

# La química de XLEAP-SBS™ amplía las capacidades de los sistemas NextSeq™ 1000 y NextSeq 2000

Mayor precisión y tiempos  
de experimento más rápidos  
en comparación con el SBS  
estándar para aplicaciones  
esenciales

- Secuenciación del exoma
- Secuenciación de ARN Total
- Secuenciación de ARN de células individuales
- Secuenciación del repertorio inmunitario



## Introducción

La química de NovaSeq X es un avance más rápido, de mayor fidelidad y más sólido para la química demostrada de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis) de Illumina. Los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000 aprovechan la química de XLEAP-SBS para ampliar las capacidades de secuenciación de cara a un rendimiento más alto, tiempos de experimento más cortos y una mejor calidad, a la vez que mantienen un flujo de trabajo sencillo. La química de XLEAP-SBS permite la celda de flujo NextSeq 2000 P4, por lo que ofrece el mayor rendimiento en un instrumento de sobremesa de Illumina hasta la fecha, así como mejoras en la calidad y el tiempo de respuesta para las celdas de flujo P1, P2 y P3.

Esta nota técnica demuestra que la química de XLEAP-SBS en los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000 proporciona una calidad de datos que cumple o supera la del SBS estándar para métodos clave, entre los que se incluyen la secuenciación del exoma, la secuenciación de ARN total, la secuenciación de ARN de células individuales y la secuenciación del repertorio inmunitario.

## Métodos

### Secuenciación del exoma

Las librerías de exomas se prepararon a partir de ADN genómico (ADNg) NA12878 (Coriell Institute for Medical Research) utilizando Illumina DNA with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation (Illumina, n.º de catálogo 20077595 y 20077596) regiones genómicas capturadas selectivas mediante Twist Bioscience para Illumina Exome 2.5 Panel.

La secuenciación se realizó en NextSeq 2000 System con NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20100989) y NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20100993) utilizando una configuración de experimento de 2 × 101 pb (24 muestras por experimento). Por comparación, las mismas librerías también se secuenciaron en NextSeq 2000 System con SBS NextSeq 2000 P3 Reagents (200 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20040560) utilizando una configuración de experimento de 2 × 101 pb (24 muestras por experimento).

El análisis de datos secundario se efectuó mediante los flujos de trabajo basados en la nube DRAGEN™ Enrichment pipeline v4.2.7 (para reactivos XLEAP-SBS) y DRAGEN Enrichment pipeline v3.10.4 (para reactivos SBS estándar). La precisión de las llamadas de variantes se evaluó con

respecto al conjunto de verdad Genome in A Bottle (GiAB) v4.2.1 del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, National Institute of Standards and Technology) (GiAB, National Institute of Standards and Technology) v4.2.1 y el genoma de referencia con enmascaramiento alternativo de hg38.<sup>1,2</sup> Los datos de secuenciación se redujeron a 30 M de pares de lecturas por muestra para comparar el rendimiento de las llamadas de variantes entre los kits de reactivos XLEAP-SBS y SBS estándar.

### Secuenciación de ARN total (RNA-Seq total)

Se prepararon librerías de ARN a partir de ARN de la línea celular de leucemia: HL-60 (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AM7836) y K562 (BioChain, n.º de catálogo R1255820-50) y ARN de la línea celular de cáncer de mama: MCF7 (BioChain, n.º de catálogo R1255830-50) con Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero™ Plus (Illumina, n.º de catálogo 20040529).

La secuenciación se realizó en NextSeq 2000 System con los kits de reactivos NextSeq 2000 P3 y P4 XLEAP-SBS (200 ciclos) mediante una configuración de experimento de 2 × 76 pb (18 muestras por experimento). Por comparación, las mismas librerías también se secuenciaron en NextSeq 2000 System con el kit de reactivos NextSeq 2000 P3 de SBS estándar (200 ciclos) mediante una configuración de experimento de 2 × 76 pb (18 muestras por experimento). Todos los experimentos se realizaron con la fórmula del ciclo de oscuridad de ARN total de Illumina.

El análisis de datos secundario se llevó a cabo utilizando el flujo de trabajo basado en la nube DRAGEN RNA pipeline v4.2.7. Los datos de secuenciación se redujeron a 10 M de lecturas para todas las muestras con el fin de comparar los datos de expresión genética, comparando los perfiles de ARN total y la química de XLEAP-SBS y las librerías emparejadas de SBS estándar para estas líneas celulares bien definidas. Los transcritos por millón (TPM) representan la expresión de cada transcrito cuando se normaliza para la longitud de los transcritos y la profundidad de secuenciación.

### Secuenciación de ARN de células individuales (scRNA-Seq)

Las muestras para scRNA-Seq se prepararon a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) crioconservadas de una donante femenina sana (de 25 a 30 años de edad) obtenidas de AllCells. Las librerías de scRNA-Seq (16 réplicas) se prepararon utilizando Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10x Genomics, n.º de catálogo 1000269) con arreglo a la guía del usuario de Chromium (CG000315 Rev E).

La secuenciación se realizó en NextSeq 2000 System con los kits de reactivos NextSeq 2000 P3 y P4 XLEAP-SBS (100 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20100990 y 20100994, respectivamente). Por comparación, las mismas librerías también se secuenciaron en NextSeq 2000 System con el kit de reactivos de SBS estándar NextSeq 2000 P3 (100 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20040559). Las configuraciones del experimento se ajustaron de acuerdo con los parámetros proporcionados por 10x Genomics: lectura 1 de 28 ciclos, lecturas de índices i7 e i5 de 10 ciclos y lectura 1 de 90 ciclos. La concentración de carga fue de 650 pM y se añadió PhiX al 1 %.

El análisis de datos se realizó con Cell Ranger pipeline v8.0.0 (10x Genomics). Los datos de secuenciación se redujeron a 75 M o 112,5 M de lecturas tras la finalización de la generación de FASTQ.

### Secuenciación del repertorio inmunitario (IR-Seq)

Las muestras para IR-Seq se prepararon en serie, donde se diluyó una mezcla de nueve líneas de linfocitos B utilizando PBMC agrupadas aisladas de tres donantes humanos sanos. Las librerías se prepararon con SMART-Seq human BcR (with UMI) Kit (Takara Bio USA, n.º de catálogo 634777) con 25 ng de ARN total. Las preparaciones de librerías independientes se realizaron por triplicado para cada punto de dilución y finalmente se agruparon en una única librería de secuenciación.

La secuenciación se realizó en NextSeq 2000 System con los kits de reactivos NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS P2 (600 ciclos) (Illumina, Catalog n.º 20100987) mediante una configuración de experimento de 2 × 300 pb. Por comparación, las mismas librerías también se secuenciaron en NextSeq 2000 System con SBS NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20075295) utilizando una configuración de experimento de 2 × 300 pb.

Los datos de secuenciación se normalizaron a 250 K lecturas/muestra y se procesaron en clonotipos con Cogent NGS Immune Profiler Software v1.6. (Takara Bio USA) con un valor de corte de UMI establecido en 2 y analizado con VDJTools v1.2.1 (MiLaboratories).

## Resultados

### Secuenciación del exoma

Se evaluaron los criterios de medición del análisis principal y secundario de la secuenciación del exoma, incluidas las puntuaciones de calidad, la tasa de error, la uniformidad de cobertura y la precisión y la retirada tanto para variantes de nucleótido único (SNV) como para inserciones-delecciones (indel). Tanto los kits de reactivos XLEAP-SBS como los kits de reactivos SBS estándar proporcionaron datos de alta calidad y llamadas de variantes de alta precisión, con experimentos de XLEAP-SBS que mostraron más lecturas y un mayor rendimiento, puntuaciones Q mejoradas y tasas de error más bajas (tabla 1). Los criterios de medición secundarios mostraron una precisión y una retirada comparables de SNV e indel, lo que demuestra concordancia entre las dos químicas (tabla 1).

Tabla 1: Criterios de medición del análisis principal y secundario para la secuenciación del exoma

|                               | Química de P3 SBS estándar | Química de P3 XLEAP-SBS | Química de P4 XLEAP-SBS |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Lecturas individuales         | 1,4 B                      | 1,4 B                   | 2,1 B                   |
| Rendimiento                   | 307 Gb                     | 309 Gb                  | 445 Gb                  |
| Configuración del experimento | 2 × 101 pb                 | 2 × 101 pb              | 2 × 101 pb              |
| Q30, lectura 1                | 94,38 %                    | 95,97 %                 | 95,92 %                 |
| Q30, lectura 2                | 93,35 %                    | 94,81 %                 | 94,54 %                 |
| Tasa de error de la lectura 1 | 0,18 %                     | 0,11 %                  | 0,10 %                  |
| Tasa de error de la lectura 2 | 0,18 %                     | 0,16 %                  | 0,15 %                  |
| Enriquecimiento de lecturas   | 87 %                       | 86 %                    | 86 %                    |
| Uniformidad de cobertura      | 96,3 %                     | 96,4 %                  | 96,9 %                  |
| Precisión de SNV              | 0,993                      | 0,994                   | 0,993                   |
| Retirada de SNV               | 0,981                      | 0,981                   | 0,980                   |
| Precisión de indel            | 0,94                       | 0,95                    | 0,96                    |
| Retirada de indel             | 0,93                       | 0,93                    | 0,93                    |

### RNA-Seq total

Para RNA-Seq total, tanto los kits de reactivos XLEAP-SBS como los kits de reactivos SBS estándar proporcionaron datos de alta calidad (tabla 2). Los kits XLEAP-SBS mostraron grupos más altos que superaban el filtro, mejoraban las puntuaciones Q y reducían

las tasas de error en comparación con los reactivos SBS estándar. La cuantificación de transcritos mostró una concordancia excelente entre las dos químicas ( $R^2 > 0,99$ ) (figura 1).

Tabla 2: Criterios de medición del experimento de secuenciación para la RNA-Seq total

|                               | Química de SBS estándar P3 | Química de P3 XLEAP-SBS | Química de P4 XLEAP-SBS |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Lecturas individuales         | 1,4 B                      | 1,4 B                   | 2,1 B                   |
| Rendimiento                   | 245 Gb                     | 245 Gb                  | 349 Gb                  |
| Configuración del experimento | 2 × 76 pb                  | 2 × 76 pb               | 2 × 76 pb               |
| Q30, lectura 1                | 94,5 %                     | 95,9 %                  | 95,8 %                  |
| Q30, lectura 2                | 92,9 %                     | 93,9 %                  | 93,8 %                  |
| Tasa de error de la lectura 1 | 0,11 %                     | 0,08 %                  | 0,07 %                  |
| Tasa de error de la lectura 2 | 0,14 %                     | 0,12 %                  | 0,13 %                  |

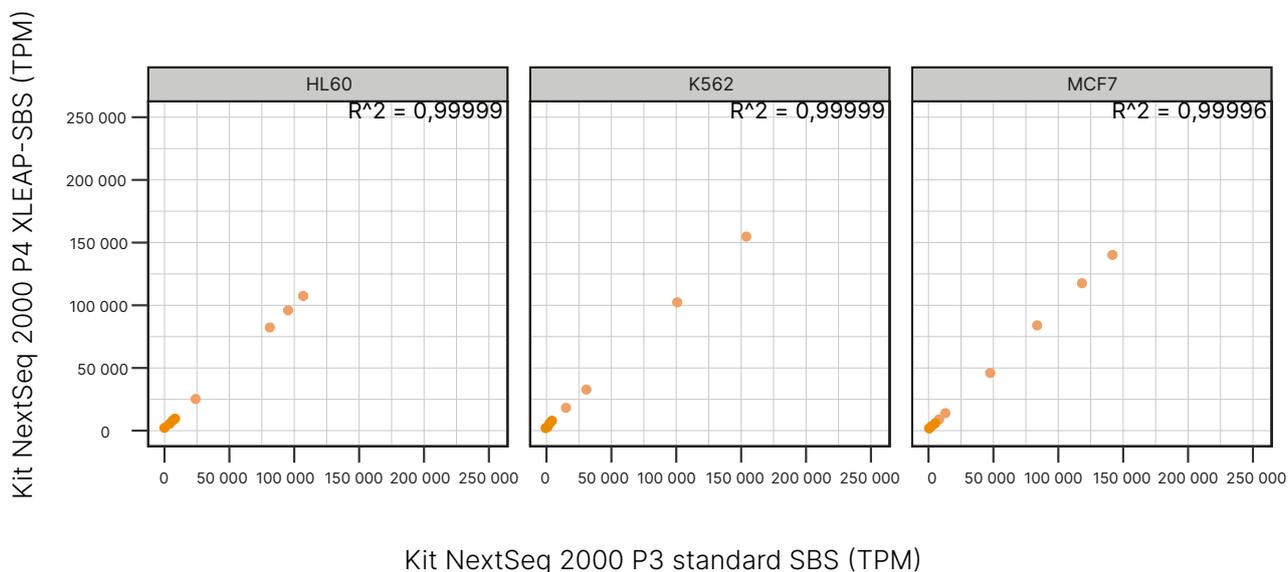


Figura 1: Correlaciones del transcriptoma completo entre la química de XLEAP-SBS y SBS estándar: se analizaron las transcripciones por millón (TPM) para las líneas celulares cancerosas, HL-60, K562 y MCF7, y se demostró la concordancia de los perfiles de expresión genética para la química de XLEAP-SBS frente a las librerías emparejadas de ARN-Seq total de SBS estándar.

### scRNA-Seq

Los criterios de medición del rendimiento de scRNA-Seq muestran que los kits de reactivos XLEAP-SBS y los kits de reactivos SBS estándar en NextSeq 2000 System cumplieron las expectativas de calidad de los datos (tabla 3). El mayor rendimiento de los reactivos de P4 XLEAP-SBS puede permitir tanto una mayor amplitud de cobertura (más células por muestra) como una mayor profundidad de cobertura (más lecturas por

celda), lo que afecta al número de genes detectados y a la mediana de los recuentos de identificadores moleculares únicos (UMI, unique molecular identifier) por celda (tabla 3). Los gráficos de t-SNE para la expresión genética de scRNA-Seq (figura 2) muestran una excelente correlación entre los kits de reactivos XLEAP-SBS y los kits de reactivos SBS estándar.

Tabla 3: Criterios de medición del análisis principal y secundario para scRNA-Seq

|  | Química de P3 SBS estándar | Química de P3 XLEAP-SBS | Química de P4 XLEAP-SBS |         |
|--|----------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|
| N.º de lecturas reducidas                  | 75 M                       | 75 M                    | 75 M                    | 112,5 M |
| Bases de la lectura 1 $\geq$ Q30           | 95,25 %                    | 96,46 %                 | 96,81 %                 | 96,81 % |
| Bases de la lectura 2 $\geq$ Q30           | 95,00 %                    | 96,10 %                 | 96,15 %                 | 96,15 % |
| Tasa de error de la lectura 1              | 0,05 %                     | 0,06 %                  | 0,06 %                  | 0,06 %  |
| Tasa de error de la lectura 2              | 0,15 %                     | 0,14 %                  | 0,15 %                  | 0,15 %  |
| N.º de genes detectados                    | 27 715                     | 27 735                  | 27 753                  | 28 474  |
| Mediana de los recuentos de IUM por célula | 30 332                     | 30 275                  | 30 568                  | 39 121  |

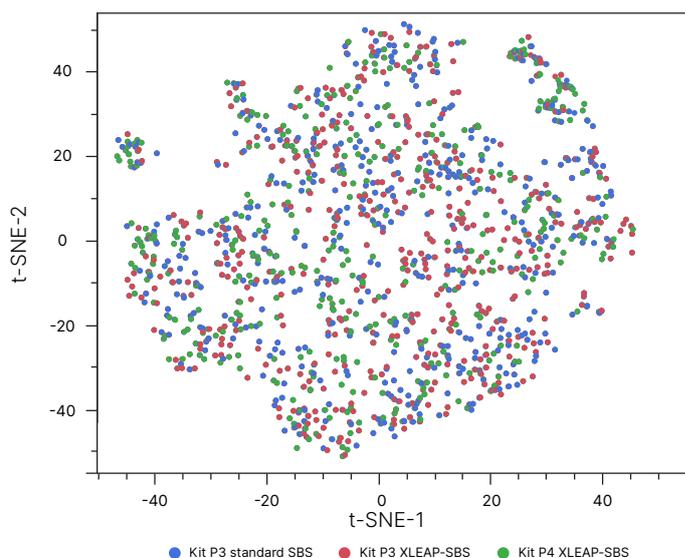


Figura 2: Resultados uniformes de expresión genética de células individuales: gráficos de t-SNE para librerías de scRNA-Seq para reactivos P3 XLEAP-SBS (rojo), reactivos P4 XLEAP-SBS (verde) y reactivos SBS estándar P3 (azul) en NextSeq 2000 System. El solapamiento sugiere una elevada concordancia entre las químicas de XLEAP-SBS y SBS estándar.

## IR-Seq

NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 ciclos) puede generar 400 M de lecturas, mientras que SBS NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 ciclos) estándar solo genera 300 M de lecturas. El aumento del rendimiento de los reactivos XLEAP-SBS P2 proporciona una mayor flexibilidad y profundidad experimentales para IR-Seq.

Los reactivos de 600 ciclos XLEAP-SBS P2 produjeron un mayor porcentaje de lecturas con puntuaciones de calidad  $\geq Q30$  en comparación con los reactivos de 600 ciclos de SBS P2 estándar en NextSeq 2000 System (figura 3). En el caso de IR-Seq, ambas químicas obtuvieron resultados de alta calidad que cumplían o superaban las especificaciones del mercado.

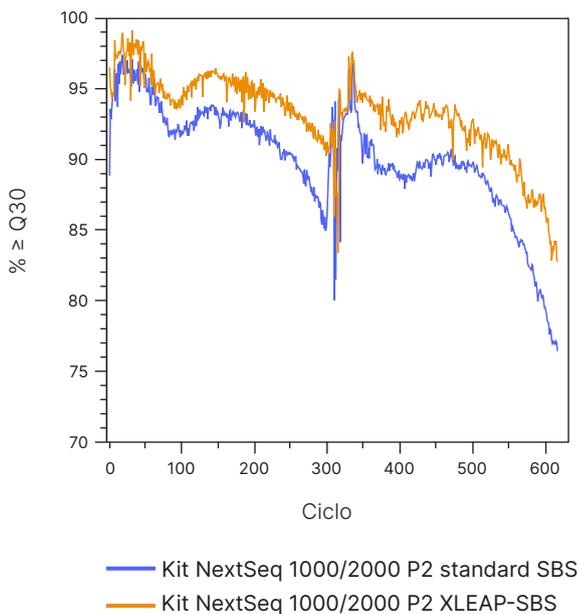


Figura 3: Secuenciación de repertorio inmunitario de alta calidad: puntuaciones de calidad para IR-Seq para reactivos XLEAP-SBS (naranja) y reactivos SBS estándar (azul) en NextSeq 2000 System. Las mejoras en la calidad, especialmente en los extremos de las lecturas, permiten una mayor cobertura y detección de clonotipos, lo que convierte a los kits XLEAP-SBS de 600 ciclos en los kits de 600 ciclos de mayor calidad del mercado.

Los reactivos de XLEAP-SBS P2 demostraron un porcentaje medio de bases superior a Q30 y tasas de error más bajas en comparación con los reactivos de SBS P2 estándar (tabla 4). La química de XLEAP-SBS también dio como resultado una mayor calidad al final de las lecturas (tabla 4), lo que mejora la sensibilidad de detección clonal porque IR-Seq depende de la superposición de "paired-end" para obtener un rendimiento óptimo.

Estas mejoras en la calidad y la productividad proporcionan una mayor confianza en las señales de repertorio observadas de conjuntos de datos complejos. En general, las características del repertorio (isotipo, longitud de CDR3 y frecuencia del gen V) se mantuvieron uniformes en los reactivos NextSeq 2000 (datos no mostrados).

Tabla 4: Criterios de medición del experimento de secuenciación para mRNA-Seq

|  | Química de P2 SBS estándar | Química de P2 XLEAP-SBS |
|--|----------------------------|-------------------------|
| Lecturas que pasan el filtro por muestra       | 390 M                      | 499 M                   |
| Rendimiento                                    | 240 Gb                     | 306 Gb                  |
| Configuración del experimento                  | 2 × 300 pb                 | 2 × 300 pb              |
| Media de Q30                                   | 90 %                       | 93 %                    |
| Tasa de errores media                          | 0,35 %                     | 0,28 %                  |
| Lectura 1 de Q30 (últimos 10 ciclos)           | 85,70 %                    | 91,14 %                 |
| Lectura 2 de Q30 (últimos 10 ciclos)           | 77,06 %                    | 83,59 %                 |
| Tasa de error de lectura 1 (últimos 10 ciclos) | 0,96 %                     | 0,57 %                  |
| Tasa de error de lectura 2 (últimos 10 ciclos) | 1,02 %                     | 0,79 %                  |

## Resumen

La química de XLEAP-SBS en los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000 ofrece capacidades de secuenciación ampliadas con mayor rendimiento, tiempos de experimento más rápidos y una mejor calidad en comparación con SBS estándar, a la vez que mantiene la facilidad de uso y reduce los costes. Los datos de los métodos clave que se suelen ejecutar en los sistemas NextSeq 1000 y NextSeq 2000, entre los que se incluyen secuenciación del exoma, RNA-Seq total, scRNA-Seq e IR-Seq, se compararon directamente con los datos generados mediante la química de SBS estándar. Los resultados demuestran que el rendimiento con los kits de reactivos NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS cumple o supera el rendimiento del kit SBS estándar.

## Más información

[NextSeq 1000 Sequencing System y NextSeq 2000 Sequencing System](#)

[Datos de demostración en BaseSpace Sequence Hub](#)

## Bibliografía

1. National Institute of Standards and Technology. Genome in a Bottle. [nist.gov/programs-projects/genome-bottle](https://nist.gov/programs-projects/genome-bottle). Fecha de consulta: 27 de julio de 2023.
2. Genome Reference Consortium. Human Genome Overview. Sitio web del NCBI. [ncbi.nlm.nih.gov/grc/human](https://ncbi.nlm.nih.gov/grc/human). Fecha de consulta: 27 de julio de 2023.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) | [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02330 ESP v1.0