

La chimica XLEAP-SBS™ amplia le capacità di NextSeq™ 1000 System e NextSeq 2000 System

Maggiore precisione e tempi
di esecuzione più rapidi
rispetto all'SBS standard per
applicazioni chiave

- Sequenziamento dell'esoma
- Sequenziamento dell'RNA totale
- Sequenziamento dell'RNA di singole cellule
- Sequenziamento per il repertorio della risposta immunitaria

illumina®

Introduzione

La chimica XLEAP-SBS rappresenta un passo avanti a livello di rapidità, fiducia ed efficacia verso la comprovata chimica del sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) offerta da Illumina. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sfruttano la chimica XLEAP-SBS per ampliare le capacità e le prestazioni di sequenziamento con output più elevati, tempi di corsa più brevi e qualità migliorata, mantenendo al contempo un flusso di lavoro semplice. La chimica XLEAP-SBS abilita la cella a flusso NextSeq 2000 P4, offrendo il più alto output mai ottenuto con uno strumento da banco Illumina, nonché miglioramenti della qualità e dei tempi di risposta per le celle a flusso P1, P2 e P3.

Questa nota tecnica dimostra che la chimica XLEAP-SBS su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System assicura una qualità dei dati che eguaglia o supera quella della chimica SBS standard per metodi chiave, tra cui il sequenziamento dell'esoma, il sequenziamento dell'RNA totale, il sequenziamento dell'RNA di singole cellule e il sequenziamento del repertorio della risposta immunitaria.

Metodi

Sequenziamento dell'esoma

Le librerie degli esomi sono state preparate a partire da DNA genomico (gDNA, genomic DNA) NA12878 (Coriell Institute for Medical Research) utilizzando Illumina DNA with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation (Illumina, n. di catalogo 20077595 e 20077596), catturando le regioni genomiche target del Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20100989) e NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20100993), utilizzando una configurazione della corsa di 2 × 101 bp (24 campioni per corsa). Per il confronto, le stesse librerie sono state sequenziate anche su NextSeq 2000 System con NextSeq 2000 P3 Reagents (200 cycles) SBS standard (Illumina, n. di catalogo 20040560) e configurazione della corsa di 2 × 101 bp (24 campioni per corsa).

L'analisi secondaria dei dati è stata eseguita utilizzando i flussi di lavoro basati sul cloud della pipeline di arricchimento DRAGEN™ v4.2.7 (per i reagenti XLEAP-SBS) e della pipeline di arricchimento DRAGEN v3.10.4 (per i reagenti SBS standard). L'accuratezza dell'identificazione di varianti è stata valutata mediante

confronto con la serie veritiera del National Institute of Standards and Technology (NIST) Genome in A Bottle (GiAB) v4.2.1 e il genoma di riferimento hg38-alt-masked.^{1,2} I dati di sequenziamento sono stati sottocampionati a 30 milioni di coppie di letture per campione per confrontare le prestazioni di identificazione delle varianti del kit di reagenti XLEAP-SBS con quelle del kit di reagenti SBS standard.

Sequenziamento dell'RNA totale (RNA-Seq totale)

Le librerie di RNA totale sono state preparate a partire da RNA della linea cellulare della leucemia, ossia HL-60 (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo AM7836) e K562 (BioChain, n. di catalogo R1255820-50), ed RNA della linea cellulare del cancro mammario, ossia MCF7 (BioChain, n. di catalogo R1255830-50) utilizzando Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero™ Plus (Illumina, n. di catalogo 20040529).

Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con i kit di reagenti NextSeq 2000 P3 e P4 XLEAP-SBS (200 cicli) e configurazione della corsa di 2 × 76 bp (18 campioni per corsa). Per il confronto, le stesse librerie sono state sequenziate anche su NextSeq 2000 System con il kit di reagenti NextSeq 2000 P3 SBS standard (200 cicli) e configurazione della corsa di 2 × 76 bp (18 campioni per corsa). Tutte le corse sono state eseguite utilizzando la ricetta per cicli dark Illumina Total RNA.

L'analisi secondaria dei dati è stata eseguita utilizzando il flusso di lavoro basato sul cloud della pipeline DRAGEN RNA v4.2.7. I dati di sequenziamento sono stati sottocampionati a 10 milioni di letture per tutti i campioni ai fini del confronto dei dati di espressione genica, comparando i profili di RNA totale della chimica XLEAP-SBS con le librerie standard abbinate a SBS per queste linee cellulari ben definite. I trascritti per milione (TPM, Transcripts Per Million) rappresentano l'espressione di ciascun trascritto normalizzato per lunghezza del trascritto e profondità del sequenziamento.

Sequenziamento dell'RNA di singole cellule (scRNA-Seq, single-cell RNA Sequencing)

I campioni per l'scRNA-Seq sono stati preparati a partire da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) umano crioconservate di una donatrice sana (di età compresa tra 25 e 30 anni) ottenute da AllCells. Le librerie di scRNA-Seq (16 replicati) sono state preparate utilizzando Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10x Genomics, n. di catalogo 1000269) secondo la guida per l'utente di Chromium (CG000315 Rev E).

Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con i kit di reagenti NextSeq 2000 P3 e P4 XLEAP-SBS (100 cicli) (Illumina, n. di catalogo 20100990 e 20100994 rispettivamente). Ai fini del confronto, le stesse librerie sono state sequenziate anche su NextSeq 2000 System con il kit di reagenti NextSeq 2000 P3 SBS standard (100 cicli) (Illumina, n. di catalogo 20040559). Le configurazioni della corsa sono state effettuate in base ai parametri forniti da 10x Genomics: lettura 1 a 28 cicli, letture degli indici i7 e i5 a 10 cicli e lettura 2 a 90 cicli. La concentrazione di caricamento era di 650 pM, con aggiunta dell'1% di PhiX.

L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la pipeline Cell Ranger v8.0.0 (10x Genomics). I dati di sequenziamento sono stati sottocampionati a 75 milioni o 112,5 milioni di letture dopo il completamento della generazione di FASTQ.

Sequenziamento per il repertorio della risposta immunitaria (IR-Seq, Immune Repertoire Sequencing)

I campioni per l'IR-Seq sono stati preparati in serie, diluendo una miscela di nove linee di cellule B con PBMC aggregate isolate da tre donatori umani sani. Le librerie sono state preparate utilizzando SMART-Seq Human BCR (con UMI) Kit (Takara Bio USA, n. di catalogo 634777) con 25 ng di RNA totale. Le preparazioni indipendenti delle librerie sono state eseguite in triplicato per ciascun punto di diluizione e infine raggruppate in un'unica libreria di sequenziamento.

Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS P2 Reagent Kit (600 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20100987) e configurazione della corsa di 2 × 300 bp. Per il confronto, le stesse librerie sono state sequenziate anche su NextSeq 2000 System con NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20075295) SBS standard e configurazione della corsa di 2 × 300 bp.

I dati di sequenziamento sono stati normalizzati a 250.000 letture/campione ed elaborati in clonotipi mediante Cogent NGS Immune Profiler Software v1.6. (Takara Bio USA) con un cutoff UMI stabilito a 2 e ulteriormente analizzati con VDJTools v1.2.1 (MiLaboratories).

Risultati

Sequenziamento dell'esoma

Le metriche dell'analisi primaria e secondaria del sequenziamento dell'esoma, inclusi i punteggi qualitativi, il tasso di errore, l'uniformità della copertura e la precisione e il richiamo, sono state valutate sia per le varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) sia per inserzioni-delezioni (indel). Sia i kit di reagenti XLEAP-SBS che i kit di reagenti SBS standard hanno fornito dati di alta qualità e identificato le varianti con elevata precisione; le corse XLEAP-SBS hanno mostrato più letture e resa più elevata, punteggi Q migliorati e tassi di errore inferiori (tabella 1). Le metriche secondarie hanno mostrato richiamo e precisione indel ed SNV comparabili, dimostrando la concordanza tra le due chimiche (tabella 1).

Tabella 1: metriche di analisi primaria e secondaria per il sequenziamento dell'esoma

	Chimica SBS standard P3	Chimica XLEAP-SBS P3	Chimica XLEAP-SBS P4
Letture single-end	1,4 miliardi	1,4 miliardi	2,1 miliardi
Resa	307 Gb	309 Gb	445 Gb
Configurazione della corsa	2 × 101 bp	2 × 101 bp	2 × 101 bp
Q30 lettura 1	94,38%	95,97%	95,92%
Q30 lettura 2	93,35%	94,81%	94,54%
Tasso di errore lettura 1	0,18%	0,11%	0,10%
Tasso di errore lettura 2	0,18%	0,16%	0,15%
Arricchimento lettura	87%	86%	86%
Uniformità di copertura	96,3%	96,4%	96,9%
Precisione SNV	0,993	0,994	0,993
Richiamo SNV	0,981	0,981	0,980
Precisione indel	0,94	0,95	0,96
Richiamo indel	0,93	0,93	0,93

RNA-Seq totale

Per l'RNA-Seq totale, sia i kit di reagenti XLEAP-SBS che i kit di reagenti SBS standard hanno fornito dati di alta qualità (tabella 2). I kit XLEAP-SBS hanno mostrato un numero maggiore di cluster che attraversano il filtro, punteggi Q migliorati e tassi di errore ridotti rispetto ai

reagenti SBS standard. La quantificazione dei trascritti ha mostrato un'eccellente concordanza tra le due chimiche ($R^2 > 0,99$) (figura 1).

Tabella 2: metriche della corsa di sequenziamento per l'RNA-Seq totale

	Chimica SBS standard P3	Chimica XLEAP-SBS P3	Chimica XLEAP-SBS P4
Lecture single-end	1,4 miliardi	1,4 miliardi	2,1 miliardi
Resa	245 Gb	245 Gb	349 Gb
Configurazione della corsa	2 × 76 bp	2 × 76 bp	2 × 76 bp
Q30 lettura 1	94,5%	95,9%	95,8%
Q30 lettura 2	92,9%	93,9%	93,8%
Tasso di errore lettura 1	0,11%	0,08%	0,07%
Tasso di errore lettura 2	0,14%	0,12%	0,13%

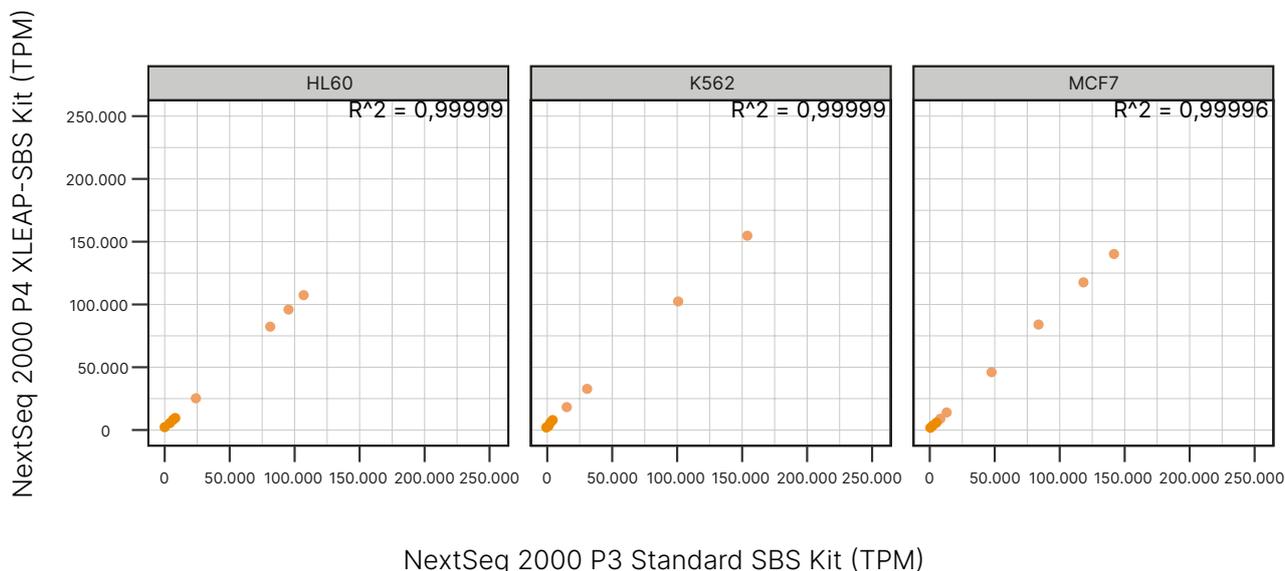


Figura 1: correlazioni dell'intero trascrittoma tra chimica XLEAP-SBS e chimica SBS standard. Sono stati analizzati i trascritti per milione (TPM) per le linee cellulari tumorali, HL-60, K562 e MCF7 ed è stata dimostrata la concordanza dei profili di espressione genica tra la chimica XLEAP-SBS e le librerie SBS standard abbinate all'RNA-Seq totale.

scRNA-Seq

Le metriche delle prestazioni dell'scRNA-Seq mostrano che i kit di reagenti XLEAP-SBS e i kit di reagenti SBS standard sul NextSeq 2000 System hanno soddisfatto le aspettative di qualità dei dati (tabella 3). L'output più elevato dei reagenti P4 XLEAP-SBS può consentire sia una maggiore ampiezza di copertura (più cellule per campione) sia una maggiore profondità di copertura

(più letture per cellula), incidendo sul numero di geni rilevati e sulle conte medie per cellula di identificatori molecolari univoci (UMI, Unique Molecular Identifier) (tabella 3). I grafici t-SNE per l'espressione genica dell'scRNA-Seq (figura 2) mostrano un'eccellente correlazione tra i kit di reagenti XLEAP-SBS e i kit di reagenti SBS standard.

Tabella 3: metriche di analisi primaria e secondaria per l'scRNA-Seq

	Chimica SBS standard P3	Chimica XLEAP-SBS P3	Chimica XLEAP-SBS P4	
N. letture sottocampionate	75 milioni	75 milioni	75 milioni	112,5 milioni
Basi lettura 1 ≥ Q30	95,25%	96,46%	96,81%	96,81%
Basi lettura 2 ≥ Q30	95,00%	96,10%	96,15%	96,15%
Tasso di errore lettura 1	0,05%	0,06%	0,06%	0,06%
Tasso di errore lettura 2	0,15%	0,14%	0,15%	0,15%
N. geni rilevati	27.715	27.735	27.753	28.474
Mediana conteggi UMI per cellula	30.332	30.275	30.568	39.121

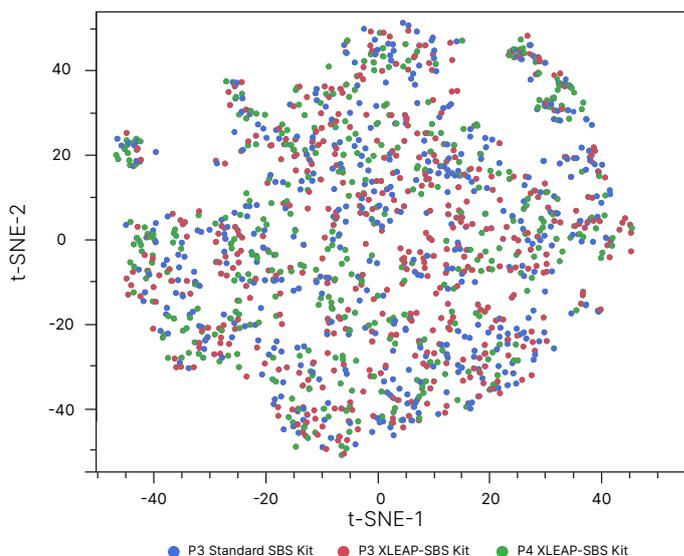


Figura 2: risultati coerenti dell'espressione genica a singola cellula. Grafici t-SNE relativi alle librerie di scRNA-Seq per i reagenti P3 XLEAP-SBS (rosso), i reagenti P4 XLEAP-SBS (verde) e i reagenti P3 SBS standard (blu) su NextSeq 2000 System. La sovrapposizione suggerisce un'elevata concordanza tra chimica XLEAP-SBS e chimica SBS standard.

IR-Seq

NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) può generare 400 milioni di letture, mentre i prodotti NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 cycles) SBS standard generano solo 300 milioni di letture. L'output più elevato dei reagenti XLEAP-SBS P2 offre maggiore flessibilità e profondità sperimentali per l'IR-Seq.

I reagenti XLEAP-SBS P2 a 600 cicli hanno prodotto una percentuale più alta di letture con punteggi di qualità maggiori o uguali a Q30 rispetto ai reagenti P2 a 600 cicli SBS standard su NextSeq 2000 System (figura 3). Per l'IR-Seq, entrambe le chimiche hanno prodotto risultati di alta qualità che hanno soddisfatto o superato le specifiche di mercato. I reagenti XLEAP-SBS P2 hanno dimostrato una percentuale media più elevata

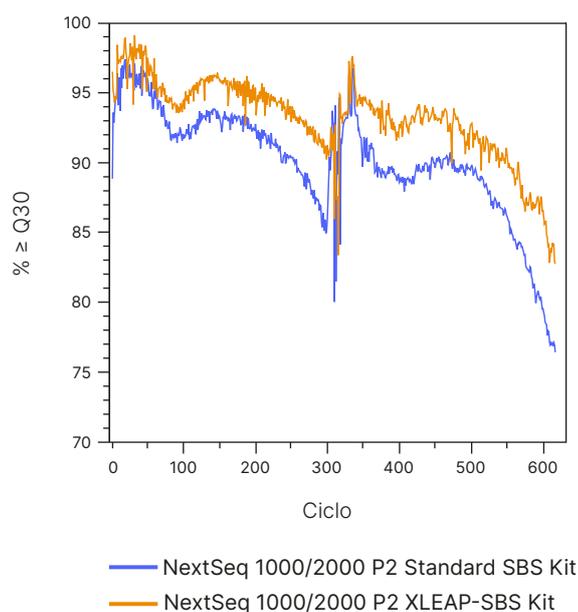


Figura 3: sequenziamento di alta qualità del repertorio immunitario. Punteggi di qualità relativi all'IR-Seq per i reagenti XLEAP-SBS (arancione) e i reagenti SBS standard (blu) su NextSeq 2000 System. I miglioramenti a livello di qualità, soprattutto alle estremità delle letture, consentono una maggiore copertura e un miglior rilevamento dei clonotipi, rendendo i kit XLEAP-SBS da 600 cicli i kit da 600 cicli della più alta qualità sul mercato.

di basi maggiori di Q30 e tassi di errore inferiori rispetto ai reagenti P2 SBS standard (tabella 4). La chimica XLEAP-SBS ha inoltre prodotto una qualità più elevata alle estremità delle letture (tabella 4); ciò migliora la sensibilità di rilevamento clonale in quanto l'IR-Seq si basa sulla sovrapposizione delle estremità accoppiate per ottenere prestazioni ottimali.

Questi miglioramenti nella qualità e nella processività rendono più affidabili i segnali del repertorio osservati a partire da set di dati complessi. Nel complesso, le caratteristiche del repertorio (isotipo, lunghezza CDR3 e frequenza del gene V) sono rimaste coerenti tra i reagenti NextSeq 2000 (dati non mostrati).

Tabella 4: metriche della corsa di sequenziamento per l'IR-Seq

	Chimica SBS standard P2	Chimica XLEAP-SBS P2
Letture che attraversano il filtro per ciascun campione	390 milioni	499 milioni
Resa	240 Gb	306 Gb
Configurazione della corsa	2 × 300 bp	2 × 300 bp
Q30 medio	90%	93%
Percentuale media di errore	0,35%	0,28%
Q30 lettura 1 (ultimi 10 cicli)	85,70%	91,14%
Q30 lettura 2 (ultimi 10 cicli)	77,06%	83,59%
Tasso di errore lettura 1 (ultimi 10 cicli)	0,96%	0,57%
Tasso di errore lettura 2 (ultimi 10 cicli)	1,02%	0,79%

Riepilogo

La chimica XLEAP-SBS su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offre funzionalità di sequenziamento ampliate con output più elevati, tempi di corsa più brevi e qualità migliorata rispetto all'SBS standard, mantenendo la facilità d'uso e riducendo i costi. I dati ottenuti con i metodi chiave comunemente eseguiti su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System, inclusi sequenziamento dell'esoma, RNA-Seq totale, scRNA-Seq e IR-Seq, sono stati confrontati direttamente con i dati generati utilizzando la chimica SBS standard. I risultati mostrano che le prestazioni con i kit di reagenti NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS uguagliano o superano le prestazioni dei kit SBS standard.

Maggiori informazioni

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

[Dati dimostrativi su BaseSpace Sequence Hub](#)

Bibliografia

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). Consultato il 27 luglio 2023.
2. Genome Reference Consortium. Human Genome Overview. Sito Web NCBI. [ncbi.nlm.nih.gov/grc/human](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human). Consultato il 27 luglio 2023.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.
Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02330 ITA v1.0