

Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

Un flux de travail intégré, rapide et hautement performant pour les applications de séquençage du génome entier

- Résultats très fiables et d'une grande précision grâce à l'optimisation de la performance de préparation des bibliothèques
- Protocole flexible prenant en charge un large éventail de types d'échantillons pour les applications de séquençage sensibles
- Flux de travail rapide et compatible avec l'automatisation d'environ 1,5 heure au total avec peu d'entrées d'ADN requises

Introduction

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) a révolutionné la façon dont les chercheurs effectuent des études génomiques. Il a permis en effet d'augmenter considérablement la quantité et la qualité des données qui peuvent être générées par analyse et de réduire le coût et le temps de réponse. Si la technologie de séquençage d'Illumina a progressé rapidement ces dernières années, les protocoles de préparation des bibliothèques dépendant de la PCR présentent encore des défis importants. Le biais de la PCR peut conduire à une couverture inégale du génome, en particulier des régions dont la composition en bases est inégale. Pour relever ce défi, Illumina DNA PCR-Free Prep Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) offre une combinaison unique de tagmentation sur billes avec un flux de travail sans PCR (figure 1).

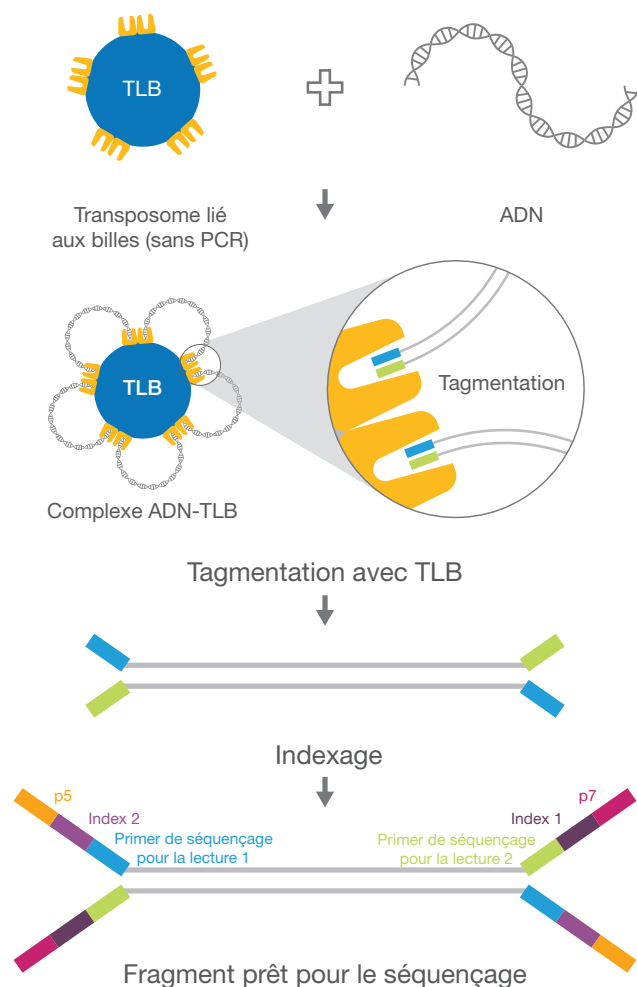


Figure 1 : Chimie Illumina DNA PCR-Free – Une solution efficace pour préparer et indexer des bibliothèques d'échantillons.

Fonctionnement

La tagmentation est une réaction à médiation transposomique qui combine le marquage et la fragmentation de l'ADN en une seule réaction rapide. La tagmentation sur billes utilise des transposomes liés aux billes pour obtenir une réaction de tagmentation plus uniforme par rapport à la tagmentation en solution. Une fois que les transposomes liés aux billes sont saturés d'ADN, aucune tagmentation supplémentaire ne peut se produire, ce qui permet d'obtenir un rendement de bibliothèque constant et des tailles d'insert de bibliothèques uniformes^{1,2}. En outre, en supprimant les étapes d'amplification de la PCR, la chimie Illumina DNA PCR-Free élimine le biais induit par la PCR et fournit des informations très précises sur les séquences pour des applications sensibles telles que l'identification du variant normal de tumeur ou le séquençage du génome humain entier. Le test Illumina DNA PCR-Free peut être réalisé en 90 minutes à partir de l'ADN génomique extrait (gDNA) ou en seulement 2,5 heures à partir d'échantillons bruts tels que le sang ou la salive (tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques d'Illumina DNA PCR-Free

Paramètre	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq DNA PCR-Free
Type d'entrée d'ADN	ADNg, sang, salive, plasmides, taches de sang séché	ADNg
Quantité d'entrée d'ADN	25 ng à 300 ng ^a	1 à 2 µg
Méthode de fragmentation	Tagmentation sur billes	Sonication Covaris
Multiplexage des échantillons	384 index doubles ^b	96 index doubles
Systèmes de séquençage pris en charge	MiniSeq ^{MC} , MiSeq ^{MC} , NextSeq ^{MC} 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000, NovaSeq ^{MC} 6000, NovaSeq X	Tous les systèmes de séquençage d'Illumina
Durée totale du flux de travail ^c	Env. 90 min ^d pour l'ADNg extrait Env. 2,5 h pour les échantillons bruts de sang ou de salive	Env. 11 h
Taille des inserts ^e	450 pb	350 pb ou 550 pb

- La quantité d'entrée maximale pour Illumina DNA PCR-Free est de 2 µg.
- Pour les stratégies de correction d'index visant à atténuer la variabilité entre les bibliothèques multiplexées, lisez la fiche [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Équilibrage de la couverture des échantillons pour le séquençage du génome entier\)](#).
- La durée totale du flux de travail comprend les étapes d'extraction et de quantification de l'ADN, de tagmentation et de groupement des bibliothèques.
- Durée du flux de travail pour la saturation de l'ADNg d'entrée (300 ng).
- Pour obtenir plus de renseignements sur l'ajustement des tailles d'insert à 350 pb ou 550 pb, lisez la fiche [Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation \(Tailles d'insert réglables avec Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation\)](#).

Une couverture très uniforme du génome entier pour le séquençage du génome humain entier

L'uniformité de la couverture mesure l'exhaustivité des données sur l'ensemble du génome pour une analyse de séquençage. La couverture uniforme permet une définition plus précise des variants qui sont éloignés de la profondeur moyenne³. Pour évaluer la performance de la couverture sur une plage de contenu de GC, des données de couverture normalisées d'Illumina DNA PCR-Free et TruSeq^{MC} DNA PCR-Free ont été tracées par rapport au contenu du génome humain en pourcentage GC. La majeure partie des données sur le génome humain est constituée de 20 à 70 % de séquences GC. Les deux trousseaux présentent des niveaux de couverture uniformes sur une large gamme de contenu de GC tels que représentés par les données du séquençage du génome humain entier (figure 2), ce qui indique qu'Illumina DNA PCR-Free est exceptionnellement bien adapté aux applications de séquençage du génome humain entier.

Couverture uniforme dans les régions à forte concentration de GC ou d'AT

En raison des éléments structurels de la transcription du génome humain, les régions du promoteur de gènes humains sont souvent riches en GC ou pauvres en GC et peuvent être difficiles à amplifier avec la PCR⁴. Les bibliothèques de séquençage du génome entier préparées avec des trousseaux qui excluent la PCR peuvent montrer une meilleure couverture dans certaines régions du promoteur riches en GC. Pour comparer la performance de couverture d'Illumina DNA PCR-Free, de TruSeq DNA PCR-Free et de TruSeq DNA Nano (y compris la PCR), des bibliothèques ont été préparées à partir de l'ADNg NA12878 de lignée cellulaire humaine (Coriell Institute). Toutes les bibliothèques ont été séquençées sur un système HiSeq^{MC}* avec une configuration d'analyse de 2 × 150 pb. Les données ont été sous-échantillonnées à une couverture de 32 à 40×. Par rapport aux données de TruSeq DNA Nano, les ensembles de données d'Illumina DNA PCR-Free et de TruSeq DNA PCR-Free montrent une couverture supérieure dans une région à fort écart GC dans le gène humain *RNPEPL1* (figure 3). L'utilisation d'Illumina DNA PCR-Free améliore la couverture dans les régions complexes.

* Le système HiSeq n'est plus disponible. Cependant, les renseignements fournis sont applicables à d'autres systèmes répertoriés dans le [tableau 1](#).

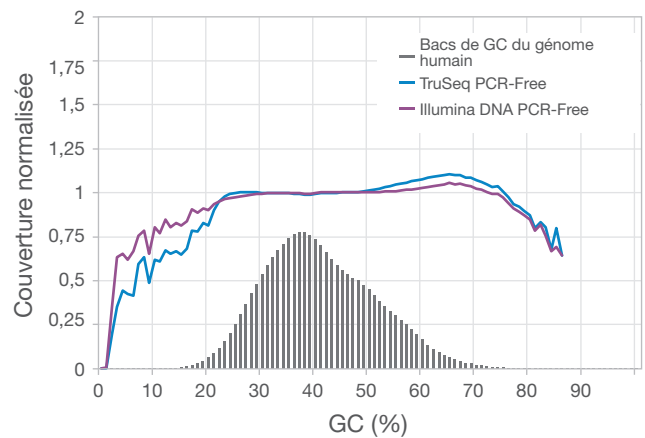


Figure 2 : Uniformité de la couverture grâce à Illumina DNA PCR-Free – Illumina DNA PCR-Free fournit une couverture uniforme pour toute une gamme de contenus GC dans le génome humain.

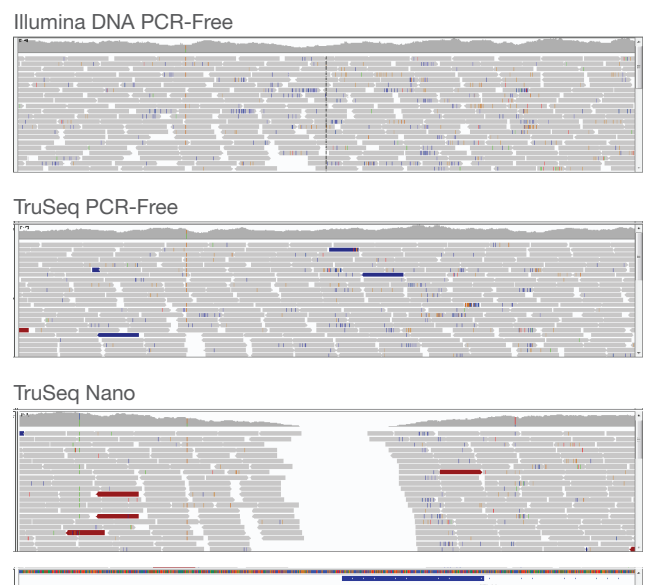


Figure 3 : Comparaison de la couverture de lecture dans les régions riches en GC – Illumina DNA PCR-Free offre une couverture de lecture supérieure dans la région du promoteur riche en GC du gène humain *RNPEPL1*, par rapport au TruSeq DNA PCR-Free et au TruSeq DNA Nano Library Prep Kit. Les cartes lues ont été visualisées avec l'application Integrative Genomics Viewer (IGV), disponible sur BaseSpace^{MC} Sequence Hub.

Excellente performance pour toute une série de quantités d'entrées d'ADN

La performance d'Illumina DNA PCR-Free a été évaluée pour toute une série de quantités d'entrées d'ADN. Les librairies ont été préparées à partir d'ADNg de lignée cellulaire humaine (Coriell Institute, référence NA12878) en utilisant des quantités d'entrées de 600 ng et de 20 à 200 ng[†] avec TruSeq DNA PCR-Free et Illumina DNA PCR-Free, respectivement. Les librairies ont été séquencées sur un système NovaSeq^{MC} 6000 avec une configuration d'analyse de 2 × 150 pb et sous-échantillonnées jusqu'à une couverture moyenne de 40×. Les scores de qualité, la définition des bases et les mesures d'appel de variants ont été comparés. Les données de chaque type de librairie sont très précises, avec plus de 85 % des bases affichant un score égal ou supérieur à Q30 sur le système NovaSeq 6000 (figure 4A). Les ensembles de données montrent également une performance de la définition des bases équivalente à la fois dans les autosomes et les exons, et un appel des variants équivalent (figure 4B). La qualité des données, la performance de la définition des bases et l'appel des variants pour toutes les entrées d'ADN, y compris la faible entrée de 20 ng^{*}, étaient également équivalents.

Tagmentation sur billes et protocole sans PCR

Illumina DNA PCR-Free offre une combinaison unique et puissante des avantages de la tagmentation sur billes et de la chimie sans PCR. Le point de saturation sur billes d'Illumina DNA PCR-Free est de ≥ 300 ng de l'ADNg. La saturation sur billes permet un contrôle robuste de la taille des inserts et des rendements normalisés à partir de quantités d'entrées d'ADN supérieures à 300 ng. Ce protocole permet de réduire au minimum les étapes de quantification avant et après la préparation de librairies. Les librairies normalisées peuvent être regroupées par volume, ce qui permet d'éviter une quantification fastidieuse des librairies individuelles. En éliminant les étapes de quantification et de la PCR, Illumina DNA PCR-Free propose un test simplifié de 90 minutes (figure 5). Bien que la normalisation soit réalisée avec des entrées de ≥ 150 ng, des librairies viables et hautement performantes peuvent être générées avec seulement 20 ng^{*} d'ADN d'entrée. La possibilité d'analyser des préparations de librairies sans PCR à partir de faibles entrées d'ADN permet de nouvelles applications telles que le séquençage du génome humain entier à partir de taches de sang séché.

[†] La quantité d'entrée maximale pour Illumina DNA PCR-Free est de 2 µg.

Multiplexage efficace des échantillons pour les applications à haut débit

Illumina DNA PCR-Free est compatible avec Illumina DNA Unique Dual Indexes, qui permet un démultiplexage précis des échantillons sur les systèmes de séquençage d'Illumina. Jusqu'à 384 index offrent une flexibilité maximale pour les projets de séquençage à haut débit.

Flux de travail compatibles avec l'automatisation

Illumina DNA PCR-Free est hautement compatible avec l'automatisation grâce à un flux de travail rapide et simplifié. En raison de la nature cohérente et autonormalisante du flux de travail basé sur les billes, les utilisateurs peuvent commencer par des échantillons bruts de sang ou de salive, exécuter le protocole Illumina Lysis et procéder à la préparation de librairies sans qu'aucune étape de quantification ne soit nécessaire. Ces caractéristiques facilitent le flux de travail pour le traitement automatisé de lots d'échantillons bruts sur des plateformes de manipulation de liquides.

Pour démontrer la compatibilité, des flux de travail automatisés pour TruSeq DNA PCR-Free et deux flux de travail concurrents sans PCR à base d'enzymes ont été comparés à Illumina DNA PCR-Free. Les points de contact, le matériel de laboratoire, le nombre de pointes et le temps nécessaire à la préparation de librairies pour 96 lots d'échantillons sur un robot Hamilton de manipulation des liquides ont été calculés pour chaque flux de travail. Les comparaisons montrent qu'Illumina DNA PCR-Free permet de gagner beaucoup de temps (tableau 2).

Réduction des coûts grâce à Illumina DNA PCR-Free

Le matériel de laboratoire, les pointes et les réactifs qPCR contribuent à la hausse des coûts lors de la préparation des librairies pour le séquençage de nouvelle génération (SNG). L'un des principaux avantages de la technologie basée sur les billes de toutes les librairies préparées dans un lot. Cette normalisation automatique élimine la nécessité de quantifier les librairies individuelles et permet de regrouper les librairies simplement par volume égal. Pour connaître les stratégies permettant de corriger la variation de performance spécifique aux index dans les librairies multiplexées, consultez la fiche technique [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing \(Équilibrage de la couverture des échantillons pour le séquençage du génome entier\)](#).

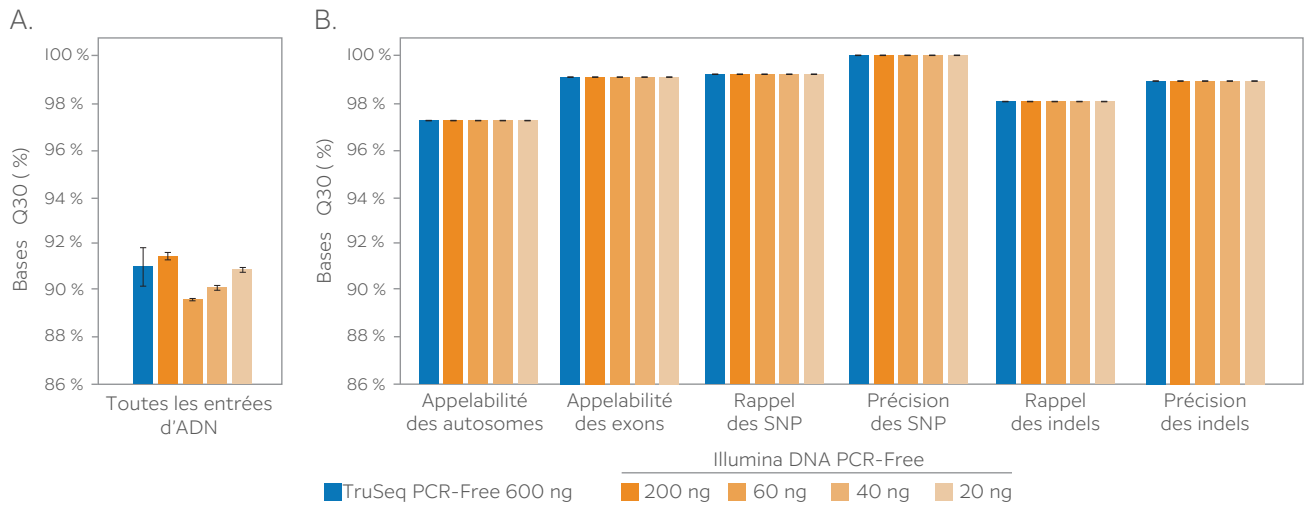


Figure 4 : Performance d'Illumina DNA PCR-Free Prep pour toute une gamme d'entrées d'ADN – Les bibliothèques d'Illumina DNA PCR-Free Prep préparées à partir d'une gamme d'entrées d'ADN démontrent (A) des spécifications de qualité satisfaisante pour toutes les entrées d'ADN et (B) une performance d'appelabilité équivalente. Score Q30 : exactitude de la définition des bases inférée de 99,9 %, appelabilité autosomique : le pourcentage de positions de référence non N dans les chromosomes autosomiques avec un typage génotypique passant, appelabilité des exons : le pourcentage de positions de référence non N dans les exons avec un typage génotypique passant, SNP : polymorphismes mononucléotidiques, indel : mutation d'insertion-suppression, précision (exactitude) : calculée comme le rapport [nombre d'appels réellement positifs/(nombre d'appels réellement positifs + nombre d'appels faux positifs)]; rappel (sensibilité) : calculé comme le rapport [nombre d'appels réellement positifs/(nombre d'appels réellement positifs + nombre d'appels faux négatifs)].

TruSeq DNA PCR-Free

Préparation de bibliothèques avec ligature des adaptateurs et marquage des index	Quantification et normalisation manuelles des bibliothèques	Regroupement manuel
5 h	2 h	0,5 h

Entreprise K

Flux de travail de préparation de bibliothèques avec l'entreprise K	Quantification et normalisation manuelles des bibliothèques	Regroupement manuel
Env. 2,5 h	2 h	0,5 h

Entreprise N

Flux de travail de préparation de bibliothèques avec l'entreprise N	Quantification et normalisation manuelles des bibliothèques	Regroupement manuel
Env. 2,5 h	2 h	0,5 h

Illumina DNA PCR-Free, sang ou salive

Illumina Lysis Kit	Préparation de bibliothèques avec tagmentation liée aux billes sans PCR	Regroupement par volume
Env. 1,5 h	1,5 h	0,5 h

Illumina DNA PCR-Free, ADNg

Préparation de bibliothèques avec tagmentation liée aux billes sans PCR	Regroupement par volume
1,5 h	0,5 h

Figure 5 : Flux de travail d'Illumina DNA PCR-Free – Le flux de travail d'Illumina DNA PCR-Free offre un temps de test total rapide de 90 minutes, de la fragmentation ou la tagmentation au nettoyage de la bibliothèque. Données internes, Illumina Inc., 2019. Remarque : L'entreprise N utilise des réactifs exclusifs combinés à des adaptateurs d'Illumina.

Tableau 2 : Consommables d'automatisation pour 96 échantillons^a

Méthode	Type d'échantillon	Points de contact	Plaques de 96 plaquettes	Pointes	Durée
TruSeq DNA PCR-Free	ADNg	20	20	5 504	10 heures 10 minutes
Entreprise K	ADNg	13	19	4 076	6 heures 21 minutes
Entreprise N	ADNg	13	17	3 266	5 heures 42 minutes
Illumina DNA PCR-Free (+ quantification qPCR facultative des groupes)	sang, salive	2 (6)	10 (12)	2 016 (2 072)	2 heures 32 minutes (4 heures 7 minutes)
Illumina DNA PCR-Free (+ quantification qPCR facultative des groupes)	ADNg	2 (6)	8 (10)	1 604 (1 660)	1 heure 32 minutes (3 heures 7 minutes)

a. Modélisé à l'aide du logiciel Hamilton pour Hamilton Star avec système de manipulation de liquides à 8 canaux et tête à 96 noyaux. qPCR est inclus dans la modélisation d'automatisation pour tous les flux de travail sur une base échantillon par échantillon. Les flux de travail autres que ceux d'Illumina DNA PCR-Free supposent que chaque échantillon soit mesuré, ajusté et regroupé par qPCR. Le regroupement des échantillons est basée sur quatre groupes de 24 échantillons. Données internes, Illumina Inc., 2019. Remarque : L'entreprise N utilise des réactifs exclusifs combinés à des adaptateurs d'Illumina.

Comme les librairies sans PCR sont généralement quantifiées par qPCR, Illumina DNA PCR-Free élimine ou réduit considérablement la quantité de qPCR impliquée dans le protocole global de préparation de la librairie (par exemple, l'amplification des librairies par PCR et la quantification post-préparation des librairies). Un modèle de coûts supplémentaires, comprenant les réactifs qPCR, le matériel de laboratoire, les réactifs de quantification, les pointes et les trousseaux d'extraction tierces, révèle que le flux de travail d'Illumina DNA PCR-Free offre des économies substantielles⁵. Par exemple, les coûts supplémentaires peuvent représenter environ 56 % du coût total du flux de travail TruSeq PCR-Free, ou environ 44 % pour les trousseaux concurrentes sans PCR à base d'enzymes[‡]. Pour le flux de travail Illumina DNA PCR-Free, les coûts supplémentaires ne sont que d'environ 21 %, ce qui représente une réduction substantielle par rapport aux autres trousseaux de préparation de librairies[‡].

[‡] Les coûts de la trousse de préparation des librairies sont pris en compte dans ce calcul. Les coûts supplémentaires sont variables et calculés en proportion du coût total sur la base d'hypothèses liées au flux de travail (tableau 2).

Résumé

Illumina DNA PCR-Free offre une combinaison unique des avantages de la tagmentation sur billes et des étapes de la chimie sans PCR. La tagmentation sur billes prend en charge la normalisation basée sur les billes, le regroupement facile des librairies selon le volume et l'élimination des étapes de quantification avant et après la préparation des librairies. Le flux de travail sans PCR simplifié et réduit le flux de travail global tout en assurant une couverture très uniforme dans les régions répétitives ou inégales du génome. Grâce à la trousse de réactifs Flex Lysis Reagent Kit intégrée, le flux de travail est compatible avec les échantillons bruts de sang, de salive et de taches de sang séché. Pour les applications sensibles telles que le séquençage du génome humain entier, l'assemblage *de novo* de génomes microbiens ou l'appel de variants normaux de tumeurs, Illumina DNA PCR-Free offre une facilité d'utilisation exceptionnelle, une couverture uniforme et des données de haute précision.

En savoir plus

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 échantillons)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 échantillons)	20041795
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091660
Illumina Lysis Reagent Kit	20042221

Références

1. Illumina. Illumina DNA Prep. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf Published 2020. Accessed September 1, 2023.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722. Published 2018 Oct 1. doi:10.1186/s12864-018-5096-9
3. Illumina. Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits. illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote_truseq_comparison.pdf Published 2013. Accessed January 31, 2022.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-125.
5. Data on file. Illumina, Inc., 2019.



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

© 2023 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-00679 FRA v2.0