren. Der vorliegende technische Hinweis enthält Empfehlungen dazu, wie sich auf der MiSeq i100 Series optimale Ergebnisse erreichen lassen, einschließlich Anleitungen zur Ladekonzentration und Qualität von Bibliotheken sowie Erwägungen zur Nukleotiddiversität.

## Optimales Laden von Bibliotheken

Die Ladekonzentration ist die Endkonzentration, mit der Bibliotheken in Sequenzierungsgeräte geladen werden. Im Anschluss an die Vorbereitung der Bibliotheken werden diese auf die Ladekonzentration verdünnt, die für den jeweiligen Bibliothekstyp, das Sequenziersystem und das Reagenzien-Kit geeignet ist.

Werden Bibliotheken in einer zu hohen bzw. zu niedrigen Konzentration geladen, beeinträchtigt dies unter Umständen die Qualität sowie die Ergebnisse der Sequenzierung und kann in Extremfällen sogar das Fehlschlagen von Läufen zur Folge haben. Das Laden bei zu geringer Konzentration kann dazu führen, dass nur ein geringer Anteil der Nanowells belegt ist (% belegt) und dass sich die Anzahl doppelter Reads erhöht, wodurch zum Erreichen der angestrebten Coverage mehr Reads erforderlich sind. Im Gegensatz dazu kann das Laden bei zu hoher Konzentration einen geringen Anteil von Clustern nach Filterung (PF, Passing Filter) zur Folge haben. Zur Bestimmung der optimalen Ladekonzentrationen auf der MiSeq i100 Series können die Metriken „% belegt“ und „% PF“ im Sequencing Analysis Viewer dargestellt werden. Anhand dieser Daten lässt sich ablesen, ob ein Lauf mit zu niedriger, optimaler oder zu hoher Konzentration geladen wurde. Die im folgenden Beispielversuch verwendete Herangehensweise kann für die Titration auf die Ladekonzentration sowie die Bewertung primärer und sekundärer Metriken genutzt werden.

 Weitere Informationen finden Sie unter [Optimizing library loading for Illumina NGS systems with patterned flow cells \(Optimieren des Ladens von Bibliotheken für NGS-Systeme von Illumina mit strukturierten Fließzellen\)](#).

## Bestimmen der optimalen Ladekonzentration

Zur Ermittlung der optimalen Ladekonzentration muss unbedingt ein breites Spektrum von Konzentrationen getestet werden. Das „nutzbare Ergebnis“ für eine Anwendung lässt sich bestimmen, indem die Performance anhand einer Kombination aus primären Metriken wie „% PF“ und „% belegt“ und sekundären Metriken wie Duplikaten sowie der Insert-Größe und Coverage gemessen wird.

### Schritt 1: Planen des Titrationsversuchs

Zur Übertragung von Projekten vom ursprünglichen MiSeq System auf die MiSeq i100 Series sollte der Äquivalenzpunkt von Titrationen bei dem ca. 10,4-Fachen der Ladekonzentration des MiSeq Reagent Kit v2 und dem ca. 6,5-Fachen der Ladekonzentration des MiSeq Reagent Kit v3 liegen. Die empfohlenen Äquivalenzpunktkonzentrationen hängen vom jeweils mit der MiSeq i100 Series verwendeten Bibliotheksvorbereitungskits ab ([Tabelle 1](#)). Für alle anderen Fälle wird eine Äquivalenzpunktkonzentration von 100 pM empfohlen.

In diesem Beispiel wurde ein Bibliothekspool aus Bakteriengenomproben von *Bacillus pacificus*, *Cereibacter sphaeroides* und *Escherichia coli* mit Illumina DNA Prep vorbereitet und bei Ladekonzentrationen von 40, 80 und 120 pM getestet.

### Schritt 2: Beurteilen der Nanowell-Belegung und der Cluster nach Filterung

Erstellen Sie ein Vergleichsdiagramm mit den Metriken „% PF“ und „% belegt“ aus dem Sequenzierungslauf für jede Ladekonzentration, um zu bestimmen, bei welchen Konzentrationen die Ladung zu niedrig, zu hoch oder ausgeglichen ist. In diesem Beispiel ergibt sich für alle drei getesteten Konzentrationen (40 pM, 80 pM, 120 pM) eine optimale Ladeform (Punktwolke mit Anstieg) im Vergleichsdiagramm für „% PF“ und „% belegt“. Dies zeigt, dass sich mit der MiSeq i100 Series robuste Ergebnisse innerhalb eines breiten Spektrums von Bibliotheksladekonzentrationen erzielen lassen ([Abbildung 1](#)).

### Schritt 3: Beurteilen der Duplikate

Der Zielkonzentrationsbereich lässt sich durch die Bestimmung des prozentualen Anteils der Duplikate analysieren. Der Menge der Duplikate neigt dazu, sich mit zunehmender Ladekonzentration zu verringern. In diesem Beispiel lag der Duplikatanteil bei allen drei getesteten Konzentrationen unter 15 %. Bei 80 pM und 120 pM war die Menge am geringsten ([Abbildung 2](#)).

### Schritt 4: Analysieren der Insert-Größe

Überprüfen Sie die Insert-Größe. Der optimale Bereich für Ihre Bibliothek und Anwendung kann je nach Anforderungen Ihres Workflows variieren. In diesem Beispiel variiert die Insert-Größe für alle drei Bakterienstämme über das getestete Konzentrationspektrum, wobei sich der größte Unterschied zwischen 40 pM und 80 pM zeigte ([Abbildung 2](#)).

Tabelle 1: Empfohlene Äquivalenzpunkt-konzentrationen für das Titrationsdesign mit der MiSeq i100 Series

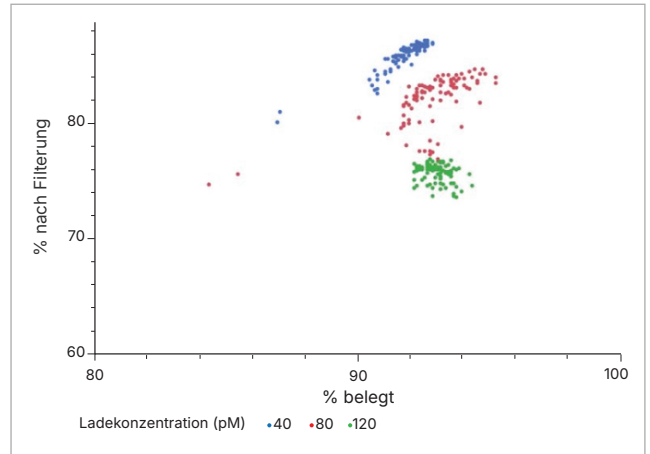
| Bibliotheksvorbereitungskit                      | Äquivalenzpunkt-konzentration |
|--|-------------------------------|
| Illumina DNA Prep                                | 80 pM                         |
| Illumina DNA Prep with Enrichment                | 60 pM                         |
| Illumina RNA Prep with Enrichment                | 80 pM                         |
| Illumina DNA PCR-Free                            | 120 pM                        |
| TruSeq DNA PCR-Free                              | 120 pM                        |
| TruSeq DNA Nano                                  | 120 pM                        |
| Illumina Viral Surveillance Panel v2             | 80 pM                         |
| Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B   | 80 pM                         |
| Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel     | 80 pM                         |
| Urinary Pathogen ID/AMR Panel                    | 80 pM                         |
| TruSight RNA Pan Cancer                          | 80 pM                         |
| 16S rRNA Amplicon                                | 80 pM                         |
| Pillar oncoReveal Myeloid Panel                  | 80 pM                         |
| Pillar oncoReveal Essential MPN Panel            | 80 pM                         |
| Pillar oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel | 80 pM                         |
| Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA 2 plus CNV Panel  | 80 pM                         |
| PhiX Control v3                                  | 120 pM                        |
| PhiX Indexed Control (1000 cycles)               | 120 pM                        |

a. Bibliotheken aus doppelsträngiger DNA wurden mit dem fluorometrischen Qubit dsDNA Quantitation High Sensitivity Assay (Thermo Fisher, Katalog-Nr. Q32851) und dem Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Katalog-Nr. 5067-4626) zur Bestimmung der durchschnittlichen Fragmentgröße quantifiziert. Bibliotheken aus einzelsträngiger DNA wurden mit dem Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher, Katalog-Nr. Q10212) quantifiziert.

b. 16S rRNA Amplicon-Bibliotheken, vorbereitet mit dem im Dokument „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ (Artikel-Nr. 15044223 Rev.B) beschriebenen Workflow.

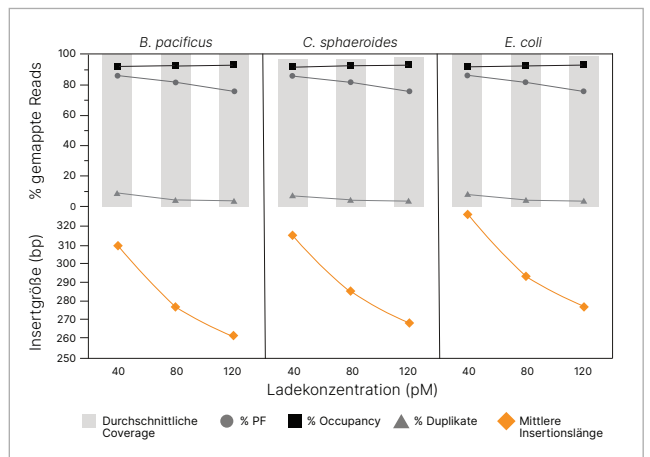
**Schritt 5: Überprüfen anderer anwendungs-spezifischer Metriken (Coverage, Mapping usw.)**

Überprüfen Sie zur Optimierung der Performance für die jeweilige Anwendung zusätzliche Sekundär-analysemetriken. In diesem Beispiel zeigt die Metrik „% gemappt“ robuste Ergebnisse für alle drei getesteten Ladekonzentrationen (Abbildung 2). Sekundäre Metriken wurden mit der DRAGEN™ Small Whole Genome Sequencing App generiert, die sowohl geräteintern als auch als Cloud-Lösung verfügbar ist.



**Abbildung 1: Optimale Nanowell-Belegung über ein breites Spektrum von Bibliotheksladekonzentrationen**

Die Sequenzierung von mit 40 pM, 80 pM und 120 pM geladenen Bibliotheken ergab eine optimale Beladungsform, woraus hervorgeht, dass die MiSeq i100 Series über ein breites Spektrum an Ladekonzentrationen robuste Ergebnisse erzielt.



**Abbildung 2: Optimierung der Sequenzierungs-performance auf der MiSeq i100 Series**

Beispiel für einen Titrationsversuch zur Untersuchung von Duplikaten, durchschnittlicher Coverage und Insert-Größe.

## Bibliotheksqualität

Kurze Inserts und während der Bibliotheksvorbereitung eingebrachte Verunreinigungen wie Adapterdimere, Primerdimere und unvollständige Bibliotheksstrukturen können das Clustering auf der MiSeq i100 Series beeinträchtigen. Kurze Inserts sind bei der Clusterbildung effizienter als längere Inserts. Sind die Sequenzierungs-Reads länger als die Bibliotheks-Inserts wird die Sequenzierung über das Insert in die Adaptersequenz und möglicherweise in die Fließzelle fortgesetzt. Wird die Sequenzierung in die Fließzelle fortgesetzt, überschreitet der Read die Vorlage für die Aufnahme von Basen. Der damit verbundene Abfall der Intensität kann bei der MiSeq i100 Series einen oder beide der folgenden Effekte zur Folge haben: starker Rückgang der Q30-Scores; Anstieg der G-Base-Calls (ähnlich wie bei anderen 2-Kanal-Geräten von Illumina wie dem NextSeq™ 1000 System und dem NextSeq 2000 System, dem NovaSeq™ 6000 System sowie der NovaSeq X Series).



Weitere Informationen finden Sie unter [How short inserts affect sequencing performance \(Wie kurze Inserts die Sequenzierungsperformance beeinflussen\)](#).

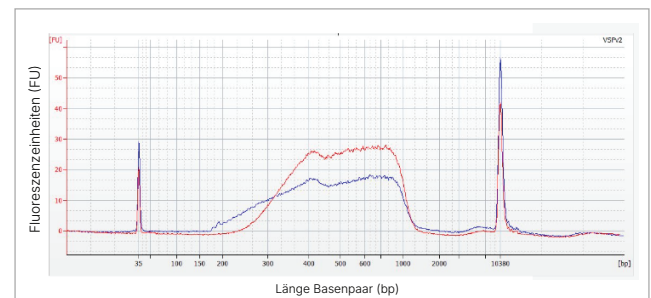
Diese kurzen Inserts und Verunreinigungen müssen während der Reinigung oder Größenauswahl unbedingt entfernt werden. Für eine optimale Performance auf der MiSeq i100 Series mit einer Read-Länge von  $2 \times 500$  bp sollte die mittlere Insert-Größe zwischen 600 und 1.200 bp liegen. Der Anteil der Inserts mit einer Länge von unter 500 bp sollte weniger als 1 % der Gesamtmasse der Bibliothek ausmachen. Kurze Inserts und Verunreinigungen lassen sich ggf. wirksamer entfernen, indem dem Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung ein optionaler Bead-Reinigungsschritt hinzugefügt wird. Nach Abschluss der Bibliotheksvorbereitung und vor der Sequenzierung sollten Anwender die Qualität und Reinheit sämtlicher Bibliotheken überprüfen. Überprüfen Sie die Bibliotheksintegrität, die durchschnittliche Insert-Größe und mögliche Verunreinigungen mit einem Agilent Bioanalyzer, einem Fragment Analyzer-System oder einer TapeStation.

Im Folgenden finden Sie zwei Beispiele für zusätzliche Bead-Reinigungsverfahren zur Verbesserung der Sequenzierungsperformance auf der MiSeq i100 Series. Im ersten Beispiel wurden die kurzen Inserts selektiv aus angereicherten Bibliotheken mit breiter Insert-Größenverteilung entfernt, was einen G-Overcall verhindert und die Sequenzierungsperformance erhöht. Im zweiten Beispiel verbessert die Entfernung von Adapterdimerverunreinigungen aus einer Ampliconbibliothek mit langen Inserts die Laufperformance sowie die Qualitäts-Scores bei der Sequenzierung mit  $2 \times 500$  bp.

## Entfernen kurzer Inserts erhöht die Sequenzierungsperformance

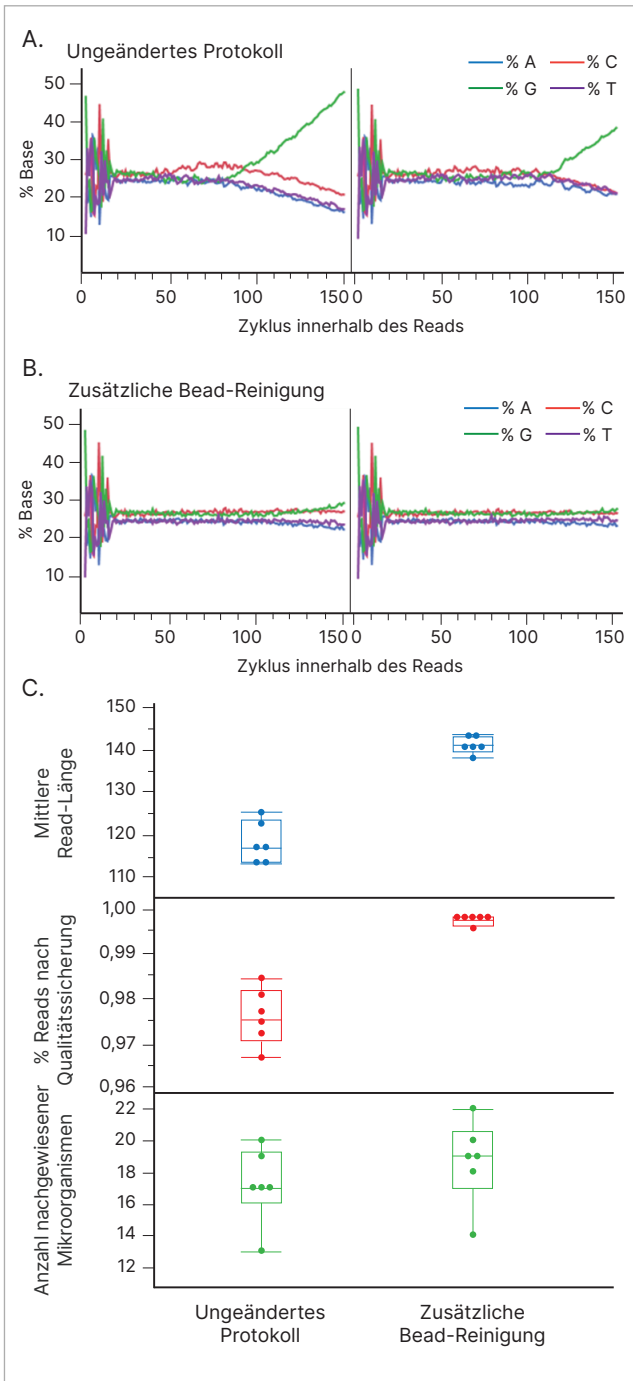
In diesem Beispiel wurden mit dem Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit aus Abwasserproben vorbereitete Bibliotheken mit einem zusätzlichen Bead-Reinigungsdurchgang behandelt (Bead-Proben-Verhältnis von 0,8-fach). Durch den zusätzlichen Bead-Reinigungsdurchgang wurden die meisten Fragmente  $< 250$  bp (entspricht Bibliotheks-Inserts  $< 100$  bp ohne Adapter) wirksam entfernt, wobei sich das Bibliotheksergebnis um insgesamt ca. 35 % verringerte (**Abbildung 3**).

Viral Surveillance Panel v2-Bibliotheken mit und ohne zusätzliche Bead-Reinigung wurden auf der MiSeq i100 Series mit einer Read-Länge von  $2 \times 150$  bp sequenziert und mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App analysiert. Bei der Sequenzierung von Bibliotheken, die mit dem zusätzlichen Bead-Reinigungsdurchgang vorbereitet wurden, zeigten sich im Vergleich zum unveränderten Protokoll eine Verringerung des G-Overcalls und verbesserte sekundäre Metriken, einschließlich mittlerer Read-Länge und Anteil von Reads nach Qualitätssicherung, sowie ein verstärkter Nachweis von Mikroorganismen (**Abbildung 4**).



**Abbildung 3: Höhere Insert-Größe durch zusätzliche Bead-Reinigungen**

Durch zusätzliche Bead-Reinigungsdurchgänge (rote Linie) ließen sich die meisten Fragmente mit weniger als 250 bp im Vergleich zum unveränderten Protokoll (blaue Linie) wirksam entfernen.

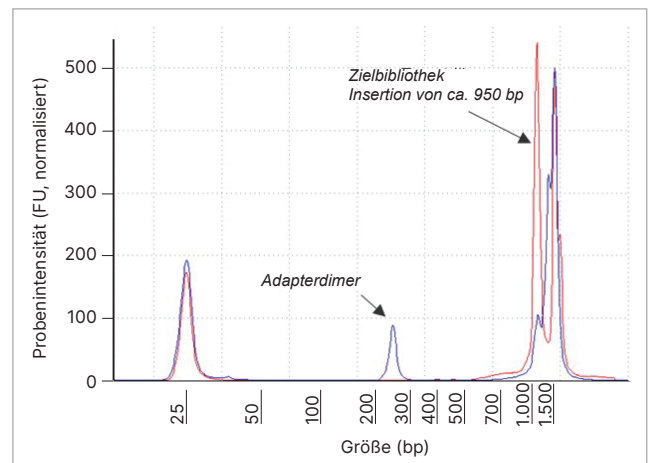


**Abbildung 4: Bessere Performance durch höhere Insert-Größen**

Bei der Sequenzierung von Bibliotheken, die nach einem (A) unveränderten und (B) modifizierten Protokoll (mit höherer Insert-Größe) auf der MiSeq i100 Series generiert wurden, reduzierte sich der G-Overcall. (C) Die Analyse mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App ergab eine höhere Performance, einschließlich einer größeren mittleren Read-Länge (für Reads mit 2 × 300 und 2 × 500 bp), eines höheren prozentualen Anteils an Reads nach Qualitätssicherung und eines verbesserten Nachweises von Mikroorganismen.

### Entfernen von Adapterdimer- verunreinigungen optimiert die Sequenzierungsperformance

In diesem Beispiel wurden anwendungsspezifische Amplikonbibliotheken mit einer Ziel-Insert-Länge von 950 bp mit zusätzlichen drei aufeinanderfolgenden Bead-Reinigungsdurchgängen behandelt (Bead-Proben-Verhältnis von 0,6-fach). Die Bibliotheksqualitätssicherung auf der TapeStation zeigt, dass durch die zusätzlichen Bead-Reinigungsdurchgänge die meisten Adapterdimer-  
verunreinigungen mit einer Fragmentlänge von ca. 250 bp selektiv entfernt wurden, während die Zielbibliothek beibehalten wurde (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Entfernung von Adapterdimeren durch zusätzliche Bead-Reinigungen**

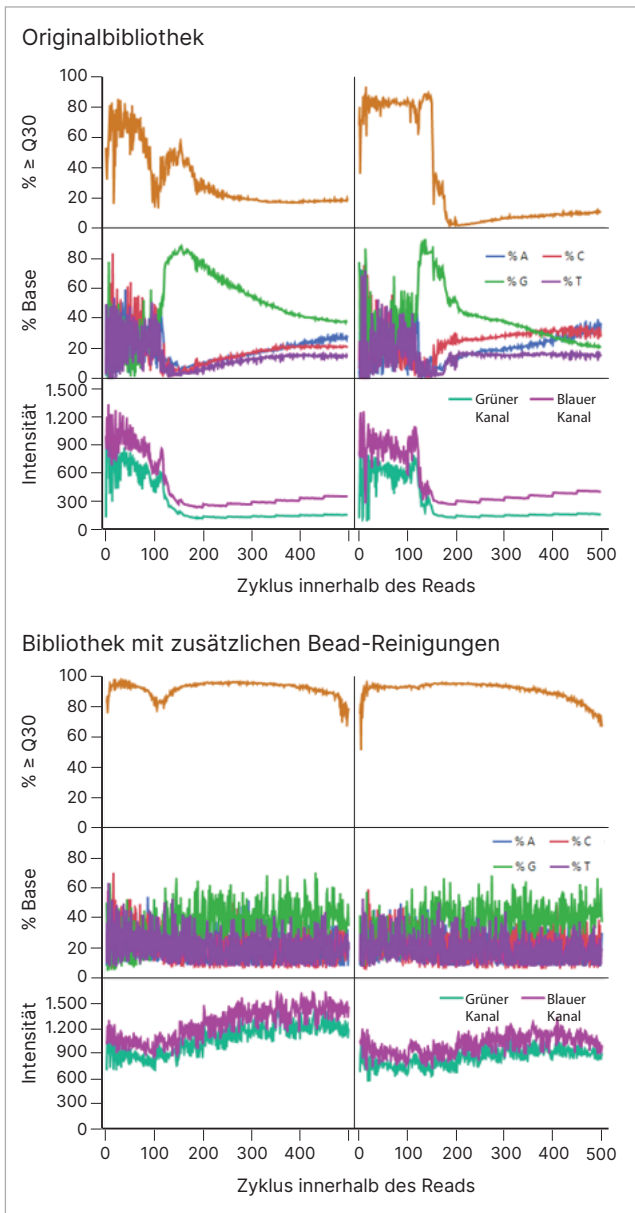
Durch zusätzliche Bead-Reinigungsdurchgänge bei anwendungsspezifischen Amplikonbibliotheken (rote Linie) ließen sich Adapterdimerverunreinigungen im Vergleich zum unveränderten Protokoll (blaue Linie) wirksam entfernen.

Die anwendungsspezifischen Amplikonbibliotheken mit und ohne zusätzliche Bead-Reinigung wurden auf der MiSeq i100 Series mit einer Read-Länge von 2 × 500 bp sequenziert. Beim Sequenzierungslauf mit den ursprünglichen Bibliotheken zeigen sich ab etwa Zyklus 100 Performanceprobleme, die auf das Vorhandensein der Adapterdimere zurückzuführen sind. Die Probleme sind gekennzeichnet durch starke Abnahmen der Signalintensität, sinkende Q30-Scores und eine Zunahme des G-Base-Callings. Die Sequenzierung der Bibliotheken mit zusätzlichen Bead-Reinigungen zeigt eine erhöhte Performance (Abbildung 6).

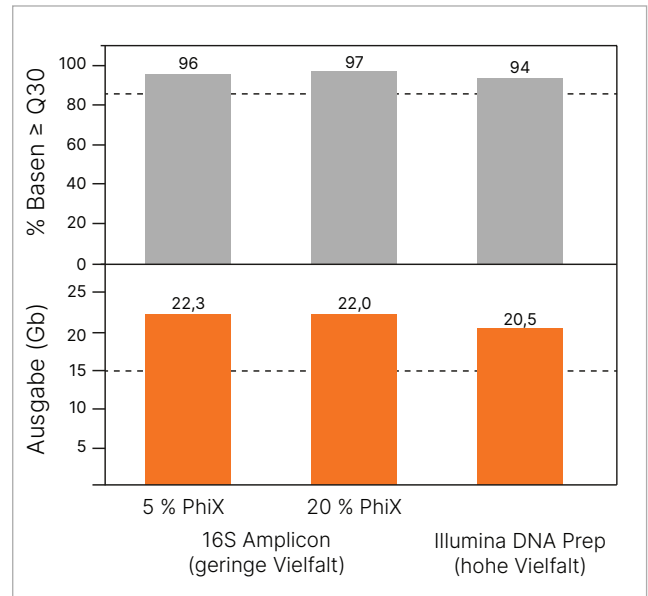
## Nukleotiddiversität

Die Nukleotiddiversität gibt den relativen Anteil der einzelnen Basen (A, C, G oder T) für jeden Laufzyklus an. Die Nukleotidbilanz ist wichtig für die Farbmatrixkorrektur und Intensitätsnormalisierung durch das Sequenziersystem. Die adaptive Real-Time Analysis-Software auf der MiSeq i100 Series wurde speziell für genaues Base-Calling bei Bibliotheken mit geringer Diversität entwickelt. Optimale Performance bei der Sequenzierung von Bibliotheken mit geringer Diversität lässt sich mit einem minimalen PhiX-Spike-in ( $\geq 5\%$ ) erreichen, das die Anzahl hochwertiger Reads maximiert.

In diesem Beispiel zeigen 16S Amplicon-Bibliotheken mit geringer Diversität und einem PhiX-Spike-in von 5 % und 20 % bei der Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series eine robuste Performance, die mit der bei Illumina DNA Prep-Humanbibliotheken mit hoher Diversität erzielten Performance vergleichbar ist (Abbildung 7).



**Abbildung 6: Durch Adapterdimerreduktion verbesserte Sequenzierungsperformance**  
Bei der Sequenzierung anwendungsspezifischer Ampliconbibliotheken nach zusätzlichen Bead-Reinigungen zur Reduzierung von Adapterdimeren mit  $2 \times 500$  bp auf der MiSeq i100 Series zeigten sich deutliche Performancesteigerungen mit höheren Qualitätsscores und einer Verringerung des G-Overcalls.



**Abbildung 7: Eignung für Bibliotheken mit geringer Diversität**

Die geräteinterne Software der MiSeq i100 Series optimiert die Sequenzierungsperformance bei Bibliotheken mit geringer Diversität, was sich am prozentualen Anteil der Basen  $\geq$  Q30 und der Gb-Ausgabe erkennen lässt. Alle Läufe wurden mit einer Read-Länge von  $2 \times 301$  bp mit dem MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles) sequenziert, wobei gestrichelte Linien die Performance-spezifikationen darstellen.

## Zusammenfassung

Bahnbrechende Fortschritte bei der Sequenzierungschemie und der integrierten Datenanalyse der MiSeq i100 Series sorgen für mehr Anwenderfreundlichkeit, hohe Datengenauigkeit und herausragende Geschwindigkeit. Durch Befolgung der im vorliegenden technischen Hinweis erläuterten Best Practices zur Beurteilung der Bibliotheksqualität, zur Optimierung der Ladekonzentration und zum Poolen von Bibliotheken lässt sich die Performance der MiSeq i100 Series maximieren.

### Weitere Informationen

[MiSeq i100 Sequencing System und MiSeq i100 Plus Sequencing System](#)



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

© 2025 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GI-03322 DEU v2.0