

# TruSeq<sup>MC</sup> Stranded mRNA et Total RNA

Obtenez un aperçu clair et exhaustif du transcriptome au moyen d'une solution rationalisée, rentable et évolutive pour les analyses de l'ARNm ou du transcriptome entier.

## Points forts

- Mesure précise de l'orientation du brin**  
 Permet la détection de transcription antisens, améliore l'annotation des transcrits et augmente l'efficacité de l'alignement
- Excellente qualité de couverture**  
 Fournit un mappage précis et exhaustif des autres transcrits et des fusions de gènes
- Compatible avec plusieurs types d'échantillons**  
 Analyse différents échantillons, y compris les échantillons de sang et ceux qui sont de faible qualité, fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE)
- Souplesse exceptionnelle**  
 Fournit une conception expérimentale exceptionnellement souple avec plus de 96 index doubles uniques (IDU) pour effectuer le multiplexage sûr des échantillons



**Figure 1 : TruSeq Stranded RNA :** TruSeq Stranded mRNA et Total RNA permettent d'effectuer des analyses précises d'échantillons standard ou de piètre qualité et sont compatibles avec une vaste gamme de conceptions d'étude.

Alors que nous continuons à reconnaître les rôles biologiques importants des ARN non codants (ARNnc), l'analyse de l'ensemble du transcriptome ou le séquençage de l'ARN total offre une vue plus large des dynamiques d'expression. Le séquençage d'ARN total obtenu par réduction d'ARN ribosomal (ARNr) est compatible avec des échantillons fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE) qui peuvent éventuellement contenir des renseignements biologiques essentiels. TruSeq Stranded RNA offre une combinaison unique de qualité de données incomparable à la fois pour l'analyse d'ARNm et pour celle du transcriptome entier. De plus, le flux de travail permet des analyses précises d'échantillons standard et de piètre qualité, et il est compatible avec une vaste gamme de conceptions d'étude (figure 1).

## Introduction

Le séquençage d'ARN (ARN-Seq) est une méthode efficace pour découvrir, réaliser le profilage et quantifier des transcrits d'ARN. Grâce à la technologie de séquençage nouvelle génération (NGS) d'Illumina, le séquençage ARN-Seq ne nécessite pas de sondes spécifiques à une espèce ou à un transcrit, ce qui signifie que les hypothèses antérieures concernant le transcriptome ne faussent pas les données. Ainsi, le séquençage ARN-Seq permet des conceptions expérimentales non hypothétiques de n'importe quelle espèce, notamment celles qui présentent une faible annotation génomique ou qui en sont dépourvues. Outre la mesure des modifications de l'expression génique, le séquençage ARN-Seq peut également être utilisé pour des applications de découverte, telles que l'identification d'autres événements d'épissage, de fusions de gènes, d'expression spécifique aux allèles et d'exams de transcrits rares et nouveaux.

À mesure que nous comprenons mieux les complexités de la régulation des gènes, un nouveau besoin d'obtenir des données supplémentaires a émergé. Les renseignements relatifs aux brins identifient lequel des deux brins d'ADN est la source d'un transcrit d'ARN donné. Ces renseignements apportent plus de fiabilité aux annotations de transcrit, en particulier pour des échantillons non humains. L'identification de l'origine d'un brin augmente le pourcentage de lectures ajustées, ce qui réduit les coûts de séquençage par échantillon. Le maintien de l'orientation du brin permet également d'identifier une expression antisens, un important médiateur de la régulation génique<sup>1</sup>. La possibilité de capter l'abondance relative d'expression sens et antisens permet de voir les interactions régulatrices qui autrement seraient ratées.

## Réduction ribosomale efficace

TruSeq Stranded RNA (tableau 1) associe une réduction ribosomale éprouvée et des compositions chimiques de préparation de librairies dans un seul protocole rationalisé. Contrairement aux méthodes de capture à base polyA, les trousse Ribo-Zero<sup>MC</sup> éliminent l'ARNr à l'aide de sondes biotinylées qui lient de façon sélective les espèces d'ARNr. Les billes magnétiques captent l'hybride sonde-ARNr et elles sont évacuées par le bas, ce qui laisse l'ARN voulu et dépourvu d'ARNr dans la solution. Ce processus diminue la contamination ribosomale, maximise le pourcentage de lectures avec mappage unique et couvre l'ARNm, ainsi qu'une vaste gamme d'espèces d'ARNnc importantes, notamment les ARN non codants intergéniques longs (ARNlinc), les petits ARN nucléaires (ARNsn), les petits ARN nucléolaires (ARNsno) ainsi que d'autres espèces d'ARN<sup>2</sup>.

**Tableau 1 : Espèces d'ARN ciblées pour la réduction**

Espèces d'ARN ciblées	Préparation de librairies
• ARNr cytoplasmique	TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero pour humain, souris et rat
• ARNr cytoplasmique • ARNr mitochondrial	TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero Gold
• ARNr cytoplasmique • ARNr mitochondrial • ARNm de globine	TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero Globin

### Information de haute qualité sur les brins

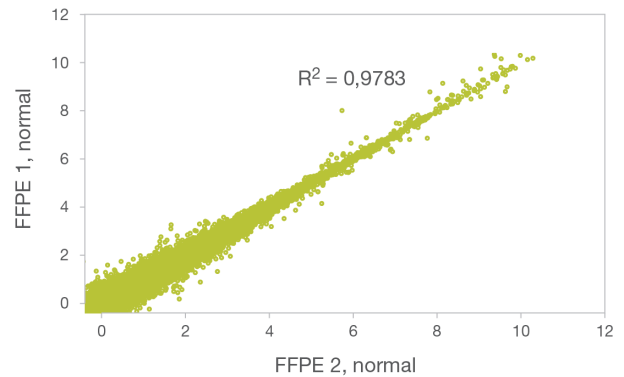
La chimie TruSeq Stranded RNA fournit une qualité de données incomparable. La mesure relative aux brins ou le pourcentage de lectures avec mappage unique ayant retourné des renseignements précis sur le brin d'origine en fonction d'un ARN de référence humain universel et bien caractérisé est supérieure ou égale à 99 % en utilisant TruSeq Stranded mRNA et supérieure ou égale à 98 % en utilisant TruSeq Stranded Total RNA. Ces renseignements extrêmement précis permettent d'augmenter le pourcentage de lectures uniques ajustées dans l'assemblage de transcriptomes avec de piètres annotations et fournissent une sensibilité permettant de détecter une expression antisens. La mesure cohérente et précise de l'abondance d'ARN est reflétée par la reproductibilité élevée entre les analyses techniques en parallèle (figure 2,  $R^2 = 0,9783$ ).

### ARN total TruSeq pour échantillons de piètre qualité

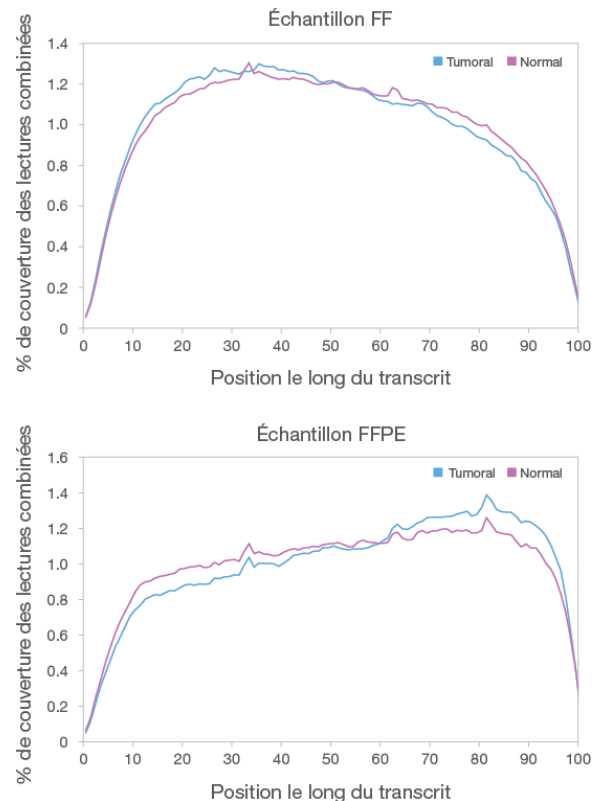
TruSeq Stranded RNA permet des analyses précises et efficaces d'échantillons FFPE et d'autres échantillons d'ARN de piètre qualité. La couverture des transcrits est élevée et équilibrée au niveau des échantillons frais congelés (FF) et FFPE préparés avec TruSeq Stranded Total RNA (figure 3). Le flux de travail optimisé d'élimination d'ARNr Ribo-Zero fournit une solution viable et hautement évolutive pour des analyses efficaces du transcriptome entier sur des échantillons qui restaient difficiles à analyser.

### Analyse d'ARN dérivé d'échantillons de sang

TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero Globin permet des analyses précises et efficaces d'ARN codants et non codants dérivés d'échantillons de sang. Un flux de travail rationalisé et facile à automatiser utilise des compositions chimiques Ribo-Zero pour enlever l'ARNm de globine ainsi que l'ARNr cytoplasmique et l'ARNr mitochondrial simultanément, en une seule étape rapide (tableau 1). Le flux de travail associe l'élimination de l'ARNm de globine, l'élimination de l'ARNr et la préparation de librairies afin d'optimiser les résultats du séquençage. Il réduit également la durée totale des tests, supprimant ainsi la nécessité de compositions chimiques supplémentaires, ainsi que les coûts par échantillon.



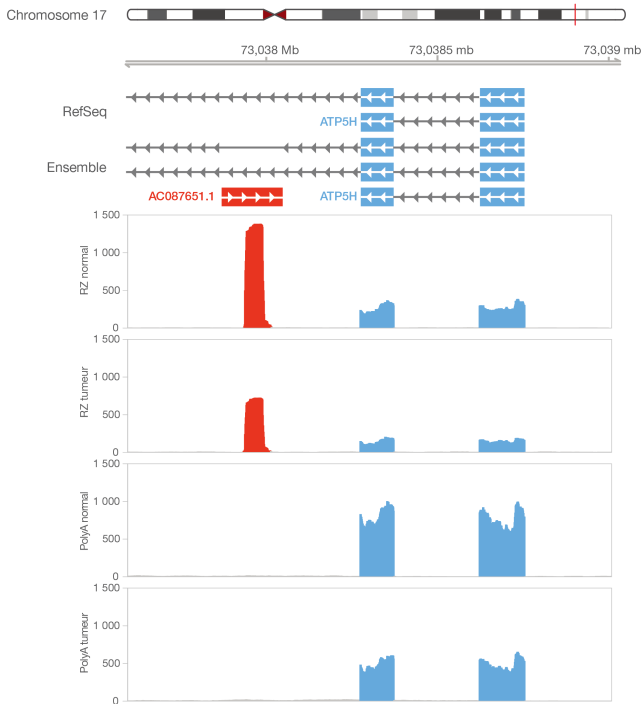
**Figure 2 : Concordance élevée entre analyses techniques en parallèle :** les analyses techniques en parallèle du tissu FFPE affichent une concordance élevée, ce qui indique une performance robuste de la préparation de librairies. Les axes sont des représentations graphiques de l'expression génique du log2 des fragments par kilobase million (FPKM). La valeur de  $R^2$  est affichée.



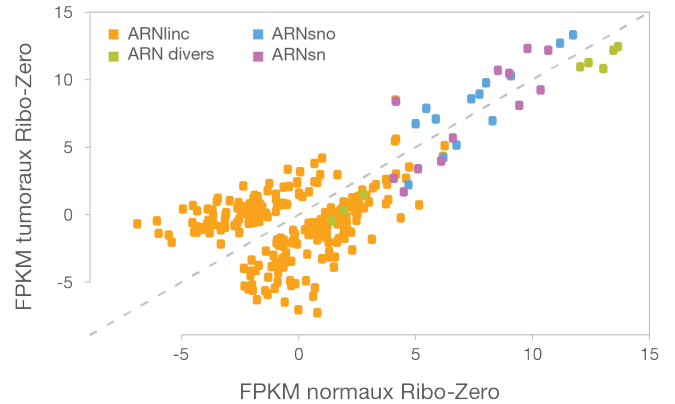
**Figure 3 : Couverture équilibrée des transcrits :** TruSeq Stranded Total RNA offre une excellente couverture des 1 000 transcrits exprimés dans des échantillons tumoraux FF (en haut) et FFPE (en bas) et dans un tissu mammaire normal correspondant, avec plus de 98 % de lectures en brin ajustées.

## Expression différentielle d'ARN non codants

Il est important pour bien des raisons de maintenir les renseignements sur les brins des transcrits d'ARN et de détecter les transcrits différemment exprimés. Les analyses par séquençage de l'ARN de tissus mammaires tumoraux et normaux ont été comparées entre TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero et une méthode standard de préparation de librairies à base polyA. Les librairies TruSeq Stranded Total RNA et celles préparées à base de polyA ont détecté l'expression différentielle de l'*ATP5H* entre les échantillons tumoraux et ceux normaux. Cependant, avec TruSeq Stranded Total RNA, l'expression différentielle dans une orientation inverse au niveau du transcrit pseudogène AC087651.1 est également détectée dans l'orientation de brin opposé prévue (figure 4). TruSeq Stranded Total RNA permet également la détection fiable de l'expression différentielle dans différentes formes d'ARNnc, y compris l'ARNlinc, l'ARNsn, l'ARNsno et d'autres espèces d'ARN (ARN divers) entre les tissus tumoraux et normaux (figure 5).



**Figure 4 : Expression différentielle de transcrits d'ARN non codant :** l'expression *ATP5H* du chromosome 17 présente une expression différentielle de la tumeur mammaire par rapport à un tissu normal. En utilisant deux méthodes de préparation de librairies différentes (RZ, Ribo-Zero pour l'ARN total ou polyA, l'ARNm à base polyA), on obtient une expression différentielle de tumeur par rapport aux tissus normaux dans les deux préparations (en bleu). Cependant, seul TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero révèle une expression différentielle sur le lieu d'un pseudogène (en rouge, AC087651.1), pour lequel les lectures sont détectées dans l'orientation opposée, comme prévu. Ces renseignements en brin auraient été perdus lors d'une préparation d'ARNm standard.



**Figure 5 : Détection de l'expression d'ARN non codants :** Avec TruSeq Stranded Total RNA, l'expression différentielle sur plusieurs espèces d'ARN non codants, notamment les ARN non codants intergéniques longs (ARNlinc), les petits ARN nucléaires (ARNsn) et les petits ARN nucléolaires (ARNsno) et d'autres types d'ARN (ARN divers) peuvent être détectés entre des tissus tumoraux et normaux (quatre analyses en parallèle par échantillon, taux de fausse découverte [FDR] = 0,05).

## Configurations de flux de travail flexibles

TruSeq Stranded mRNA et Total RNA constituent des solutions optimisées pour les besoins expérimentaux individuels. Chaque flux de travail comprend des protocoles à débits faible et élevé idéalement adaptés aux projets  $\leq 48$  échantillons et  $\geq 48$  échantillons, respectivement. Les configurations de TruSeq Stranded Total RNA sont disponibles pour cibler l'élimination de l'ARNr cytoplasmique uniquement ou des ARNr cytoplasmiques et mitochondriaux à la fois. Lors d'une comparaison utilisant un ARN de référence humain universel, TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero pour humain, souris et rat et Gold ont tous deux fait baisser l'ARNr cytoplasmique à moins de 2 % de lectures ajustées. TruSeq Stranded avec Ribo-Zero Gold a également fait baisser l'ARNr mitochondrial de 7 % à seulement 0,02 % de lectures ajustées.

## Multiplexage efficace des échantillons

À l'aide d'une procédure simple, les index sont ajoutés aux fragments d'ADN codant des échantillons afin de fournir une solution innovante de multiplexage des échantillons. Pour la meilleure efficacité opérationnelle, jusqu'à 96 échantillons pré-répartis dans des plaques et à index unique peuvent être regroupés et séquencés simultanément dans une ligne de Flow Cell unique sur toute plateforme de séquençage d'Illumina. Après le séquençage, les index sont utilisés pour démultiplexer les données et affecter précisément des lectures aux échantillons appropriés dans le groupe.

TruSeq Stranded RNA peut utiliser une stratégie d'indexage simple ou double employant une combinaison unique de deux index pour le démultiplexage. Des adaptateurs d'index double unique (IDU), développés conjointement par Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) et Illumina (offerts séparément), utilisent des paires uniques d'index pour le démultiplexage. Les nouveaux IDU (24 et 96) offrent une flexibilité supérieure permettant une attribution précise des lectures et une utilisation efficace des Flow Cells. L'utilisation de combinaisons d'IDU est fortement recommandée pour s'assurer que les lectures ayant des index inappropriés n'affectent pas l'appel des variants.

## Renseignements relatifs à la commande

Produit	Élimination ribosomale	Configuration	N° de référence
Préparation de librairies TruSeq Stranded mRNA	s.o.	48 échantillons	20020594
		96 échantillons	20020595
Préparation de librairies TruSeq Stranded Total RNA pour humain, souris et rat	ARN ribosomal cytoplasmique	48 échantillons	20020596
		96 échantillons	20020597
Préparation de librairies TruSeq Stranded Total RNA Gold	ARN ribosomal cytoplasmique et mitochondrial	48 échantillons	20020598
		96 échantillons	20020599
Préparation de librairies TruSeq Stranded Total RNA Plant	ARN ribosomal cytoplasmique et chloroplastique	48 échantillons	20020610
		96 échantillons	20020611
Préparation de librairies TruSeq Stranded Total RNA Globin	ARN ribosomal cytoplasmique et mitochondrial et ARNm Globin	48 échantillons	20020612
		96 échantillons	20020613
Index		Configuration	N° de référence
Ensemble A d'index uniques pour TruSeq RNA		12 index,	20020492
		48 échantillons	
Ensemble B d'index uniques pour TruSeq RNA		12 index,	20020493
		48 échantillons	
Index CD pour TruSeq RNA		96 index,	20019792
		96 échantillons	
IDT pour Illumina – Index doubles uniques pour TruSeq RNA		24 index,	20020591
		96 échantillons	
IDT pour Illumina – Index doubles uniques pour TruSeq RNA		96 index,	Disponible prochainement
		96 échantillons	

## Résumé

TruSeq Stranded mRNA et Total RNA offrent un aperçu clair et complet du transcriptome, permettant ainsi une mesure précise de l'orientation du brin, une couverture uniforme et une détection hautement fiable de caractéristiques telles que les autres transcrits, les fusions de gènes et une expression propre aux allèles. TruSeq Stranded Total RNA combine tous les avantages de la préparation de librairies TruSeq RNA avec des compositions chimiques de réduction ribosomale Ribo-Zero, ce qui fournit une solution robuste et hautement évolutive pour préparer les librairies prêtes au séquençage pour l'analyse du transcriptome entier compatible avec une vaste gamme d'échantillons, y compris des échantillons non humains et FFPE.

## Références

1. Nagai K, Kohno K, Chiba M, et al. Differential expression profiles of sense and antisense transcripts between HCV-associated hepatocellular carcinoma and corresponding noncancerous liver tissue. *Int J Oncol.* 2012(40): 1813-20.
2. Benes V, Blake J, Doyle K. Ribo-Zero Gold Kit: Improved RNA-Seq results after removal of cytoplasmic and mitochondrial ribosomal RNA. *Nat Methods.* 2011(8):10.1038/nmeth.f.352.