

Nextera^{MC} DNA Exome

Flux de travail simple facilitant la préparation des librairies et l'enrichissement de l'exome afin d'accélérer le séquençage de l'exome humain.

Points forts

- Flexibilité dans la conception des études**
 Procédés chimiques optimisés compatibles avec une quantité faible d'ADN d'entrée
- Efficacité supérieure de la préparation des librairies et de l'enrichissement de l'exome**
 Flux de travail propice à l'automatisation axé sur la rapidité : moins de deux jours requis, dont seulement trois heures de manipulations
- Détection exacte des variants**
 Taux de couverture élevé et séquençage exact produisant des données précises
- Solution de flux de travail intégré**
 Flux de travail complet simplifiant le séquençage de l'exome, de la préparation des librairies à l'analyse des données.

Introduction

Le séquençage de l'exome est de plus en plus reconnu dans la communauté scientifique comme méthode éprouvée pouvant aider à découvrir des variants étiologiques potentiels de diverses maladies génétiques¹⁻³. Nextera DNA Exome, auparavant vendu sous le nom TruSeq^{MC} Rapid Exome Kit, offre un flux de travail de séquençage de l'exome rapide, combinant la préparation des librairies et l'enrichissement de l'exome en un seul processus simplifié n'ayant pas besoin d'équipement de cisaillement de l'ADN.

Flexibilité dans la conception des études

Nextera DNA Exome est optimisé pour 50 ng d'ADN d'entrée. Le procédé chimique amélioré emploie un transposome, pour une réduction des biais : la quantité d'ADN employée peut varier sans que la préparation des librairies et l'enrichissement de l'exome s'en ressentent (figure 1). Puisque l'enzyme transposome est très peu sensible à la quantité d'ADN d'entrée, les incohérences mineures observables lors de la quantification de l'ADN n'ont plus d'importance. La trousse prévoit le regroupement des librairies avant l'enrichissement, permettant aux laboratoires d'analyser jusqu'à 12 échantillons simultanément, selon le volume de traitement des échantillons. Nextera DNA Exome se distingue par un flux de travail propice à l'automatisation pour des traitements en laboratoire plus simples et plus efficaces.

Un contenu exonique spécifique

Nextera DNA Exome est optimisé pour offrir une couverture uniforme et spécifique de 45 Mb de contenu exonique. L'ensemble de sondes est conçu pour enrichir 214 405 exons (tableau 2). Ce modèle spécialement élaboré, accompagné d'un enrichissement uniforme particulier, permet le séquençage complet de l'exome, ainsi que l'identification fiable de variants codants vrais.

Tableau 1 : Contenu d'exome avec Nextera DNA Exome et TruSeq DNA Exome

Spécifications de couverture	Nextera DNA Exome ou TruSeq DNA Exome
Taille de la cible	45 Mb
Nbre d'exons cibles	214 405
Contenu de la cible	exons codants
Pourcentage d'exome couvert (par base de données)	
RefSeq ^a	99,45 %
CCDS ^b	98,83 %
ENSEMBL ^c	99,68 %
GENCODE v19 ^d	99,68 %

- a. RefSeq : base de données de séquences de référence de la NCBI. www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/. Source consultée le 11 février 2015.
- b. CCDS - Base de données du Consensus CDS (CCDS). www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi. Source consultée le 11 février 2015.
- c. ENSEMBL - Navigateur de génome Ensembl. www.ensembl.org/index.html. Source consultée le 11 février 2015.
- d. GENCODE - Projet GENCODE : Encyclopédie de gènes de variants génétiques. www.gencodegenes.org/. Source consultée le 11 février 2015.

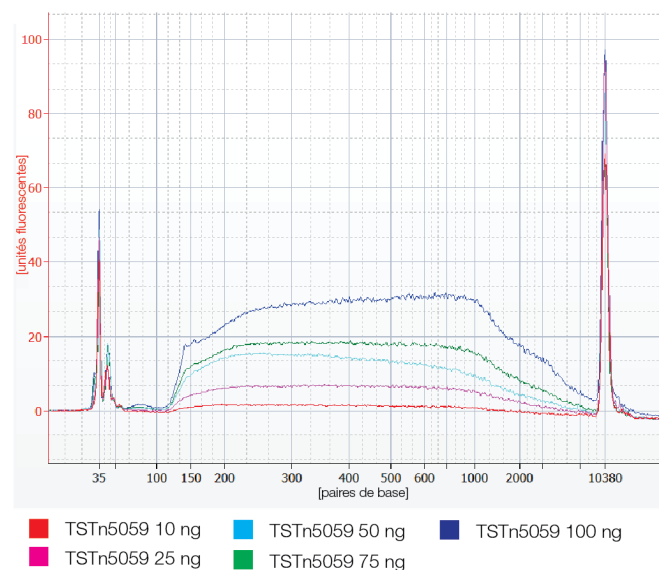


Figure 1 : Tagmentation uniforme pour quantités d'entrées variables : Le procédé chimique amélioré employant un transposome très peu sensible à la quantité d'ADN d'entrée permet de réduire les biais et d'obtenir des résultats cohérents. Les librairies ont été évaluées sur un bioanalyseur.

Préparation des librairies et enrichissement de l'exome efficaces

Nextera DNA Exome permet de réaliser la préparation des librairies et l'enrichissement de l'exome en moins de deux jours, avec seulement trois heures de manipulations (figure 3). Le processus de préparation des librairies débute par la tagmentation, qui consiste en la fragmentation de l'ADN et l'ajout simultané d'adaptateurs (figure 3A). L'ADN tagmenté est amplifié et les index de séquençage sont ajoutés par PCR (figure 3B). Il est possible de grouper jusqu'à 12 librairies; le groupe de librairies est ensuite concentré et les librairies sont dénaturées en un ADN simple brin (figure 3C). Des sondes marquées à la biotine spécifiques aux régions ciblées sont utilisées pour deux cycles d'hybridation (figures 3D et 3E). Le groupement est enrichi en fonction des régions d'intérêt à l'aide de billes de streptavidine qui se lient aux sondes biotinylées. Les fragments d'ADN biotinylés liés aux billes de streptavidine sont magnétiquement extraits de la solution. Les fragments d'ADN enrichi sont alors élués des billes et amplifiés à nouveau par PCR (figure 3F). Les librairies amplifiées sont nettoyées et préparées pour le séquençage (figure 3G).

Détection exacte des variants

Les librairies préparées avec Nextera DNA Exome offrent un taux de couverture élevé, avec 85 % des lectures couvertes à une profondeur 20x (figure 2). Avec une telle couverture, l'exactitude de la détection de variants est assurée. Plus de 99,58 % des détections de variants réalisées avec Nextera DNA Exome correspondent aux données de référence standard de la base de données du National Institute of Standards and Technology (NIST) (figure 4)^{5,6}.

Nextera DNA Exome produit en moyenne 75 % de lectures de séquençage exactes (figure 6). Par conséquent, il faut moins de cycles de séquençage pour atteindre la couverture souhaitée, mais sans que l'uniformité de celle-ci soit compromise : les résultats restent d'une grande fiabilité. Les laboratoires peuvent en outre séquencer un plus grand nombre d'exomes par analyse et tirer le meilleur parti du budget qui leur est alloué (tableau 2).

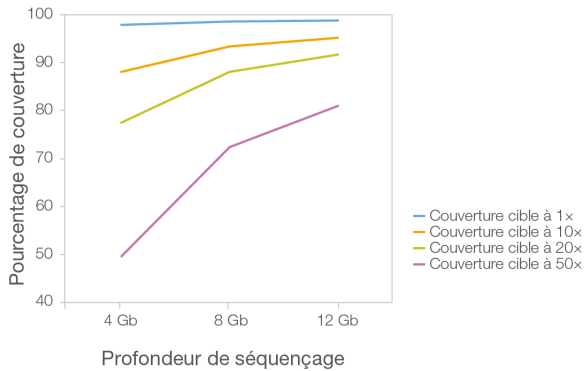


Figure 2 : Efficacité de couverture à différents profondeurs : Nextera DNA Exome offre une couverture exceptionnelle pour différents profondeurs de séquençage, avec plus de 80 % des cibles couvertes jusqu'à une profondeur de 20x.



* Illumina conseille si nécessaire de suspendre les opérations à ce moment et de reprendre le déroulement du flux le jour suivant.

Figure 3 : Flux de travail efficace et rapide : Nextera DNA Exome permet de réaliser la préparation des librairies et l'enrichissement de l'exome en moins de deux jours et comprend un point d'arrêt sécuritaire pour une flexibilité accrue.

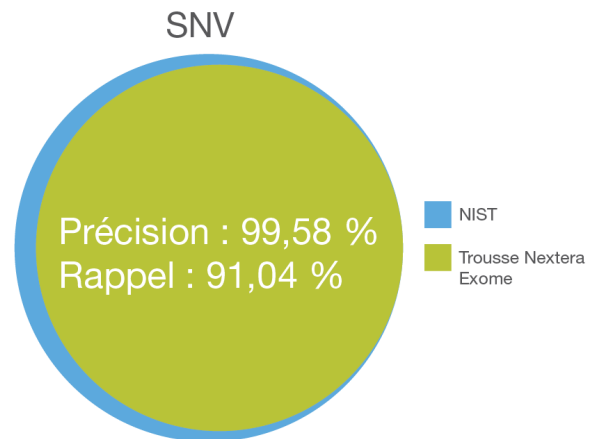


Figure 4 : Corrélation élevée avec la base de données NIST : Les détections de variant d'un seul nucléotide (SNV) réalisées avec Nextera DNA Exome manifestent une concordance élevée avec les données de référence standard. L'échantillon d'ADN NA12878 du Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) a été séquençé à une profondeur de couverture de 100x. On définit la **précision** comme la probabilité qu'un variant détecté soit exact. On définit un **rappel** comme la probabilité qu'un variant validé soit détecté.

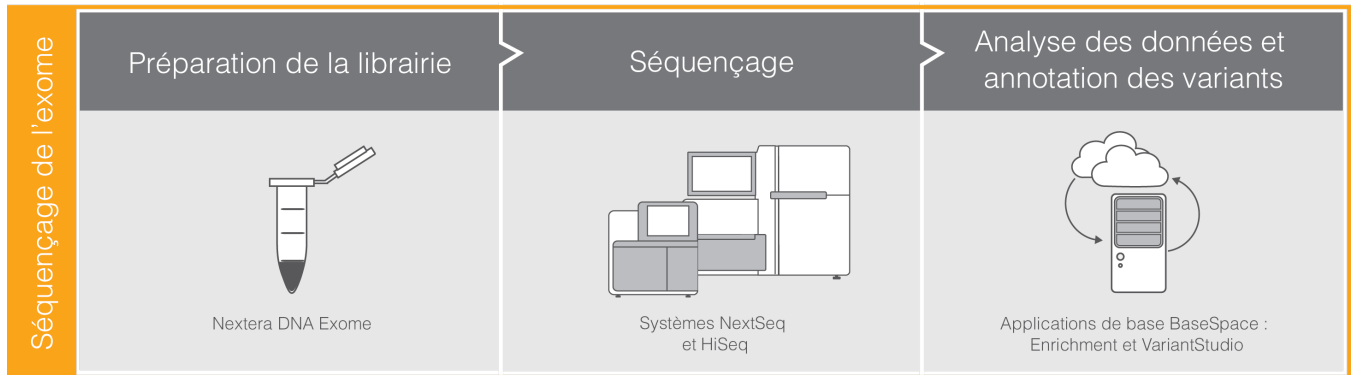


Figure 5 : Flux de travail de séquençage de l'exome : Nextera DNA Exome fait partie d'une solution intégrée de séquençage de l'exome comprenant la préparation des librairies, le séquençage et l'analyse des données.

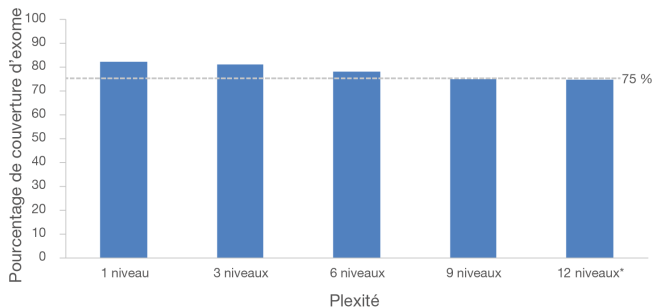


Figure 6 : Enrichissement exact : Nextera DNA Exome produit en moyenne 75 % de lectures de séquençage exactes à 4 Gp par exome, permettant de réaliser des séquençages efficaces et à coût raisonnable.

Tableau 2 : Comparaison de débits avec Nextera DNA Exome^a

Système de séquençage	Nbre d'exomes par analyse à 50x	Nbre d'exomes par analyse à 100x
Gamme MiSeq	1	s.o.
Gamme NextSeq		
Flow Cell à rendement moyen	3	2
Flow Cell à rendement élevé	12	6
Gamme HiSeq		
Mode d'analyse rapide du système HiSeq 2500 (double Flow Cell)	24	12
Mode de débit élevé du système HiSeq 2500 (double Flow Cell)	156	78
Système HiSeq 3000	96	48
Système HiSeq 4000 (double Flow Cell)	192	96

a. Le nombre estimé d'exomes séquencés par analyse est calculé avec une couverture moyenne de 50x et 100x, respectivement. Illumina recommande une longueur de lecture 2 x 75 bp sur tous les séquenceurs lorsque la trousse Nextera DNA Exome est utilisée.

Flux de travail de séquençage intégré

Nextera DNA Exome fait partie d'une solution cohésive et compatible guidant les chercheurs depuis la préparation des librairies jusqu'à l'analyse des données (figure 5). La trousse associe la préparation de librairies et l'enrichissement de l'exome, ce qui élimine la nécessité d'acheter des index, des billes de purification d'échantillons ou d'autres matériaux auxiliaires. Tous les composants de la trousse Nextera DNA Exome sont conjointement conçus, optimisés et validés de manière analytique afin de ne pas avoir à évaluer plusieurs composants disparates. Les experts scientifiques d'Illumina fournissent une source unique d'assistance technique et d'assistance sur le terrain à chaque étape du flux de travail. En rejoignant la communauté Illumina, les chercheurs peuvent profiter de l'expertise de l'équipe d'assistance d'Illumina et collaborer avec l'important réseau de scientifiques qui utilisent la technologie Illumina.

Nextera DNA Exome est compatible avec les systèmes de séquençage MiSeq^{MC}, NextSeq^{MC}, HiSeq^{MC} et NovaSeq^{MC}. Les systèmes de séquençage Illumina utilisent une chimie SBS (séquençage par synthèse), employée pour générer plus de 90 % des données de séquençage mondiales.* Les données de séquençage sont automatiquement transférées des systèmes Illumina au BaseSpace^{MD} Sequence Hub (l'environnement de calcul génomique Illumina). BaseSpace Sequence Hub élimine une grande partie de la complexité des flux de travail d'analyse traditionnels, simplifiant ainsi l'étude des données et l'interprétation biologique. BaseSpace Sequence Hub offre un écosystème établi d'outils d'analyse des données intégrés conçus pour les biologistes. Avec les applications BaseSpace, les outils d'analyse préférés des experts sont rassemblés dans une interface conviviale et intuitive, afin que les chercheurs puissent accéder à des pipelines d'analyses fiables sans expérience antérieure en bio-informatique (figure 7). Les chercheurs ont la possibilité d'analyser les données de l'exome à l'aide de l'application BWA Enrichment, qui emploie la méthode standard du secteur, BWA/GATK, ou l'application Isaac^{MC} Enrichment, qui emploie le pipeline précis et rapide d'Illumina⁶.

Pour les biologistes recherchant la base génétique d'une maladie, l'application VariantStudio permet l'identification et l'interprétation fonctionnelle des variants à simple nucléotide (SNV) ainsi que des insertions et des délétions (indels). Les chercheurs peuvent filtrer et isoler rapidement les variants subséquents pour enrichir les données de séquençage d'un contexte biologique. Les résultats significatifs sont exportés sous la forme de rapports concis. L'application VariantStudio permet aux chercheurs d'explorer l'importance biologique en quelques étapes simples.

* Calculs des données internes. Illumina, Inc., 2015.

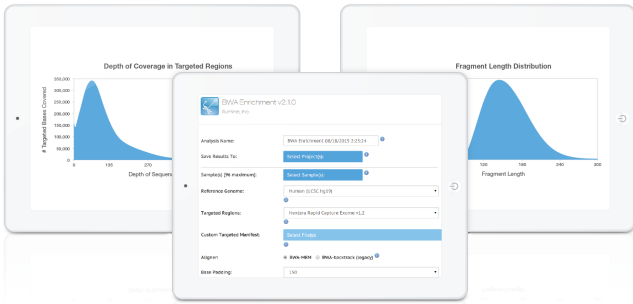


Figure 7 : Analyses de données simplifiées avec applications BaseSpace : Les données de séquençage produites avec Nextera DNA Exome peuvent être facilement téléchargées avec sécurité sur BaseSpace Sequence Hub, puis analysées avec l'application BWA Enrichment. Les résultats sont fournis dans des formats faciles à lire.

Comparaison des performances du séquençage de l'exome

Illumina offre deux solutions intégrées de séquençage de l'exome, ainsi que des flux de travail combinant la fonction de préparation de librairies Illumina à TruSeq DNA Exome ou Nextera DNA Exome, suivie d'un processus d'enrichissement de l'exome utilisant des agents bloquants xGen®, des réactifs bloquants xGen et l'outil xGen Exome Research Panel v1.0, disponibles chez IDT (tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des performances des flux de travail de l'exome

Indicateur	TruSeq-xGen ^a	Nextera-xGen ^a	TruSeq Exome	Nextera Exome
Entrée d'ADN	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng
Types d'échantillons	ADN	ADN	ADN et FFPE	ADN
Durée de manipulation	5 heures	2 heures	6 heures	3 heures
Durée totale du test	2,5 jours	2 jours	2,5 jours	2 jours
Durée de l'hybridation	4 heures	4 heures	16 heures	2 heures
% d'exactitude	> 91 %	> 92 %	> 80 %	> 75 %
% de couverture à 20x ^b	> 95 %	> 85 %	> 90 %	> 85 %

- a. Les spécifications des processus d'enrichissement de l'exome Illumina-IDT sont basées sur des données préliminaires publiées sur BaseSpace Sequence Hub.
- b. Le pourcentage de couverture à 20x a été déterminé pour les troupes TruSeq-xGen et Nextera-xGen avec 3,5 Gb de séquençage. Le pourcentage de couverture à 20x a été déterminé pour TruSeq DNA Exome et Nextera DNA Exome avec 8 Gb de séquençage.

Résumé

Nextera DNA Exome offre une méthode simple et efficace d'identification et de compréhension des variants codants avec des données d'une précision exceptionnelle. Le processus rapide de préparation de librairies et d'enrichissement de l'exome permet d'obtenir des librairies prêtes pour le séquençage en moins de deux jours et offre une flexibilité de planification de projet selon le volume d'échantillons. Dans le cadre d'un flux de travail complet comprenant

une technologie de séquençage de pointe et des outils d'analyse faciles à utiliser, Nextera DNA Exome permet aux chercheurs de réaliser des séquençages de l'exome avec efficacité et à coût raisonnable.

En savoir plus

Des renseignements supplémentaires sur le séquençage de l'exome sont disponibles sur www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html.

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
Trousse Nextera Exome (24 échantillons)	20020616
Trousse Nextera Exome (96 échantillons)	20020617

Références

- Litchfield K, Summersgill B, Yost S, et coll. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun.* 2015;6:5973.
- Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et coll. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol.* 2014;76:473–483.
- Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et coll. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med.* 2011;13:255–262.
- Données de référence standard (www.nist.gov/srd). Consultées le 11 février 2015.
- Genome in a Bottle Consortium | Advances in Biological and Medical Measurement Science (sites.stanford.edu/abms/giab). Source consultée le 20 février 2015.
- Raczy C, Petrovski R, Saunders CT, et coll. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics.* 2013;29:2041–2043.

Illumina, Inc. • 1 800 809 4566 (numéro sans frais aux États-Unis) • tél. +1 858 202 4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser dans le cadre d'exams diagnostiques.

© 2017 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Illumina, BaseSpace, HiSeq, Isaac, MiSeq, Nextera, NextSeq, NovaSeq, TruSeq et la couleur orange citrouille sont des marques de commerce d'Illumina, Inc. ou de ses sociétés affiliées aux États-Unis ou dans d'autres pays. xGen est une marque de commerce d'Integrated DNA Technologies, Inc. aux États-Unis ou dans d'autres pays Pub. n° 770-2015-018-B-FRA