

Illumina DNA Prep

Flux de travail de préparation de
bibliothèques rapide et intégré pour
une vaste gamme d'applications
de séquençage

- Préparation des bibliothèques en moins de 3 heures avec un minimum de points de contact
- Prise en charge d'une large plage d'entrée d'ADN (1 à 500 ng) et de plusieurs types d'entrée d'ADN
- Prise en charge d'une vaste gamme d'applications avec la possibilité de séquencer des génomes de petites à grandes tailles ainsi que des amplicons

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 librairies du flux de travail de SNG. Comme de multiples étapes précèdent et suivent la préparation des librairies, de nombreux laboratoires doivent composer avec d'importants délais avant de pouvoir lancer une analyse de séquençage. Les étapes précédant la préparation des librairies 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 librairies.

Nextera^{MC} DNA Library Preparation Kit a 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 librairies à 90 minutes. Nextera XT DNA Library Prep Kit élimine la nécessité de quantifier les librairies avant leur regroupement et séquençage¹. Fondée sur ces innovations, la trousse Illumina DNA Prep Kit* offre une chimie unique (figure 1, tableau 1) qui regroupe les étapes d'extraction et de fragmentation de l'ADN, ainsi que de préparation et de normalisation des librairies pour procurer le flux de travail le plus rapide et le plus souple de la gamme de préparation de librairies d'Illumina (figure 2, tableau 2).

En plus de procurer un flux de travail rapide, Illumina DNA Prep Kit 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 (WGS, Whole-Genome Sequencing) aux petits plasmides microbiens, Illumina DNA Prep offre une couverture uniforme du génome et une qualité des données exceptionnelle.

Flux de travail de préparation des librairies rapide

Illumina DNA Prep Kit combine plusieurs fonctionnalités pour offrir le flux de travail de préparation de librairies le plus rapide de la gamme Illumina. Une avancée majeure est la tagmentation sur billes, 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.

* Anciennement, Nextera DNA Flex Library Preparation Kit.

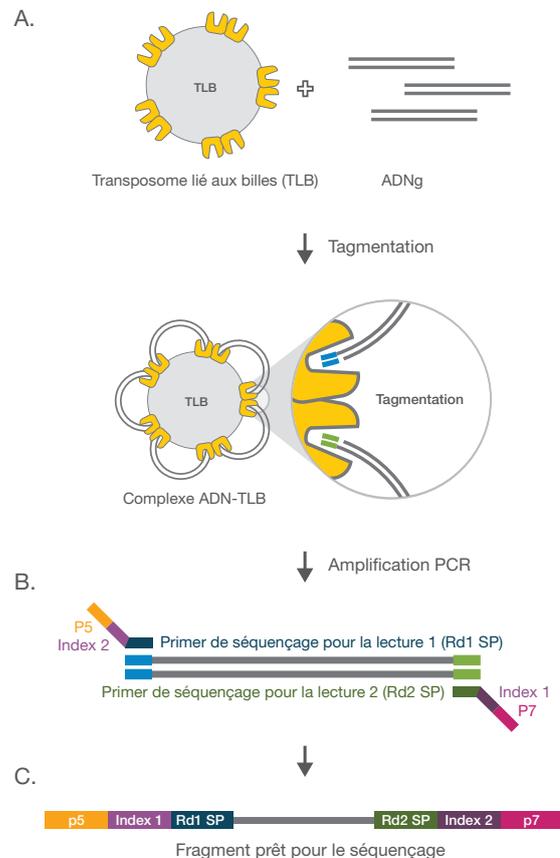


Figure 1 : Chimie de transposomes liés aux billes d'Illumina – (A) Les transposomes liés aux billes servent d'agent médiateur pour que la fragmentation d'ADNg et l'ajout des primers de séquençage puissent s'opérer simultanément. (B) La procédure PCR à nombre réduit de cycles amplifie les fragments d'ADN 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 d'Illumina DNA Prep

Paramètre	Spécification
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	384 index doubles
Systèmes de séquençage pris en charge	Tous les systèmes d'Illumina
Durée totale du flux de travail* (ADNg)	3 à 4 heures

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

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 troussez 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 librairie 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 librairies. 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).

TruSeq Nano

Extraction d'ADN	Quant. d'ADN	Frag. d'ADN	Préparation de librairies avec ligature des adaptateurs et marquage des index	Quant. de la librairie	Normalisation et regroupement manuels	Env. 11 h 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 librairies avec Nextera Tagmentation	Normalisation et regroupement sur billes	Env. 5,5 h DTFT
1 h	0,5 h	2,5 h	1,5 h	

Illumina DNA Prep

Extraction d'ADN	Quant. d'ADN	Préparation de librairies avec Nextera Tagmentation et normalisation intégrée	Env. 4 h DTFT
1 h	0,5 h	2,5 h	

Illumina DNA Prep (sang)

Flex Lysis Kit	Préparation de librairies avec Nextera Tagmentation et normalisation intégrée sans quantification	Env. 3 h DTFT
0,5 h	2,5 h	

Figure 2 : Illumina DNA Prep 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 librairies. Durée des étapes du flux de travail calculée en fonction des méthodes spécifiques : extraction d'ADN (QIAamp DNA Mini Kit ou Flex Lysis Kit), quantification d'ADN (Qubit), fragmentation d'ADN (Covaris) et normalisation et regroupement de librairies manuelles (Bioanalyzer). Les durées peuvent varier selon le matériel utilisé, le nombre d'échantillons traité, 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 troussez de préparation de librairies.

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

	TruSeq DNA Nano	Nextera XT	Illumina DNA Prep ^{a,b}
Lyse d'ADN intégrée incluse	—	—	✓
Plage d'entrée d'ADN large et flexible	—	—	✓
Normalisation de librairies incluse	—	✓	✓
Entrée d'ADN	100 à 200 ng	1 ng	1 à 500 ng
Durée totale de préparation des librairies ^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	384 index doubles

a. Des protocoles d'extraction d'ADN intégrés sont disponibles pour le sang et les échantillons DBS.

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

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

Entrée d'ADN intégrée

Grâce aux Illumina DNA Prep Kit et Flex Lysis Kit, l'extraction d'ADN peut être effectuée directement à partir d'échantillons de sang frais. Les Flex Lysis Kit optionnels ont été optimisés et validés pour être utilisés avec Illumina DNA Prep 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 l'Illumina DNA Prep.

Performance optimisée

Les propriétés de la tagmentation sur billes ont permis d'importantes améliorations en matière de rendement de la préparation des bibliothèques. Illumina DNA Prep Kit 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 billes permet la génération de tailles d'insert uniformes, 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. En plus de tailles d'insert uniformes, la tagmentation sur billes offre également des rendements de bibliothèques uniformes et cohérents (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 la performance d'Illumina DNA Prep et de TruSeq^{MC} DNA Nano Library Prep Kit, Illumina DNA Prep Kit 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 5A). Même les génomes avec un contenu de GC élevé ou faible démontrent une couverture remarquablement uniforme sans biais spécifique à la région (figure 5B).

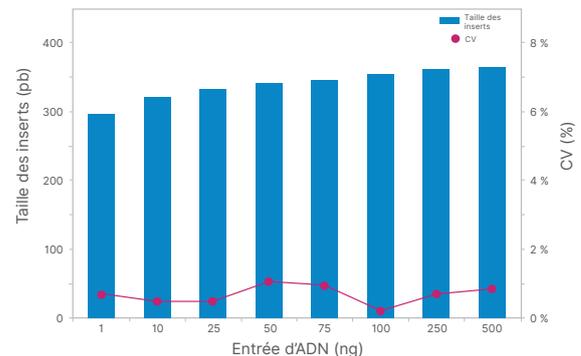


Figure 3 : Tailles d'insert uniformes et constantes –

La tagmentation sur billes produit des tailles d'insert constantes, 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 en utilisant Illumina DNA Prep et l'analyse est réalisée sur un système MiSeq^{MC} (2 × 76 pb).

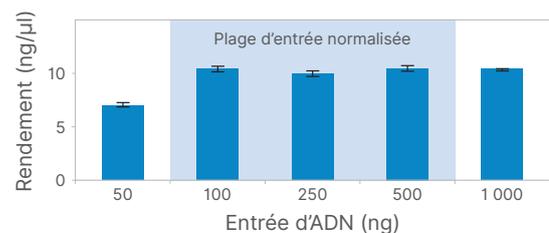


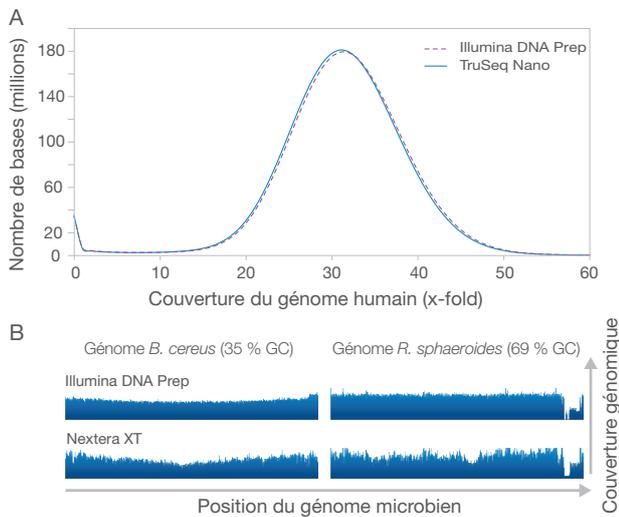
Figure 4 : Bibliothèques fragmentées par tagmentation et normalisée –

Les billes deviennent saturées à un niveau égal ou supérieur à 100 ng, produisant un rendement normalisé d'ADN fragmenté par tagmentation, ce qui élimine la nécessité d'étapes de normalisation des bibliothèques en aval. Bibliothèques produites à partir d'échantillons humains NA12878 (Coriell Institute) et analyse réalisée sur un système MiSeq (2 × 76 pb).

Tableau 3 : Performance d'Illumina DNA Prep

Paramètre ^a	Illumina DNA Prep	TruSeq Nano
Lectures appariées PF	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 des SNV	98,7 %	98,7 %
Précision des 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 mononucléotidique; indel : variant d'insertion/suppression.



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

L'avantage le plus important d'Illumina DNA Prep 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'agrégénomique 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, Illumina DNA Prep 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.

Figure 5 : Uniformité de la couverture améliorée – (A) Illumina DNA Prep fournit une couverture uniforme du génome comparable à TruSeq DNA Nano Kit. Les bibliothèques ont été produites à partir d'échantillons humains NA12878 (Coriell Institute) avec Illumina DNA Prep ou TruSeq DNA Nano Kit. Le séquençage a été réalisé sur un système HiSeq X^{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 billes, Illumina DNA Prep démontre une couverture plus uniforme que Nextera XT. Préparation des bibliothèques avec Nextera XT ou Illumina DNA Prep Kit. Les données ont été générées sur un système HiSeq^{MC} 2500 (Rapid Run v2, 2 × 151 pb).

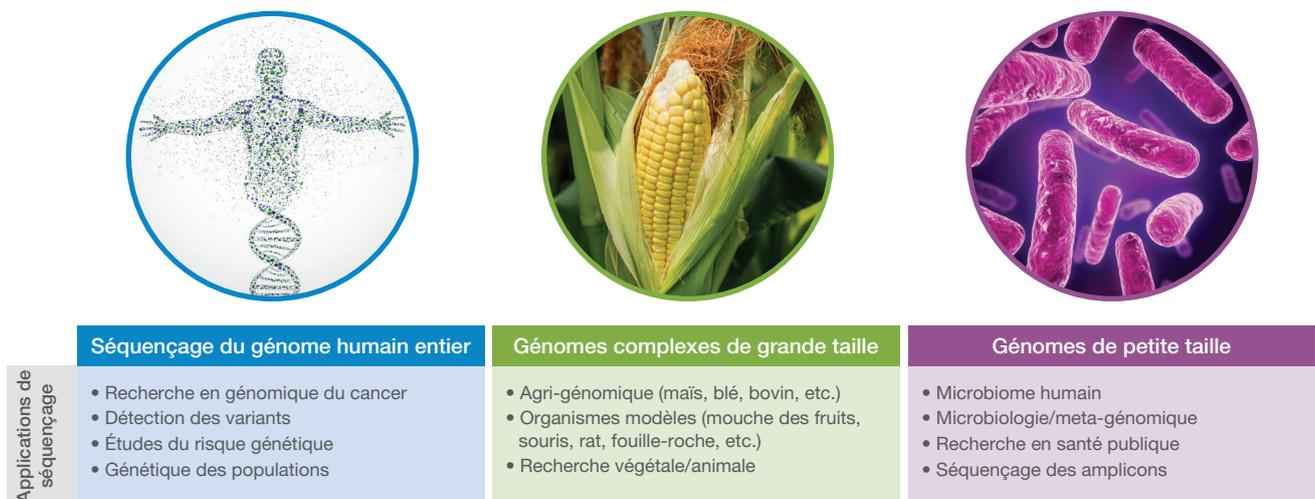


Figure 6 : Large gamme d'applications avec Illumina DNA Prep – Du séquençage du génome humain entier et de génomes complexes/ de grande taille à de petits génomes microbiens, Illumina DNA Prep offre une flexibilité expérimentale.

Résumé

ILLUMINA DNA Prep offre un flux de travail révolutionnaire qui combine l'extraction, la quantification et la fragmentation d'ADN, de même que la normalisation des librairies, ce qui en fait le flux de travail de préparation de librairies 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 billes prend 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 d'ILLUMINA DNA Prep, utilisé de concert avec la puissante chimie de SBS d'ILLUMINA, peut accélérer l'avancement de vos objectifs de recherche dès aujourd'hui.

En savoir plus

[ILLUMINA DNA Prep](#)

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
ILLUMINA DNA Prep, (M) Tagmentation (24 échantillons, IPB)	20060060
ILLUMINA DNA Prep, (M) Tagmentation (96 échantillons, IPB)	20060059
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
ILLUMINA DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091654
ILLUMINA DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091656
ILLUMINA DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091658
ILLUMINA DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20091660
Nextera DNA CD Indexes (96 index, 96 échantillons)	20018708

Référence

1. ILLUMINA. [Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#). Published November 2, 2016. Accessed August 28, 2023.



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809 4566 | Téléphone : + (1) 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 ILLUMINA, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'ILLUMINA, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-01373 FRA v1.0