

# illumina RNA Prep with Enrichment

Ein schneller, integrierter Workflow für RNA-Anreicherungsanwendungen.

## Vorteile

- Schneller und unkomplizierter Workflow für die RNA-Anreicherung**  
 Bibliotheken in nur neun Stunden mit weniger als zwei Stunden manuellem Aufwand vorbereiten
- Herausragende Datenqualität bei schwierigen Proben**  
 Hohe Sensitivität bei einer Gesamtmenge von nur 10 ng RNA aus frischen oder gefrorenen Proben oder einer Gesamtmenge von nur 20 ng RNA aus degradierten FFPE-Proben
- Fokussierte und kostengünstige RNA-Sequenzierung**  
 Maximale Erkennungsleistung mit zuverlässiger Erfassungseffizienz bei reduzierter Sequenzierungstiefe für die genaue, unverzerrte Bestimmung
- Flexibler und skalierbarer Durchsatz**  
 Multiplexierung von bis zu 384 Proben in einem einzigen Lauf mit eindeutigen doppelten Indizes

## Einleitung

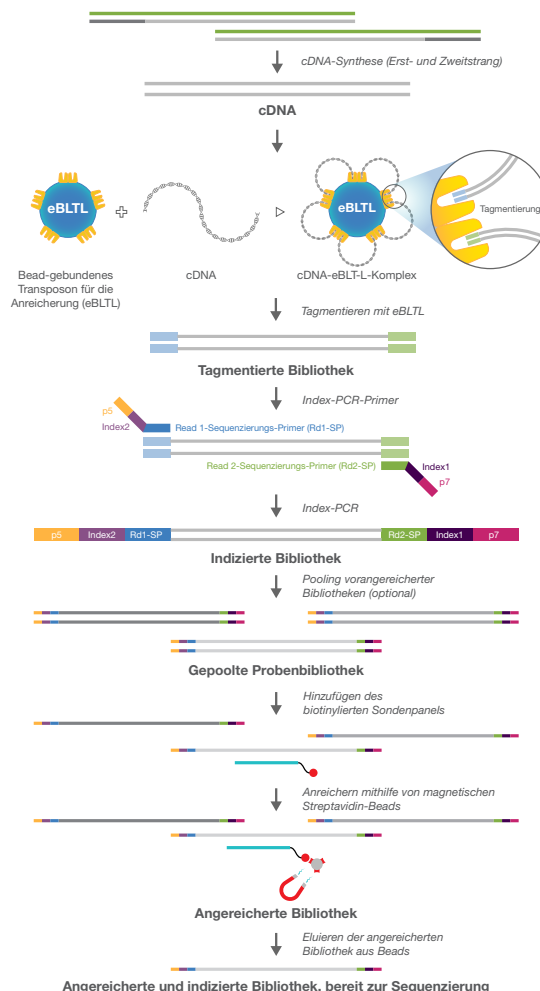
RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) mit NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ist eine leistungsstarke Methode für die Erkennung, das Profiling und die Quantifizierung von RNA-Transkripten. RNA-Seq bietet folgende Vorteile:

- Bei der zielgerichteten RNA-Sequenzierung wird die Expression einer spezifischen Gruppe von Genen analysiert. Die Anreicherung ermöglicht eine kostengünstige RNA-Exomanalyse anhand der sequenzspezifischen Erfassung von codierenden Regionen des Transkriptoms. Das Verfahren ist bestens für FFPE-Proben (formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Proben) von minderer Qualität geeignet.
- Gesamt-RNA-Seq bietet einen unverzerrten, hypothesefreien Ansatz für die umfassende Transkriptomanalyse. Gen- und Transkriptmenge werden mit dem Verfahren genau erfasst. Außerdem lassen sich sowohl bekannte als auch neue Merkmale in codierender sowie in zahlreichen Formen nicht codierender RNA ermitteln.
- Messenger-RNA(mRNA)-Seq quantifiziert mit hoher Sensitivität und Genauigkeit die Genexpression, ermittelt bekannte und neue Isoformen im codierenden Transkriptom und misst die allelspezifische Expression.

illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation bietet eine optimierte Lösung für die zielgerichtete RNA-Seq. Das Produkt zeichnet sich durch hohe Flexibilität in Bezug auf Zugabety und -menge für ein breites Spektrum an RNA-Seq-Anwendungen aus und ermöglicht so Nachweis- und Forschungsstudien in Bereichen wie der allelspezifischen Expression, der Erkennung von Fusionen, dem Biomarker-Screening usw. Die Kombination aus illumina RNA Prep with Enrichment und dem illumina Exome Panel liefert einen umfassenden Überblick des codierenden Transkriptoms und damit maximale Erkennungsleistung bei einem Bruchteil der Sequenzierungstiefe.

## Schneller und unkomplizierter Workflow für die RNA-Anreicherung

Der schnelle Workflow von illumina RNA Prep with Enrichment umfasst die On-Bead-Tagmentation sowie einen anschließenden einzelnen 90-minütigen vereinfachten Hybridisierungsschritt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: illumina RNA Prep with Enrichment-Chemie:** Nach der cDNA-Synthese ermöglicht eine durch eBTLs vermittelte einheitliche Tagmentierungsreaktion, gefolgt von einer einzelnen 90-minütigen Hybridisierungsreaktion einen schnellen und flexiblen Workflow.

Bei der On-Bead-Tagmentation kommen Bead-gebundene Transposone für die Anreicherung (enrichment Bead-Linked Transposome, eBTL) zum Einsatz, die für RNA optimiert wurden (eBTL) und eine einheitliche Tagmentierungsreaktion ermöglichen. Da keine separaten Fragmentierungsschritte erforderlich sind, verkürzt sich der Prozess. Dank der Innovationen bei der Hybridisierungsreaktion zeichnet sich der Workflow durch weniger Schritte, kürzere Inkubationszeiten, zahlreiche sichere Haltepunkte und eine Assay-Gesamtdauer aus, die > 50 % unter der von TruSeq™ RNA Exome liegt (Abbildung 2). Zusätzlich zur manuellen Vorbereitung ist illumina RNA Prep with Enrichment auch zur automatischen Verarbeitung mit Liquid-Handling-Plattformen geeignet, was eine hochgradig reproduzierbare Handhabung von Proben mit geringerem Risiko menschlicher Fehler und weniger manuellem Aufwand gewährleistet.



**Abbildung 2: Illumina RNA Prep with Enrichment zeichnet sich durch einen schnellen Workflow aus:** On-Bead-Tagmentierung und ein einzelner 90-minütiger Hybridisierungsschritt sorgen gemeinsam für einen im Vergleich zu TruSeq RNA Exome schnelleren Workflow mit weniger Schritten.

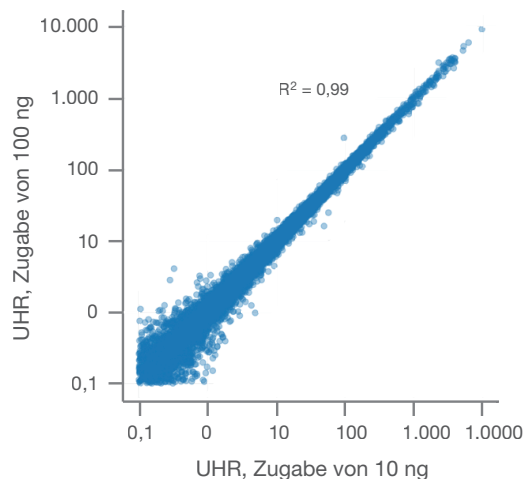
## Qualitativ hochwertige Daten

### Hochgradig genaue Daten aus FFPE-Proben und Proben von geringer Menge

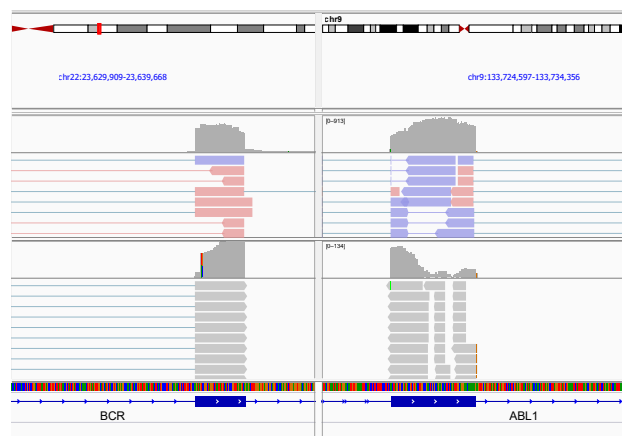
Die hohe Erfassungseffizienz und die hohe Coverage-Einheitlichkeit minimieren die erforderliche Sequenzierungstiefe, um Expressionsebenen genau und ohne Verzerrungen zu ermitteln. Illumina RNA Prep with Enrichment liefert ab einer Gesamtmenge von nur 10 ng RNA aus frischen oder gefrorenen Proben hochwertige Daten mit hoher Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen RNA-Zugabemengen (Abbildung 3). Wertvolle Tumor-Normal-Proben oder archivierte FFPE-Gewebeproben stellen eine umfassende Quelle biologischer Informationen für das Genexpressions-Profil dar, lassen sich aufgrund der durch den Fixierungs- und Lagerungsprozess verursachten Nukleinsäure-Degradation jedoch nur schwer untersuchen.<sup>1</sup> Illumina RNA Prep with Enrichment liefert ab einer RNA-Zugabe von nur 20 ng aus FFPE-Proben hochwertige Daten. Gemeinsam unterstreichen diese Ergebnisse, dass es sich bei Illumina RNA Prep with Enrichment um die ideale Lösung für wertvolle und degradierte Proben handelt, bei denen nur begrenzt Ausgangsmaterial zur Verfügung steht.

### Erkennung von Genfusionen in Proben von geringer Menge oder FFPE-Proben

Zur Demonstration der Fähigkeit von Illumina RNA Prep with Enrichment, strukturelle Varianten in RNA-Transkripten zu erkennen, wurden frische, gefrorene und FFPE-Proben mit dem Illumina Exome Panel angereichert und mit dem NovaSeq™ 6000-System sequenziert. Die Ergebnisse zeigen eine Call-Rate von 100 % für *BCR-ABL1*- (Abbildung 4) und *TPM3-NTRK1*-Genfusionen bei sechs Replikaten der K-562-Zelllinie (RNA-Integritätszahl [RNA Integrity Number, RIN] = 7,4, DV<sub>200</sub> = 90 %) und einer Kolorektalkrebs-Zelllinie (RIN = 2,5, DV<sub>200</sub> = 85 %) (Tabelle 1).



**Abbildung 3: Hochwertige Daten aus Proben von geringer Menge:** Illumina RNA Prep with Enrichment zeichnet sich durch eine hohe Übereinstimmung der Daten bei RNA-Gesamtzugabemengen von 10 ng und 100 ng aus UHR-Proben (universelle humane Referenz) aus. UHR-RNA-Bibliotheken wurden in Teilproben mit 25 Mio. Clustern je Bibliothek auf einem NovaSeq 6000-System sequenziert. Die Daten wurden mit der App BaseSpace RNA-Seq Alignment v 1.1.1 analysiert.



**Abbildung 4: Erkennung der BCR-ABL1-Genfusion:** Aus 10 ng RNA der K-562-Zelllinie mit Illumina RNA Prep with Enrichment und dem Illumina Exome Panel vorbereitete Bibliotheken ermöglichten die erfolgreiche Erkennung der *BCR-ABL1*-Genfusion mit dem Broad Integrative Genomics Viewer (IGV). Die obere Alignment-Spur zeigt alle Reads. Die untere Spur zeigt nur Reads, die auf die *BCR-ABL1*-Fusion hindeuten.

**Tabelle 1: Erkennung von Genfusionen**

Fusion (Quelle)	RIN	RNA-Zugabe	Erkennung
<i>BCR-ABL1</i> (K-562)	7,4	10 ng	6/6 Replikate (100 %)
<i>TPM3-NTRK1</i> (Kolorektalkrebs)	2,5	20 ng	6/6 Replikate (100 %)

## Zielgerichtete, kostengünstige RNA-Seq

### Hervorragende Exon-Coverage

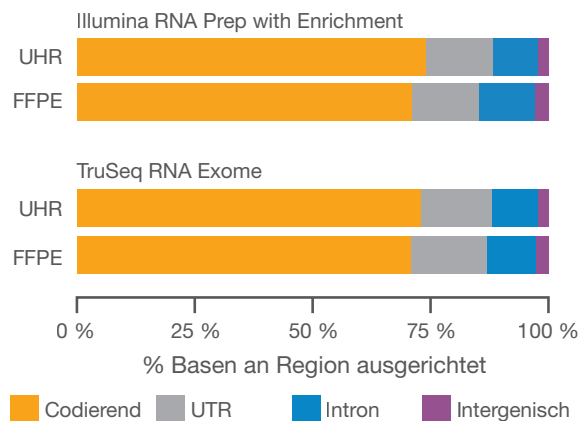
Illumina RNA Prep with Enrichment kann gemeinsam mit dem Illumina Exome Panel verwendet werden. Dieses enthält ein hochgradig optimiertes Sondenset, das eine umfassende Coverage codierender RNA-Sequenzen bietet (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Illumina Exome Panel – Spezifikationen**

Coverage-Spezifikation	Illumina Exome Panel
Anzahl der Zielgene	21.415
Anzahl der exonischen Zielregionen	214.126
Anzahl der Sonden	425.437
RefSeq-Exom-Coverage in Prozent	98,3 %

Zur Auswertung der Leistung von Illumina RNA Prep with Enrichment bei der Exomsequenzierung wurden Bibliotheken aus UHR-RNA (Universal Human Reference, universelle humane Referenz) und FFPE-RNA mit Illumina RNA Prep with Enrichment vorbereitet. Diese Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000-System bei 2 × 100 bp (25 Mio. Reads) sequenziert. Die Datenanalyse mit der Enrichment-App in BaseSpace™ Sequence Hub zeigt für Illumina RNA Prep with Enrichment eine herausragende exonische Coverage (Abbildung 5) mit > 85 % der erfassten Basen aligniert mit codierender Sequenz und untranslatierten Bereichen (Untranslated Regions, UTR) der RNA. Das Ergebnis ist vergleichbar mit dem von TruSeq RNA Exome (Abbildung 6).

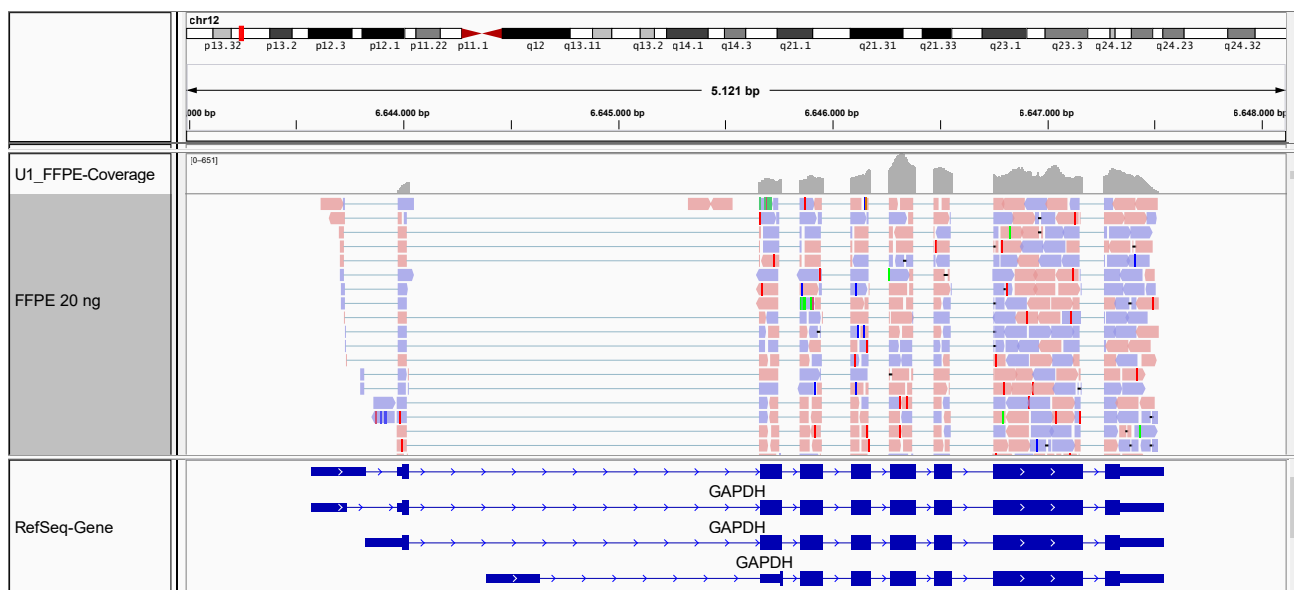
Diese Ergebnisse zeigen, dass Illumina RNA Prep with Enrichment eine hochgradig effiziente Erfassung ermöglicht, indem die Sequenzierung auf die hochwertigen Inhalte codierender RNA-Regionen fokussiert wird. Aufgrund der Nutzung fokussierter Inhalte erfordert Illumina RNA Prep with Enrichment geringere Sequenzierungstiefen und liefert kleinere Datensätze, wodurch Zeit und Kosten eingespart werden.



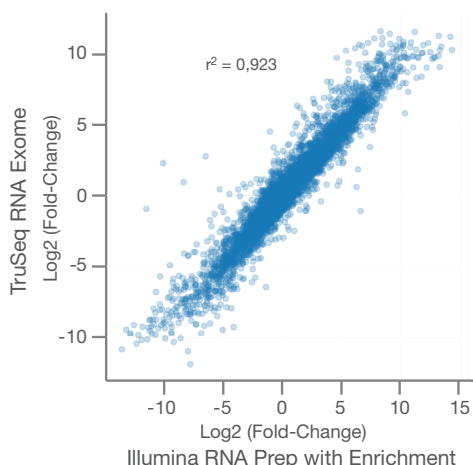
**Abbildung 6: Coverage codierender Regionen mit Illumina RNA Prep with Enrichment:** Aus 10 ng UHR-RNA und 20 ng FFPE-RNA mit Illumina RNA Prep with Enrichment und dem Illumina Exome Panel vorbereitete Bibliotheken zeigen, dass über 85 % der Daten auf codierende Bereiche und UTRs aligniert sind. Zum Vergleich sind Daten aus TruSeq RNA Exome-Bibliotheken abgebildet. Die Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000-System bei 2 × 100 bp (in Teilproben mit 25 Mio. Reads) sequenziert.

### Übereinstimmung mit TruSeq RNA Exome

Der Vergleich von Daten, die aus Illumina RNA Prep with Enrichment-Bibliotheken generiert wurden, mit Daten aus TruSeq RNA Exome-Bibliotheken, einer Standardlösung für die RNA-Anreicherung, zeigt eine hohe Übereinstimmung (Abbildung 7). Zu beachten ist, dass sich der s-förmige Datenverlauf aufgrund von Index-Hopping bei mit TruSeq RNA Exome verwendeten Adaptern ergibt. Wichtig ist, dass Illumina RNA Prep with Enrichment eindeutige doppelte Indizes (Unique Dual Indexes, UDIs) verwendet, die Index-Rekombination verhindern.



**Abbildung 5: Coverage codierender Regionen bei Illumina RNA Prep with Enrichment:** Eine aus 20 ng einer minderwertigen FFPE-Probe vorbereitete und mit dem Illumina Exome Panel angereicherte Probe wurde bei 25 Mio. Reads analysiert. Dargestellt wird die Coverage des GAPDH-Kontrollgens mit Broad IGV mit Reads in den codierenden Exonen und einer guten Target-Erfassung.



**Abbildung 7: Übereinstimmung mit TruSeq RNA Exome:** Das Diagramm zu Illumina RNA Prep with Enrichment zeigt eine hohe Übereinstimmung mit TruSeq RNA Exome, gemessen als Log<sub>2</sub> (Fold-Change) für UHR-RNA (Agilent, Katalog-Nr. 740000) im Vergleich zu Human Brain Total RNA (Thermo-Fisher, Katalog-Nr. AM7962). Alle Bibliotheken wurden mit einer Zugabemenge von 10 ng vorbereitet. Die TruSeq RNA Exome-Bibliotheken wurden als 4-Plex-Bibliotheken angereichert. Illumina RNA Prep with Enrichment-Bibliotheken wurden als 3-Plex-Bibliotheken angereichert. Bei allen Daten erfolgte ein Downsampling auf 25 Mio. Cluster pro Bibliothek. Die Daten wurden mit der BaseSpace Cufflinks Assembly & DE App v 2.1.0 analysiert.

## Flexibler und skalierbarer Durchsatz

Durch die Kombination von Illumina RNA Prep with Enrichment mit Hochdurchsatzgeräten wie dem NextSeq™ 550- und dem NovaSeq 6000-System können Labors deutlich mehr Daten pro Lauf sequenzieren, ohne dass es dabei zu einer Beeinträchtigung der Datenqualität kommt. Für eine zusätzliche Steigerung des Probendurchsatzes unterstützt Illumina RNA Prep with Enrichment die Multiplexierung mit 384 eindeutigen doppelten Indizes (Unique Dual Indexes, UDIs)<sup>a</sup>. UDI unterbindet nicht nur Index-Fehlzuweisungen, sondern senkt auch die Sequenzierungskosten, da sich bis zu 384 Proben auf eine einzige NovaSeq S4-Fließzelle laden lassen, was einen deutlich höheren Durchsatz ermöglicht.

## Modulares Design für ein breites Spektrum von RNA-Anwendungen

Mit der Kombination von RNA-Bibliotheksvorbereitung und Anreicherungsleistung mit der bewährten Genauigkeit der SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) von Illumina<sup>2</sup> ist Illumina RNA Prep with Enrichment bei festen und anwendungsspezifischen Panels unterschiedlicher Größen für komplexe Studiendesigns in unterschiedlichen Bereichen geeignet. Zu den Beispielen gehören das Illumina Exome Panel zur Analyse codierender Regionen des Transkriptoms und das fokussiertere Respiratory Virus Oligos Panel mit ca. 7.800 Sonden zur Erkennung von Atemwegsviren, aktuellen Grippeviren und SARS-CoV-2, dem neuartigen Coronavirus (CoV), das die COVID-19-Pandemie ausgelöst hat.

<sup>a</sup> Bei der Produkteinführung werden bis zu 192 UDIs unterstützt. Zusätzliche UDIs sind im weiteren Verlauf des Jahres 2020 erhältlich.

Bei der Kombination von Illumina RNA Prep with Enrichment mit einem anwendungsspezifischen Panel sind u. U. eine Validierung und Protokollanpassungen erforderlich.

## Zusammenfassung

Illumina RNA Prep with Enrichment bietet eine optimierte Lösung und einen unkomplizierten, schnellen Workflow für die zielgerichtete RNA-Seq. Das Produkt zeichnet sich durch herausragende Flexibilität beim Zugabetyp aus (einschließlich degradierter Proben) und eignet sich auch für geringe Eingabemengen. Das modulare Design eignet sich für ein weites Spektrum an RNA-Seq-Anwendungen für Regionen von Interesse, beispielsweise mit dem Illumina Exome Panel sowie dem Illumina Respiratory Virus Oligos Panel, und ermöglicht so Nachweis- und Forschungsstudien in Bereichen wie der allelspezifischen Expression, der Erkennung von Fusionen, dem Biomarker-Screening usw.

## Weitere Informationen

Weitere Informationen zu Illumina RNA Prep with Enrichment und derzeit erhältliche Panel-Inhalten finden Sie unter [www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html](http://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html).

## Bestellinformationen

Bibliotheksvorbereitung	Katalog-Nr.
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 Proben) <sup>a</sup>	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 Proben) <sup>a</sup>	20040537
Indizes	Katalog-Nr.
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben) <sup>b</sup>	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben) <sup>b</sup>	20027214
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben)	20042666 demnächst erhältlich
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indizes, 96 Proben)	20042667 demnächst erhältlich
Anreicherungs-Panel	Katalog-Nr.
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina Respiratory Virus Oligos Panel v2	20044311

a. Das 16-Proben-Kit enthält ausreichend Reagenzien für 16 1-Plex-Anreicherungsreaktionen. Das 96-Proben-Kit enthält ausreichend Reagenzien für 32 3-Plex-Anreicherungsreaktionen.  
b. „IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes“ ist die neue Bezeichnung für „IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes“. Der Kit-Inhalt ist identisch.

## Quellen

- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, and Schlimpberger M. [Determinants of RNA quality from FFPE samples.](#) *PLoS ONE*. 2007;2(12): e1261.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry.](#) *Nature*. 2008;456:53–59.