

La chimie XLEAP-SBS^{MC} étend les capacités des systèmes NextSeq^{MC} 1000 et NextSeq 2000

Précision accrue et durées d'analyse plus courtes par rapport à la chimie de SBS standard pour les applications clés

- Séquençage des exomes
- Séquençage d'ARN total
- Séquençage d'ARN unicellulaire
- Séquençage du répertoire immunitaire



Introduction

La chimie XLEAP-SBS est une avancée plus rapide, plus fidèle et plus fiable vers le séquençage par synthèse (SBS, Sequencing by Synthesis) éprouvé d'Illumina. Les systèmes NextSeq 1000 et NextSeq 2000 exploitent la chimie de séquençage par synthèse XLEAP-SBS pour étendre les capacités du séquençage et la performance avec des débits plus élevés, des durées d'analyse plus courtes et une qualité améliorée, tout en maintenant un flux de travail facile. La chimie XLEAP-SBS est déployée sur la NextSeq 2000 P4 Flow Cell, en offrant le débit le plus élevé sur un instrument de paillasse Illumina à ce jour, ainsi que des améliorations de la qualité et du temps de traitement pour les Flow Cell P1, P2 et P3.

Cette note technique démontre que la chimie XLEAP-SBS sur les systèmes NextSeq 1000 et NextSeq 2000 produit une qualité de données qui atteint ou dépasse celle de la chimie de SBS standard pour les méthodes clés, y compris le séquençage de l'exome, le séquençage de l'ARN total, le séquençage de l'ARN unicellulaire et le séquençage du répertoire immunitaire.

Méthodes

Séquençage des exomes

Des librairies d'exomes ont été préparées à partir de l'ADN génomique (ADNg) NA12878 (Coriell Institute for Medical Research) à l'aide d'Illumina DNA with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation (Illumina, références 20077595 et 20077596) et des régions génomiques capturées ciblées par Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

Le séquençage a été effectué sur le système NextSeq 2000 avec la trousse NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, référence 20100989) et la trousse NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, référence 20100993) en utilisant une configuration d'analyse de 2 × 101 pb (24 échantillons par analyse). À titre de comparaison, les mêmes librairies ont également été séquencées sur le système NovaSeq 2000 avec les réactifs Standard SBS NextSeq 2000 P3 Reagent (200 cycles) (Illumina, référence 20040560) en utilisant une configuration d'analyse de 2 × 101 pb (24 échantillons par analyse).

L'analyse secondaire des données a été effectuée à l'aide des flux de travail infonuagiques DRAGEN^{MC} Enrichment Pipeline v4.2.7 (pour les réactifs XLEAP-SBS) et DRAGEN Enrichment Pipeline v3.10.4 (pour les réactifs SBS standard). La précision de l'appel des variants a été évaluée par rapport à l'ensemble représentatif de la réalité du projet Genome in A Bottle (GIAB) v4.2.1 du

National Institute of Standards and Technology (NIST) et au génome de référence hg38 avec des contigs ALT masqués^{1,2}. Les données de séquençage ont été sous-échantillonnées à 30 millions de paires de lectures par échantillon pour comparer la performance de l'appel des variants entre les trousse de réactifs SBS standard et XLEAP-SBS.

Séquençage de l'ARN total (RNA-Seq total)

Des librairies d'ARN total ont été préparées à partir d'ARN de lignée cellulaire leucémique : HL-60 (Thermo Fisher Scientific, référence AM7836) et K562 (BioChain, référence R1255820-50), et à partir d'ARN de lignée cellulaire du cancer du sein : MCF7 (BioChain, référence R1255830-50) à l'aide d'Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero^{MC} Plus (Illumina, référence 20040529).

Le séquençage a été effectué sur le système NextSeq 2000 avec les trousse NextSeq 2000 P3 Reagent Kit et P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) en utilisant une configuration d'analyse de 2 × 76 pb (18 échantillons par analyse). À titre de comparaison, les mêmes librairies ont également été séquencées sur le système NovaSeq 2000 avec la trousse NextSeq 2000 P3 Standard SBS Reagent Kit (200 cycles) en utilisant une configuration d'analyse de 2 × 76 pb (18 échantillons par analyse). Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de la formule des cycles obscurs Illumina Total RNA.

L'analyse secondaire des données a été effectuée à l'aide du flux de travail infonuagique DRAGEN RNA Pipeline v4.2.7. Les données de séquençage ont été sous-échantillonnées à 10 millions de lectures pour tous les échantillons afin de comparer les données d'expression génique, en comparant les profils d'ARN totaux entre la chimie XLEAP-SBS et les librairies appariées de SBS standard pour ces lignées cellulaires bien définies. Les transcrits par million (TPM) représentent l'expression de chaque transcrit lors de la normalisation par rapport à la longueur du transcrit et à la profondeur du séquençage.

Séquençage d'ARN unicellulaire (scRNA-Seq)

Des échantillons pour le séquençage d'ARN unicellulaire (scRNA-Seq) ont été préparés à partir de cellules mononucléées de sang périphérique humain (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) cryoconservées d'un donneur de sexe féminin en bonne santé (âgé entre 25 et 30 ans) obtenues à partir d'AllCells. Des librairies scRNA-Seq (16 réplicats) ont été préparées à l'aide des trousse Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kit v3.1 (10x Genomics, référence 1000269) conformément au guide de l'utilisateur Chromium (CG000315 Rév. E).

Le séquençage a été effectué sur le système NextSeq 2000 avec les trousse NextSeq 2000 P3 Reagent Kit et P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, références 20100990 et 20100994, respectivement). À titre de comparaison, les mêmes librairies ont également été séquencées sur le système NovaSeq 2000 avec la trousse NextSeq 2000 P3 Standard SBS Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, référence 20040559). Les configurations de l'analyse ont été effectuées selon les paramètres fournis par 10x Genomics : lecture 1 de 28 cycles, lectures d'index i5 et i7 de 10 cycles et lecture 2 de 90 cycles. La concentration de chargement était de 650 pM et 1 % de PhiX a été ajouté.

L'analyse des données a été effectuée à l'aide de Cell Ranger Pipeline v8.0.0 (10x Genomics). Les données de séquençage ont été sous-échantillonnées à 75 millions ou 112,5 millions de lectures après la génération des fichiers FASTQ.

Séquençage du répertoire immunitaire (IR-Seq)

Les échantillons pour le séquençage du répertoire immunitaire (IR-Seq) ont été préparés en série, où un mélange de neuf lignées de lymphocytes B a été dilué à l'aide de PBMC regroupées isolées de trois donneurs humains en bonne santé. Les librairies ont été préparées à l'aide de la trousse SMART-Seq Human BCR Kit (avec UMI) (Takara Bio USA, référence 634777) avec 25 ng d'ARN total. Des librairies indépendantes ont été préparées en trois exemplaires pour chaque point de dilution et finalement regroupées dans une seule librairie de séquençage.

Le séquençage a été effectué sur le système NextSeq 2000 avec la trousse NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS P2 Reagent Kit (600 cycles) (Illumina, référence 20100987) en utilisant une configuration d'analyse de 2 × 300 pb. À titre de comparaison, les mêmes librairies ont également été séquencées sur le système NovaSeq 2000 avec les réactifs SBS standard NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagent (600 cycles) (Illumina, référence 20075295) en utilisant une configuration d'analyse de 2 × 300 pb.

Les données de séquençage ont été normalisées à 250 000 lectures/échantillon et traitées en clonotypes à l'aide du logiciel Cogent NGS Immune Profiler Software v1.6. (Takara Bio USA) avec un seuil UMI établi à 2 et analysé plus en détail à l'aide de VDJTools v1.2.1 (MiLaboratories).

Résultats

Séquençage des exomes

Les indicateurs des analyses primaire et secondaire du séquençage de l'exome ont été évalués, notamment les scores de qualité, le taux d'erreur, l'uniformité de la couverture, la précision et le rappel pour les variants mononucléotidiques (SNV) et les insertions/suppressions (indels). Les trousse de réactifs XLEAP-SBS et SBS standard ont toutes les deux fourni des données de haute qualité et un appel des variants très précis, avec des analyses XLEAP-SBS montrant plus de lectures et un rendement plus élevé, des scores Q améliorés et des taux d'erreur plus faibles (tableau 1). Les indicateurs secondaires ont montré un rappel et une précision des SNV et des indels comparables, démontrant une concordance entre les deux chimies (tableau 1).

Tableau 1 : Indicateurs des analyses primaire et secondaire pour le séquençage de l'exome

	Chimie P3 SBS standard	Chimie P3 XLEAP-SBS	Chimie P4 XLEAP-SBS
Lectures uniques	1,4 milliard	1,4 milliard	2,1 milliards
Rendement	307 Gb	309 Gb	445 Gb
Configuration de l'analyse	2 × 101 pb	2 × 101 pb	2 × 101 pb
Q30 de la lecture 1	94,38 %	95,97 %	95,92 %
Q30 de la lecture 2	93,35 %	94,81 %	94,54 %
Taux d'erreur de la lecture 1	0,18 %	0,11 %	0,10 %
Taux d'erreur de la lecture 2	0,18 %	0,16 %	0,15 %
Enrichissement des lectures	87 %	86 %	86 %
Uniformité de la couverture	96,3 %	96,4 %	96,9 %
Précision des SNV	0,993	0,994	0,993
Rappel des SNV	0,981	0,981	0,980
Précision des indels	0,94	0,95	0,96
Rappel des indels	0,93	0,93	0,93

Total RNA-Seq

Pour le séquençage de l'ARN total, les trousse de réactifs XLEAP-SBS et les trousse de réactifs SBS standard ont fourni des données de haute qualité (tableau 2). Les trousse XLEAP-SBS ont montré un plus grand nombre d'amplifiats passant le filtre, des scores Q

supérieurs et des taux d'erreur réduits par rapport aux réactifs SBS standard. La quantification des transcrits a montré une excellente concordance entre les deux chimies ($R^2 > 0,99$) (figure 1).

Tableau 2 : Indicateurs d'analyse de séquençage pour le séquençage de l'ARN total (RNA-Seq)

	Chimie P3 SBS standard	Chimie P3 XLEAP-SBS	Chimie P4 XLEAP-SBS
Lectures uniques	1,4 milliard	1,4 milliard	2,1 milliards
Rendement	245 Gb	245 Gb	349 Gb
Configuration de l'analyse	2 × 76 pb	2 × 76 pb	2 × 76 pb
Q30 de la lecture 1	94,5 %	95,9 %	95,8 %
Q30 de la lecture 2	92,9 %	93,9 %	93,8 %
Taux d'erreur de la lecture 1	0,11 %	0,08 %	0,07 %
Taux d'erreur de la lecture 2	0,14 %	0,12 %	0,13 %

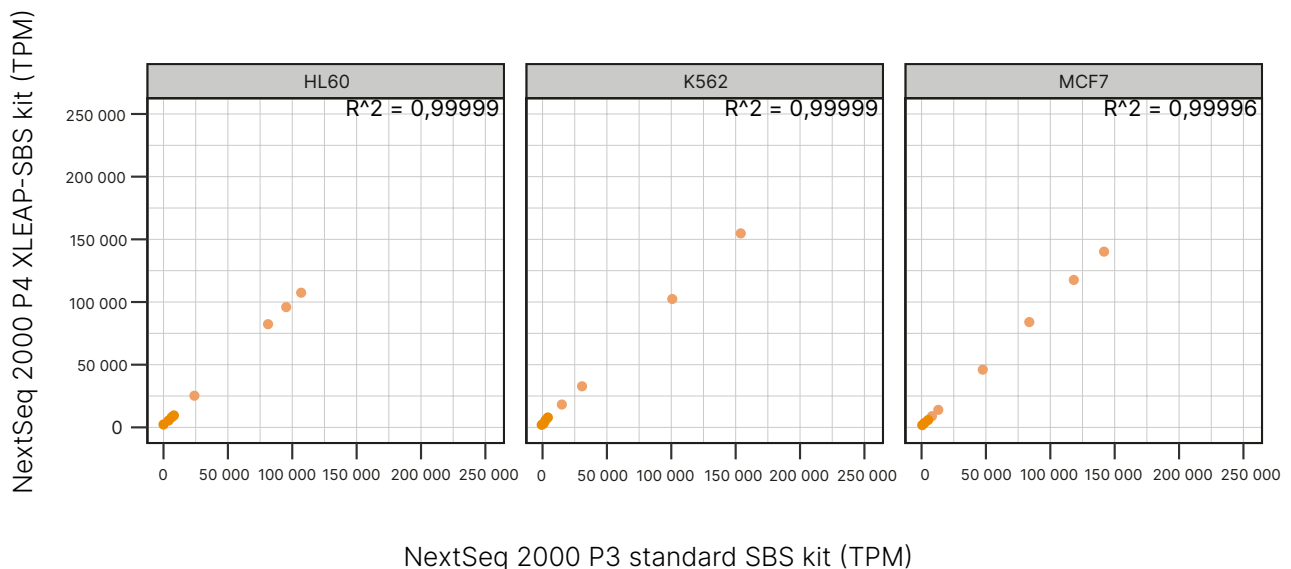


Figure 1 : Corrélations du transcriptome entier entre la chimie XLEAP-SBS et la chimie SBS standard : des transcrits par million (TPM) pour les lignées de cellules cancéreuses, HL-60, K562 et MCF7 ont été analysées et ont démontré une concordance des profils d'expression génique pour la chimie XLEAP-SBS par rapport aux bibliothèques appariées de RNA-Seq total par la chimie SBS standard.

scRNA-Seq

Les indicateurs de performance pour le séquençage de l'ARN unicellulaire (scRNA-Seq) montrent que les trousse de réactifs XLEAP-SBS et les trousse de réactifs SBS standard sur le système NextSeq 2000 répondent aux attentes en matière de qualité des données (tableau 3). Le débit plus élevé des réactifs P4 XLEAP-SBS permet à la fois une couverture plus étendue (plus de cellules par échantillon) et une profondeur de

couverture accrue (plus de lectures par cellule), ce qui a un impact sur le nombre de gènes détectés et le nombre médian d'identifiants moléculaires uniques (UMI) par cellule (tableau 3). Les représentations graphiques de l'algorithme t-SNE pour l'expression génique du scRNA-Seq (figure 2) montrent une excellente corrélation entre les trousse de réactifs XLEAP-SBS et les trousse de réactifs SBS standard.

Tableau 3 : Indicateurs des analyses primaire et secondaire pour le séquençage de l'ARN unicellulaire

	Chimie P3 SBS standard	Chimie P3 XLEAP-SBS	Chimie P4 XLEAP-SBS	
Nombre de lectures sous-échantillonnées	75 millions	75 millions	75 millions	112,5 millions
Bases de la lecture 1 ≥ Q30	95,25 %	96,46 %	96,81 %	96,81 %
Bases de la lecture 2 ≥ Q30	95,00 %	96,10 %	96,15 %	96,15 %
Taux d'erreur de la lecture 1	0,05 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %
Taux d'erreur de la lecture 2	0,15 %	0,14 %	0,15 %	0,15 %
Nbre de gènes détectés	27 715	27 735	27 753	28 474
Nbre médian d'IMU par cellule	30 332	30 275	30 568	39 121

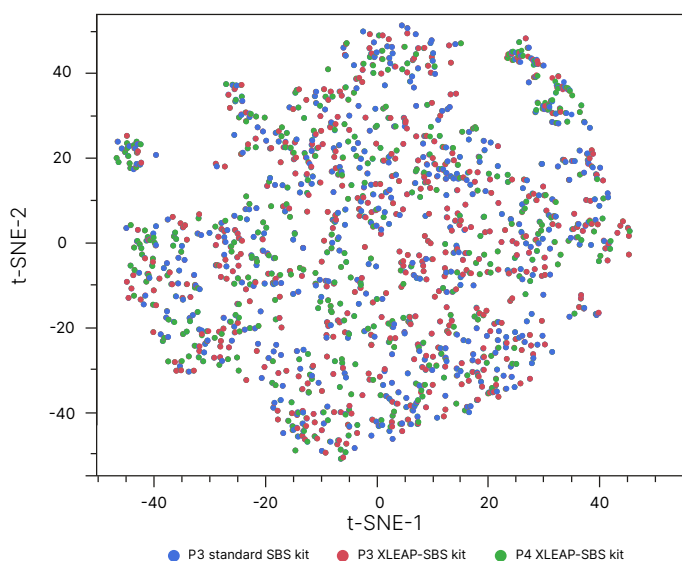


Figure 2 : Résultats cohérents de l'expression génique unicellulaire : représentations graphiques de l'algorithme t-SNE pour les bibliothèques scRNA-Seq pour les réactifs XLEAP-SBS P3 (rouges), les réactifs XLEAP-SBS P4 (verts) et les réactifs SBS standard P3 (bleus) sur le système NextSeq 2000. Le chevauchement suggère une concordance élevée entre les chimies XLEAP-SBS et SBS standard.

IR-Seq

La trousse NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) peut générer 400 millions de lectures, tandis que la trousse SBS NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 cycles) standard n'en génère que 300 millions. Le débit accru des réactifs XLEAP-SBS P2 offre une flexibilité expérimentale et une profondeur supplémentaires pour le séquençage du répertoire immunitaire (IR-Seq).

Les réactifs XLEAP-SBS P2 (600 cycles) ont produit un pourcentage plus élevé de lectures avec des scores de qualité \geq Q30 par rapport aux réactifs SBS P2 (600 cycles) standard sur le système NextSeq 2000 (figure 3). Pour l'IR-Seq, les deux chimies ont produit des résultats de haute qualité qui répondent ou dépassent les spécifications du marché. Les réactifs XLEAP-SBS P2 ont démontré un pourcentage moyen plus élevé de

bases au-dessus de Q30 et des taux d'erreur plus faibles par rapport aux réactifs SBS P2 standard (tableau 4). La chimie XLEAP-SBS a également entraîné une meilleure qualité aux extrémités des lectures (tableau 4), ce qui améliore la sensibilité de détection clonale, car l'IR-Seq s'appuie sur un chevauchement apparié pour fonctionner de manière optimale.

Ces améliorations de la qualité et du débit offrent une plus grande confiance dans les signaux observés du répertoire à partir d'ensembles de données complexes. Dans l'ensemble, les caractéristiques du répertoire (isotype, longueur CDR3 et fréquence des gènes V) sont restées cohérentes entre les réactifs NextSeq 2000 (données non illustrées).

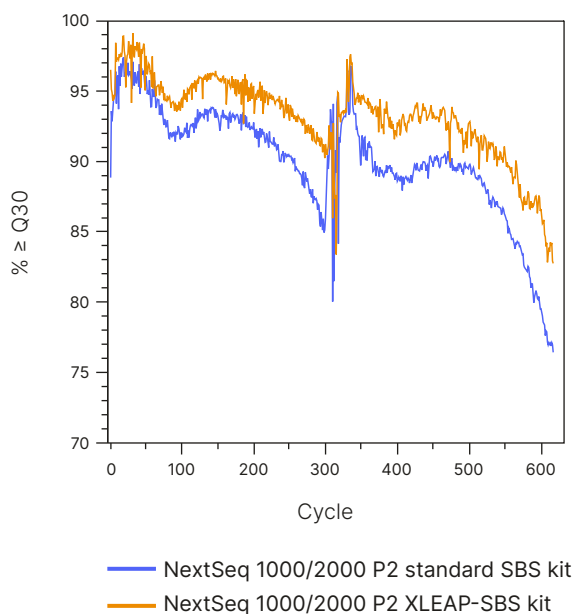


Figure 3 : Séquençage de répertoire immunitaire de haute qualité : scores de qualité pour le séquençage du répertoire immunitaire pour les réactifs XLEAP-SBS (orange) et les réactifs SBS standard (bleus) sur le système NextSeq 2000. Les améliorations de la qualité, en particulier aux extrémités des lectures, permettent une couverture et une détection accrues des clonotypes, ce qui fait des trousse XLEAP-SBS 600 cycles les trousse 600 cycles de la plus haute qualité du marché.

Tableau 4 : Indicateurs d'analyse de séquençage pour le séquençage du répertoire immunitaire (IR-Seq)

	Chimie P2 SBS standard	Chimie P2 XLEAP-SBS
Lectures passant le filtre par échantillon	390 millions	499 millions
Rendement	240 Gb	306 Gb
Configuration de l'analyse	2 × 300 pb	2 × 300 pb
Q30 moyen	90 %	93 %
Taux d'erreurs moyen	0,35 %	0,28 %
Q30 de la lecture 1 (10 derniers cycles)	85,70 %	91,14 %
Q30 de la lecture 2 (10 derniers cycles)	77,06 %	83,59 %
Taux d'erreur de la lecture 1 (10 derniers cycles)	0,96 %	0,57 %
Taux d'erreur de la lecture 2 (10 derniers cycles)	1,02 %	0,79 %

Résumé

La chimie XLEAP-SBS sur les systèmes NextSeq 1000 et NextSeq 2000 offre des capacités de séquençage étendues avec des débits plus élevés, des durées d'analyse plus courtes et une qualité améliorée par rapport au SBS standard, tout en maintenant la facilité d'utilisation et en réduisant les coûts. Les données provenant des principales méthodes couramment utilisées sur les systèmes NextSeq 1000 et NextSeq 2000, notamment le séquençage de l'exome, le séquençage de l'ARN total, le séquençage de l'ARN unicellulaire et le séquençage du répertoire immunitaire, ont été directement comparées aux données générées à l'aide de la chimie SBS standard. Les résultats montrent que la performance des trousseaux NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Reagent Kit est égale ou supérieure à celle des trousseaux SBS standard.

En savoir plus

[Systèmes de séquençage NextSeq 1000 et NextSeq 2000](#)

[Données de démonstration sur BaseSpace Sequence Hub](#)

Références

1. National Institute of Standards and Technology. Genome in a Bottle. [nist.gov/programs-projects/genome-bottle](https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle). Consulté le 27 juillet 2023.
2. Genome Reference Consortium. Human Genome Overview. NCBI website. [ncbi.nlm.nih.gov/grc/human](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human). Consulté le 27 juillet 2023.



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02330 FRA v1.0