

Bibliotheksqualitätssicherung mit der MiSeq™ i100 Series

Bewertung der Bibliotheksqualität und
Optimierung des Bibliothekspoolings vor der
Sequenzierung auf Hochdurchsatzsystemen



Optimierung der Bibliotheks-
qualitätssicherung mit
Ergebnissen am selben Tag
dank schneller, flexibler
Sequenzierung



Vereinfachung des
Rebalancings von
Bibliotheken anhand
automatisierter
Berechnungen im Gerät



Steigerung des Vertrauens
in Ergebnisse von
Hochdurchsatzsystemen
dank hoher Korrelation
der Indexrepräsentation

Einleitung

Zur Maximierung der Effizienz bei der Hochdurchsatzsequenzierung ist es wichtig, die Qualität der Ausgangsbibliothek zu bestimmen. Mangelnde Bibliotheksqualität kann die Ergebnisse großer Sequenzierungsprojekte beeinträchtigen sowie die kostspielige und zeitaufwendige Wiederholung von Versuchen erforderlich machen. Herkömmliche Verfahren zur Qualitätssicherung (QC, Quality Control) bei Bibliotheken wie die Bibliotheksquantifizierung/-qualifizierung durch Fluorometrie oder qPCR sind keine funktionalen Assays und bewerten nicht, ob die Bibliothek von Interesse mit den richtigen Indizes vorbereitet wurde. Mit der MiSeq i100 Series lässt sich ein schneller und funktionaler Assay zur Bibliotheksqualität durchführen, bevor die Entscheidung über einen umfassenden Lauf auf dem NovaSeq™ 6000 System oder der NovaSeq X Series erfolgt. So lassen sich Zeit und Geld sparen sowie bessere Ergebnisse erzielen.

Mit einem einfachen, optimierten Workflow generiert die MiSeq i100 Series in kurzer Zeit ausführliche Qualitätsmetriken. Anhand dieser Metriken lassen sich aufgrund fehlgeschlagener Bibliotheksvorbereitung oder Indexfehlzuweisung während der Laufplanung ungeeignete Proben erkennen und automatisierte Berechnungen für das Pool-Rebalancing durchführen, was probenübergreifend eine ausgewogene Indexrepräsentation gewährleistet.

Im vorliegenden Anwendungshinweis wird ein schneller, unkomplizierter und kostengünstiger Workflow für die Bibliotheks-QC auf der MiSeq i100 Series vorgestellt, der vor der Sequenzierung auf der NovaSeq X Series oder dem NovaSeq 6000 System eine herausragende Bibliotheksrepräsentation liefert ([Abbildung 1](#)).

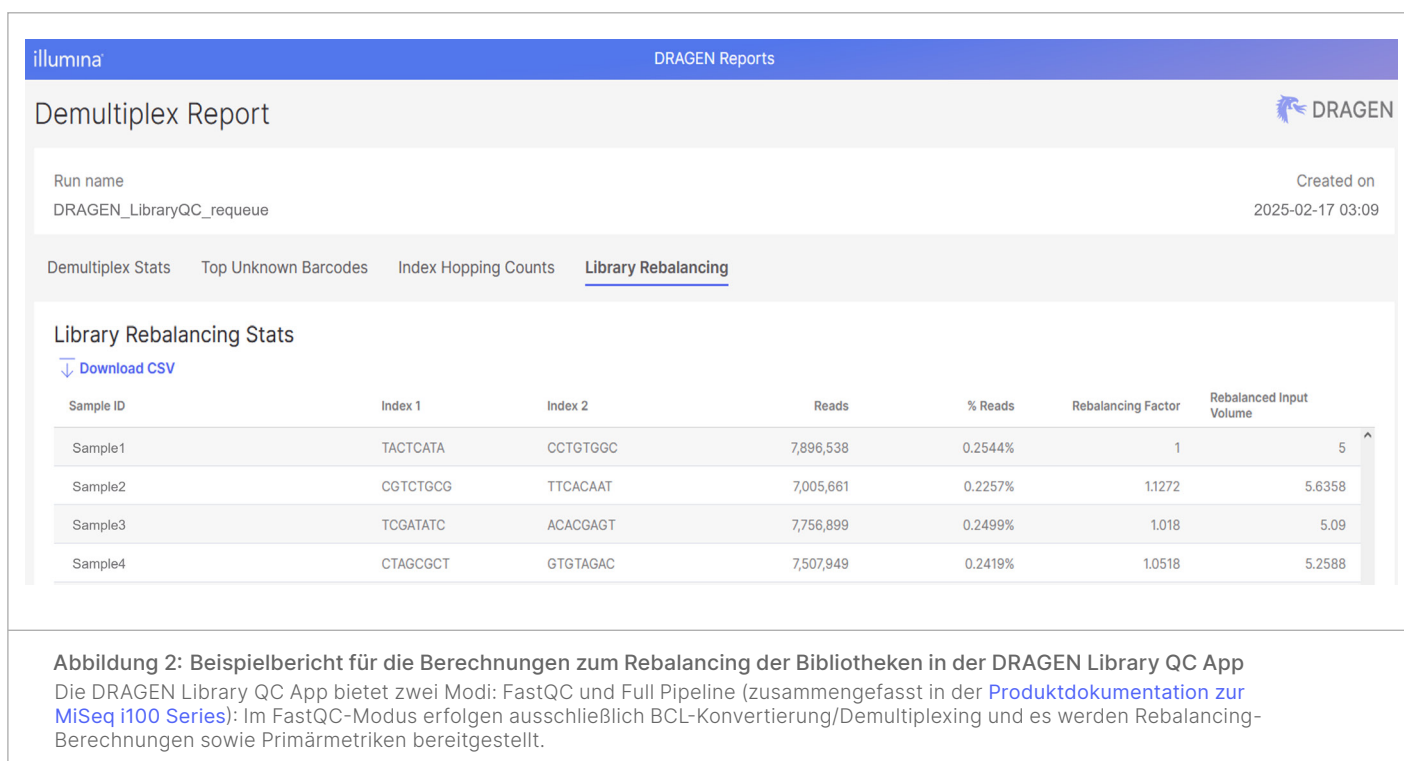
Rebalancing von Bibliotheken mit der MiSeq i100 Series

MiSeq i100 Series kann zur Bibliotheks-QC eingesetzt werden. Dadurch lassen sich ungeeignete Bibliotheken ermitteln und ein Rebalancing der Bibliotheken zur Vereinheitlichung der Indexrepräsentation in einem Pool durchführen. Auf der MiSeq i100 Series ist die DRAGEN Library QC App v1.0.13 installiert, eine geräteinterne Software, die automatisch das Demultiplexing von Sequenzierungs-Reads sowie Berechnungen durchführt und einen Bericht zur Konfiguration des Rebalancings der Bibliotheken vor der Sequenzierung auf einem Hochdurchsatz-Sequenziersystem bereitstellt ([Abbildung 2](#)). Die MiSeq i100 Series vereint die automatisierte Rebalancing-Berechnung mit Index-First-Sequenzierung und liefert in nur ca. 3,2 Stunden demultiplexierte Bibliotheksdaten.



Abbildung 1: Bibliotheksqualitätssicherungsworkflow

Mit den automatisierten Rebalancing-Berechnungen der DRAGEN Library QC App im Gerät oder in der Cloud nach Abschluss der Sequenzierung bietet die MiSeq i100 Series einen einfachen Workflow, der in nur ca. 3,2 Stunden demultiplexierte Bibliotheksdaten für die Bibliotheksqualitätssicherung und das Rebalancing liefert.



Methoden

Bibliotheksvorbereitung

Die Bibliotheken wurden auf dem Biomek NGenius Next Generation Library Prep System (Beckman Coulter, Katalog-Nr. C62703) mit einer Zugabe von 300 ng genomischer DNA (gDNA) NA12878 (Coriell Institute for Medical Research, Katalog-Nr. NA12878) mit Illumina DNA PCR-Free Prep (Illumina, Katalog-Nr. 20041795) unter Verwendung von Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (Illumina, Katalog-Nr. 20091654) und Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (Illumina, Katalog-Nr. 20091656) vorbereitet. Die Bibliotheken wurden zudem manuell mit TruSeq™ DNA Nano (Illumina, Katalog-Nr. 20015965) unter Verwendung von IDT für Illumina DNA UD Indexes v2 (96 indexes, 96 samples) (Illumina, Katalog-Nr. 20040870) vorbereitet.

Sequenzierung und Rebalancing

Die vorbereiteten Bibliotheken wurden in gleichen Volumina gepoolt und auf dem MiSeq i100 Plus System mit dem MiSeq i100 Series 5M Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20126566) unter Verwendung der Laufkonfiguration mit 2 × 151 bp bei 24-Plex sequenziert ([Tabelle 1](#)). Zum Vergleich wurden die gleichen Bibliotheken auf dem iSeq™ 100 System mit dem iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle) Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20031371) sequenziert.

Die Sequenzierungsdaten wurden im MiSeq i100 Plus System mit der DRAGEN™ Library QC App v1.0.13 analysiert, die automatisch Berechnungen für das Rebalancing der Bibliotheken durchführt. Im Anschluss an das Rebalancing der Bibliothekspools wurden diese auf dem NovaSeq X Plus System und dem NovaSeq 6000 System mithilfe der Laufkonfiguration mit 2 × 151 bp zur Bestimmung des Index-CV sequenziert.

Ergebnisse

Rebalancing der Bibliotheken verbessert den Index-CV

Mit Illumina DNA PCR-Free Prep und TruSeq DNA Nano vorbereitete Bibliotheken wurden auf der MiSeq i100 Series sequenziert. Die Faktoren für das Rebalancing der Bibliotheken wurden mit der geräteinternen DRAGEN Library QC App v1.0.13 ermittelt. Die Bibliotheken wurden mit und ohne Rebalancing auf dem NovaSeq X Plus System und dem NovaSeq 6000 System sequenziert. Die Ergebnisse zeigen nach dem Rebalancing für alle drei Bibliothekspools sowohl beim NovaSeq X Plus System ([Abbildung 3A](#)) als auch beim NovaSeq 6000 System ([Abbildung 3B](#)) eine Verbesserung des Index-CV.

Tabelle 1: Bibliotheksqualitätssicherung auf der MiSeq i100 Series

Parameter	Illumina DNA PCR-Free Prep	Illumina DNA PCR-Free Prep	TruSeq DNA Nano
Automatisierung	Beckman Coulter Biomek NGenius	Beckman Coulter Biomek NGenius	Manuell
Genomische DNA	Coriell Human NA12878	Coriell Human NA12878	Coriell Human NA12878
DNA-Zugabe	300 ng	300 ng	100 ng
Adapter	Illumina Set A UDI 1–24	Illumina Set B UDI 97–120	IDT for Illumina TruSeq UDI 1–24
Ladekonzentration	120 pM	120 pM	120 pM
% Occupancy	91,59 %	89,27 %	91,43 %
% nach Filterung	80,42 %	77,20 %	85,02 %

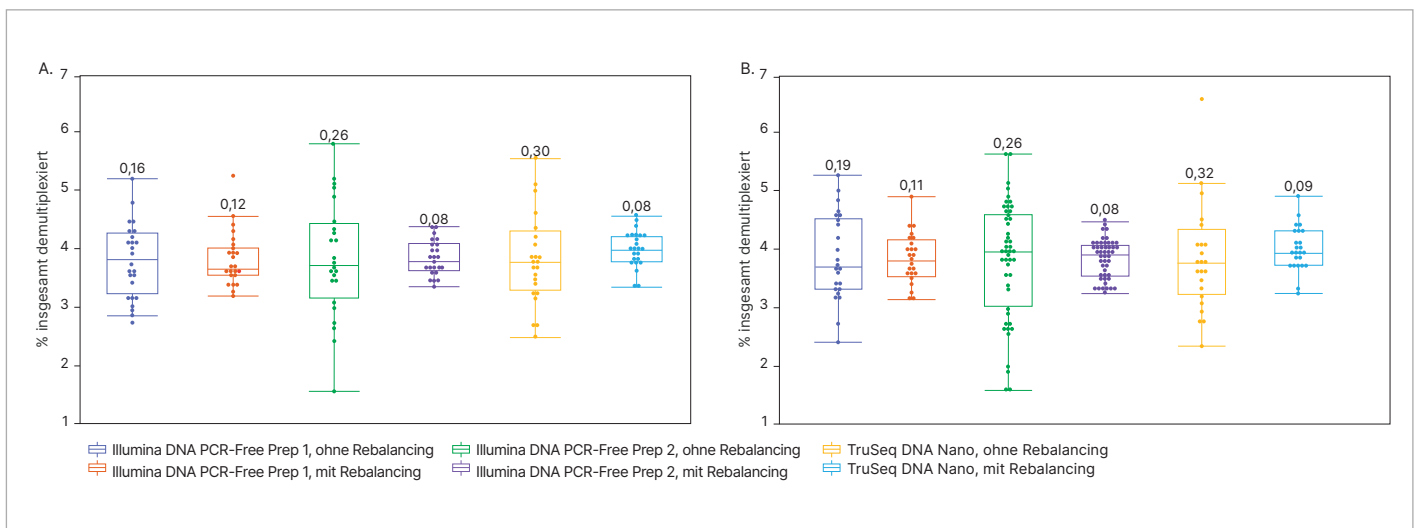


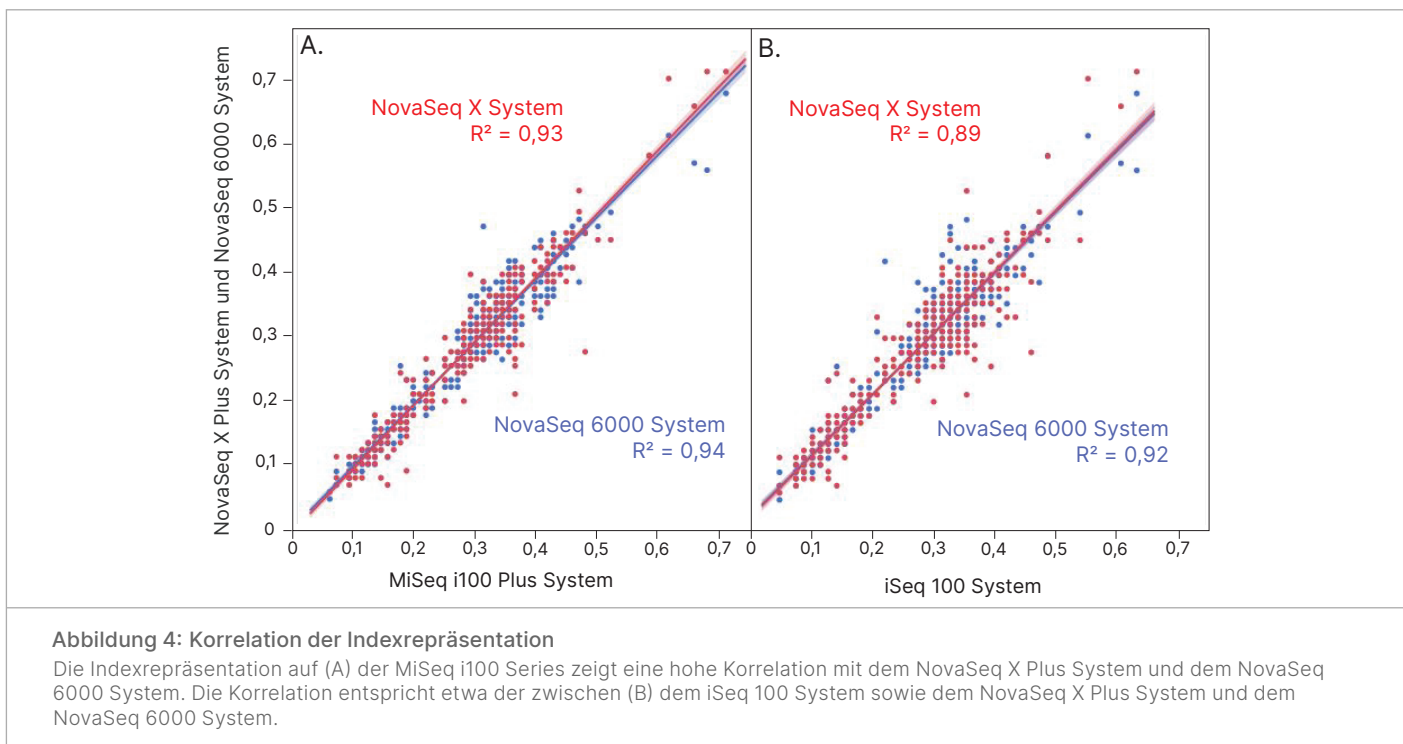
Abbildung 3: Rebalancing von Bibliotheken mit dem MiSeq i100 Plus System

Drei 24-Plex-Humanbibliothekspools (Illumina DNA PCR-Free Prep 1, Illumina DNA PCR-Free Prep 2 und TruSeq DNA Nano) wurden auf dem MiSeq i100 Plus System sequenziert. Die Faktoren für das Rebalancing der Bibliotheken wurden mit der geräteinternen DRAGEN Library QC App v1.0.13 ermittelt. Die Bibliotheken wurden anschließend mit und ohne Rebalancing auf dem NovaSeq X Plus System und dem NovaSeq 6000 System sequenziert. Nach dem Rebalancing zeigt sich für alle drei Bibliothekspools eine Verbesserung des Index-CV (Mittelwert über den einzelnen Box-Plots) sowohl auf dem (A) NovaSeq X Plus System als auch auf dem (B) NovaSeq 6000 System.

Korrelation der Indexrepräsentation zwischen Systemen

Die Baseline-Korrelation der Indexrepräsentation wurde zwischen dem MiSeq i100 Plus System, dem iSeq 100 System, dem NovaSeq X Plus System und dem NovaSeq 6000 System beurteilt. Aus der gDNA Coriell Human NA11992 wurde ein Illumina DNA PCR-Free Prep-Bibliothekspool mit 384-Plex mithilfe des Liquid-Handling-Roboters Hamilton STAR vorbereitet. Die gepoolten Bibliotheken wurden auf dem MiSeq i100 Plus System, dem iSeq 100 System, dem NovaSeq X System und dem NovaSeq 6000 System sequenziert.

Die mit dem MiSeq i100 Plus System generierten demultiplexierten Daten weisen mit $R^2 > 0,9$ eine hohe Korrelation mit den mit dem NovaSeq X Plus System und dem NovaSeq 6000 System generierten demultiplexierten Daten auf ([Abbildung 4A](#)) und entsprechen den mit dem iSeq 100 System generierten demultiplexierten Daten ([Abbildung 4B](#)).



Zusammenfassung

Die MiSeq i100 Series bietet einen schnellen, einfachen und kostengünstigen Workflow für die Bibliotheks-QC, der in nur 3,2 Stunden demultiplexierte Bibliotheksdaten liefert. Die hohe Korrelation der Indexrepräsentation ermöglicht bei einem gegebenen Satz von Indexpaaren die Prognose der Indexrepräsentation auf einem Hochdurchsatz-Sequenziersystem. Diese Funktion für die Bibliotheksqualitätssicherung ermöglicht Anwendern auf der NovaSeq X Series und dem NovaSeq 6000 System die Maximierung der Performance.

Weitere Informationen →

[MiSeq i100 Series](#)

[NovaSeq X Series](#)

[NovaSeq 6000 System](#)

illumina[®]

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.
 M-GL-02871 DEU v2.0