

# Química XLEAP-SBS™ expande os recursos dos sistemas NextSeq 1000 e NextSeq 2000

Mais precisão e tempos de execução mais rápidos em comparação com SBS padrão das principais aplicações

- Sequenciamento de exoma
- Sequenciamento de RNA total
- Sequenciamento de RNA de célula única
- Sequenciamento de repertório imunológico

**illumina**®

## Introdução

A química XLEAP-SBS é um avanço na rapidez, na fidelidade e na robustez da química de sequenciamento por síntese comprovado da Illumina (SBS). Os sistemas NextSeq 1000 e NextSeq 2000 utilizam a química XLEAP-SBS para expandir os recursos e o desempenho de sequenciamento com saídas mais elevadas, tempos de execução mais curtos e qualidade aprimorada, mantendo um fluxo de trabalho fácil. A química XLEAP-SBS possibilita o uso da lâmina de fluxo P4 do NextSeq 2000, oferecendo a maior saída de instrumento de bancada Illumina, e melhorias de qualidade e tempo de resposta para lâminas de fluxo P1, P2 e P3.

Esta nota técnica demonstra que a química XLEAP-SBS nos sistemas NextSeq 1000 e NextSeq 2000 fornece qualidade de dados igual ou superior à química de SBS padrão para os principais métodos, incluindo sequenciamento de exoma, sequenciamento total de RNA, sequenciamento de RNA de célula única e sequenciamento de repertório imune.

## Métodos

### Sequenciamento de exoma

As bibliotecas de exomas foram preparadas a partir do DNA genômico NA12878 (gDNA) (Coriell Institute for Medical Research) usando DNA da Illumina com Exome 2.5 Enrichment, (S) Tagmentation (Illumina, catálogos nº 20077595 e nº 20077596) e regiões genômicas capturadas e direcionadas pelo Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel.

O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, nº do catálogo 20100989) e NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) (Illumina, nº do catálogo 20100993) usando uma configuração de execução de 2 × 101 bp (24 amostras por execução). Para comparação, as mesmas bibliotecas também foram sequenciadas no NextSeq 2000 System com SBS NextSeq 2000 P3 Reagents (200 cycles) padrão (Illumina, nº do catálogo 20040560) usando uma configuração de execução de 2 × 101 bp (24 amostras por execução).

A análise secundária de dados foi realizada com o pipeline DRAGEN™ Enrichment v4.2.7 (para reagentes XLEAP-SBS) e o pipeline DRAGEN Enrichment v3.10.4 (para reagentes SBS padrão) em fluxos de trabalho baseados em nuvem. A precisão da identificação de variantes foi avaliada em relação ao conjunto de verdades do Genome in A Bottle (GIAB) v4.2.1 do

National Institute of Standards and Technology (NIST) e ao genoma de referência hg38-alt-masked.<sup>1,2</sup> Os dados de sequenciamento tiveram a amostra reduzida para 30 milhões de pares de leitura por amostra para comparar o desempenho da identificação de variantes entre os kits de reagentes XLEAP-SBS e SBS padrão.

### Sequenciamento de RNA total (RNA-Seq total)

As bibliotecas de RNA total foram preparadas a partir do RNA da linhagem celular de leucemia: HL-60 (Thermo Fisher Scientific, nº do catálogo AM7836) e K562 (BioChain, nº do catálogo R1255820-50) e RNA da linhagem celular de câncer de mama: MCF7 (BioChain, nº do catálogo R1255830-50) com Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero™ Plus (Illumina, nº do catálogo 20040529).

O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com NextSeq 2000 P3 e P4 XLEAP-SBS reagent kits (200 cycles) usando configuração de execução de 2 × 76 bp (18 amostras por execução). Para comparação, as mesmas bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 2000 System com NextSeq 2000 P3 standard SBS reagent kit (200 cycles) usando configuração de execução de 2 × 76 bp (18 amostras por execução). Todas as execuções foram realizadas usando receita do ciclo escuro do Illumina Total RNA.

A análise secundária de dados foi realizada com o fluxo de trabalho baseado na nuvem do pipeline DRAGEN RNA v4.2.7. A amostra dos dados de sequenciamento foi reduzida para 10 milhões de leituras em todas as amostras para comparar os dados de expressão gênica, relacionando os perfis de RNA total entre a química XLEAP-SBS e as bibliotecas correspondentes de SBS padrão para essas linhagens celulares bem definidas. As transcrições por milhão (TPM) representam a expressão de cada transcrição quando normalizadas para comprimento da transcrição e a profundidade do sequenciamento.

### Sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-Seq)

As amostras para scRNA-Seq foram preparadas a partir de células mononucleares criopreservadas do sangue periférico humano (PBMCs) de uma doadora saudável do sexo feminino (com idade entre 25 e 30 anos) obtidas pela AllCells. As bibliotecas de scRNA-Seq (16 réplicas) foram preparadas usando Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10x Genomics, nº do Catálogo 1000269) de acordo com o guia do usuário do Chromium (CG000315 Rev E).

O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com NextSeq 2000 P3 e P4 XLEAP-SBS reagent kits (100 cycles) (Illumina, números do catálogo 20100990 e 20100994, respectivamente). Para comparação, as mesmas bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 2000 System com NextSeq 2000 P3 standard SBS reagent kit (100 cycles) (Illumina, nº do catálogo 20040559). As configurações de execução foram definidas de acordo com os parâmetros fornecidos pela 10x Genomics: leitura 1 de 28 ciclos leituras de índice i7 e i5 de 10 ciclos e leitura 2 de 90 ciclos. A concentração de carga foi de 650 pM e 1% de PhiX foi adicionado.

A análise de dados foi realizada usando pipeline Cell Ranger v8.0.0 (10x Genomics). Os dados de sequenciamento tiveram a amostra reduzida para 75 milhões ou 112,5 milhões de leituras após a conclusão da geração do FASTQ.

### Sequenciamento de repertório imunológico (IR-Seq).

As amostras para IR-Seq foram preparadas em série, em que uma mistura de nove linhagens celulares B foi diluída usando PBMCs agrupadas, isoladas de três doadores humanos saudáveis. As bibliotecas foram preparadas usando o SMART-Seq Human BCR (with UMIs) Kit (Takara Bio USA, nº do catálogo 634777) com 25 ng de RNA total. Preparações de bibliotecas independentes foram realizadas em triplicata para cada ponto de diluição e agrupadas em uma única biblioteca de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS P2 Reagent Kit (600 cycles) (Illumina, nº do catálogo 20100987) usando uma configuração de execução de 2 × 300 bp. Para comparação, as mesmas bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 2000 System com os reagentes padrão SBS NextSeq 1000/2000 P2 300M (600 cycles) (Illumina, nº do catálogo 20075295) usando uma configuração de execução de 2 × 300 bp.

Os dados de sequenciamento foram normalizados para 250 mil leituras/amostras e processados em clonótipos usando o Cogent NGS Immune Profiler Software v1.6. (Takara Bio EUA) com limite de UMI estabelecido em 2 e analisado usando VDJTools v1.2.1 (MiLaboratories).

## Resultados

### Sequenciamento de exoma

As métricas de análise primária e secundária do sequenciamento do exoma foram avaliadas, incluindo pontuações de qualidade, taxa de erro, uniformidade de cobertura e precisão e recall para variantes de nucleotídeo único (SNVs) e deleções de inserção (indels). Os kits de reagentes XLEAP-SBS e SBS padrão forneceram dados de alta qualidade e identificação de variantes altamente precisa. As execuções com XLEAP-SBS apresentaram mais leituras e maior rendimento, Q-scores aprimoradas e taxas de erro mais baixas (tabela 1). As métricas secundárias mostraram precisão e recall de SNV e indel comparáveis, apresentando concordância entre os dois produtos químicos (tabela 1).

Tabela 1: Métricas de análise primária e secundária para sequenciamento do exoma

	Química SBS padrão P3	Química XLEAP-SBS P3	Química XLEAP-SBS P4
Leituras tipo single-end	1,4 bilhão	1,4 bilhão	2,1 bilhão
Rendimento	307 Gb	309 Gb	445 Gb
Configuração da execução	2 × 101 bp	2 × 101 bp	2 × 101 bp
Leitura 1 Q30	94,38%	95,97%	95,92%
Leitura 2 Q30	93,35%	94,81%	94,54%
Taxa de erro de leitura 1	0,18%	0,11%	0,10%
Taxa de erro de leitura 2	0,18%	0,16%	0,15%
Enriquecimento da leitura (%)	87%	86%	86%
Uniformidade da cobertura	96,3%	96,4%	96,9%
Precisão de SNV	0,993	0,994	0,993
Recall de SNV	0,981	0,981	0,980
Precisão de indel	0,94	0,95	0,96
Recall de indel	0,93	0,93	0,93

## RNA-Seq total

Para o RNA-Seq total, os kits de reagentes XLEAP-SBS e SBS padrão forneceram dados de alta qualidade (tabela 2). Os kits XLEAP-SBS apresentaram maior filtro de passagem de clusters, Q-score aprimoradas e taxas

de erro reduzidas em comparação com reagentes SBS padrão. A quantificação das transcrições demonstrou excelente concordância entre os dois produtos químicos ( $R^2 > 0,99$ ) (figura 1).

Tabela 2: Métricas de execução do sequenciamento para RNA-Seq total

	Química SBS padrão P3	Química XLEAP-SBS P3	Química XLEAP-SBS P4
Leituras tipo single-end	1,4 bilhão	1,4 bilhão	2,1 bilhão
Rendimento	245 Gb	245 Gb	349 Gb
Configuração da execução	2 × 76 bp	2 × 76 bp	2 × 76 bp
Leitura 1 Q30	94,5%	95,9%	95,8%
Leitura 2 Q30	92,9%	93,9%	93,8%
Taxa de erro de leitura 1	0,11%	0,08%	0,07%
Taxa de erro de leitura 2	0,14%	0,12%	0,13%

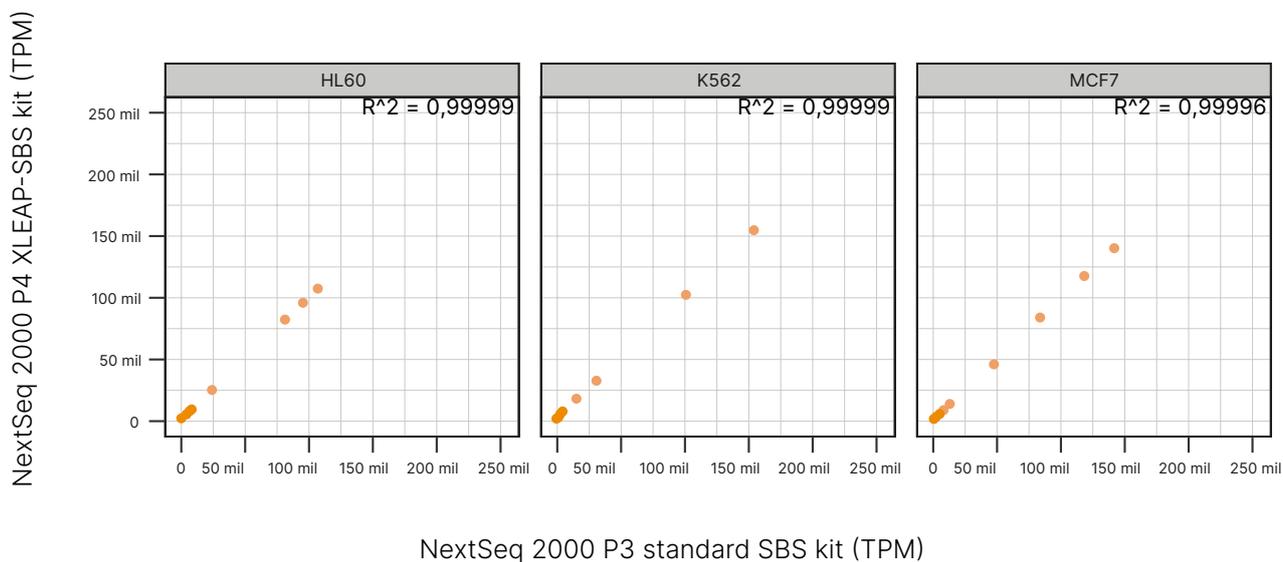


Figura 1: Correlações de transcriptoma total entre química XLEAP-SBS e SBS padrão: transcrições por milhão (TPM) para linhagens celulares de câncer, HL-60, K562 e MCF7 foram analisadas e demonstraram concordância com os perfis de expressão gênica da química XLEAP-SBS em comparação com as bibliotecas correspondentes de RNA-Seq total de SBS padrão.

### scRNA-Seq

As métricas de desempenho do scRNA-Seq mostram que os kits de reagentes XLEAP-SBS e SBS padrão do NextSeq 2000 System atenderam às expectativas de qualidade dos dados (tabela 3). O resultado mais alto dos reagentes P4 XLEAP-SBS possibilita uma maior amplitude de cobertura (mais lâminas por amostra) e mais profundidade de cobertura (mais leituras por

lâmina), afetando o número de genes detectados e as contagens médias de identificador molecular único (UMI) por lâmina (tabela 3). Os gráficos t-SNE da expressão gênica scRNA-Seq (figura 2) mostram uma excelente correlação entre os kits de reagentes XLEAP-SBS e SBS padrão.

Tabela 3: Métricas de análise primária e secundária para scRNA-Seq

	Química SBS padrão P3	Química XLEAP-SBS P3	Química XLEAP-SBS P4	
Nº de leituras com amostra reduzida	75 mi	75 mi	75 mi	112,5 mi
Leitura 1 bases ≥ Q30	95,25%	96,46%	96,81%	96,81%
Leitura 2 bases ≥ Q30	95,00%	96,10%	96,15%	96,15%
Taxa de erro de leitura 1	0,05%	0,06%	0,06%	0,06%
Taxa de erro de leitura 2	0,15%	0,14%	0,15%	0,15%
Nº de genes detectados	27.715	27.735	27.753	28.474
Contagens médias de UMI por lâmina	30.332	30.275	30.568	39.121

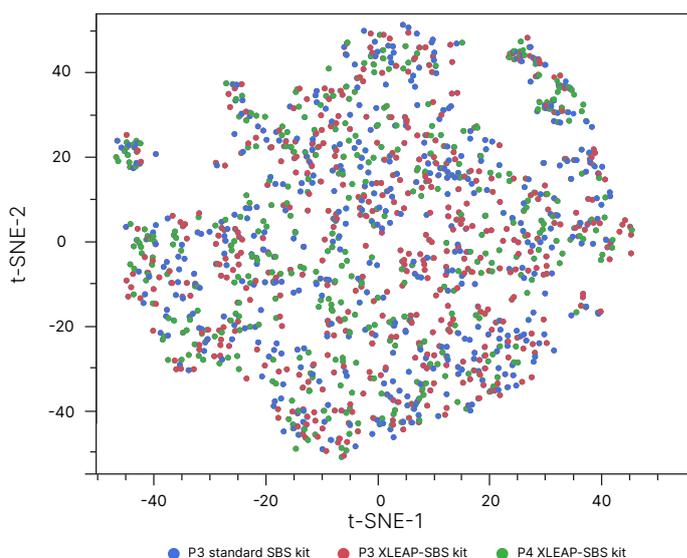


Figura 2: Resultados consistentes de expressão gênica de célula única: gráficos t-SNE para bibliotecas scRNA-Seq de reagentes P3 XLEAP-SBS (vermelho), reagentes P4 XLEAP-SBS (verde) e reagentes SBS padrão P3 (azul) no NextSeq 2000 System. A sobreposição sugere alta concordância entre os produtos químicos XLEAP-SBS e SBS padrão.

## IR-Seq

O NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) pode gerar 400 milhões de leituras, enquanto o SBS NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 cycles) gera apenas 300 milhões de leituras. O aumento na saída dos reagentes XLEAP-SBS P2 fornece maior flexibilidade experimental e profundidade para o IR-Seq.

Os reagentes XLEAP-SBS P2 600-cycle produziram uma porcentagem maior de leituras com pontuações de qualidade  $\geq$  Q30 em comparação com os reagentes SBS P2 600-cycle padrão no NextSeq 2000 System (figura 3). Para o IR-Seq, os dois produtos químicos produziram resultados de alta qualidade que atenderam ou excederam as especificações do mercado. Os reagentes XLEAP-SBS P2 apresentaram

uma porcentagem média mais alta com bases acima de Q30 e taxas de erro mais baixas em comparação com os reagentes SBS P2 padrão (tabela 4). O químico XLEAP-SBS também apresentou mais qualidade nas extremidades das leituras (tabela 4), o que melhora a sensibilidade de detecção clonal, uma vez que o IR-Seq depende da sobreposição tipo paired-end para ter um desempenho ideal.

Essas melhorias na qualidade e na produtividade fornecem mais confiança nos sinais de repertório observados a partir de conjuntos de dados complexos. Em geral, as características do repertório (isótipo, comprimento de CDR3 e frequência do gene V) permaneceram consistentes entre os reagentes do NextSeq 2000 (dados não mostrados).

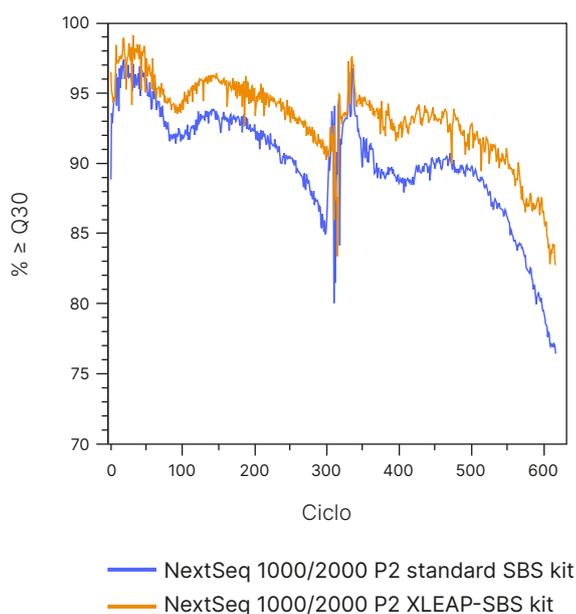


Figura 3: Sequenciamento do repertório imune de alta qualidade: pontuações de qualidade para IR-Seq de reagentes XLEAP-SBS (laranja) e reagentes SBS padrão (azul) no NextSeq 2000 System. Melhorias na qualidade, especialmente nas extremidades das leituras, permitem maior cobertura e detecção de clonótipos, tornando a qualidade dos kits XLEAP-SBS de 600 ciclos a mais alta do mercado.

Tabela 4: Métricas de execução do sequenciamento para IR-Seq

	Química SBS padrão P2	Química XLEAP-SBS P2
Leituras de filtro de passagem por amostra	390 mi	499 mi
Rendimento	240 Gb	360 Gb
Configuração da execução	2 × 300 bp	2 × 300 bp
Média Q30	90%	93%
Taxa média de erros	0,35%	0,28%
Leitura 1 Q30 (últimos 10 ciclos)	85,70%	91,14%
Leitura 2 Q30 (últimos 10 ciclos)	77,06%	83,59%
Taxa de erro de leitura 1 (últimos 10 ciclos)	0,96%	0,57%
Taxa de erro de leitura 2 (últimos 10 ciclos)	1,02%	0,79%

## Resumo

O produto químico XLEAP-SBS nos sistemas NextSeq 1000 e NextSeq 2000 oferece recursos de sequenciamento expandidos com maiores saídas, tempos de execução mais rápidos e qualidade aprimorada em comparação com o SBS padrão, mantendo a facilidade de uso e reduzindo os custos. Os dados dos principais métodos comumente executados nos sistemas NextSeq 1000 e NextSeq 2000, incluindo o sequenciamento de exoma, RNA-Seq total, scRNA-Seq e IR-Seq, foram comparados diretamente aos dados gerados com química SBS padrão. Os resultados mostram que o desempenho com kits de reagentes NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS atende ou excede o desempenho do kit com SBS padrão.

## Saiba mais

[Sistemas de Sequenciamento NextSeq 1000 e NextSeq 2000](#)

[Dados de demonstração do BaseSpace Sequence Hub](#)

## Referências

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). Acessado em 27 de julho de 2023.
2. Genome Reference Consortium. Human Genome Overview. Site do NCBI. [ncbi.nlm.nih.gov/grc/human](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human). Acessado em 27 de julho de 2023.



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) | [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2024 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02330 PTB v1.0