

TruSeq™ ChIP Library Preparation Kit

Bewährte TruSeq-
Datenqualität für ein
umfassendes und genaues
Profiling der Targetprotein-
DNA-Interaktionen

- Umfassendes und genaues Profiling der Targetprotein-DNA-Interaktionen
- Zuverlässige Ergebnisse anhand von nur 5 ng Zugabe-DNA aus zahlreichen Probenquellen
- Verbesserte Skalierbarkeit dank einfachem, optimiertem Workflow
- Geringere Kosten je Probe dank optimierter Verteilung der Sequenzierungsausgabe auf die Proben

illumina®

Einleitung

Die Bestimmung des Beitrags der Protein-DNA-Interaktionen zur Regulation der Genexpression ist eine Voraussetzung für das vollständige Verständnis zahlreicher biologischer Prozesse und Erkrankungen. Diese epigenetischen Erkenntnisse ergänzen die DNA-Sequenzierung, Genotypisierung, Genexpression und andere Arten der Genomanalyse. Bei ChIP-Seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing, Chromatin-Immunpräzipitations-Sequenzierung) werden mit NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) die Verteilung und die Häufigkeit der zu untersuchenden DNA-gebundenen Protein-Targets im gesamten Genom schnell und effizient bestimmt. ChIP-Seq ist mittlerweile eine der am weitesten verbreiteten NGS-Anwendungen und ermöglicht Forschern die zuverlässige Bestimmung von Bindungsstellen in einem breiten Spektrum von Targets im gesamten Genom mit hoher Auflösung.

Vor dem Hintergrund der gestiegenen Ausgabeleistung von NGS-Systemen sind ChIP-Seq-Forscher in verstärktem Maße auf eine Kombination aus hochmultiplexierter Sequenzierung und einfachen, rationalisierten Workflows angewiesen. TruSeq ChIP Library Preparation Kits erfüllen diese Anforderungen und stellen eine einfache, kostengünstige Lösung dar, die Einblicke in die Mechanismen der Genregulation liefert. Bei der Generierung von Bibliotheken aus ChIP-DNA werden indizierte Adapter zugegeben, die abhängig von der gewünschten Coverage eine optimale Verteilung der Sequenzierungsausgabe ermöglichen. Ein optimierter, hoch skalierbarer Workflow für die Bibliotheksvorbereitung und die Master-Mischungs-Reagenzien reduzieren den manuellen Aufwand und liefern ein für die Automatisierung geeignetes Format zur gleichzeitigen Verarbeitung von bis zu 48 Proben. Der Versuchsdurchsatz lässt sich maximieren, indem Proben mit unterschiedlichen Indizes gemischt und aufeinander abgestimmt werden. Dank der geringen erforderlichen Probenzugabe (5 ng) sind zuverlässige Ergebnisse selbst bei begrenzter Verfügbarkeit der Zugabe-DNA möglich und es besteht Flexibilität hinsichtlich der Probenquelle sowie der Targetproteine für die Analyse.

Einfacher, optimierter Workflow

TruSeq ChIP Library Preparation Kits zeichnen sich durch einen im Vergleich zu anderen Methoden deutlich verbesserten Bibliotheksvorbereitungsworkflow aus. Beim TruSeq-Workflow sind weniger Aufreinigungs-, Probenübertragungs-, Pipettier- und Reinigungsschritte erforderlich. Das Design der Universaladapter mit einer Indexsequenz für den ersten Ligationsschritt steigert die Effizienz des Workflows und ermöglicht eine zuverlässigere multiplexierte Sequenzierung (Abbildung 1). Der Workflow beginnt mit der Anreicherung spezifischer vernetzter DNA-Proteinkomplexe unter Verwendung eines Antikörpers gegen ein Protein von Interesse (Abbildung 1A-B). Anschließend werden die an das Targetprotein gebundenen DNA-Abschnitte isoliert und als Zugabe-DNA für die Vorbereitung der TruSeq ChIP-Bibliothek verwendet.

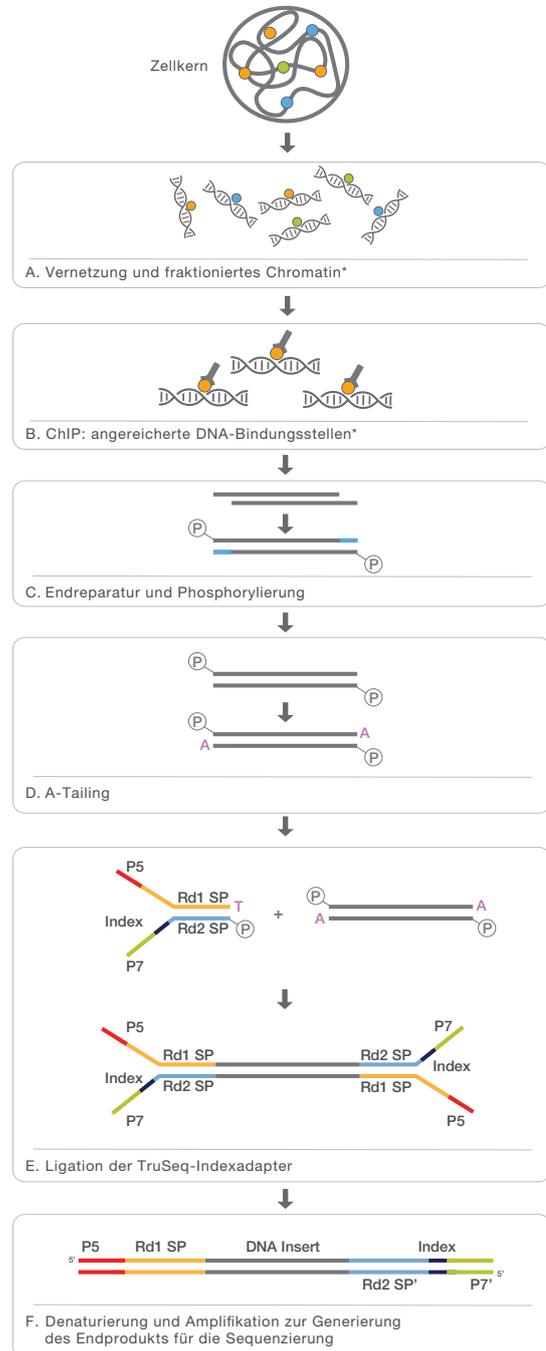


Abbildung 1: TruSeq ChIP-Seq-Workflow: Der einfache, optimierte Workflow (Schritte C-F) reduziert den manuellen Aufwand und beschleunigt die Analyse. TruSeq-Universaladapter erhöhen die Effizienz des Workflows und ermöglichen eine zuverlässige multiplexierte Sequenzierung.

Die Enden der DNA-Fragmente werden repariert und an den stumpfen Enden der einzelnen Stränge wird zur Vorbereitung der Ligation an die Sequenzierungsadapter eine „A“-Base angefügt (Abbildung 1C–D). Jeder TruSeq-Adapter enthält einen T-Basenüberhang an der 3'-Seite als komplementären Überhang für die Ligation des Adapters an die fragmentierte DNA mit A-Schwanz (Abbildung 1E). Das Endprodukt wird erstellt (Abbildung 1F) und im Anschluss an die Größenauswahl werden sämtliche ChIP-DNA-Fragmente gleichzeitig sequenziert.

Die TruSeq ChIP Library Preparation Kits können zur Vorbereitung von Proben für die Single-Read- oder Paired-End-Sequenzierung verwendet werden und sind mit jedem Illumina-Sequenziersystem kompatibel. Damit ermöglichen Sie maximale Flexibilität.

TruSeq-Datenqualität

Die bewährte hochwertigen TruSeq-Daten liefern ein umfassendes und genaues Profil der Targetprotein-DNA-Interaktionen und ermöglichen optimale Werte beim Prozentsatz an Reads nach Filterung, bei alignierbaren Reads in Prozent und bei der Einheitlichkeit der Coverage sowie eine hohe Sensitivität zur Erkennung von Hits mit geringer Häufigkeit.

Zuverlässige Multiplexing-Leistung

TruSeq ChIP Library Preparation Kits bieten bis zu 24 Gesamtindizes. Dies erhöht Durchsatz und Konsistenz ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse. Die TruSeq-Universaladapter ligieren während der Bibliotheksgenerierung an Probenfragmente, sodass die Proben gepoolt und während der nachgeschalteten Analyse individuell identifiziert werden können. Diese Indexierungsfunktion erhöht die Effizienz des Workflows und ermöglicht eine zuverlässige multiplexierte Sequenzierung. Die Indexierung sorgt für mehr Flexibilität beim Studiendesign und ermöglicht Forschern, jeden Lauf so optimal wie möglich zu nutzen, indem sich die Read-Ausgabe anhand der optimalen Anforderungen an die Lesetiefe pro Probe effizient verteilt.

Flexible Targetauswahl

TruSeq ChIP Library Preparation Kits ermöglichen die Generierung von Bibliotheken mit nur 5 ng Zugabe-DNA und bilden damit eine hochwertige, kosteneffiziente Hochdurchsatzlösung für eine breite Palette von ChIP-Studiendesigns. ChIP-Seq ist eine vielseitige Anwendung, die bereits für eine Vielzahl von Proteintargets erfolgreich eingesetzt wurde, darunter Transkriptionsfaktoren und Histone, die Grundbestandteile des Chromatins. ChIP-Studien zur Untersuchung von Transkriptionsfaktoren können dazu dienen,

die spezifischen Modulatoren und Signaltransduktionswege zu bestimmen, die in Zusammenhang mit Erkrankungen, Entwicklungsstadien oder anderen Zuständen stehen, während Histone-„Markierungen“ ein besseres Verständnis für den Einfluss von Chromatinmodifikationen und lokalen strukturellen Veränderungen auf die Aktivität der lokalen Genexpression ermöglichen.^{1–8}

Bestimmung von Peaks im gesamten Genom

Zur Demonstration der Leistung des TruSeq ChIP Library Preparation Kit wurde eine Bibliothek für den Transkriptionsfaktor MafK aus 5 ng Zugabe-DNA generiert (Abbildung 2), die aus einer an HELA-Zellen durchgeführten ChIP gewonnen wurde.

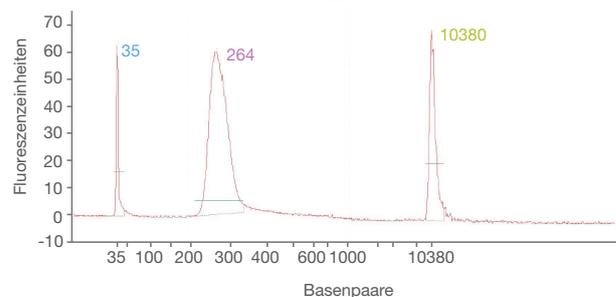


Abbildung 2: Bioanalyzer-Spur der MafK-Bibliothek: Bioanalyzer-Spurdaten für eine Bibliothek, die für das Transkriptionsfaktortarget MafK mit dem TruSeq ChIP Library Preparation Kit mit 5 ng Zugabe-DNA generiert wurde. Der mittlere Peak weist auf ein zuverlässiges Ergebnis innerhalb des gewünschten Insert-Größenbereichs hin.

Die Sequenzierungsdaten wurden in einem Einzellauf auf einem MiSeq™ System generiert. Die qualitätsgefilterten BAM-Ausgabedateien wurden anschließend mit der Peakfinder-Software MACS ausgewertet und die ermittelten Peaks wurden anschließend mit der Motivfinder-Software MEME auf Anreicherung überprüft. Die Ergebnisse zeigen eine sensitive und zuverlässige Erkennung von DNA-Protein-Interaktionen, wobei ein repräsentativer, ermittelter Peak einer MafK-Bindungsstelle entspricht, die in der ENCODE-Projektdateiabank aufgeführt wird (Abbildung 3).

Die Anreicherung für das bekannte MafK-Bindungsmotiv wurde wie erwartet erkannt (Tabelle 1). Dies erfolgte wiederum in Übereinstimmung mit Daten, die mit MafK-Peakdaten generiert wurden, die in der ENCODE-Datenbank enthalten sind.⁹ Die Fähigkeit, Peaks im gesamten Genom mit geringen Zugabemengen zuverlässig zu erkennen, ist entscheidend für die Durchführung von ChIP-Studien. TruSeq ChIP Library Preparation Kits bieten die Flexibilität zur Untersuchung beliebiger Proteintargets und stellen eine optimierte, kostengünstige Lösung für Studien dar, die ein breites Spektrum an Reads pro Probe erfordern, einschließlich Transkriptionsfaktoren (Abbildung 3) und Histonmarkierungen wie H3K4Me3 (Abbildung 4).

Tabelle 1: Motivsuche-Peak-Analyse mit TruSeq ChIP

Name	% Top-Peaks mit MafK-Motiv
TruSeq ChIP	95 %
ENCODE HELA	92 %
ENCODE HES	86 %

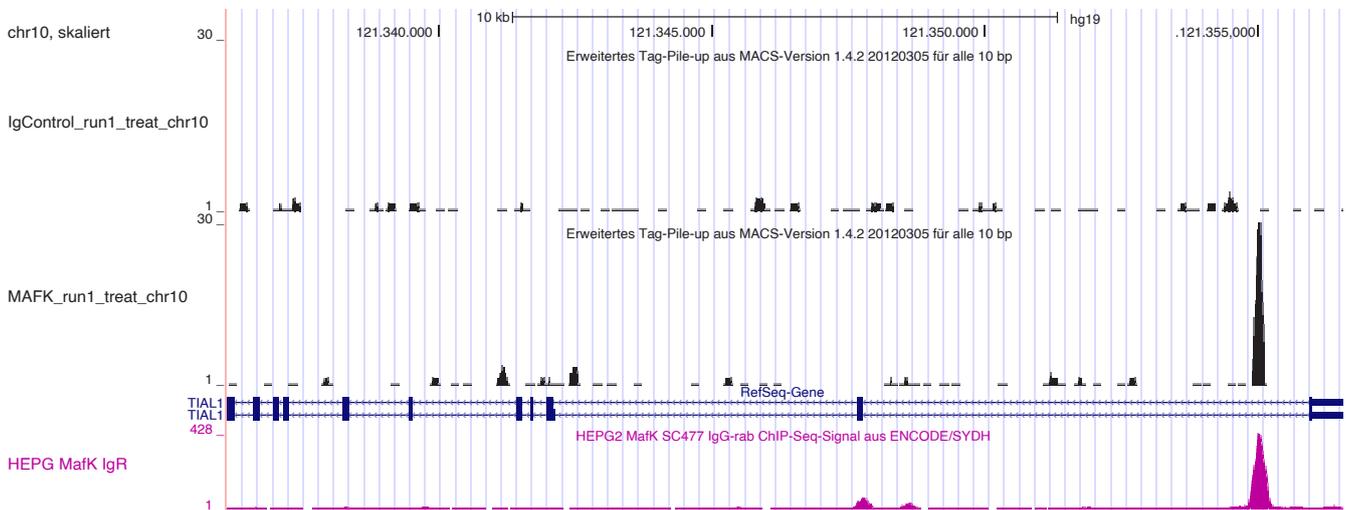


Abbildung 3: Ausgabe des Peak-Findings für MafK: TruSeq ChIP Library Preparation Kits ermöglicht die Generierung von Bibliotheken für ein breites Spektrum an Studiendesigns. Oben sehen Sie Peak-Daten für eine negative Ig-Kontrollprobe, das Transkriptionsfaktor-Target MafK und einen Referenzpeak für MafK aus der ENCODE-Datenbank.

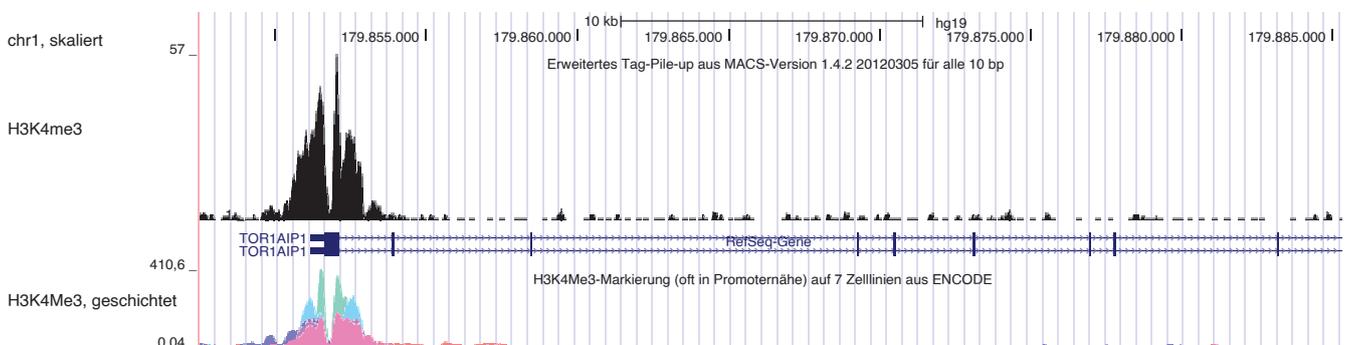


Abbildung 4: Ausgabe des Peak-Findings für MafK: Die Peak-Ergebnisse für das H3K4me3-Target weisen eine hohe Übereinstimmung mit den ENCODE-Annotationsdaten für dieses gut charakterisierte Target auf, mit einem repräsentativen Peak für das Target mit Histonmarkierung H3K4me3 und einem entsprechenden ENCODE-Referenzpeak.

Sequenzierungslösungen von Illumina

TruSeq ChIP Library Preparation Kits sind mit allen SBS-basierten (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) NGS-Systemen von Illumina kompatibel. Die Datenkompatibilität ist unabhängig vom jeweiligen System gewährleistet.

Zusammenfassung

TruSeq ChIP Library Preparation Kits zeichnen sich durch die bewährte Genauigkeit von TruSeq und einen einfachen, optimierten Workflow aus, der eine hochmultiplexierte, kostengünstige ChIP-Sequenzierung ermöglicht. Die Kits eignen sich für die Analyse eines breiten Spektrums von Targets im gesamten Genom selbst bei geringer Probenzugabe und liefern ein vollständiges, genaues Profil der DNA-Protein-Bindungsinteraktionen sowie einen besseren Einblick in die Mechanismen der Genregulation.

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSeq ChIP Library Preparation Kit, Set A (12 indexes, 48 samples)	IP-202-1012
TruSeq ChIP Library Preparation Kit, Set B (12 indexes, 48 samples)	IP-202-1024

Quellen

1. Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. [Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions](#). *Science*. 2007;316(5830):1497-1502. doi:10.1126/science.1141319.
2. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. [High-resolution profiling of histone methylations in the human genome](#). *Cell*. 2007;129(4):823-837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009.
3. Marban C, Su T, Ferrari R, et al. [Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome](#). *PLoS One*. 2011;6(11):e26894. doi:10.1371/journal.pone.0026894.
4. Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, et al. [GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination](#). *Nature*. 2011;480(7378):557-560. Veröffentlicht am 27. Nov. 2011. doi:10.1038/nature10656.
5. Botti E, Spallone G, Moretti F, et al. [Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13710-13715. doi:10.1073/pnas.1110931108.
6. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, et al. [MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L](#). *Cancer Cell*. 2011;20(1):66-78. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.010.
7. de Almeida SF, Grosso AR, Koch F, et al. [Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36](#). *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(9):977-983. Veröffentlicht am 26. Juli 2011. doi:10.1038/nsmb.2123.
8. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, et al. [Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells](#). *Nature*. 2011;473(7347):389-393. doi:10.1038/nature09934.
9. ENCODE Project Consortium. [A user's guide to the encyclopedia of DNA elements \(ENCODE\)](#). *PLoS Biol*. 2011;9(4):e1001046. doi:10.1371/journal.pbio.1001046.

illumina[®]

+1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) | +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 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-01512 DEU v1.0