

Maximisation des performances sur la série MiSeq^{MC} i100

Étapes d'optimisation du chargement des bibliothèques pour garantir la réussite des analyses

Optimisation du chargement des bibliothèques

Déterminez la concentration de chargement optimale pour les Flow Cell de la série MiSeq i100

Maximisation des performances

Améliorez la représentation de la taille des inserts pour maximiser les performances de séquençage

Prise en charge des bibliothèques à faible diversité

Séquenchez les bibliothèques à faible diversité en ajustant la complexité des bibliothèques avec PhiX

Introduction

La série MiSeq i100 offre le séquençage de paillasse le plus simple et le plus rapide. Les avancées révolutionnaires dans la conception du système, la chimie XLEAP-SBS^{MC} et l'analyse intégrée des données offrent une plus grande simplicité, une grande exactitude des données et une vitesse exceptionnelle, générant des résultats jusqu'à quatre fois plus rapidement que le MiSeq System d'origine. Dans le cadre d'une solution de SNG de bout en bout, la série MiSeq i100 fournit des résultats le jour même pour diverses applications, notamment la transcriptomique, la génomique microbienne et les études de séquençage génique ciblé dans des domaines clés tels que la microbiologie, les maladies infectieuses, l'oncologie, et plus.

Lors du transfert de projets vers la série MiSeq i100 à partir d'un autre système de séquençage, l'optimisation du chargement des librairies peut aider à maximiser le rendement et la qualité des données. Cette note technique fournit des recommandations pour optimiser les résultats sur la série MiSeq i100, notamment des conseils sur la concentration de chargement des librairies, la qualité des librairies et les considérations relatives à la diversité des nucléotides.

Chargement optimal des librairies

La concentration de chargement fait référence à la concentration finale d'une librairie chargée sur un instrument pour le séquençage. Une fois les librairies préparées, elles sont diluées à la concentration de chargement appropriée pour le type de librairie, le système de séquençage et la trousse de réactifs.

Le chargement des librairies à une concentration trop élevée ou trop faible peut entraîner une qualité et un rendement de séquençage inférieurs, et éventuellement des échecs d'analyse dans des cas extrêmes. Un chargement insuffisant peut entraîner un faible pourcentage d'occupation des nanopuits (% d'occupation) et un nombre plus élevé de doublons de lecture, ce qui entraîne ensuite un besoin plus élevé de lectures pour atteindre la couverture cible. À l'inverse, un chargement excessif peut entraîner un faible pourcentage d'amplifiats passant le filtre (PF). Pour déterminer les concentrations de chargement optimales sur la série MiSeq i100, les indicateurs % d'occupation et % PF peuvent être représentés dans le logiciel Sequencing Analysis Viewer pour déterminer si une analyse a été sous-chargée, chargée de manière optimale ou surchargée. L'approche employée dans l'exemple d'expérience suivant peut être utilisée pour titrer la concentration de chargement afin d'évaluer les indicateurs primaires et secondaires.



Pour en savoir plus, lisez l'article [Optimizing library loading for Illumina NGS systems with patterned flow cells \(Optimisation du chargement des librairies pour les systèmes de SNG d'Illumina avec Flow Cell structurées\)](#).

Détermination de la concentration de chargement optimale

Lors de la recherche de la concentration de chargement optimale, il est essentiel de tester une large gamme de concentrations. Utilisez les indicateurs principaux tels que le % PF et le % d'occupation avec les indicateurs secondaires tels que les doublons, la taille de l'insert et la couverture pour mesurer les performances à diverses concentrations de chargement afin de déterminer le « rendement utilisable » pour une application donnée.

Étape 1 : Conception de l'expérience de titrage

Pour le transfert de projets du MiSeq System d'origine à la série MiSeq i100, ciblez les titrages à environ 10,4 fois la concentration de chargement de la trousse MiSeq Reagent Kit v2 et à environ 6,5 fois la concentration de chargement de la trousse MiSeq Reagent Kit v3. Les concentrations cibles recommandées varient pour les différentes trouses de préparation de librairies à utiliser avec la série MiSeq i100 ([tableau 1](#)). Pour tous les autres cas, il est recommandé d'utiliser 100 pM pour la concentration cible.

Dans cet exemple, un groupe de librairies composé d'échantillons de génome bactérien de *Bacillus pacificus*, *Cereibacter sphaeroides* et *Escherichia coli* préparés à l'aide d'Illumina DNA Prep a été testé à des concentrations de chargement de 40 pM, 80 pM et 120 pM.

Étape 2 : Évaluation du taux d'occupation des nanopuits et des amplifiats PF

Représentez graphiquement les indicateurs % PF contre % d'occupation de l'analyse de séquençage pour chaque concentration de chargement afin de déterminer quelles concentrations ont entraîné un chargement insuffisant, un chargement excessif ou un chargement équilibré. Dans cet exemple : les trois concentrations testées (40 pM, 80 pM, 120 pM) affichent une forme de chargement optimale (un nuage de points avec une pente positive) dans le graphique % PF contre % d'occupation, démontrant que la série MiSeq i100 peut obtenir des résultats fiables dans une large plage de concentrations de chargement de librairies ([figure 1](#)).

Étape 3 : Évaluation des doublons

Réduisez la plage de concentrations cibles en analysant le pourcentage de doublons. Les doublons ont tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration de chargement. Dans cet exemple, bien que les trois concentrations testées présentent toutes moins de 15 % de doublons, les concentrations de 80 pM et 120 pM ont affiché les valeurs les plus faibles ([figure 2](#)).

Étape 4 : Analyse de la taille des inserts

Examinez les tailles d'insert. La plage optimale pour votre librairie et votre application peut varier en fonction des exigences de votre flux de travail. Dans cet exemple, les tailles d'insert pour les trois souches bactériennes varient sur la plage de concentrations testées, la plus grande différence étant observée entre 40 pM et 80 pM ([figure 2](#)).

Tableau 1 : Concentrations cibles recommandées pour la conception du titrage avec la série MiSeq i100

Trousse de préparation de bibliothèques	Concentration cible
Illumina DNA Prep	80 pM
Illumina DNA Prep with Enrichment	60 pM
Illumina RNA Prep with Enrichment	80 pM
Illumina DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA Nano	120 pM
Illumina Viral Surveillance Panel v2	80 pM
Illumina Microbial Amplicon Prep – Influenza A/B	80 pM
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel	80 pM
Urinary Pathogen ID/AMR Panel	80 pM
TruSight RNA Pan Cancer	80 pM
16S rRNA Amplicon	80 pM
Pillar oncoReveal Myeloid Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Essential MPN Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel	80 pM
Pillar oncoReveal BRCA 1 & BRCA 2 plus CNV Panel	80 pM
PhiX Control v3	120 pM
PhiX Indexed Control (1 000 cycles)	120 pM

a. Les bibliothèques d'ADN double brin ont été quantifiées à l'aide du test fluorométrique Qubit dsDNA Quantitation High Sensitivity (Thermo Fisher, référence n° Q32851) et de la trousse Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent, référence n° 5067-4626) pour l'estimation de la taille moyenne des fragments. Les bibliothèques d'ADN simple brin ont été quantifiées à l'aide de la trousse Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher, référence n° Q10212).

b. Les bibliothèques 16S rRNA Amplicon préparées à l'aide du flux de travail décrit dans le document 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Préparation des bibliothèques de séquençage métagénomique 16S) (référence n° 15044223 Rév. B).

Étape 5 : Examen d'autres indicateurs dépendants de l'application (couverture, cartographie, etc.)

Examinez les indicateurs d'analyse secondaire supplémentaires pour optimiser les performances de votre application. Dans cet exemple, l'indicateur cartographié en pourcentage montre des résultats fiables pour les trois concentrations de chargement testées (figure 2). Les indicateurs secondaires ont été générés avec l'application DRAGEN^{MC} Small Whole Genome Sequencing, disponible en tant que solution intégrée sur instrument et en nuage.

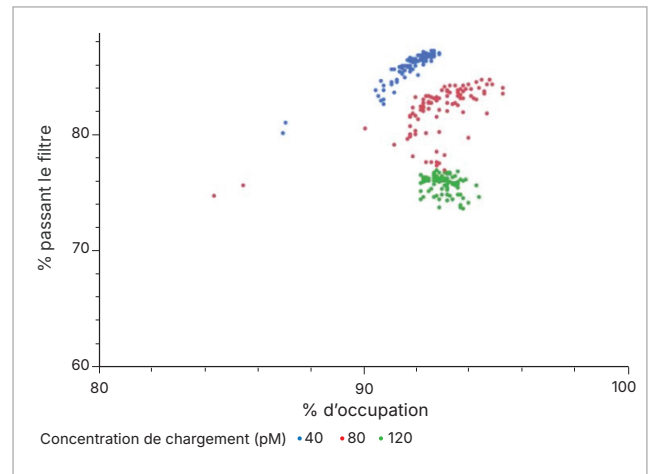


Figure 1 : Occupation optimale des nanopuits sur une large plage de concentrations de chargement de bibliothèques

Le séquençage des bibliothèques chargées à 40 pM, 80 pM et 120 pM affichait une forme de chargement optimale, démontrant que la série MiSeq i100 peut obtenir des résultats fiables sur une large plage de concentrations de chargement.

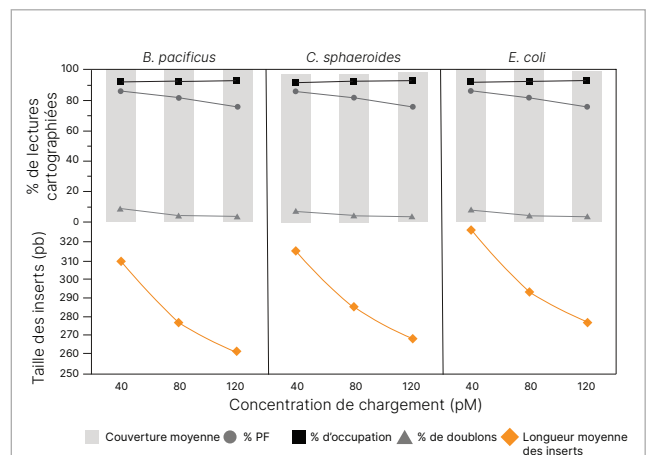



Figure 2 : Optimisation des performances de séquençage sur la série MiSeq i100

Exemple d'expérience de titrage examinant les doublons, la couverture moyenne et la taille d'insert.

Qualité des librairies

Les inserts courts et les contaminants introduits pendant la préparation de librairies, y compris les dimères d'adaptateur, les dimères de primers et les structures de librairies partielles, peuvent avoir un impact négatif sur la génération d'amplifiats sur la série MiSeq i100. Les inserts courts se regroupent plus efficacement que les inserts plus longs. Si la longueur de lecture de séquençage est supérieure à la taille d'insert des librairies, le séquençage se poursuivra à travers l'insert dans la séquence d'adaptateur et potentiellement dans la Flow Cell. Lorsque le séquençage se poursuit dans la Flow Cell, la lecture manque de modèles pour l'incorporation des bases, ce qui entraîne une réduction de l'intensité qui, sur la série MiSeq i100, peut se traduire par au moins l'un des effets suivants : une forte baisse des scores Q30, une augmentation des définitions de bases G (similaire à celle observée sur d'autres instruments Illumina à 2 canaux tels que les systèmes NextSeq^{MC} 1000 et NextSeq 2000, NovaSeq^{MC} 6000 System et la série NovaSeq X).

 Pour en savoir plus, lisez l'article [How short inserts affect sequencing performance \(Comment les inserts courts affectent les performances de séquençage\)](#).

Il est essentiel de retirer ces inserts courts et ces contaminants pendant les étapes de nettoyage ou de sélection de la taille. Pour une performance optimale sur la série MiSeq i100 à une longueur de lecture de 2 × 500 pb, la taille moyenne des inserts des librairies doit être comprise entre 600 et 1 200 pb, tandis que les inserts inférieurs à 500 pb doivent représenter moins de 1 % de la masse totale des librairies. Si nécessaire, les inserts courts et les contaminants peuvent être éliminés plus efficacement en ajoutant une étape facultative de purification des billes au protocole de préparation des librairies. Une fois la préparation des librairies terminée et avant le séquençage, les utilisateurs doivent vérifier la qualité et la pureté de toutes les librairies. Utilisez un bioanalyseur Agilent Bioanalyzer, un système Fragment Analyzer ou TapeStation pour vérifier l'intégrité des librairies, la taille moyenne des inserts et les contaminants.

Voici deux exemples de procédures de purification des billes supplémentaires utilisées pour améliorer les performances de séquençage sur la série MiSeq i100. Dans le premier exemple, les inserts courts de librairies enrichies avec une distribution de taille d'insert vaste ont été retirés de façon sélective pour éliminer les définitions erronées de bases G et améliorer les performances de séquençage. Dans le deuxième exemple, il est démontré que l'élimination des contaminants dimères d'adaptateur dans la librairie d'amplicons à inserts longs améliore les performances de l'analyse et les scores de qualité pour le séquençage avec une configuration de 2 × 500 pb.

L'élimination des inserts courts améliore les performances de séquençage

Dans cet exemple, les librairies d'échantillons d'eaux usées préparées avec la trousse Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit ont été traitées en incluant une phase supplémentaire de purification des billes avec un rapport bille/échantillon de 0,8×. La phase supplémentaire de purification des billes a efficacement éliminé la plupart des fragments < 250 pb (correspondant à des inserts de librairies < 100 pb sans adaptateurs), avec une réduction totale du rendement des librairies d'environ 35 % (figure 3).

Les librairies Viral Surveillance Panel v2, avec et sans la phase supplémentaire de purification des billes, ont été séquencées sur la série MiSeq i100 à une longueur de lecture de 2 × 150 pb et analysées avec l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Le séquençage des librairies préparées avec la phase supplémentaire de purification des billes, par rapport au protocole non modifié, a entraîné une réduction des définitions erronées de bases G et une amélioration des indicateurs secondaires, y compris la longueur de lecture moyenne et le pourcentage de lectures après le contrôle de la qualité, ainsi qu'une détection accrue des microorganismes (figure 4).

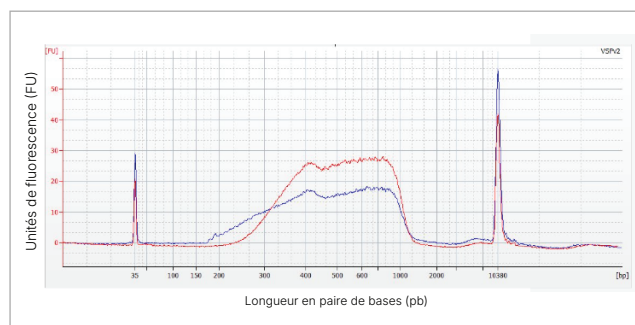


Figure 3 : Augmentation de la taille d'insert avec purifications supplémentaires des billes

Des phases supplémentaires de purification des billes (ligne rouge) ont efficacement éliminé la plupart des fragments inférieurs à 250 pb, par rapport au protocole non modifié (ligne bleue).

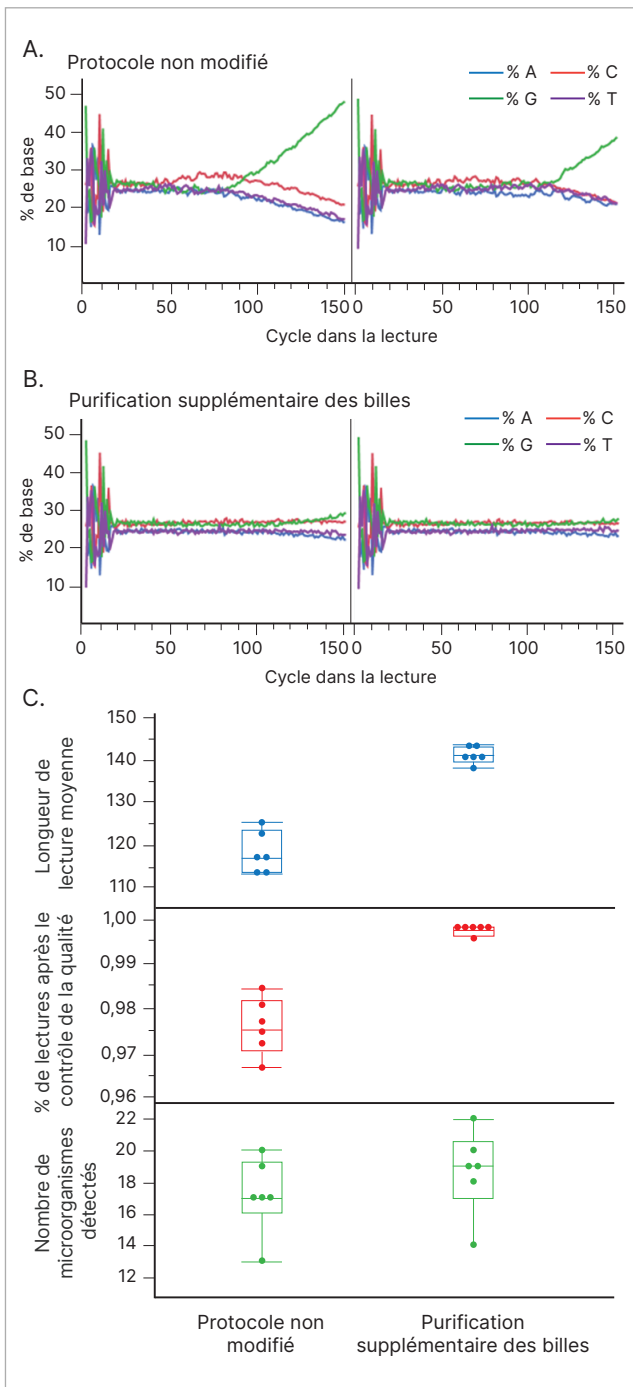


Figure 4 : Performances améliorées avec des tailles d'insert accrues

Le séquençage des librairies générées à la suite d'un protocole (A) non modifié et (B) modifié (avec des tailles d'insert accrues) sur la série MiSeq i100 a permis de réduire les définitions erronées de bases G; (C) l'analyse avec l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus a montré des performances améliorées, notamment une longueur de lecture moyenne accrue (pour des lectures de 2×300 et 2×500 pb), le pourcentage de lectures après le contrôle de la qualité et la détection de microorganismes.

L'élimination des contaminants dimères d'adaptateur optimise les performances de séquençage

Dans cet exemple, les librairies d'amplicons personnalisées avec une longueur d'insert cible de 950 pb ont été traitées en incluant trois phases successives supplémentaires de purification des billes avec un rapport bille/échantillon de 0,6 \times . Le contrôle de la qualité des librairies sur TapeStation montre que les phases supplémentaires de purification des billes ont éliminé de façon sélective la plupart des contaminants dimères d'adaptateur à une longueur de fragment d'environ 250 pb tout en conservant la librairie cible (figure 5).

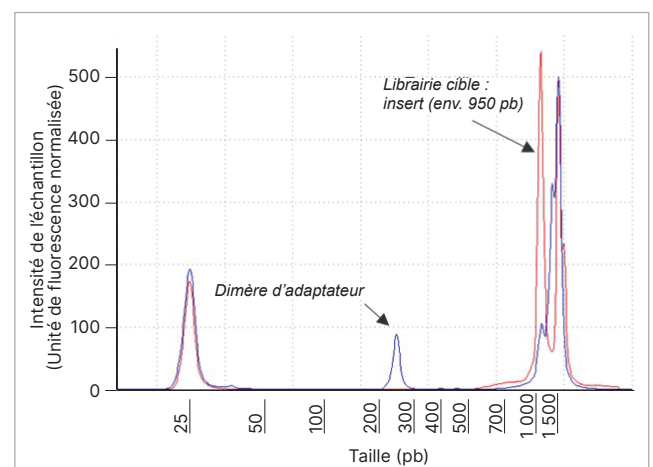


Figure 5 : Élimination des dimères d'adaptateur avec purifications supplémentaires des billes

Des phases supplémentaires de purification des billes de librairies d'amplicons personnalisées (ligne rouge) ont efficacement éliminé les contaminants dimères d'adaptateur, par rapport au protocole non modifié (ligne bleue).

Les librairies d'amplicons personnalisées, avec et sans purification supplémentaire des billes, ont été séquençées sur la série MiSeq i100 à une longueur de lecture de 2×500 pb. L'analyse de séquençage avec les librairies d'origine montre des problèmes de performance, aux alentours du cycle 100, attribuables à la présence des dimères d'adaptateur, caractérisés par des chutes importantes de l'intensité de signal, une diminution des scores Q30 et une augmentation des définitions de bases G. Le séquençage des librairies avec les phases supplémentaires de purification des billes montre des performances améliorées (figure 6).

Diversité des nucléotides

La diversité des nucléotides indique la proportion relative de chaque base (A, C, G ou T) présente dans chaque cycle de l'analyse. L'équilibre des nucléotides est important pour la correction de la matrice de couleurs et la normalisation de l'intensité par le système de séquençage. Le logiciel adaptatif Real-Time Analysis intégré à la série MiSeq i100 a été soigneusement développé pour permettre une définition des bases précise des librairies à faible diversité. Des performances optimales de séquençage des librairies à faible diversité peuvent être obtenues avec l'ajout d'un pourcentage minimum de substance de contrôle PhiX ($\geq 5\%$) pour maximiser le nombre de lectures de haute qualité.

Dans cet exemple, les librairies d'amplicons 16S à faible diversité avec ajouts de 5 % et 20 % de substance de contrôle PhiX séquencées sur la série MiSeq i100 présentent des performances fiables comparables à celles des librairies d'ADN humain Illumina DNA Prep à haute diversité (figure 7).

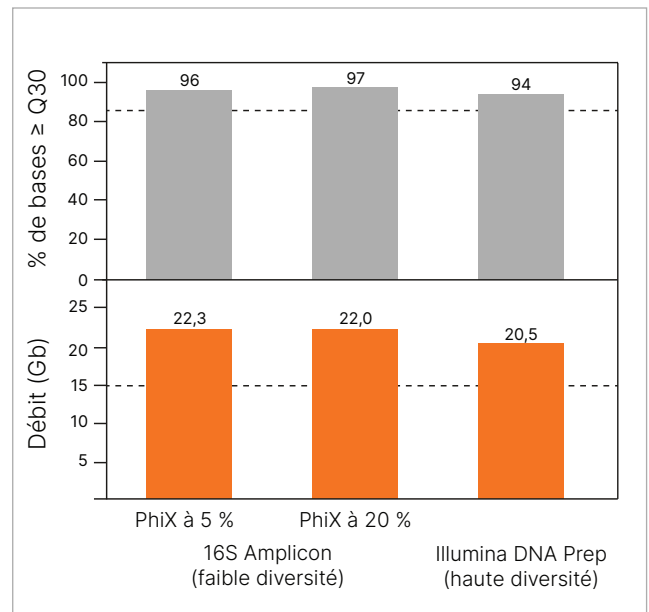


Figure 7 : Prise en charge des librairies à faible diversité

Le logiciel intégré à la série MiSeq i100 optimise les performances de séquençage pour les librairies à faible diversité, comme le montrent le pourcentage de bases \geq Q30 et le débit en Gb. Toutes les analyses ont été séquencées à une longueur de lecture de 2×301 pb à l'aide de la trousse MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles), les lignes en pointillés représentant les spécifications de performance.

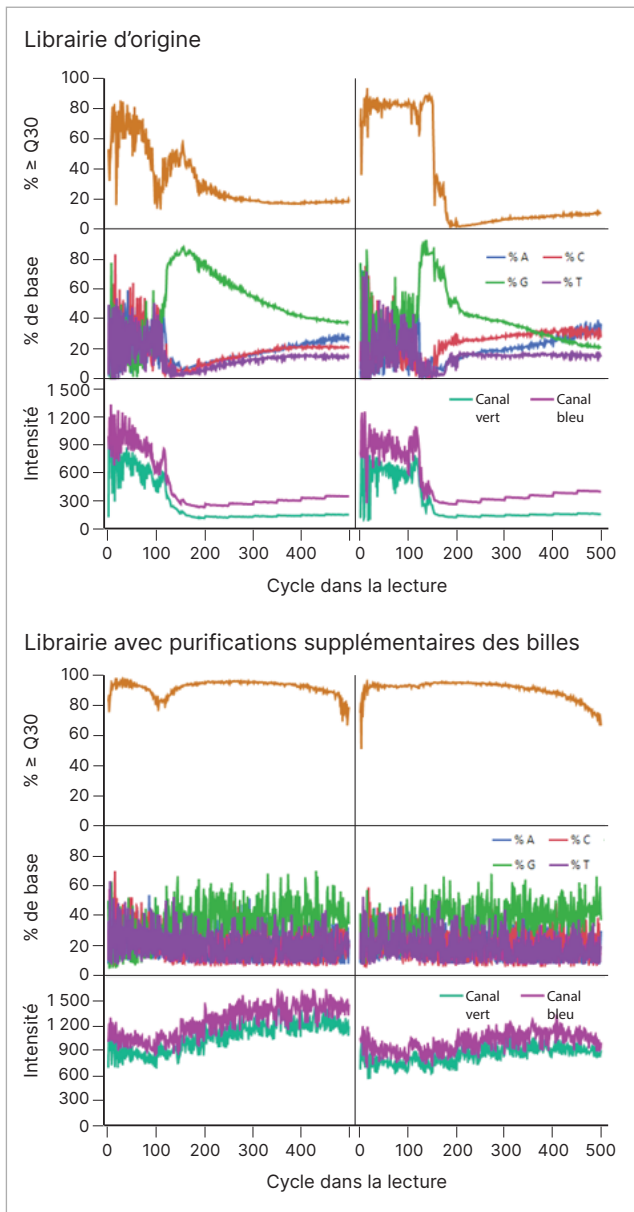


Figure 6 : Amélioration des performances de séquençage grâce à la réduction des dimères d'adaptateur

Le séquençage, avec une configuration de 2×500 pb sur la série MiSeq i100, de librairies d'amplicons personnalisées traitées en incluant des phases supplémentaires de purification des billes pour réduire les dimères d'adaptateur a montré des améliorations significatives des performances, avec des scores de qualité accrus et une réduction des définitions erronées de bases G.

Résumé

Les avancées révolutionnaires en chimie de séquençage et l'analyse intégrée des données sur la série MiSeq i100 offrent une facilité d'utilisation améliorée, une grande exactitude des données et une vitesse exceptionnelle. Le respect des meilleures pratiques décrites dans cette note technique pour évaluer la qualité des librairies, optimiser la concentration de chargement et regrouper les librairies peut maximiser les performances sur la série MiSeq i100.

En savoir plus

[Systèmes de séquençage MiSeq i100 et MiSeq i100 Plus](#)



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

© 2025 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-GI-03322 FRA v2.0