

Preparazione con Illumina RNA Prep with Enrichment

Un flusso di lavoro integrato e veloce per le applicazioni di arricchimento dell'RNA.

Punti principali

- Flusso di lavoro semplice e veloce per l'arricchimento dell'RNA**
 Preparazione delle librerie in appena nove ore con meno di due ore di interventi manuali
- Dati di qualità eccellente da campioni difficili**
 Elevata sensibilità da appena 10 ng di RNA totale ottenuto da campioni freschi o congelati o da 20 ng di RNA totale da campioni in FFPE degradati
- Sequenziamento dell'RNA mirato ed economico**
 Rilevamento accurato e oggettivo a una profondità ridotta di sequenziamento grazie a un'efficiente e robusta cattura che massimizza l'efficacia della scoperta
- Processività flessibile e scalabile**
 Multiplex fino a 384 campioni in una singola corsa con doppi indici univoci

Introduzione

Il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) assieme al sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) è un metodo potente per la scoperta, la profilazione e la quantificazione dei trascritti dell'RNA. I vantaggi di RNA-Seq includono:

- La tecnologia RNA-Seq mirata analizza l'espressione in un determinato gruppo di geni. L'arricchimento consente l'analisi dell'esoma dell'RNA utilizzando la cattura specifica per la sequenza di regioni codificanti del trascrittoma. È ideale per i campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) di scarsa qualità.
- RNA-Seq totale fornisce un approccio oggettivo e privo di ipotesi per l'analisi esaustiva del trascrittoma. Consente di misurare l'abbondanza del gene e del trascritto e di rilevare le caratteristiche note e nuove nella codifica e più forme dell'RNA non codificante.
- Il sequenziamento dell'RNA messaggero (Messenger RNA, mRNA-Seq) quantifica in modo sensibile e accurato l'espressione genica, identifica isoforme note e nuove nel trascrittoma codificante e misura l'espressione specifica per l'allele.

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation offre una soluzione ottimizzata per il sequenziamento RNA-Seq mirato. Offre elevata flessibilità per il tipo e la quantità di input per supportare un'ampia gamma di applicazioni RNA-Seq, consentendo il rilevamento e studi di scoperta come l'espressione specifica per l'allele, il rilevamento della fusione, lo screening di biomarcatori e altro. Illumina RNA Prep with Enrichment assieme al pannello Illumina Exome forniscono una panoramica esaustiva del trascrittoma codificante per ottenere la massima efficacia di scoperta a una frazione della profondità di sequenziamento.

Flusso di lavoro semplice e veloce per l'arricchimento dell'RNA

Illumina RNA Prep with Enrichment utilizza la tagmentazione su microsfere per offrire un rapido flusso di lavoro attenendosi a una singola fase di ibridazione semplificata di 90 minuti (Figura 1).

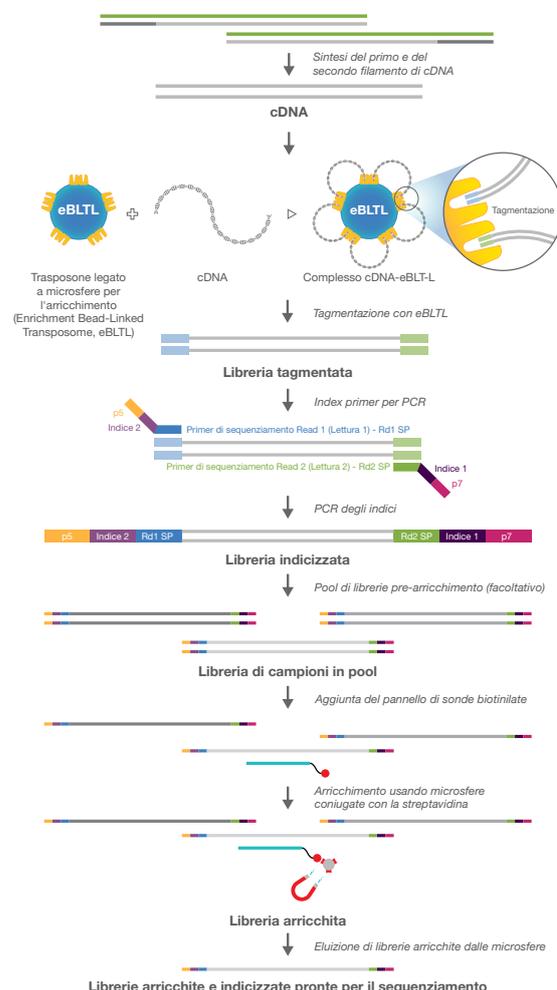


Figura 1: Chimica Illumina RNA Prep with Enrichment: dopo una sintesi di cDNA, una reazione di tagmentazione uniforme mediata da eBTL e seguita da una singola reazione di ibridazione di 90 minuti consente un flusso di lavoro veloce e flessibile.

La tagmentazione su microsfere offre trasposoni legati a microsfere per l'arricchimento (Enrichment Bead-Linked Transposome, eBTL) ottimizzati per l'RNA (eBTLT) che consentono di mediare una reazione di tagmentazione uniforme, eliminando la necessità di fasi separate di frammentazione al fine di risparmiare tempo. Unito alle innovazioni apportate alla reazione di ibridazione, il flusso di lavoro è composto da un numero inferiore di fasi, tempi inferiori di incubazione, numerosi punti di arresto sicuri e una durata complessiva del saggio del 50% più veloce rispetto a TruSeq™ RNA Exome (Figura 2). Oltre alla preparazione manuale, Illumina RNA Prep with Enrichment è progettato per la compatibilità con le piattaforme di gestione dei liquidi per un flusso di lavoro automatizzato, fornendo gestione dei campioni altamente riproducibile, rischio ridotto di errore umano e tempi di interventi manuali inferiori.



Figura 2: Illumina RNA Prep with Enrichment fornisce un veloce flusso di lavoro: la tagmentazione su microsferi assieme a una singola fase di ibridazione di 90 minuti forniscono un flusso di lavoro più veloce con un numero inferiore di fasi rispetto a TruSeq RNA Exome.

Elevata qualità dei dati

Dati altamente accurati da campioni con input ridotto e in FFPE

L'elevata efficacia di cattura e l'uniformità di copertura riducono al minimo la profondità di sequenziamento richiesta per determinare accuratamente i livelli di espressione senza distorsioni. Partendo da appena 10 ng di RNA totale, Illumina RNA Prep with Enrichment fornisce dati di qualità con elevata concordanza tra diverse quantità di input di RNA ottenuto da campioni freschi o congelati (Figura 3). I campioni preziosi tumore-normale o i campioni di tessuto in FFPE archiviati forniscono una ricca fonte di informazioni biologiche per il profilo dell'espressione genica; tuttavia possono essere difficili da studiare a causa della degradazione dell'acido nucleico dovuta al processo di fissazione e conservazione.¹ Illumina RNA Prep with Enrichment genera dati di elevata qualità da appena 20 ng di input di RNA ottenuto da campioni in FFPE. Questi risultati assieme dimostrano che Illumina RNA Prep with Enrichment è una soluzione ideale per campioni preziosi o degradati con limitato materiale di partenza.

Rilevamento della fusione genica in campioni con basso input o in FFPE

Per dimostrare la capacità di Illumina RNA Prep with Enrichment di riconoscere le varianti strutturali nei trascritti di RNA, sono stati arricchiti campioni freschi/congelati e in FFPE utilizzando il pannello Illumina Exome e sequenziati sul sistema NovaSeq™ 6000. I risultati hanno mostrato una percentuale di rilevamento del 100% per le fusioni geniche *BCR-ABL1* (Figura 4) e *TPM3-NTRK1* su sei replicati della linea cellulare K-562 (numero di integrità RNA, RIN = 7,4, DV₂₀₀ = 90%) e una linea cellulare colon-retto (RIN = 2,5, DV₂₀₀ = 85%), rispettivamente (Tabella 1).

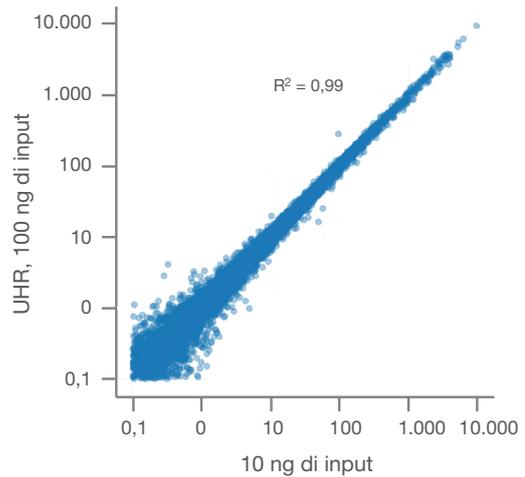


Figura 3: Dati di elevata qualità da campioni con basso input: Illumina RNA Prep with Enrichment fornisce elevata concordanza di dati tra quantità di input di 10 ng e 100 ng di RNA totale dal riferimento umano universale (Universal Human Reference, UHR). Le librerie di RNA UHR sono state sequenziate su un sistema NovaSeq 6000, sottocampionate a 25 milioni di cluster per libreria. I dati sono stati analizzati con l'applicazione BaseSpace RNA-Seq Alignment v 1.1.1.

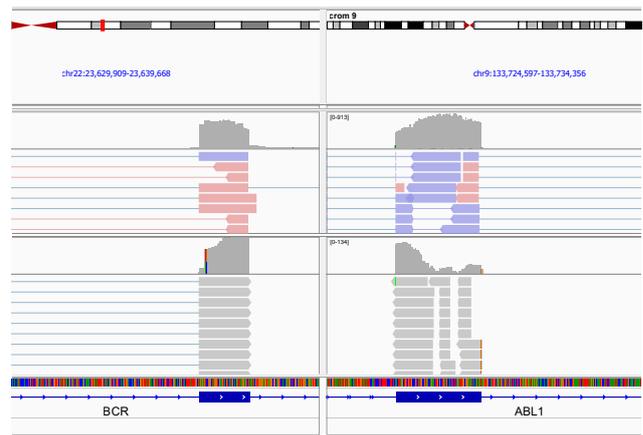


Figura 4: Rilevamento della fusione genica BCR-ABL1: le librerie preparate da 10 ng di RNA della linea cellulare K-562 utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment e il pannello Illumina Exome hanno permesso di rilevare correttamente la fusione genica di *BCR-ABL1* utilizzando Broad Integrative Genomics Viewer (IGV). Il tracciato rosso superiore mostra tutte le letture; il tracciato inferiore mostra solo le letture che supportano la fusione *BCR-ABL1*.

Tabella 1: Rilevamento della fusione genica

Fusione (fonte)	RIN	Input di RNA	Rilevamento
<i>BCR-ABL1</i> (K-562)	7,4	10 ng	6/6 replicati (100%)
<i>TPM3-NTRK1</i> (cancro colon-retto)	2,5	20 ng	6/6 replicati (100%)

RNA-Seq mirato ed economico

Copertura esonica eccellente

Quando Illumina RNA Prep with Enrichment viene utilizzato con il pannello Illumina Exome avete a disposizione un set di sonde altamente ottimizzato che fornisce una copertura esaustiva delle sequenze di RNA codificanti (Tabella 2).

Tabella 2: Specifiche del pannello Illumina Exome

Specifiche della copertura	Pannello Illumina Exome
N. di geni target	21.415
N. di regioni esoniche target	214.126
N. di sonde	425.437
Percentuale esonica coperta RefSeq	98,3%

Per la valutazione delle prestazioni di Illumina RNA Prep with Enrichment per il sequenziamento dell'esoma, sono state preparate librerie da RNA di riferimento umano universale (UHR) e da RNA in FFPE utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment. Le librerie ottenute sono state sequenziate su un sistema NovaSeq 6000 a 2 x 100 bp (25 milioni di letture). L'analisi dei dati con l'applicazione Enrichment in BaseSpace™ Sequence Hub ha rivelato che Illumina RNA Prep with Enrichment era eccellente nella copertura esonica (Figura 5) con più dell'85% delle basi coperte e allineate rispetto alla sequenza codificante e alle regioni non tradotte (Untranslated Region, UTR) dell'RNA, rispetto a TruSeq RNA Exome (Figura 6).

Questi risultati dimostrano che Illumina RNA Prep with Enrichment fornisce un'elevata efficacia di cattura che concentra gli sforzi del sequenziamento su contenuti di elevato valore delle regioni codificanti dell'RNA. Lavorando su un contenuto più mirato, Illumina RNA Prep with Enrichment richiede minori profondità di sequenziamento e fornisce set di dati più piccoli che consentono di risparmiare tempo e costi.

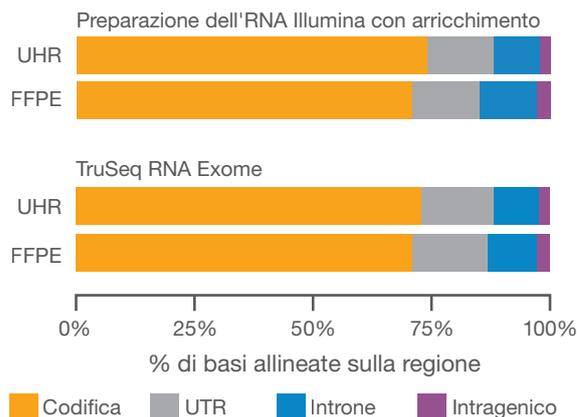


Figura 6: Copertura di regioni codificanti con Illumina RNA Prep with Enrichment: le librerie preparate da 10 ng di RNA UHR e da 20 ng di RNA in FFPE utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment e il pannello Illumina Exome mostrano più dell'85% di dati allineati sulle regioni codificanti e le regioni UTR. I dati ottenuti dalle librerie generate con TruSeq RNA Exome sono mostrati a scopo di confronto. Le librerie sono state sequenziate su un sistema NovaSeq 6000 a 2 x 100 bp, sottocampionate a 25 milioni di letture.

Concordanza con TruSeq RNA Exome

Il confronto dei dati ottenuti dalle librerie preparate con Illumina RNA Prep with Enrichment rispetto ai dati ottenuti dalle librerie preparate con TruSeq RNA Exome (una soluzione standard per l'arricchimento dell'RNA) ha mostrato elevata concordanza (Figura 7). Da notare, che la forma sigmoide del grafico dei dati è il risultato dell'hopping degli indici ottenuto dagli adattatori utilizzati con TruSeq RNA Exome. È importante ricordare che Illumina RNA Prep with Enrichment utilizza doppi indici univoci (Unique Dual Index, UDI) progettati per eliminare la ricombinazione degli indici.

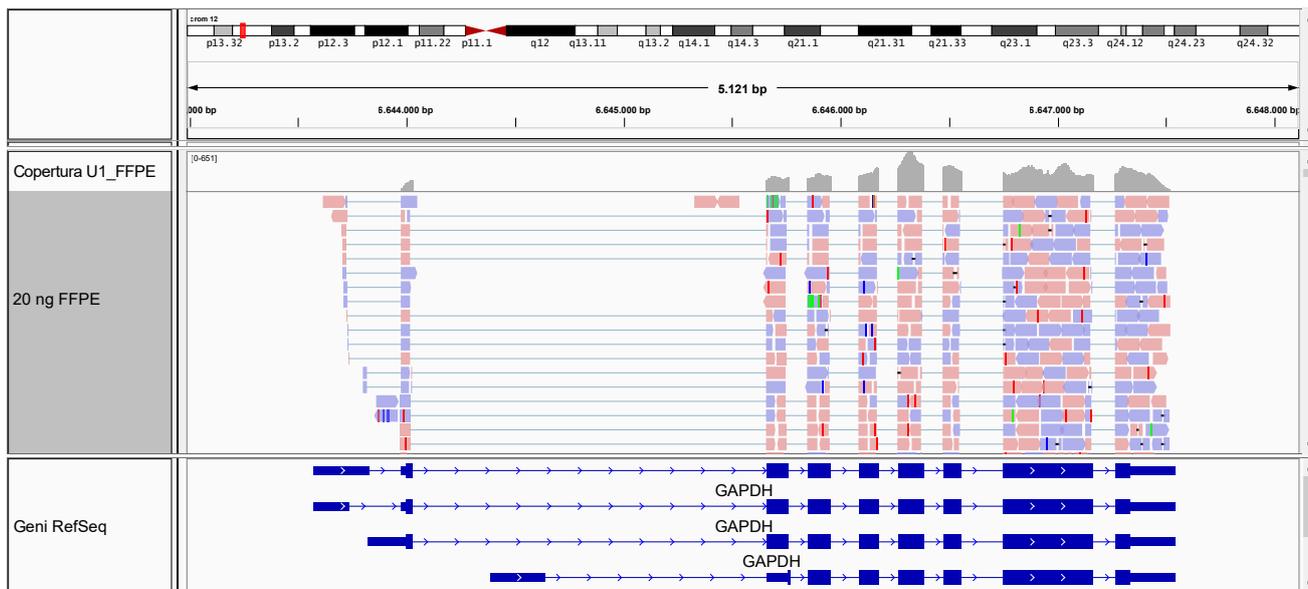


Figura 5: Copertura delle regioni codificanti con Illumina RNA Prep with Enrichment: una libreria preparata da 20 ng di campioni in FFPE di bassa qualità e arricchita con il pannello Illumina Exome è stata sequenziata a 25 milioni di letture. Il grafico visualizza la copertura del gene di controllo GAPDH utilizzando Broad IGV e mostra le letture che si allineano sull'esone codificante mostrando una buona cattura dei target.

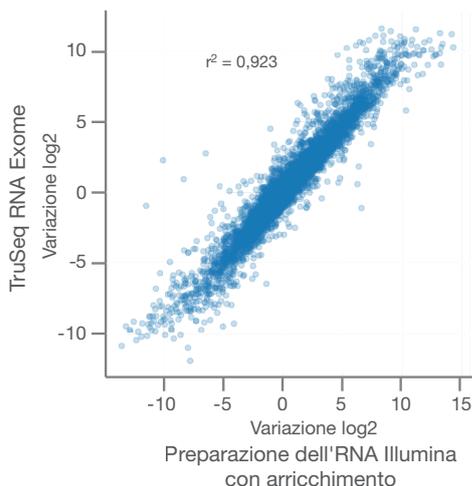


Figura 7: Concordanza con TruSeq RNA Exome: il grafico di Illumina RNA Prep with Enrichment mostra elevata concordanza con TruSeq RNA Exome, come misurato dalla variazione log₂ per UHR RNA (Agilent, n. di catalogo 740000) rispetto a Human Brain Total RNA (Thermo-Fisher, n. di catalogo AM7962). Tutte le librerie sono state preparate da input di 10 ng. Le librerie preparate con TruSeq RNA Exome sono state arricchite come un 4 plex, le librerie Illumina RNA Prep with Enrichment sono state arricchite come un 3 plex. Tutti i dati sono stati sottocampionati a 25 milioni di cluster per libreria. I dati sono stati analizzati con l'applicazione BaseSpace Cufflinks Assembly & DE v 2.1.0.

Processività flessibile e scalabile

Unendo Illumina RNA Prep with Enrichment e strumenti a elevata processività come i sistemi NextSeq™ 550 e NovaSeq 6000, i laboratori possono sequenziare un numero significativamente superiore di campioni per corsa senza compromissione della qualità dei dati. Per aumentare ulteriormente la processività dei campioni, Illumina RNA Prep with Enrichment supporta il multiplex con 384 doppi indici univoci (UDI).^{*} Oltre ad eliminare l'errata assegnazione degli indici, gli indici UDI contribuiscono a ridurre i costi del sequenziamento grazie alla possibilità di caricare fino a 384 campioni su una singola cella a flusso NovaSeq S4 aumentando in modo significativo la processività.

Design modulare per un'ampia gamma di applicazioni per l'RNA

Unendo la preparazione delle librerie di RNA con le prestazioni di arricchimento e la comprovata accuratezza della chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina,² Illumina RNA Prep with Enrichment supporta sia i pannelli fissi che i pannelli personalizzati di diverse dimensioni per le progettazioni di studi avanzati in diverse aree. Esempi includono il pannello Illumina Exome per l'analisi delle regioni codificanti del trascrittoma e il pannello Respiratory Virus Oligos, che offre circa 7.800 sonde progettate per rilevare virus respiratori, recenti ceppi influenzali e SARS-CoV-2, il nuovo ceppo di coronavirus (CoV)

^{*} Al lancio del prodotto saranno supportati fino a 192 UDI. Ulteriori UDI saranno disponibili nel corso del 2020.

responsabile della pandemia da COVID-19. Quando si unisce Illumina RNA Prep with Enrichment a un pannello personalizzato potrebbe essere necessario ottimizzare la convalida e il protocollo.

Riepilogo

Illumina RNA Prep with Enrichment offre una soluzione ottimizzata con un flusso di lavoro semplice e rapido per il sequenziamento RNA-Seq mirato. Offre eccellente flessibilità per il tipo di input, inclusi campioni degradati, e supporta basse quantità di input. Il design modulare supporta un'ampia gamma di applicazioni RNA-Seq sulle regioni di interesse, ad esempio con il pannello Illumina Exome Panel e il pannello Respiratory Virus Oligos, consentendo il rilevamento e studi di scoperta come l'espressione specifica per l'allele, il rilevamento della fusione, lo screening di biomarcatori e altro.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su Illumina RNA Prep with Enrichment e per consultare le opzioni disponibili per il contenuto del pannello, visitate la pagina Web www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html.

Informazioni per gli ordini

Preparazione delle librerie	N. di catalogo
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 campioni) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 campioni) ^a	20040537
Indici	N. di catalogo
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indici, 96 campioni) ^b	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indici, 96 campioni) ^b	20027214
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20042666 Presto disponibile
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indici, 96 campioni)	20042667 Presto disponibile
Pannello Enrichment	N. di catalogo
Pannello Illumina Exome	20020183
Pannello Illumina Respiratory Virus Oligos v2	20044311

a. Il kit da 16 campioni dispone di reagenti sufficienti per 1 plex e 16 reazioni di arricchimento, il kit da 96 campioni dispone di reagenti sufficienti per 3 plex e 32 reazioni di arricchimento.
 b. "IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes" sono i nuovi nomi per "IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes"; il contenuto dei kit rimane lo stesso.

Bibliografia

- 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.