

XLEAP-SBS™ - Chemie erweitert die Funktionen des NextSeq™ 1000 System und des NextSeq 2000 System

Höhere Genauigkeit und kürzere
Laufzeiten im Vergleich zu
Standard-SBS bei wichtigen
Anwendungen

- Exomsequenzierung
- RNA-Sequenzierung
- Einzelzell-RNA-Sequenzierung
- Immunrepertoire-Sequenzierung



Einleitung

XLEAP-SBS-Chemie ist eine schnellere, hochwertigere und robustere Weiterentwicklung der bewährten SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) von Illumina. Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System zeichnen sich dank der XLEAP-SBS-Chemie durch erweiterte Sequenzierungsfunktionen und eine höhere Sequenzierungsperformance mit größerer Ausgabe, kürzeren Laufzeiten sowie verbesserter Qualität aus und gewährleisten zugleich einen einfachen Workflow. Die XLEAP-SBS-Chemie ermöglicht in der NextSeq 2000 P4-Fließzelle die bisher höchste Leistung auf einem Illumina-Tischgerät sowie Verbesserung bei Qualität und Durchlaufzeit für P1-, P2- und P3-Fließzellen.

Der vorliegende technische Hinweis zeigt, dass die XLEAP-SBS-Chemie auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System Daten mit einer Qualität liefert, die jene von Standard-SBS-Chemie bei wichtigen Methoden erfüllt oder übertrifft, darunter Exomsequenzierung, RNA-Sequenzierung, Einzelzell-RNA-Sequenzierung und Immunrepertoire-Sequenzierung.

Methoden

Exomsequenzierung

Die Exombibliotheken wurden aus der genomischen DNA (gDNA) NA12878 (Coriell Institute for Medical Research) unter Verwendung von Illumina DNA with Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation (Illumina, Katalog-Nr. 20077595 und 20077596) vorbereitet und haben die vom Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel untersuchten Regionen erfasst.

Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit dem NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20100989) und dem NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20100993) unter Verwendung einer Laufkonfiguration mit 2×101 bp (24 Proben pro Lauf). Zum Vergleich wurden dieselben Bibliotheken auch auf dem NextSeq 2000 System mit dem Standard-Kit SBS NextSeq 2000 P3 Reagents (200 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20040560) unter Verwendung einer Laufkonfiguration mit 2×101 bp (24 Proben pro Lauf) sequenziert.

Die Sekundäranalyse der Daten erfolgte anhand von Cloud-Workflows mit der DRAGEN™ Enrichment-Pipeline v4.2.7 (für XLEAP-SBS-Reagenzien) und der DRAGEN Enrichment-Pipeline v3.10.4 (für Standard-SBS-Reagenzien).

Die Genauigkeit des Variant-Callings wurde anhand der Referenz Genome in A Bottle (GiAB) v4.2.1 des National Institute of Standards and Technology (NIST) und des Referenzgenoms hg38-alt-masked bewertet.^{1,2} Sequenzierungsdaten wurden einem Downsampling auf 30 Mio. Read-Paare pro Probe unterzogen, um die Variant-Calling-Performance von XLEAP-SBS und Standard-SBS-Reagenzienkits zu vergleichen.

RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Die RNA-Bibliotheken wurden aus Leukämiezelllinien-RNA vorbereitet: HL-60 (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. AM7836), K562 (BioChain, Katalog-Nr. R1255820-50) sowie Brustkrebszelllinien-RNA: MCF7 (BioChain, Katalog-Nr. R1255830-50) mit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero™ Plus (Illumina, Katalog-Nr. 20040529).

Die Sequenzierung erfolgt auf dem NextSeq 2000 System mit den NextSeq 2000 XLEAP-SBS-Reagenzienkits (P3 und P4, 200 Zyklen) mit einer Laufkonfiguration von 2×76 bp (18 Proben pro Lauf). Zum Vergleich wurden dieselben Bibliotheken auch auf dem NextSeq 2000 System mit dem NextSeq 2000-Standard-SBS-Reagenzienkit (P3, 200 Zyklen) unter Verwendung einer Laufkonfiguration mit 2×76 bp (18 Proben pro Lauf) sequenziert. Alle Läufe wurden mit der Illumina Total RNA-Dunkelzyklusrezeptur durchgeführt.

Die Sekundärdatenanalyse erfolgte mit dem DRAGEN RNA-Pipeline v4.2.7-Workflow in der Cloud. Die Sequenzierungsdaten für alle Proben wurden zum Vergleich der Genexpressionsdaten einem Downsampling auf 10 Mio. Reads unterzogen. Verglichen wurden hierbei die jeweiligen mit XLEAP-SBS-Chemie und mit Standard-SBS-Chemie generierten Bibliotheken für diese gut definierten Zelllinien. TPM (Transkripte pro Million) stellt die für Transkriptlänge und Sequenzierungstiefe normalisierte Expression der einzelnen Transkripte dar.

Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq, Single-cell RNA Sequencing)

Die Proben für die scRNA-Seq wurden anhand von kryokonservierten mononukleären Zellen aus peripherem menschlichem Blut (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells) einer gesunden weiblichen Spenderin (Alter zwischen 25 und 30 Jahren) vorbereitet, die von AllCells bezogen wurden. Die scRNA-Seq-Bibliotheken (16 Replikate) wurden mit den Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10x Genomics, Katalog-Nr. 1000269) gemäß dem Chromium-Benutzerhandbuch (CG000315 Rev E) vorbereitet.

Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit den NextSeq 2000 XLEAP-SBS-Reagenzienkits (P3 und P4, 100 Zyklen) (Illumina, Katalog-Nr. 20100990 bzw. 20100994). Zum Vergleich wurden die gleichen Bibliotheken auch auf dem NextSeq 2000 System mit dem NextSeq 2000-Standard-SBS-Reagenzienkit (P3, 100 Zyklen) sequenziert (Illumina, Katalog-Nr. 20040559). Laufkonfigurationen wurden gemäß den von 10x Genomics bereitgestellten Parametern eingerichtet: 28 Zyklen für Read 1, 10 Zyklen für i7- und i5-Index-Reads und 90 Zyklen für Read 2. Die Ladekonzentration betrug 650 pM, mit einem Spike-in von 1 % PhiX.

Die Datenanalyse erfolgte mit der Cell Ranger-Pipeline v8.0.0 (10x Genomics). Die Sequenzierungsdaten wurden nach Abschluss der FASTQ-Generierung einem Downsampling auf 75 Mio. oder 112,5 Mio. Reads unterzogen.

Immunrepertoire-Sequenzierung (IR-Seq)

Die Proben für IR-Seq wurden in Serie vorbereitet, wobei eine Mischung aus neun B-Zell-Linien mit gepoolten PBMCs verdünnt wurde, die aus drei gesunden menschlichen Spendern isoliert wurden. Die Bibliotheken wurden mit dem SMART-Seq Human BCR (with UMIs) Kit (Takara Bio USA, Katalog-Nr. 634777) mit 25 ng RNA vorbereitet. Unabhängige Bibliotheksvorbereitungen wurden für jeden Verdünnungspunkt dreimal durchgeführt und schließlich in einer einzigen Sequenzierungsbibliothek gepoolt.

Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit dem NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS P2 Reagent Kit (600 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20100987) mit einer Laufkonfiguration von 2 × 300 bp. Zum Vergleich wurden dieselben Bibliotheken auch auf dem NextSeq 2000 System mit dem Standard-SBS-Kit NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20075295) unter Verwendung einer Laufkonfiguration mit 2 × 300 bp sequenziert.

Die Sequenzierungsdaten wurden auf 250.000 Reads/Probe normalisiert und mit der Cogent NGS Immune Profiler Software v1.6 (Takara Bio USA) mit einem bei 2 festgelegten UMI-Cutoff zu Klonotypen verarbeitet und mit VDJTools v1.2.1 (MiLaboratories) weiter analysiert.

Ergebnisse

Exomsequenzierung

Die Primär- und Sekundäranalysemetriken für die Exomsequenzierung wurden ausgewertet, darunter Qualitäts-Scores, Fehlerrate, Coverage-Einheitlichkeit sowie Präzision und Recall für SNVs (Single-Nucleotide Variants, Einzelnukleotid-Varianten) und Indels (Insertionen/Deletionen). Sowohl die XLEAP-SBS-Reagenzienkits als auch die Standard-SBS-Reagenzienkits lieferten hochwertige Daten und ein hochpräzises Varianten-Calling, wobei XLEAP-SBS-Läufe mehr Reads und Ergebnisse, höhere Q-Scores und niedrigere Fehlerraten zeigten (Tabelle 1). Sekundäre Metriken zeigten vergleichbare Werte für Präzision und Recall bei SNVs und Indels, was die Übereinstimmung zwischen den beiden Chemietypen unterstreicht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Primär- und Sekundäranalysemetriken für die Exomsequenzierung

	P3-Standard-SBS-Chemie	P3-XLEAP-SBS-Chemie	P4-XLEAP-SBS-Chemie
Single-End-Reads	1,4 Mrd.	1,4 Mrd.	2,1 Mrd.
Ergebnis	307 Gb	309 Gb	445 Gb
Laufkonfiguration	2 × 101 bp	2 × 101 bp	2 × 101 bp
Q30 Read 1	94,38 %	95,97 %	95,92 %
Q30 Read 2	93,35 %	94,81 %	94,54 %
Fehlerrate Read 1	0,18 %	0,11 %	0,10 %
Fehlerrate Read 2	0,18 %	0,16 %	0,15 %
Read-Anreicherung	87 %	86 %	86 %
Coverage-Einheitlichkeit	96,3 %	96,4 %	96,9 %
SNV-Präzision	0,993	0,994	0,993
SNV-Recall	0,981	0,981	0,980
Indel-Präzision	0,94	0,95	0,96
Indel-Recall	0,93	0,93	0,93

RNA-Seq

Bei der RNA-Seq lieferten sowohl die XLEAP-SBS-Reagenzienkits als auch die Standard-SBS-Reagenzienkits hochwertige Daten (Tabelle 2). Die XLEAP-SBS-Kits zeigten im Vergleich zu Standard-SBS-Reagenzien mehr Cluster nach Filterung,

verbesserte Q-Scores und geringere Fehlerraten. Die Quantifizierung der Transkripte zeigte eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen den beiden Chemietypen ($R^2 > 0,99$) (Abbildung 1).

Tabelle 2: Sequenzierungslaufmetriken für die RNA-Seq

	P3-Standard-SBS-Chemie	P3-XLEAP-SBS-Chemie	P4-XLEAP-SBS-Chemie
Single-End-Reads	1,4 Mrd.	1,4 Mrd.	2,1 Mrd.
Ergebnis	245 Gb	245 Gb	349 Gb
Laufkonfiguration	2 × 76 bp	2 × 76 bp	2 × 76 bp
Q30 Read 1	94,5 %	95,9 %	95,8 %
Q30 Read 2	92,9 %	93,9 %	93,8 %
Fehlerrate Read 1	0,11 %	0,08 %	0,07 %
Fehlerrate Read 2	0,14 %	0,12 %	0,13 %

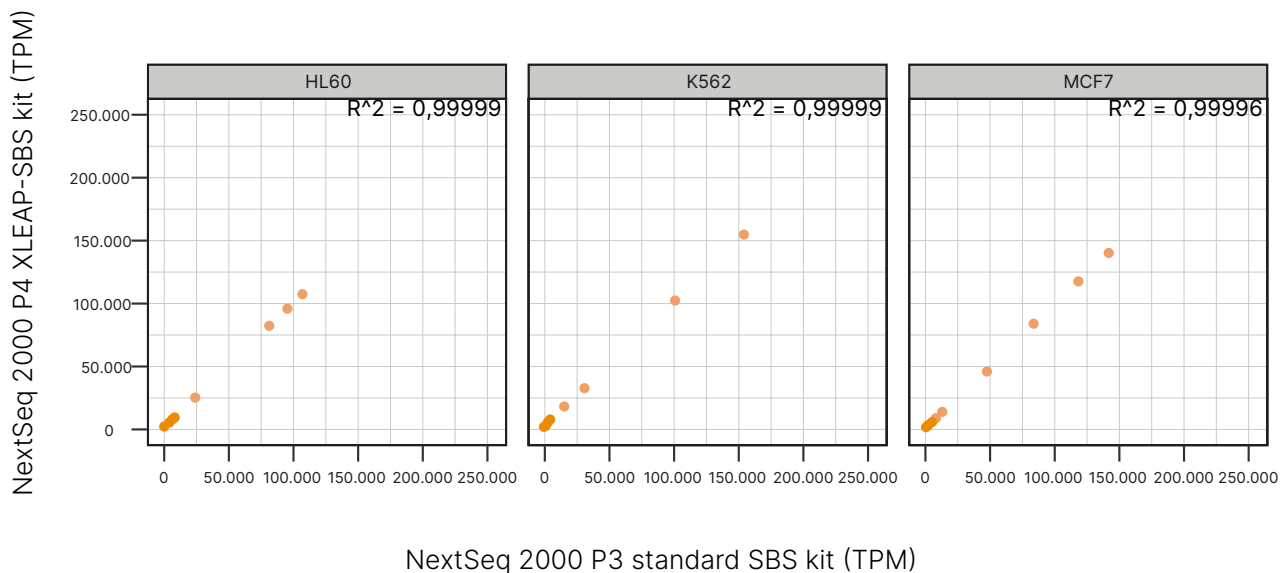


Abbildung 1: Transkriptom-Korrelationen zwischen XLEAP-SBS- und Standard-SBS-Chemie: Transkripte pro Million (TPM) für die Krebszelllinien HL-60, K562 und MCF7 wurden analysiert und zeigten eine Übereinstimmung der Genexpressionsprofile für die jeweiligen mit XLEAP-SBS- und Standard-SBS-RNA-Seq-Chemie generierten Bibliotheken.

scRNA-Seq

Die Performancemetriken für scRNA-Seq zeigen, dass XLEAP-SBS-Reagenzienkits und Standard-SBS-Reagenzienkits auf dem NextSeq 2000 System die Erwartungen an die Datenqualität erfüllen (Tabelle 3). Die höhere Ausgabe der P4-XLEAP-SBS-Reagenzien kann sowohl eine erhöhte Coverage-Breite (mehr Zellen pro Probe) als auch eine erhöhte Coverage-Tiefe

(mehr Reads pro Zelle) ermöglichen, was sich auf die Anzahl der nachgewiesenen Gene und die mittlere Anzahl der Unique Molecular Identifier (UMI) pro Zelle auswirkt (Tabelle 3). t-SNE-Plots für die scRNA-Seq-Genexpression (Abbildung 2) zeigen eine herausragende Korrelation zwischen XLEAP-SBS-Reagenzienkits und Standard-SBS-Reagenzienkits.

Tabelle 3: Primär- und Sekundäranalysenmetriken für die scRNA-Seq

	P3-Standard-SBS-Chemie	P3-XLEAP-SBS-Chemie	P4-XLEAP-SBS-Chemie	
Anzahl der Reads nach Downsampling	75 Mio.	75 Mio.	75 Mio.	112,5 Mio.
Basen Read 1 \geq Q30	95,25 %	96,46 %	96,81 %	96,81 %
Basen Read 2 \geq Q30	95,00 %	96,10 %	96,15 %	96,15 %
Fehlerrate Read 1	0,05 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %
Fehlerrate Read 2	0,15 %	0,14 %	0,15 %	0,15 %
Anzahl nachgewiesener Gene	27.715	27.735	27.753	28.474
UMI-Anzahl pro Zelle (Median)	30.332	30.275	30.568	39.121

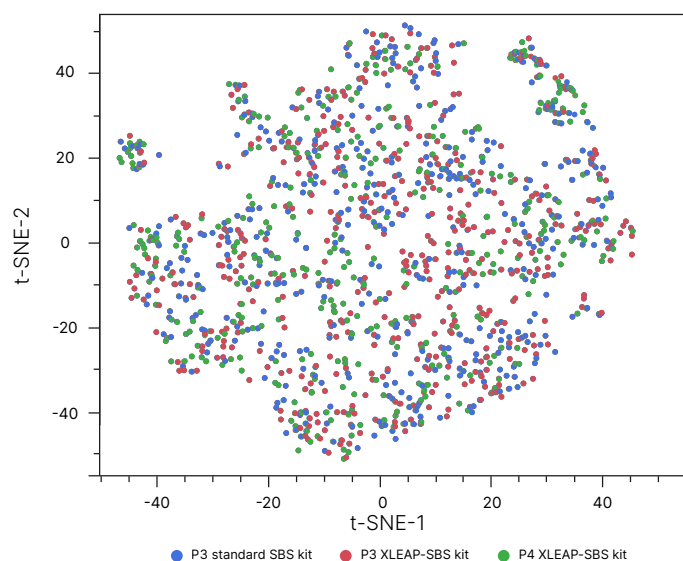


Abbildung 2: Konsistente Ergebnisse für die Genexpression: t-SNE-Plots für scRNA-Seq-Bibliotheken für P3-XLEAP-SBS-Reagenzien (rot), P4-XLEAP-SBS-Reagenzien (grün) und P3-Standard-SBS-Reagenzien (blau) auf dem NextSeq 2000 System. Die Überlappung deutet auf eine hohe Übereinstimmung zwischen XLEAP-SBS- und Standard-SBS-Chemie hin.

IR-Seq

Das NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) kann 400 Mio. Reads generieren, wogegen das Standard-SBS-Kit NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 cycles) nur 300 Mio. Reads generiert. Die höhere Ausgabe der XLEAP-SBS P2-Reagenzien bietet Flexibilität für Versuche sowie zusätzliche Tiefe für die IR-Seq.

Die XLEAP-SBS P2-Reagenzien für 600 Zyklen erzeugten im Vergleich zu den Standard-SBS-P2-Reagenzien für 600 Zyklen auf dem NextSeq 2000 System einen höheren Prozentsatz von Reads mit Qualitäts-Scores \geq Q30 (Abbildung 3). Für die IR-Seq lieferten beide Chemietypen qualitativ hochwertige Ergebnisse, die den Spezifikationen auf dem Markt verfügbarer Produkte gleichwertig waren oder diese

übertrafen. Die XLEAP-SBS P2-Reagenzien zeigten im Vergleich zu Standard-SBS-P2-Reagenzien einen höheren mittleren Prozentsatz an Basen über Q30 und niedrigere Fehlerraten (Tabelle 4). Die XLEAP-SBS-Chemie zeichnete sich zudem durch eine höhere Qualität an den Enden der Reads aus (Tabelle 4), was die Sensitivität der klonalen Detektion verbessert, da IR-Seq für optimale Ergebnisse auf Paired-End-Überlappungen angewiesen ist.

Diese Verbesserungen bei Qualität und Durchsatz erhöhen die Zuverlässigkeit von Repertoiresignalen aus komplexen Datensätzen. Insgesamt blieben die Repertoiremerkmale (Isotyp, CDR3-Länge und V-Genfrequenz) bei NextSeq 2000-Reagenzien konsistent (Daten nicht dargestellt).

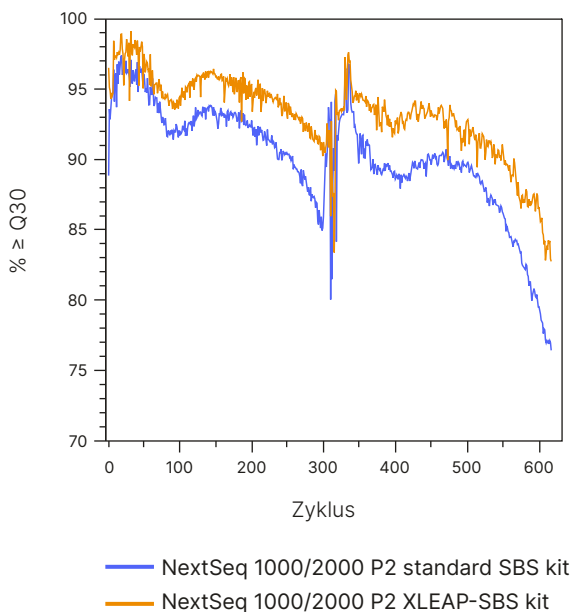


Abbildung 3: Hochwertige Immunrepertoire-Sequenzierung: Qualitäts-Scores für IR-Seq für XLEAP-SBS-Reagenzien (orange) und Standard-SBS-Reagenzien (blau) auf dem NextSeq 2000 System. Verbesserungen bei der Qualität, insbesondere an Read-Enden, ermöglichen eine erhöhte Coverage und einen besseren Nachweis von Klonotypen und machen XLEAP-SBS-Kits für 600 Zyklen zu den qualitativ hochwertigsten 600-Zyklus-Kits auf dem Markt.

Tabelle 4: Sequenzierungslaufmetriken für die IR-Seq

	P2, Standard-SBS-Chemie	P2, XLEAP-SBS-Chemie
Reads nach Filterung je Probe	390 Mio.	499 Mio.
Ergebnis	240 Gb	306 Gb
Laufkonfiguration	2 × 300 bp	2 × 300 bp
Mittelwert Q30	90 %	93 %
Mittlere Fehlerrate	0,35 %	0,28 %
Q30 Read 1 (letzte 10 Zyklen)	85,70 %	91,14 %
Q30 Read 2 (letzte 10 Zyklen)	77,06 %	83,59 %
Fehlerrate Read 1 (letzte 10 Zyklen)	0,96 %	0,57 %
Fehlerrate Read 2 (letzte 10 Zyklen)	1,02 %	0,79 %

Zusammenfassung

Die XLEAP-SBS-Chemie auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System bietet erweiterte Sequenzierungsfunktionen mit höherer Ausgabe, kürzeren Laufzeiten und höherer Qualität im Vergleich zu Standard-SBS. Die Anwenderfreundlichkeit bleibt dabei unverändert und die Kosten sind niedriger. Daten von wichtigen Verfahren, die häufig auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System durchgeführt werden, darunter Exomsequenzierung, RNA-Seq, scRNA-Seq und IR-Seq, wurden direkt mit Daten verglichen, die mit Standard-SBS-Chemie generiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die mit den NextSeq 1000/2000-XLEAP-SBS-Reagenzienkits erzielte Performance der mit Standard-SBS-Kits erzielten Performance entspricht oder diese übertrifft.

Quellen

1. National Institute of Standards and Technology. Genome in a Bottle. nist.gov/programs-projects/genome-bottle. Aufgerufen am 27. Juli 2023.
2. Genome Reference Consortium. Human Genome Overview. NCBI-Website. ncbi.nlm.nih.gov/grc/human. Aufgerufen am 27. Juli 2023.

Weitere Informationen

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

[BaseSpace Sequence Hub-Demodaten](#)



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02330 DEU v1.0