

TruSeq^{MC} DNA Exome

Solution économique de préparation de librairies et d'enrichissement de l'exome offrant une précision exceptionnelle.

Points forts

- Qualité de données TruSeq éprouvée**
 La séparation mécanique et la chimie d'enrichissement TruSeq produisent une couverture uniforme et $\geq 80\%$ de lectures de séquençage exactes
- Séquençage de l'exome rentable**
 Le groupement de librairies préenrichissement et la couverture optimale permettent un séquençage de l'exome abordable
- Résultats précis et fiables**
 Analyse de données à bouton poussoir permettant d'identifier avec confiance les variants exoniques
- Solution de flux de travail intégré**
 Le flux de travail exhaustif simplifie 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. TruSeq DNA Exome offre une solution peu coûteuse de séquençage de l'exome, permettant aux chercheurs de séquencer plus d'exomes par étude et de réaliser leurs travaux plus rapidement. Cette trousse combine la technologie TruSeq éprouvée avec une précision exceptionnelle, même lorsque les échantillons sont de piètre qualité. Faisant partie d'un flux de travail intégré comprenant la préparation de librairies, l'enrichissement de l'exome, le séquençage et l'analyse de données, TruSeq DNA Exome offre des appels de variants précis et permet d'arriver à une compréhension plus approfondie des mutations codantes.

Qualité de données TruSeq éprouvée

L'obtention de définitions de variants hautement fiables dépend tout autant de l'exactitude du séquençage que de la haute qualité de la préparation et de l'enrichissement des librairies. TruSeq DNA Exome est compatible avec les systèmes de séquençage MiSeq^{MC}, NextSeq^{MC}, HiSeq^{MC} et NovaSeq^{MC} (tableau 1). Ces systèmes utilisent une chimie Sequencing by Synthesis (SBS), employée pour générer plus de 90 % des données de séquençage mondiales*. La chimie SBS Illumina fournit un pourcentage élevé de bases séquencées supérieures à Q30. En combinant TruSeq DNA Exome avec la chimie SBS, les chercheurs peuvent identifier un nombre élevé de véritables variants codants et réduire au minimum les faux positifs et les faux négatifs.

Un contenu exonique spécifique

La trousse TruSeq DNA Exome est optimisée 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 un séquençage de l'exome complet, ainsi que l'identification fiable de variants codants vrais.

Tableau 1 : Comparaison de débits avec TruSeq 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 débit moyen | 3 | 2 |
| Flow Cell à débit 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. L'estimation du nombre d'exomes séquencés par analyse est faite sur la base d'une couverture moyenne respective de 50x et 100x Illumina recommande une longueur de lecture 2 x 75 pb sur tous les séquenceurs lorsque la trousse TruSeq DNA Exome est utilisée.

Tableau 2 : Contenu d'exome avec TruSeq DNA Exome et Nextera^{MC} Exome

| Spécifications de couverture | TruSeq DNA Exome ou Nextera 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 % |

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

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

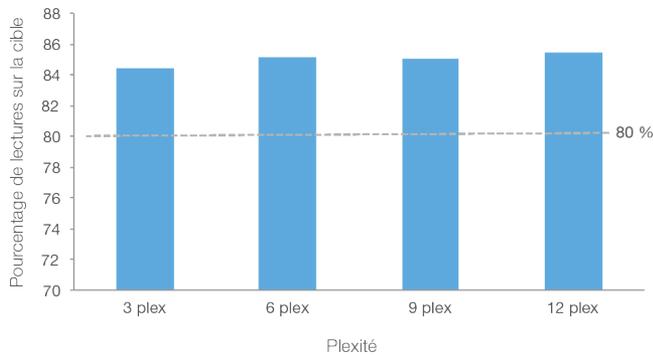


Figure 1 : Enrichissement exact : TruSeq DNA Exome produit plus de 80 % de lectures de séquençage exact, permettant de réaliser des séquençages économiques et efficaces.

Séquençage d'exome efficace

TruSeq DNA Exome prend en charge un groupement 12-plex. Le séquençage peut donc atteindre 12 librairies par ligne de Flow Cell, ce qui permet aux chercheurs d'optimiser le rendement et d'identifier les variants plus rapidement. TruSeq DNA Exome produit jusqu'à 80 % de lectures de séquençage exactes (figure 1) et offre une bonne uniformité de couverture, pour des résultats très fiables. Il permet également le séquençage d'un nombre plus important d'exomes par analyse et, ainsi, l'optimisation du budget des chercheurs.

Chimie d'enrichissement efficace

TruSeq DNA Exome a été optimisé pour produire des résultats fiables avec plusieurs types d'échantillons. Le flux de travail de préparation des librairies (figure 2) commence par une fragmentation mécanique, générant des fragments de tailles uniformes afin d'avoir une reproductibilité maximale d'une librairie à l'autre (figure 2A). Cette séparation mécanique par traitement aux ultrasons Covaris ou une autre méthode semblable permet d'utiliser des échantillons compromis, comme ceux comprenant de petits fragments d'ADN. Les fragments d'ADN à bouts francs sont générés par l'association de réactions de remplissage et d'une activité d'exonucléase suivies d'une sélection de taille à l'aide des billes d'immobilisation réversible en phase solide (SPRI) AMPure (Beckman Coulter) fournies. Des adaptateurs contenant le complément entier du séquençage des sites d'hybridation du primer pour les lectures uniques, appariées et à index sont ligaturés aux fragments (figure 2B). Les produits ligaturés sont amplifiés avec PCR (figure 2C).

Les librairies sont ensuite groupées et dénaturées (figure 2D). Les sondes biotinylées sont hybridées aux régions ciblées (figures 2E et 2F), lesquelles sont enrichies à l'aide de billes de streptavidine. Après une autre réaction PCR (figure 2G), les fragments sont élués des billes et prêts pour le séquençage (figure 2H). Ce flux de travail simplifié génère une taille d'insert cible d'environ 150 pb et peut être achevé en moins de 2,5 jours. TruSeq DNA Exome enrichit le contenu en exomes pour maximiser l'efficacité du séquençage, offrant une uniformité de couverture élevée avec plus de 85 % des bases couvertes à une profondeur 10x (figure 3).

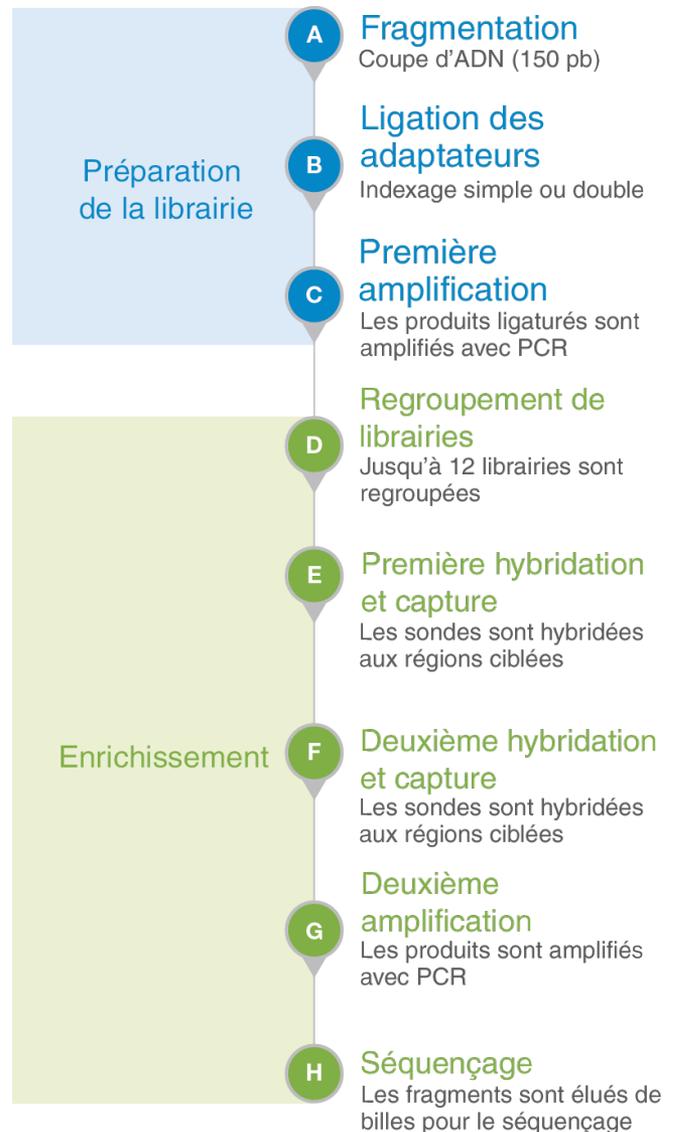


Figure 2 : Flux de travail TruSeq DNA Exome : Combinant la préparation des librairies et l'enrichissement de l'exome, le flux de travail TruSeq DNA Exome peut être réalisé en moins de 2,5 jours.

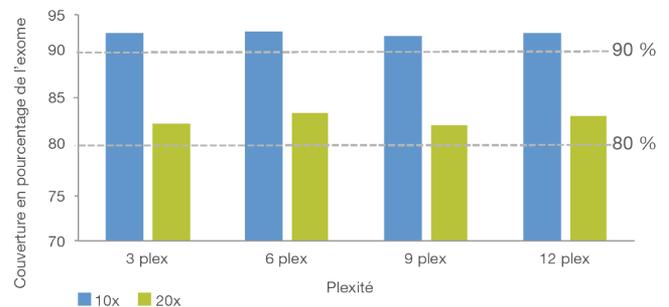


Figure 3 : Uniformité de couverture élevée : TruSeq DNA Exome offre une couverture uniforme, avec plus de 85 % des bases couvertes à 10x de profondeur.

Résultats précis et fiables

TruSeq DNA Exome offre une couverture exceptionnelle des cibles sur une vaste gamme de profondeurs de lecture (figure 4). Grâce à la reproductibilité de TruSeq DNA Exome, à son uniformité de couverture élevée et à la chimie SBS, les appels de variants sont d'une grande exactitude. Plus de 99,65 % des appels de variants réalisés après un séquençage TruSeq DNA Exome et Illumina correspondent aux données de références standard de la base de données du National Institute of Standards and Technology (NIST) (figure 5)^{4,5}.

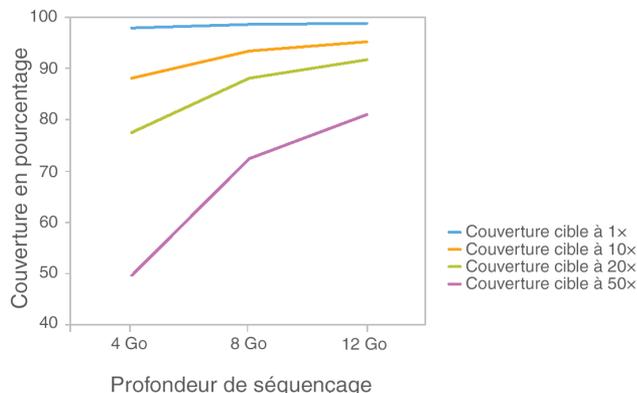


Figure 4 : Efficacité de couverture à différentes profondeurs : TruSeq DNA Exome offre une couverture exceptionnelle sur différentes profondeurs de séquençage, avec plus de 80 % des cibles couvertes jusqu'à une profondeur de 20x.

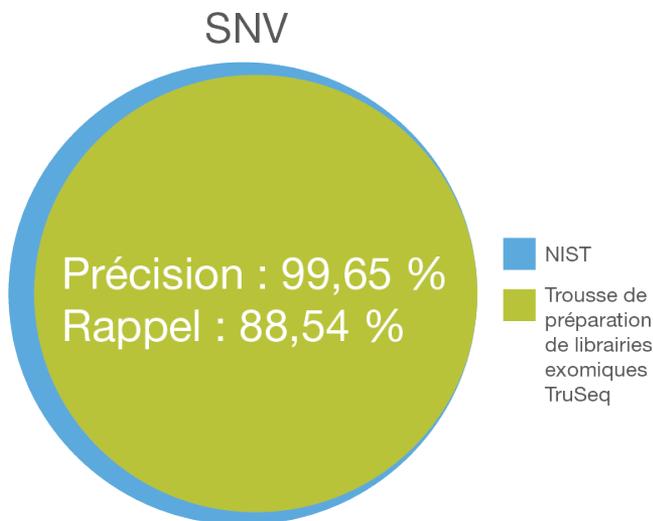


Figure 5 : Corrélation élevée avec la base de données NIST : Les appels de variants réalisés avec TruSeq DNA Exome correspondent très largement aux données de référence standard. L'échantillon d'ADN NA12878 du Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) a été séquençé à une profondeur de couverture de 100x. Les appels de variants mononucléotides (SNV) sont signalés. On définit la **précision** comme la probabilité qu'un variant appelé soit exact. On définit un **rappel** comme la probabilité qu'un variant validé soit appelé.

Flux de travail de séquençage intégré

TruSeq DNA Exome fait partie d'une solution cohésive et documentée guidant les chercheurs depuis la préparation des librairies jusqu'à l'analyse des données (figure 7). 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 TruSeq DNA Exome sont conjointement conçus, optimisés et validés de manière analytique, supprimant ainsi le besoin d'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.

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 6). Les chercheurs peuvent analyser les données de l'exome à l'aide de l'application d'enrichissement BWA, qui emploie la méthode standard du secteur, BWA/GATK, ou de l'application d'enrichissement Isaac^{MC}, 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.

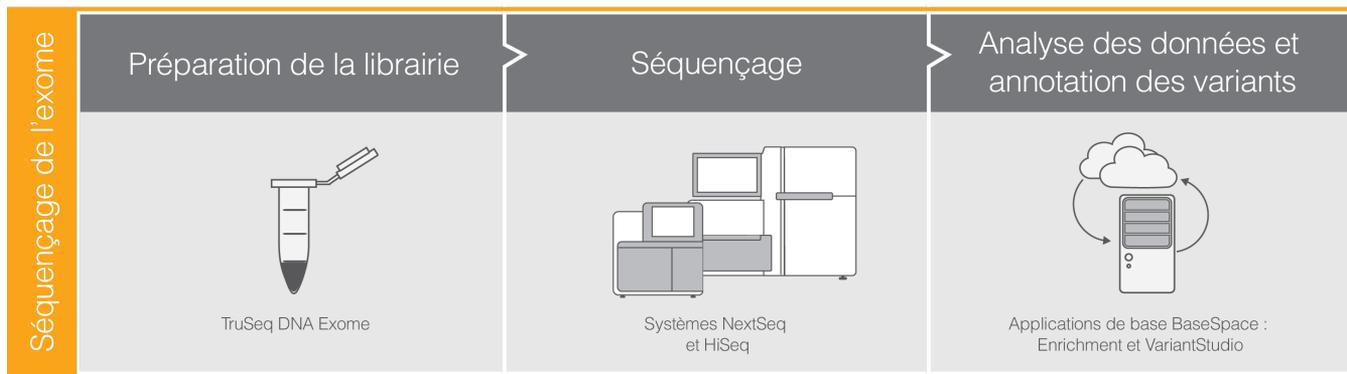


Figure 7 : Flux de travail de séquençage de l'exome : TruSeq DNA Exome fait partie d'un flux de travail de séquençage de l'exome intégré comprenant la préparation des librairies, le séquençage et l'analyse des données.

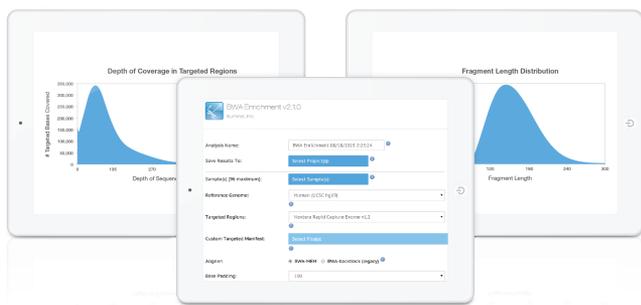


Figure 6 : Analyses de données simplifiées avec applications BaseSpace : Les données de séquençage produites avec TruSeq DNA Exome peuvent être facilement téléchargées en toute sécurité sur BaseSpace Sequence Hub, puis analysées avec l'application BWA Enrichment. Les résultats sont fournis dans des formats faciles à lire.

Comparaison des performances du séquençage de l'exome

Illumina offre deux solutions de flux de travail intégrés pour le séquençage de l'exome. Illumina offre aussi 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^{MD}, des réactifs bloquants xGen et l'outil xGen Exome Research Panel v1.0, disponibles chez IDT (tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des performances du 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 trousseaux 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

TruSeq DNA Exome offre une méthode simplifiée et rentable d'identification et de compréhension des variants codants avec des données d'une exactitude exceptionnelle. L'intégration à un flux de travail complet, composé d'une technologie de séquençage de pointe et d'outils d'analyse simples à utiliser, permet aux chercheurs d'avoir accès à une source unique pour tout ce dont ils ont besoin pour le séquençage d'exome.

En savoir plus

Des informations 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 TruSeq Exome (24 échantillons) | 20020614 |
| Trousse TruSeq Exome (96 échantillons) | 20020615 |
| Technologies intégrées d'ADN pour Illumina : index doubles uniques TruSeq DNA UD Indexes (24 index, 96 échantillons) | 20020590 |
| Technologies intégrées d'ADN pour Illumina : index doubles uniques TruSeq DNA UD Indexes (96 index, 96 échantillons) | Disponible prochainement |

Références

1. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun.* 2015;6:5973.
2. Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol.* 2014;76:473–483.
3. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et al. 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.
4. Données de référence standard (www.nist.gov/srd). Consultées le 11 février 2015.
5. Genome in a Bottle Consortium | Advances in Biological and Medical Measurement Science (sites.stanford.edu/abms/giab) Consulté le 20 février 2015.
6. Raczy C, Petrovski R, Saunders CT, et al. 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

© 2017 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. Pub. No. 770-2015-007-C FRA QB #

illumina[®]