

# Trousse de préparation Illumina DNA sans amplification en chaîne par polymérase (PCR), tagmentation

Haut rendement pour les applications sensibles telles que le séquençage du génome humain.

## Points saillants

- Couverture très précise de l'ensemble du génome**  
 La couverture compte ainsi moins de lacunes, même dans les régions génomiques à forte teneur en GC ou en AT
- Flux de travail simplifié et temps global réduit**  
 La mise en commun des bibliothèques sur la base du volume est simplifiée et la technologie réduit au minimum des étapes de quantification avant et après la mise en place des bibliothèques
- Solution hautement compatible avec l'automatisation**  
 La solution s'intègre à un système robotisé de manipulation des liquides pour automatiser les flux de travail avec un minimum de points de contact et faire gagner beaucoup de temps
- Excellent rendement et faible apport d'échantillons d'ADN**  
 La solution offre une définition des bases précise et une identification des variants pour un large éventail de quantités d'ADN

## Introduction

Le séquençage de nouvelle génération 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 cycle 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 des régions du génome, en particulier des régions dont la composition en bases est extrêmement inégale. Pour relever ce défi, la préparation Illumina DNA sans PCR, tagmentation (Préparation Illumina DNA sans PCR) offre une combinaison unique de tagmentation sur billes avec un flux de travail sans PCR (figure 1).

## 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 bibliothèque uniformes<sup>1,2</sup>. En outre, en supprimant les étapes d'amplification de la PCR, la chimie Illumina DNA sans PCR 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 sans PCR 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).

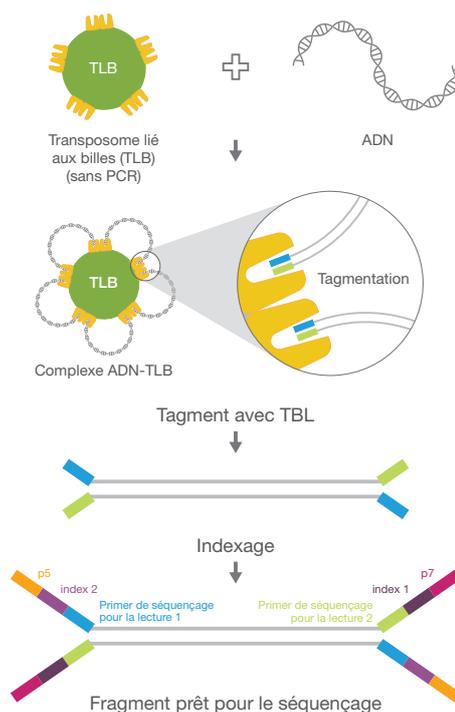


Figure 1 : La chimie Illumina DNA sans PCR : constitue une solution efficace pour préparer et indexer des bibliothèques d'échantillons.

Tableau 1 : Caractéristiques d'Illumina DNA sans PCR

Paramètre	Illumina DNA sans PCR	TruSeq DNA sans PCR
Type d'entrée d'ADN	ADN génomique, sang, salive, plasmides, taches de sang séché	ADN génomique
Quantité d'entrée d'ADN	De 25 ng à 2 µg	De 1 à 2 µg
Méthode de fragmentation	Tagmentation sur billes	Sonication Covaris
Multiplexage des échantillons	384 doubles index	96 doubles index
Systèmes de séquençage pris en charge	Systèmes MiniSeq <sup>MC</sup> , MiSeq <sup>MC</sup> , NextSeq <sup>MC</sup> 550, HiSeq 2500, HiSeq 3000/4000, NovaSeq 6000	Tous les systèmes de séquençage d'Illumina
Temps total du flux de travail <sup>a</sup>	Env. 90 minutes pour l'extrait d'ADN génomique Env. 2,5 heures pour les échantillons bruts de sang ou de salive	Env. 11 heures
Taille des inserts	450 pb	350 pb ou 550 pb

a. La durée totale du flux de travail comprend les étapes d'extraction et de quantification de l'ADN (ou Flex Lysis), de tagmentation et de mise en commun des bibliothèques

b. Pour ajuster les tailles d'insert à 350 pb ou 550 pb, lisez la note d'application « Grandeur des inserts Tunable » pour la préparation de tagmentation d'Illumina DNA sans PCR

## Une couverture très uniforme de l'ensemble du génome humain 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. Une couverture uniforme permet une définition plus précise des variants qui sont éloignées de la profondeur moyenne.<sup>3</sup> Pour évaluer le rendement de la couverture sur une gamme de contenus GC faibles, moyens et élevés, des données de couverture normalisées provenant d'Illumina DNA sans PCR et de TruSeq<sup>MC</sup> DNA sans PCR 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 troupes présentent des niveaux de couverture uniformes sur une gamme de contenus GC tels que représentés par les données du séquençage du génome humain entier (figure 2), ce qui indique qu'Illumina DNA sans PCR est exceptionnellement bien adaptée aux applications de séquençage du génome humain entier.

## Une 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 promotrices des gènes humains sont souvent soit riches en GC, soit pauvres en GC, et peuvent ainsi être difficiles à amplifier avec la PCR.<sup>4</sup> Par conséquent, les bibliothèques du séquençage du génome humain entier préparées avec des ensembles qui excluent la PCR peuvent présenter une meilleure couverture dans certaines régions promotrices riches en GC. Pour comparer le rendement de couverture d'Illumina DNA sans PCR, de TruSeq DNA sans PCR et de TruSeq DNA Nano (y compris la PCR), des bibliothèques ont été préparées à partir de la lignée cellulaire humaine NA12878 de l'ADN génomique (Institut Coriell). Toutes les bibliothèques ont été séquençées sur un système HiSeq<sup>MC</sup> avec une configuration d'exécution de 2 x 150 pb. L'échantillon de données a été réduit à une couverture de 32x-40x. Par rapport aux données de TruSeq DNA Nano, les jeux de données d'Illumina DNA sans PCR et de TruSeq DNA sans PCR montrent une couverture supérieure dans une région à fort écart GC dans le gène humain *RNPEPL1* (figure 3). L'utilisation d'Illumina DNA sans PCR améliore la couverture dans les régions difficiles.

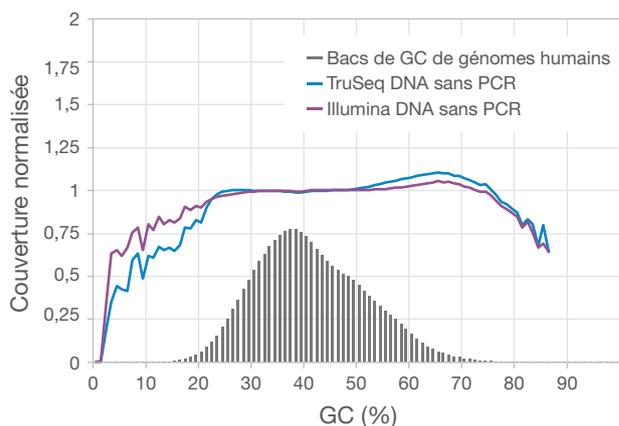
## Excellent rendement pour toute une série de quantités d'ADN

Le rendement d'Illumina DNA sans PCR a été évalué pour toute une série de quantités d'ADN. Les bibliothèques ont été préparées à partir d'ADN de lignées cellulaires humaines (Institut Coriell, NA12878) en utilisant des quantités d'entrée de 600 ng et de 20 à 200 \*ng avec TruSeq DNA sans PCR et Illumina DNA sans PCR, respectivement. Les bibliothèques ont été séquençées sur un système NovaSeq<sup>MC</sup> 6000 avec une configuration d'exécution de 2 x 150 pb et échantillonnées jusqu'à une couverture moyenne de 40x. Les scores de qualité, la définition des bases et les mesures de définition de variant ont été comparés. Les données de chaque type de bibliothèque dépassent la spécification de qualité de 75 % > Q30 pour le système NovaSeq 6000 (figure 4a). Les ensembles de données montrent également le rendement de la définition des bases équivalentes à la fois dans les autosomes et les exons, et la définition des variants équivalente (figure 4b). La qualité des données, le rendement des définitions des bases et les définitions de 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 sans PCR 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 sans PCR est de  $\geq 300$  ng de l'ADN génomique. La saturation sur billes permet un contrôle robuste de la taille des inserts et des rendements normalisés à partir de quantités d'entrée d'ADN supérieures à 300 ng. Cela permet de réduire au minimum les étapes de quantification avant et après la préparation de la bibliothèque. Les bibliothèques normalisées peuvent être regroupées par volume, ce qui permet d'éviter une quantification fastidieuse des bibliothèques individuelles.

\* La plage d'entrée recommandée pour Illumina DNA sans PCR est de 25 à 300 ng.

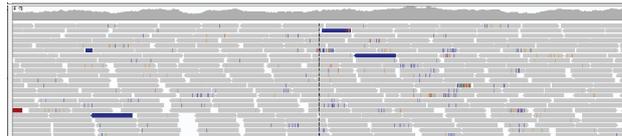


**Figure 2 : Uniformité de la couverture par Illumina DNA sans PCR :** Illumina DNA sans PCR fournit une couverture uniforme pour toute une gamme de contenus GC dans le génome humain.

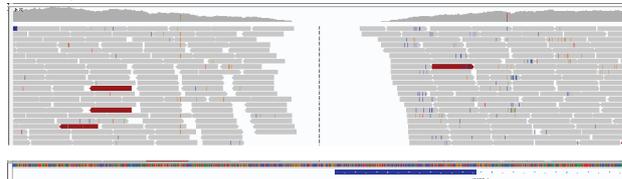
Illumina DNA sans PCR



TruSeq DNA sans PCR



TruSeq Nano

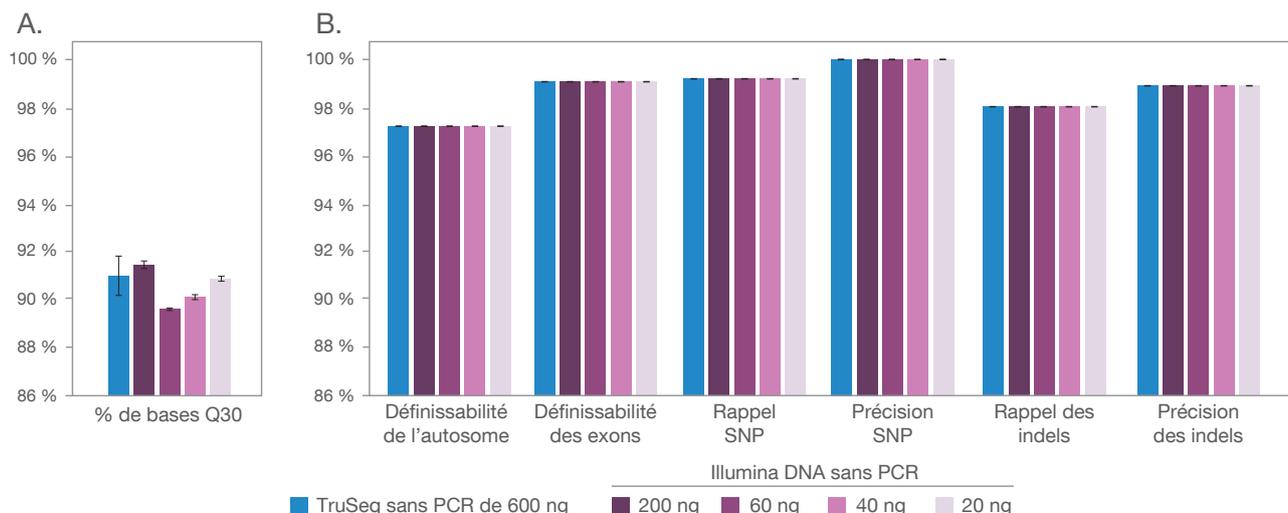


**Figure 3 : Comparaison de la couverture de lecture dans les régions riches en GC :** l'ensemble de préparation de bibliothèque Illumina DNA sans PCR offre une couverture de lecture supérieure dans la région du gène humain riche en GC *RNPEPL1*, par rapport aux troupes de préparation de bibliothèque TruSeq DNA sans PCR et TruSeq DNA Nano. Les cartes lues ont été visualisées avec l'application Integrative Genomics Viewer (IGV), disponible sur BaseSpace<sup>MC</sup> Sequence Hub.

En éliminant la quantification et les étapes de la PCR, Illumina DNA sans PCR propose un test simplifié de 90 minutes (figure 5). Bien que la normalisation soit réalisée avec des entrées de  $\geq 150$  ng, des bibliothèques viables et performantes peuvent être générées avec aussi peu que 20 ng\* d'ADN d'entrée. La possibilité d'exécuter des préparations de bibliothèque 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.

## Multiplexage efficace des échantillons pour les applications à haut débit

Illumina DNA sans PCR est compatible avec IDT pour 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.



**Figure 4 : Rendement d'Illumina DNA sans PCR sur une gamme d'entrées d'ADN** : les bibliothèques d'Illumina DNA sans PCR 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) un rendement de définissabilité équivalent. Score Q30 = exactitude de la définition des bases inférée de 99,9 %, définissabilité autosomique = le pourcentage de positions de référence non-N dans les chromosomes autosomiques avec un typage génotypique passant, définissabilité des exons = le pourcentage de positions de référence non-N dans les exons avec un typage génotypique passant, SNP = polymorphismes d'un seul nucléotide, indel = mutation insertion-délétion, précision (exactitude) = calculée comme le rapport [(nombre de définitions réellement positives)/(nombre de définitions réellement positives + nombre de définitions faux positifs)], rappel (sensibilité) = calculé comme le rapport [(nombre de définitions réellement positives)/(nombre de définitions réellement positives + nombre de définitions faux négatifs)]. Remarque : Les spécifications de la limite inférieure d'entrée des échantillons pour Illumina DNA sans PCR n'ont pas été finalisées.

**TruSeq DNA sans PCR**

Préparation de bibliothèques avec ligation des adaptateurs et marquage des index	Quantification et normalisation manuelles de la bibliothèque	Regroupement manuel
<b>5 h</b>	<b>2 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Entreprise K**

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

**Entreprise N**

Flux de travail de préparation de bibliothèques avec l'entreprise N	Quantification et normalisation manuelles de la bibliothèque	Regroupement manuel
<b>Env. 2,5 h</b>	<b>2 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Illumina DNA sans PCR, sang ou salive**

Trousse Illumina Lysis	Préparation de bibliothèques avec Nextera tagmentation sans PCR	Regroupement par volume
<b>Env. 1,5 h</b>	<b>1,5 h</b>	<b>0,5 h</b>

**Illumina DNA sans PCR, ADN génomique**

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

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

Tableau 2 : consommables d'automatisation pour 96 échantillons

Méthode	Type d'échantillon	Points de contact	96 plaquettes d'échantillons	Pointes	Durée
TruSeq DNA sans PCR	ADN génomique	20	20	5 504	10 h 10
Entreprise K	ADN génomique	13	19	4 076	6 h 21
Entreprise N	ADN génomique	13	17	3 266	5 h 42
Illumina DNA sans PCR (+ quantification qPCR facultative des groupements)	sang, salive	2 (6)	10 (12)	2 016 (2 072)	2 h 32 (4 h 07)
Illumina DNA sans PCR (+ quantification qPCR facultative des groupements)	ADN génomique	2 (6)	8 (10)	1 604 (1 660)	1 h 32 (3 h 07)

Modélisé à l'aide du logiciel Hamilton pour Hamilton Star avec 96 têtes de noyau + 8 canaux. 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 qu'Illumina DNA sans PCR supposent que chaque échantillon est mesuré, ajusté et mis en commun par le qPCR. La mise en commun des échantillons est basée sur 4 groupes de 24 échantillons. Données internes d'Illumina Inc., 2019 Remarque : L'entreprise N utilise des réactifs exclusifs combinés à des adaptateurs en fourche d'Illumina.

## Flux de travail compatibles avec l'automatisation

Illumina DNA sans PCR 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 de sang ou de salive bruts, exécuter le protocole Flex Lysis, puis procéder à la préparation de la bibliothèque 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 plates-formes de manipulation de liquides.

Pour démontrer la compatibilité, des flux de travail automatisés pour TruSeq DNA sans PCR et deux flux de travail concurrents basés sur la PCR sans enzyme ont été comparés à Illumina DNA sans PCR. Les points de contact, le matériel de laboratoire, le nombre de pointes et le temps nécessaire à la préparation de 96 lots d'échantillons sur un robot Hamilton de manipulation des liquides ont été calculés pour chaque flux de travail. Il a ainsi été démontré qu'Illumina DNA sans PCR permettait de gagner beaucoup de temps (tableau 2).

## Réduction des coûts grâce à Illumina DNA sans PCR

Les logiciels de laboratoire, les pointes et les réactifs qPCR contribuent aux coûts cachés lors de la préparation des bibliothèques pour le séquençage de nouvelle génération. L'un des principaux avantages de la technologie basée sur les billes est la normalisation automatique, basée sur les billes, de toutes les bibliothèques préparées dans un lot, ce qui élimine la nécessité de quantifier chaque bibliothèque et permet de regrouper simplement les bibliothèques par volume égal.

Comme les bibliothèques sans PCR sont généralement quantifiées par qPCR, Illumina DNA sans PCR élimine ou réduit considérablement la quantité de qPCR mise en jeu dans le protocole global de préparation des bibliothèques (par exemple l'amplification des bibliothèques par PCR et la quantification post-préparation des bibliothèques). Un modèle des coûts cachés, comprenant les réactifs de qPCR, le matériel de laboratoire, les pointes, les réactifs de quantification et les trousseaux d'extraction tiers, révèle que le flux de travail d'Illumina DNA sans PCR offre des économies substantielles.<sup>5</sup> Par exemple, les coûts cachés peuvent représenter env. 56 % des coûts totaux pour le flux de travail TruSeq sans PCR, ou env. 44 % pour les trousseaux concurrents sans PCR à base d'enzymes.<sup>†</sup> Pour le flux de travail Illumina DNA sans PCR, les coûts cachés ne sont que d'env. 21 %, ce qui représente une réduction substantielle par rapport aux autres trousseaux de préparation de bibliothèque.<sup>†</sup>

<sup>†</sup> Les coûts de la trousse de préparation de la bibliothèque sont pris en compte dans ce calcul. Les coûts cachés sont variables et calculés en proportion du coût total sur la base d'hypothèses liées au flux de travail (tableau 1).

## Résumé

Illumina DNA sans PCR 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, la mise en commun facile des bibliothèques en fonction du volume et l'élimination des étapes de quantification avant et après les bibliothèques. Le flux de travail sans PCR simplifié et réduit le temps 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 intégrée, le flux de travail est compatible avec les échantillons bruts formés à partir du sang, de la salive et des taches de sang séché. Pour les applications sensibles telles que le séquençage du génome humain entier, l'assemblage *de novo* de génomes microbiens ou la définition de variants normaux de tumeurs, Illumina DNA sans PCR offre une facilité d'utilisation exceptionnelle, une couverture uniforme et des données de haute précision.

## En savoir plus

Pour obtenir de plus amples renseignements, veuillez consulter le site Web [www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.html](http://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.html)

## Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
Préparation Illumina DNA sans PCR, tagmentation (24 échantillons)	20041794
Préparation Illumina DNA sans PCR, tagmentation (96 échantillons)	20041795
IDT <sup>MD</sup> pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina : ensemble A, tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20027213
IDT pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina : ensemble B, tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20027214
IDT pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina : ensemble C, tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20042666 À venir
IDT pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina : ensemble D, tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20042667 À venir
Primer de séquençage Illumina DNA sans PCR R1	20041796
Trousse de réactifs Lysis d'Illumina	20042221

« IDT pour Illumina DNA/RNA UD Indexes » sont les nouveaux noms donnés aux trousseaux « IDT pour Illumina Nextera DNA UD Indexes ». Le contenu des trousseaux, quant à lui, demeure le même.

## Références

- Illumina (2018). *Trousse de préparation de bibliothèques Nextera DNA Flex*. Consulté le 10 avril 2020.
- Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, Czyz A, Morrell N, et al. *Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation*. *BMC Genomics*. 2018;19(1):722.
- Illumina (2013). *Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits Technical Note*. Consulté le 10 mai 2020.
- Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. *Content analysis of the core promoter region of human genes*. *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-25.
- Calcul des données internes. Illumina Inc., 2019.