

TruSeq^{MC} RNA Exome

Solution reproductible et économique pour l'analyse d'ARN isolés provenant de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) et d'autres échantillons de piètre qualité.

Points forts

- Des données de bonne qualité issues d'échantillons difficiles à exploiter**
 Évalue les échantillons dégradés, notamment les tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine, pour le séquençage d'ARN
- Couverture exceptionnelle avec contenu ciblé**
 Maximise la puissance de découverte lorsque la profondeur de séquençage est réduite en ciblant les régions codantes du transcriptome
- Faible prise d'échantillons**
 Maintient une grande qualité de données avec seulement 10 ng d'ARN total
- Solution de flux de travail intégrée et flexible**
 Flux de travail complet augmentant l'efficacité du séquençage de capture d'exome d'ARN et prenant en charge le plexage simple ou le multiplexage jusqu'à 4 niveaux

ou nécessitent un séquençage en profondeur onéreux. Cela donne lieu à des vues nettement différentes du transcriptome, ce qui réduit la fiabilité des données et augmente les contraintes budgétaires.

Données de bonne qualité à partir d'échantillons difficiles à exploiter

Pour surmonter ces difficultés et faciliter l'accès aux renseignements précieux contenus dans les échantillons FFPE et d'autres échantillons de piètre qualité, Illumina offre le produit TruSeq RNA Exome, auparavant vendu sous le nom TruSeq RNA Access Library Prep Kit (figure 1). Ce flux de travail permet aux chercheurs de s'appuyer sur la technologie de séquençage nouvelle génération (NGS) pour réaliser des études de l'expression génétique portant sur l'ARN isolé provenant d'échantillons de piètre qualité. En ciblant les régions codantes de l'ARN, TruSeq RNA Exome a besoin de moins d'ARN et d'un nombre réduit de lectures, accroissant ainsi le nombre d'échantillons par analyse pour une analyse plus rentable du transcriptome.

Couverture exceptionnelle

TruSeq RNA Exome comprend une sonde fortement optimisée pour offrir une couverture complète des séquences de codage de l'ARN. TruSeq RNA Exome comprend plus de 425 000 sondes, chacune élaborée par rapport au génome de référence NCBI37/hg19 couvrant 98,3 % de l'exome RefSeq. Chaque sonde a été conçue pour capturer plus de 210 000 cibles, couvrant 21 415 gènes d'intérêt (tableau 1).

Tableau 1 : Détails de couverture de TruSeq RNA Exome

Spécifications de couverture	TruSeq RNA Exome
Nombre de gènes cibles	21 415
Nbre de régions exoniques ciblées	214 126
Nbre de sondes	425 437
Pourcentage couvert de l'exome RefSeq	98,3 %

Introduction

La disponibilité de millions d'échantillons préservés de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) procure un gisement énorme et extrêmement précieux de renseignements pour la recherche médicale, particulièrement pour les recherches sur le cancer. En général, ces échantillons sont associés à des données phénotypiques à long terme qui peuvent fournir des indications sur les modifications de l'expression génétique qui se produisent au cours des différents stades de la maladie. Malheureusement, le processus de fixation et le stockage des échantillons FFPE entraînent souvent une forte dégradation de l'ARN, ce qui complique considérablement la réalisation d'études reproductibles de profilage d'expression génétique avec séquençage d'ARN^{1,2}. Il est possible d'extraire de l'ARN utilisable à partir d'échantillons FFPE, mais les méthodes d'analyse actuelles produisent des résultats très variables

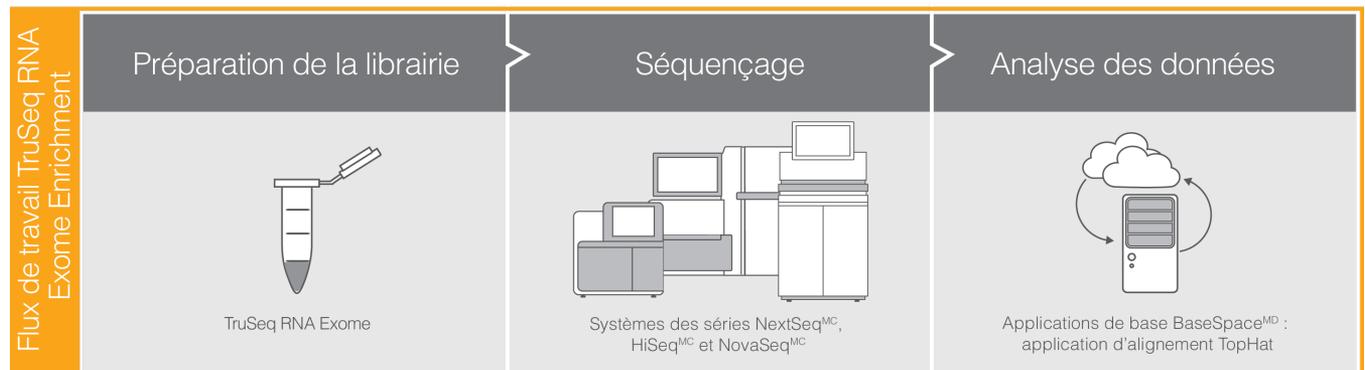


Figure 1 : Flux de travail TruSeq RNA Exome : TruSeq RNA Exome fait partie d'une solution intégrée de séquençage nouvelle génération (NGS) comprenant une préparation de librairies simplifiée, une fonction de capture de transcriptome codant, un module de séquençage et des analyses de données conviviales.

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser dans le cadre d'exams diagnostiques.

Un contenu ciblé

TruSeq RNA Exome offre des captures extrêmement efficaces permettant de cibler les efforts de séquençage sur le contenu à haute valeur des régions de codage de l'ARN. Pour étayer cette efficacité, des librairies ont été préparées à partir d'échantillons fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) de tumeurs pulmonaires et de tissus normaux, avec l'aide de TruSeq Stranded Total RNA et TruSeq RNA Exome. Des opérations de séquençage et d'analyse réalisées avec l'application BaseSpace TopHat Alignment ont révélé qu'avec TruSeq RNA Exome, plus de 85 % des bases couvertes étaient alignées sur la séquence de codage et les régions non traduites (UTR) de l'ARN, par rapport à moins de 40 % avec TruSeq Stranded Total RNA (figure 3). Grâce à l'utilisation d'un contenu plus ciblé, TruSeq RNA Exome produit de plus petits ensembles de données permettant d'accélérer les analyses de données et de faciliter la manipulation de données.

Faible prise d'échantillons

La grande efficacité de la capture et la grande uniformité de la couverture minimisent la profondeur de séquençage requise pour définir les niveaux d'expression de manière précise et sans distorsion. En démarrant avec 10 ng d'ARN total seulement, il est possible d'obtenir la profondeur de séquençage requise pour une analyse quantitative et une détection précises des transcrits et des fusions de gènes. Grâce à cette faible utilisation d'échantillons, la solution TruSeq RNA Exome est idéale pour les échantillons précieux dont la quantité de matériel initial est limitée.

Un flux de travail simple et évolutif

TruSeq RNA Exome a été conçu et optimisé pour une flexibilité maximale selon les besoins de multiplexage, offrant une solution simple et évolutive faisant partie d'un système intégré basé sur la technologie de séquençage nouvelle génération (NGS) d'Illumina, comprenant la préparation des librairies, le séquençage et l'analyse des données (figure 1).

Préparation rationalisée de librairies

Les librairies de séquençage de brins d'ARN sont préparées avec la chimie TruSeq, précise et éprouvée. Cette méthode ajoute des oligonucléotides uniques à chaque librairie, en les marquant pour le groupement en aval sur une ligne (figure 2A). Cette étape de regroupement multi-échantillons permet de charger un plus grand nombre d'échantillons en une seule analyse de séquençage pour des études à débit élevé. Une fois les librairies groupées, elles passent par une étape de capture qui génère une librairie ciblée dépourvue d'ARN ribosomique ou de régions introniques et intergéniques. Les librairies groupées sont hybridées à des sondes marquées à la biotine spécialement utilisées pour le codage des régions ARN (figure 2B). On capture alors les cibles définies au sein de l'ensemble en ajoutant des billes de streptavidine qui se lient aux sondes biotinylées (figure 2C). Des aimants extraient les fragments d'ARN liés de la solution (figure 2D). Les fragments d'ARN capturés sont élués des billes et hybridés pour une seconde réaction d'enrichissement. Après amplification, une librairie ciblée est prête pour la génération d'amplifiats et le séquençage ultérieur. Les réactifs sont fournis en quantités suffisantes pour offrir une flexibilité de plexage des échantillons, allant du plexage simple au multiplexage à 4 niveaux.

Les mélanges de réactifs permettent de démarrer rapidement et rendent le processus facile à automatiser.

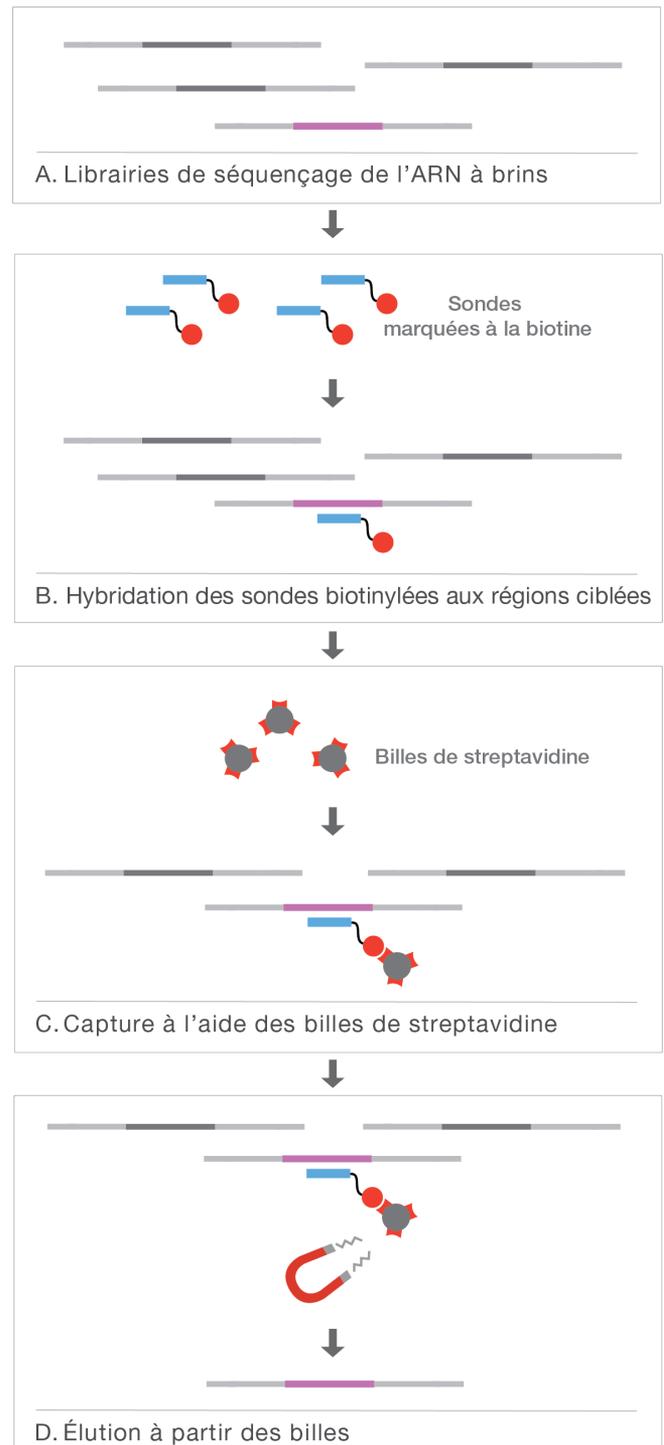
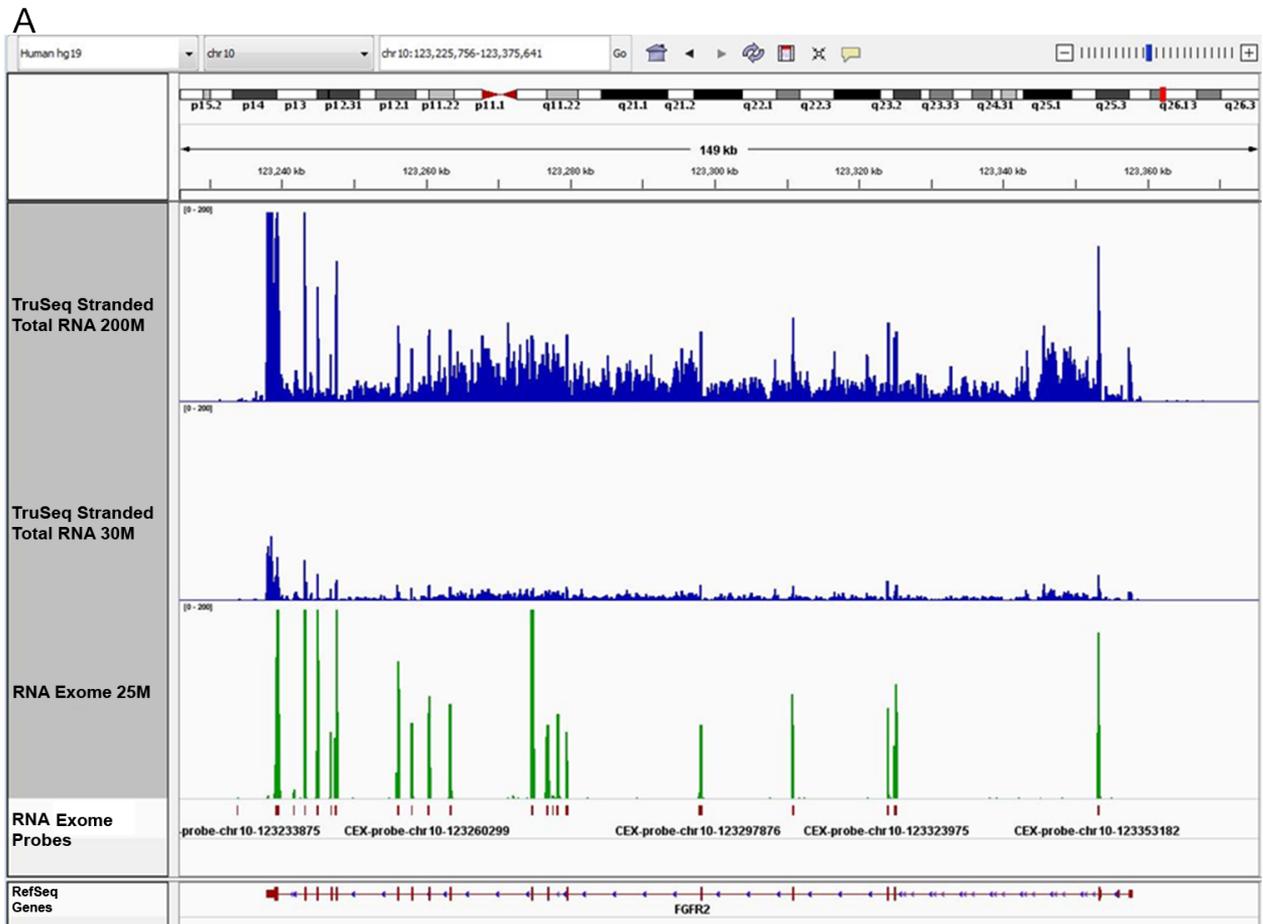


Figure 2 : Chimie de capture TruSeq RNA Exome : TruSeq RNA Exome offre une méthode simple et rationalisée pour isoler les régions d'intérêt ciblées des échantillons.



B

% bases alignées sur la région

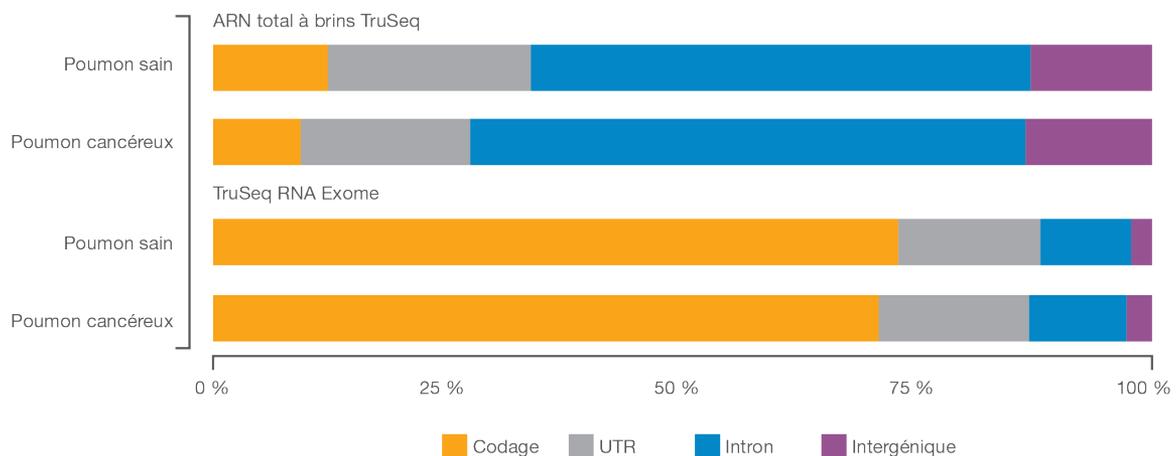


Figure 3 : Attention ciblée sur les régions codantes de l'ARN avec TruSeq RNA Exome : Des échantillons fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) de tumeurs pulmonaires et de tissus normaux ont été préparés avec TruSeq Stranded Total RNA et avec TruSeq RNA Exome. Les librairies ont été séquençées à 200 M et 25 M lectures, respectivement. (A) Les échantillons préparés avec TruSeq RNA Exome présentent une couverture bien plus importante des exons, même à 1/8 du nombre de lectures. Les données de TruSeq Stranded Total RNA ont été sous-échantillonnées à 30 M de lectures à titre de comparaison. (B) Avec l'application BaseSpace TopHat Alignment, plus de 85 % des données générées par TruSeq RNA Exome se sont alignées sur les transcrits (régions codantes et UTR).

Séquençage rentable

En se concentrant sur les régions codantes de l'ARN et en combinant TruSeq RNA Exome avec des instruments à débit élevé comme les systèmes NextSeq, HiSeq et NovaSeq, les laboratoires peuvent séquençer cinq fois plus d'échantillons par série d'analyses sans compromettre la qualité des données (figures 3 et 4). TruSeq RNA Exome génère des renseignements extrêmement précis qui accroissent le pourcentage de lectures exoniques utilisables dans l'ensemble des régions codantes de l'ARN fortement fragmenté. Les lectures sont concentrées sur les régions étudiées, ce qui augmente les budgets de lecture (tableau 2) sans sacrifier la capacité de détection des fusions de gènes (figure 5).

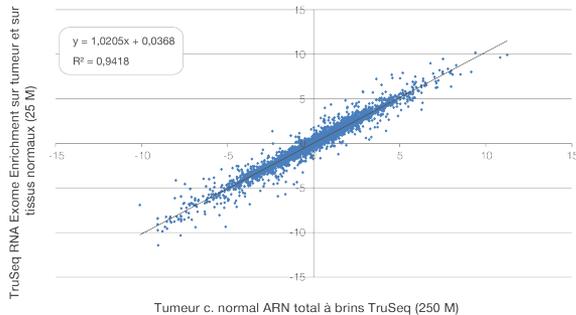


Figure 4 : Données précises avec une fraction du nombre de lectures : Les librairies ont été préparées avec TruSeq RNA Exome (25 M lectures) et TruSeq Stranded Total RNA (250 M lectures) à partir d'échantillons fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) de tumeurs pulmonaires et de tissus normaux. Analyse d'expression différentielle révélant que les valeurs à modification de facteur log, présentent une forte corrélation sur toute la plage dynamique ($R^2 = 0,9418$).

Tableau 2 : TruSeq RNA Exome donne plus de lectures pour le même budget

Système de séquençage	Séquençage de l'ARN d'échantillons frais ou congelés ou FFPE ^a
Chimie MiSeq™ System v3	1 échantillon par analyse
Système NextSeq 500, Flow Cell à débit moyen	5 échantillons par analyse
Système NextSeq 500, Flow Cell à débit élevé	16 échantillons par analyse
Système HiSeq 2500, mode analyse rapide	24 échantillons par analyse
Système HiSeq 2500, mode débit élevé	160 échantillons par analyse
Système NovaSeq 6000, Flow Cell S2	132 échantillons par analyse

a. Séquencé à 25 M lectures par échantillon (2 × 75 pb).

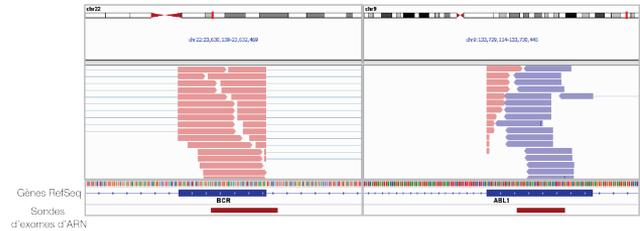


Figure 5 : Découverte efficace des fusions de gènes : TruSeq RNA Exome permet de détecter les transcriptions de fusions exprimées sans qu'il soit nécessaire de créer des sondes spéciales de jonction de fusions. La fusion BCR-ABL bien définie est détectée efficacement dans l'échantillon d'ARN de référence humain universel (UHRR) à 25 M de lectures.

Une analyse des données pratique et facile

Les ensembles de données TruSeq RNA Exome peuvent être analysés à l'aide des applications RNA-Seq dans BaseSpace Sequence Hub. Ces applications offrent des outils d'analyse de données appréciés des experts, ainsi qu'une interface utilisateur intuitive et facile à utiliser, conçue pour les novices en informatique. TopHat 2 permet de bénéficier d'un alignement extrêmement fiable pour les mesures d'abondance, ainsi que pour la détection des jonctions d'épissage, des fusions de gènes et des SNP. CuffDiff permet une recherche efficace de transcrits et des analyses d'expression différentielle. TopHat Fusion permet une détection rigoureuse et extrêmement fiable des fusions de gènes, tandis que le pipeline Isaac™ d'Illumina offre une définition sûre des variants³. Les fichiers produits peuvent être utilisés dans une grande variété de solutions d'analyses secondaires. Les applications RNA-Seq permettent de regrouper facilement des rapports portant sur plusieurs échantillons, de noter la réalisation de tâches sur des dispositifs mobiles et d'organiser efficacement des fichiers à des fins de collaboration et de partage.

Résumé

Les échantillons FFPE constituent une mine de renseignements difficile d'accès par le passé. Faisant partie d'une solution intégrée de séquençage Illumina, TruSeq RNA Exome offre une méthode rentable et reproductible de séquençage d'ARN à partir d'échantillons fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) et d'autres échantillons de piètre qualité.

En savoir plus

Des renseignements supplémentaires sur le séquençage de capture d'exome d'ARN sont disponibles sur www.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/rna-exome-capture-sequencing.html.

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
Préparation de librairies TruSeq RNA pour enrichissement (48 échantillons)	20020189
Trousse d'enrichissement TruSeq RNA (jusqu'à 48 échantillons en multiplexage 4 niveaux, 12 enrichissements)	20020490
Ensemble A d'index uniques pour TruSeq RNA (12 index, 48 échantillons)	20020492
Ensemble B d'index uniques pour TruSeq RNA (12 index, 48 échantillons)	20020493
Panel d'exomes (45 Mb)	20020183

Références

1. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlimpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE*. 2007. 2. 12. e1261.
2. Penland SK, Keku TO, Torrice C, et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Lab Invest*. 2007;794:383–391.
3. RACZY, C., PETROVSKI, R., SAUNDERS, C. T., et coll. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041–2043.