

DNA Prep d'Illumina

Flux de travail intégré et rapide pour une large gamme d'applications du séquençage du génome humain entier aux amplicons, plasmides et espèces microbiennes.

Points saillants

- Flux de travail rapide de préparation de bibliothèques**
 Économisez du temps et minimisez la durée de manipulation des points de contact avec la tagmentation sur bille, qui permet de réduire le temps de préparation des bibliothèques à < 3 heures
- Entrée d'échantillons intégrée**
 Plus grande efficacité lors de la préparation de bibliothèques grâce à des protocoles d'extraction d'ADN intégrés pour le sang, la salive et les taches de sang séché
- Flux de travail flexible avec une large plage d'entrée d'ADN**
 Simplification des opérations quotidiennes grâce à une trousse qui prend en charge une large plage d'entrée d'ADN, (1 à 500 ng), plusieurs types d'entrée d'ADN et des génomes de petites à grandes tailles
- Vaste gamme d'applications**
 Séquençage de génomes humains ou d'autres génomes complexes/de grande taille ainsi que d'amplicons et d'espèces microbiennes, parasitaires ou fongiques
- Optimisation du rendement de la préparation des bibliothèques**
 Tailles d'insert cohérentes et uniformité de couverture élevée quel que soit le niveau d'expérience de l'utilisateur

Introduction

Bien que les avancées de la technologie de séquençage nouvelle génération (SNG) ont accéléré les progrès de la recherche en génomique, de nombreux laboratoires ont encore des problèmes d'engorgement à l'étape de la préparation des bibliothèques du flux de travail de SNG. Comme de multiples étapes précèdent et suivent la préparation des bibliothèques, de nombreux laboratoires doivent composer avec d'importants délais avant de pouvoir lancer le processus de séquençage. Les étapes précédant la préparation des bibliothèques comprennent l'extraction, la quantification et la fragmentation de l'ADN, tandis que celles qui la suivent comprennent les évaluations de la qualité, la quantification et la normalisation des bibliothèques.

Les trousse Nextera^{MC} DNA Library Preparation ont introduit la chimie de tagmentation qui a combiné les étapes de fragmentation d'ADN et de ligation des adaptateurs en une réaction unique de 15 minutes et a réduit le temps de préparation des bibliothèques à 90 minutes. Grâce au lancement des trousse Nextera XT DNA Library Preparation, plus besoin de quantifier les bibliothèques avant leur regroupement et séquençage.¹ La dernière révolution en matière de chimie de préparation des bibliothèques d'Illumina est arrivée : la trousse DNA Prep d'Illumina¹. La chimie unique incluse dans la trousse DNA Prep d'Illumina (figure 1, tableau 1) regroupe les étapes d'extraction et de fragmentation de l'ADN, ainsi que de préparation et de normalisation des bibliothèques pour procurer le flux de travail le plus rapide et le plus souple de la gamme de préparation de bibliothèques d'Illumina (figure 2, tableau 2).

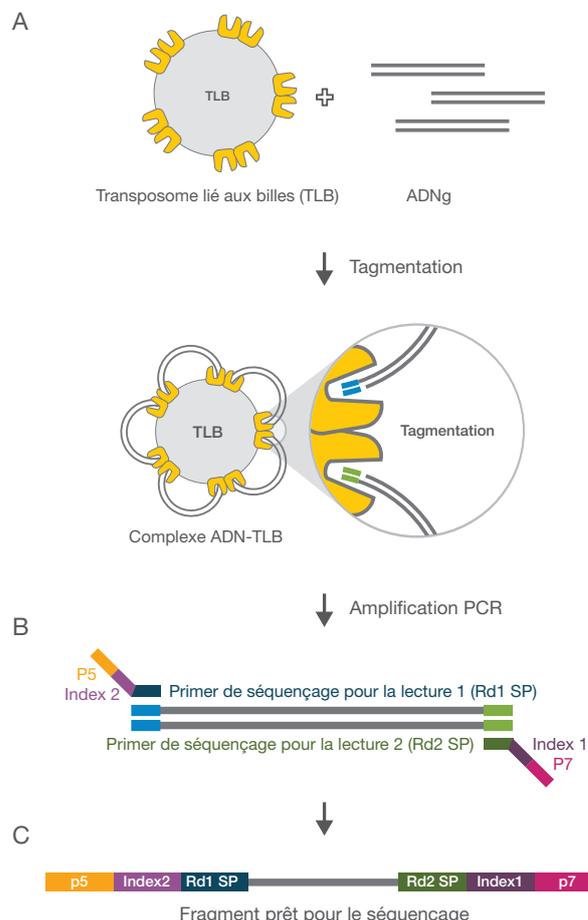


Figure 1: Chimie de transposome lié aux billes d'Illumina : (A) les transposomes liés aux billes servent d'agent médiateur pour que la fragmentation d'ADNg et l'ajout des primers de séquençage d'Illumina puissent s'opérer simultanément. (B) la procédure PCR à nombre réduit de cycles amplifie les fragments d'ADN prêts pour le séquençage et ajoute les index et les adaptateurs. (C) les fragments prêts pour le séquençage sont lavés et regroupés.

Tableau 1: Caractéristiques de la trousse DNA Prep d'Illumina

Paramètre	Trousse DNA Prep d'Illumina
Type d'entrée d'ADN	ADNg, sang, salive, amplicons PCR, plasmides, taches de sang séché
Exigence d'entrée d'ADN	1 à 500 ng, génomes de petite taille 100 à 500 ng, génomes de grande taille
Multiplexage des échantillons	24 index simples, 384 index doubles
Systèmes de séquençage pris en charge	Tous les systèmes d'Illumina
Durée totale du flux de travail de préparation de bibliothèques (ADNg) ^a	3 à 4 heures

a. Comprend l'extraction d'ADN, la préparation des bibliothèques et les étapes de normalisation et de regroupement des bibliothèques.

* Ancienne trousse Nextera DNA Flex Library Preparation

TruSeq Nano

Extraction d'ADN	Quant. d'ADN	Frag. d'ADN	Préparation de bibliothèques avec ligation des adaptateurs et marquage des index	Quantification de la bibliothèque	Normalisation et regroupement manuels	Env. 11 heures DTFT
1 h	0,5 h	1 h	6 h	0,5 h	2 h	

Nextera XT

Extraction d'ADN	Quant. d'ADN	Préparation de bibliothèques avec Nextera Tagmentation	Normalisation et regroupement à billes	Env. 5,5 heures DTFT
1 h	0,5 h	2,5 h	1,5 h	

DNA Prep d'Illumina

Extraction d'ADN	Quant. d'ADN	Préparation de bibliothèques avec tagmentation Nextera et normalisation intégrée	~ 4 heures DTFT
1 h	0,5 h	2,5 h	

DNA Prep d'Illumina (sang, salive)

Trousse Flex Lysis	Préparation de bibliothèques avec tagmentation Nextera et normalisation intégrée sans quantification	Env. 3 heures DTFT
0,5 h	2,5 h	

Figure 2 : DNA Prep d'Illumina produit le flux de travail le plus rapide d'Illumina : calculs basés sur le traitement de 16 échantillons à la fois avec une pipette multicanaux. DTFT = Durée totale du flux de travail de l'extraction d'ADN à la normalisation et regroupement des bibliothèques. Durée des étapes du flux de travail calculé en fonction de méthodes spécifiques : extraction d'ADN (trousse QIAamp DNA Mini Kit ou trousse Flex Lysis), quantification d'ADN (Qubit), fragmentation d'ADN (Covaris) et normalisation et regroupement de bibliothèques manuelles (Bioanalyzer). Les durées peuvent varier selon le matériel utilisé, le nombre d'échantillons traités, l'automatisation des procédures et le niveau d'expérience de l'utilisateur. Les étapes du flux de travail en gris ne sont pas incluses dans les trousse de préparation de bibliothèques

Tableau 2: Comparaison des flux de travail de préparation de bibliothèques d'ADN d'Illumina

	TruSeq Nano	Nextera XT	DNA Prep d'Illumina ^{a,b}
Lyse d'ADN intégrée incluse	—	—	✓
Plage d'entrée d'ADN large et flexible	—	—	✓
Normalisation des bibliothèques incluse	—	✓	✓
Entrée d'ADN	100 à 200 ng	1 ng	1 à 500 ng
Durée totale de préparation des bibliothèques ^c	11 heures	5 heures	3 à 4 heures
Taille des inserts	350 pb ou 550 pb	< 300 pb	300 à 350 pb
Multiplexage des échantillons	96 index doubles	384 index doubles	24 index simples 384 index doubles

a. Protocoles d'extraction d'ADN intégrés disponibles pour le sang, la salive et les échantillons DBS.

b. Normalisation des bibliothèques à ≥ 100 ng d'entrée d'ADN.

c. La durée totale de préparation des bibliothèques comprend l'extraction d'ADN, la préparation des bibliothèques et les étapes de normalisation et de regroupement des bibliothèques.

En plus de procurer un flux de travail rapide, le trousse DNA Prep d'Illumina offre une grande souplesse en matière de type d'entrée, de quantité d'entrée et de prise en charge d'une vaste gamme d'applications. Du séquençage du génome entier (SGE) aux petits plasmides microbiens, la trousse DNA Prep d'Illumina offre une couverture uniforme du génome grâce à la précision éprouvée de la chimie de séquençage par synthèse (SBS) d'Illumina².

Flux de travail rapide et flexible de préparation de bibliothèques

La trousse DNA Prep d'Illumina combine plusieurs fonctionnalités pour offrir le flux de travail de préparation de bibliothèques le plus rapide de la gamme Illumina. Une avancée majeure de la chimie d'Illumina

est la tagmentation sur bille, qui utilise des transposomes liés aux billes pour médier une réaction de tagmentation plus uniforme en comparaison aux réactions de tagmentation en solution. Une fois les transposomes liés aux billes saturés d'ADN, aucune autre tagmentation ne peut se produire, ce qui permet un processus de normalisation basée sur la saturation hautement uniforme. Cette stratégie procure de nombreux avantages importants :

- La quantification précise de l'échantillon d'ADN initial n'est pas requise pour les entrées d'ADN de 100 à 500 ng. La taille des fragments d'insert d'ADN n'est pas affectée par l'entrée d'ADN dans cette plage, ce qui permet d'économiser du temps et de réduire les coûts associés à des processus de quantification encombrants
- La tagmentation sur billes élimine le besoin d'étapes de fragmentation mécanique ou enzymatique de l'ADN séparées, ce qui permet d'économiser du temps et de réduire les coûts associés aux instruments de cisaillement ou aux trousse enzymatiques
- Pour les entrées d'ADN de 100 à 500 ng, la tagmentation sur billes résulte en une normalisation d'ADN basée sur la saturation, ce qui permet d'éliminer la nécessité de longues étapes de quantification et de normalisation de chaque bibliothèque avant leur regroupement

En outre, le flux de travail convivial réduit le nombre d'étapes de manipulation et prend en charge les systèmes de manipulation des liquides pour l'automatisation de la préparation des bibliothèques. Ces avancées produisent un flux de travail avec le plus petit nombre d'étapes et à la durée totale la plus rapide de la gamme Illumina (figure 2).

Entrée d'ADN intégrée

Grâce aux trousse DNA Prep d'Illumina et aux trousse de réactifs Flex Lysis, l'extraction d'ADN peut être effectuée directement à partir d'échantillons de sang frais ou de salive. Les trousse de réactifs Flex Lysis optionnels ont été optimisés et validés pour DNA Prep d'Illumina et les étapes du flux de travail, les réactifs ainsi que les instructions du guide de l'utilisateur ont été entièrement intégrés pour une performance optimale. Les protocoles de lyse sont préparés avec des réactifs pratiques à base de billes, requièrent moins de 30 minutes de durée de manipulation et alimentent directement la réaction de tagmentation de la trousse DNA Prep d'Illumina.

Optimisation du rendement de la préparation des bibliothèques

Les propriétés de la tagmentation sur bille ont permis d'importantes améliorations en matière de rendement de la préparation des bibliothèques. La trousse DNA Prep d'Illumina produit des tailles d'insert (300 à 350 pb) hautement uniformes et cohérentes à l'échelle d'une large plage d'entrée d'ADN (1 à 500 ng) (figure 3). La tagmentation sur bille permet la génération de tailles d'insert uniformes à l'échelle d'une large plage d'entrée, ce qui élimine la nécessité d'optimiser le rapport transposome sur ADN afin de contrôler la longueur des fragments. En outre, la large plage d'entrée d'ADN procure la souplesse nécessaire à la réalisation d'expériences sur divers types d'échantillons, y compris les échantillons précieux. En plus de tailles d'insert uniformes, la tagmentation sur bille offre également des rendements de bibliothèques uniformes et cohérents à l'échelle d'une large plage d'entrées d'ADN (100 à 500 ng) (figure 4). Près du niveau d'entrée d'ADN de 100 ng, ou exactement à ce niveau, les billes deviennent saturées, conduisant à des rendements cohérents et normalisés, ce qui permet d'éviter d'avoir à consacrer du temps à la quantification et à la normalisation des bibliothèques préalablement à leur regroupement. Après avoir comparé les performances des trousse DNA Prep d'Illumina et TruSeq^{MC} Nano DNA Prep, la trousse DNA Prep d'Illumina a produit des résultats comparables à ou, pour certaines mesures, meilleurs que la fragmentation mécanique (tableau 3).

Au delà des améliorations du flux de travail grâce à la technologie à base de billes, l'avantage le plus important de tailles d'insert cohérents et uniformes et du rendement des bibliothèques est une couverture plus égale et uniforme du génome pour les espèces humaines et non humaines (figure 5). Même les génomes avec un contenu de GC élevé ou faible démontre une couverture remarquablement uniforme sans biais spécifique à la région (figure 5B).

Tableau 3: Performance de la trousse DNA Prep d'Illumina

Paramètre ^a	DNA Prep d'Illumina	TruSeq Nano
Lectures appariées passant le filtre	3,7 × 10 ⁸	3,7 × 10 ⁸
Appelabilité de l'autosome	96,5 %	96,9 %
Appelabilité des exons de l'autosome	98,4 %	98,4 %
Couverture de l'autosome > 10X	98,5 %	98,6 %
Rappel SNV	98,7 %	98,7 %
Précision SNV	99,8 %	99,7 %
Rappel des indels	93,7 %	92,9 %
Précision des indels	97,0 %	94,9 %

a. L'analyse a été effectuée sur 20 échantillons (tous les échantillons NA12878 Coriell) répartis sur 5 analyses pour approximer les versions du génome humain 30x. L'analyse des données a été effectuée avec les applications BaseSpace^{MC} Whole Genome Sequencing v6.0.0 et Variant Calling Assessment Tool v3.0.0. SNV : variant à simple nucléotide; indel : variant à insertion/délétion.

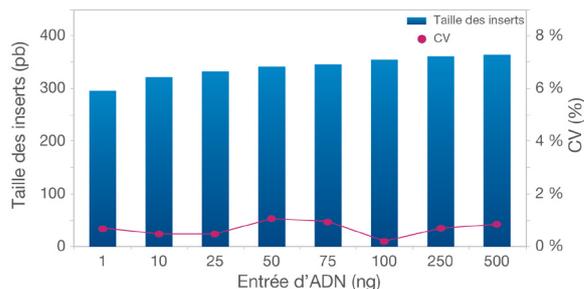


Figure 3 : Tailles d'insert uniformes et constantes : la tagmentation sur bille produit des tailles d'insert cohérentes, peu importe la quantité d'entrées d'ADN. Pour une entrée d'ADN de 1 à 500 ng, le coefficient de variation (CV) total est de 6,09 %. Les bibliothèques produites à partir de souches d'*E. coli* reproduisent les échantillons traités à l'aide de la trousse DNA Prep d'Illumina. Analyse réalisée sur un système MiSeq^{MC} (analyse de 2 × 76 pb).

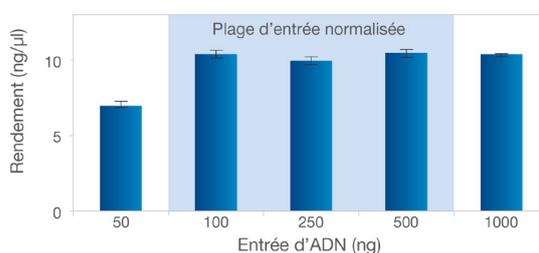


Figure 4 : Bibliothèques fragmentées par tagmentation et normalisées : les billes deviennent saturées à un niveau égal ou supérieur à 100 ng, produisant un rendement normalisé d'ADN fragmenté par tagmentation. La normalisation d'ADN tagmenté élimine la nécessité d'étapes de normalisation des bibliothèques en aval. Les bibliothèques produites à partir d'échantillons humains NA12878 (Coriell Institute) avec DNA Prep d'Illumina. Analyse réalisée sur un système MiSeq^{MC} (analyse de 2 × 76 pb).

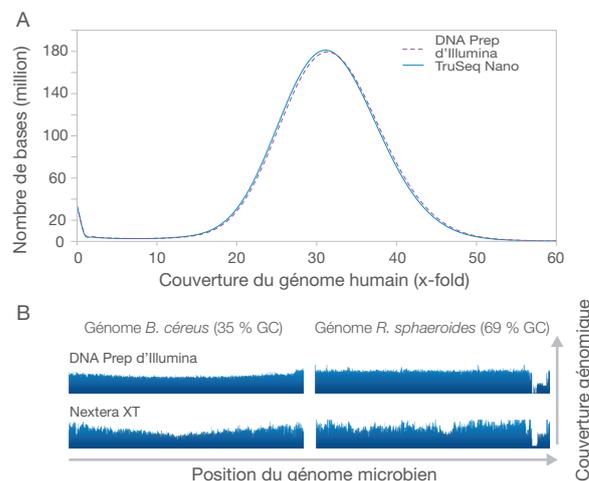


Figure 5: DNA Prep d'Illumina améliore l'uniformité de la couverture : (A) DNA Prep d'Illumina fournit une couverture uniforme du génome comparable à la trousse TruSeq Nano DNA. Bibliothèques produites à partir d'échantillons humains NA12878 (Coriell Institute) avec les trousse DNA Prep d'Illumina ou TruSeq Nano. Séquençage réalisé sur un système HiSeq^{MC} (2 × 151 pb). (B) la couverture est indiquée pour les micro-organismes avec un contenu en GC extrêmement élevé ou faible. Grâce à la chimie améliorée de préparation de bibliothèques sur bille, DNA Prep d'Illumina démontre une couverture plus uniforme que Nextera XT. Préparation des bibliothèques avec les trousse Nextera XT ou DNA Prep d'Illumina. Les données ont été générées sur un système HiSeq^{MC} 2500 (Rapid Run v2, 2 × 151 pb).



	Séquençage du génome humain entier	Génomes complexes de grande taille	Génomes de petite taille
Applications de séquençage	<ul style="list-style-type: none"> Recherche en génomique du cancer Détection des variants Études du risque génétique Génétique des populations 	<ul style="list-style-type: none"> Agri-génomique (maïs, blé, bovin, etc.) Organismes modèles (mouche des cerises, souris, fouille-roche, etc.) Recherche végétale/animale 	<ul style="list-style-type: none"> Microbiome humain Microbiologie/meta-génomique Recherche en santé publique Séquençage des amplicons
Exemples de séquençage	<ul style="list-style-type: none"> Génome humain (3,2 Gb), 30x, trousse S2, système NovaSeq^{MC}, 8 échantillons/Flow Cell Génome humain (3,2 Gb), > 30x, système HiSeq X v2.5, 8 échantillons/Flow Cell 	<ul style="list-style-type: none"> Génome de mouche des cerises (175 Mb), 30x, trousse v2, système NextSeq^{MC} 550, 22 échantillons/Flow Cell Génome de souris (2,7 Gb), 30x, trousse v1, systèmes HiSeq 4000, 8 échantillons/Flow Cell 	<ul style="list-style-type: none"> Génome <i>E. coli</i> (4,6 Mb), 30x, système MiniSeq^{MC}, 50 échantillons/Flow Cell Plasmides/amplicons (650 kb), système MiSeq 1000x, 11 échantillons/Flow Cell

Figure 6: Large gamme d'applications avec DNA Prep d'Illumina : du séquençage du génome humain entier et de génomes complexes/de grande taille à de petits génomes microbiens, DNA Prep d'Illumina offre une flexibilité expérimentale.

Le flux de travail flexible permet une large gamme d'applications

L'avantage le plus important de la trousse DNA Prep d'Illumina est sans doute la flexibilité qu'elle offre pour une large gamme d'applications et d'intérêts de recherche. La trousse peut notamment servir au séquençage du génome humain entier, à la recherche sur la génomique du cancer, à la métagénomique environnementale, à la recherche sur les maladies infectieuses, à l'agrigénomique et plus encore (figure 6). Que ce soit pour le séquençage de génomes complexes de grande taille, de génomes de petite taille, de plasmides, d'amplicons, de bactéries à Gram positif ou négatif, de champignons ou d'un éventail d'espèces végétales et animales, DNA Prep d'Illumina procure une couverture complète du génome. Le flux de travail conviviale et flexible s'adapte au niveau d'expérience de l'utilisateur, à différentes applications et à plusieurs types d'entrée d'échantillons.

Résumé

La trousse DNA Prep d'Illumina offre un flux de travail révolutionnaire qui combine l'extraction, la quantification et la fragmentation d'ADN, de même que la normalisation des bibliothèques, ce qui en fait le flux de travail de préparation de bibliothèques le plus rapide et le plus souple de toute la gamme Illumina. Le flux de travail convivial et compatible avec l'automatisation s'adresse aux utilisateurs de tous les niveaux d'expérience et procure un cadre commun pour un éventail de conceptions expérimentales. La chimie de tagmentation sur bille permet de prendre en charge une large plage de quantités d'entrées d'ADN, divers types d'échantillons et une vaste gamme d'applications, notamment le séquençage du génome humain entier, la métagénomique environnementale, les recherches sur les animaux et les végétaux, le profilage des tumeurs et plus encore. Voyez comment le flux de travail novateur de la trousse DNA Prep d'Illumina, utilisé de concert avec la puissante chimie SBS d'Illumina, peut accélérer l'avancement de vos objectifs de recherche dès aujourd'hui.

En savoir plus

Pour en savoir plus sur DNA Prep d'Illumina, consultez le site www.illumina.com/illumina-dna-prep.

Pour plus de renseignements sur le séquençage du génome entier avec DNA Prep d'Illumina, consultez les notes relatives à l'application du séquençage du génome humain entier et à l'application séquençage microbien du génome entier.

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
DNA Prep d'Illumina, (M) tagmentation (24 échantillons)	20018704
DNA Prep d'Illumina, (M) tagmentation (96 échantillons)	20018705
Trousse de réactifs Flex Lysis	20018706
IDT 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 le Nextera DNA UD Indexes d'Illumina – ensemble C (96 index, 96 échantillons)	20027215
IDT pour le Nextera DNA UD Indexes d'Illumina – ensemble D (96 index, 96 échantillons)	20027216
IDT pour le Nextera DNA UD Indexes d'Illumina – ensemble A-D (384 index, 384 échantillons)	20027217
IDT pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina – ensemble C, tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20042666 Bientôt disponible
IDT pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina – ensemble D, tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20042667 Bientôt disponible
Index CD DNA Nextera (24 index, 24 échantillons)	20018707
Index CD DNA Nextera (96 index, 96 échantillons)	20018708
« IDT pour DNA/RNA UD Indexes d'Illumina » remplace « IDT pour le Nextera DNA UD Indexes d'Illumina »; le contenu des troussees reste inchangé.	

Références

- Illumina (2014). Fiche technique de la trousse Nextera XT DNA Library Preparation. Consulté le 14 avril, 2020.
- Bentley D. R., Balasubramanian S., Swerdlow H. P., et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008; 456 : 53-59.