

illumina RNA Prep with Enrichment

Flusso di lavoro rapido e integrato
per il rilevamento accurato
e obiettivo dei trascritti

- Raggiungimento di un'elevata sensibilità da soli 10-20 ng di RNA totale da campioni preparati al momento, congelati o FFPE
- Preparazione delle librerie in nove ore con meno di due ore di interventi manuali
- Multiplex fino a un massimo di 384 campioni in una singola corsa con indici doppi univoci

Introduzione

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

- La tecnologia RNA-Seq mirata analizza l'espressione in un determinato gruppo di geni. L'arricchimento consente un'analisi conveniente dell'esoma dell'RNA utilizzando la cattura specifica per la sequenza di regioni codificanti del trascrittoma. È ideale per campioni di bassa qualità fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded).
- L'RNA-Seq totale fornisce un approccio obiettivo 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.
- L'RNA messaggero (mRNA, messenger RNA)-Seq quantifica in modo sensibile e preciso l'espressione genica, identifica le isoforme note e quelle nuove nel trascrittoma di codifica e misura l'espressione allele-specifica.

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation offre una soluzione ottimizzata per il sequenziamento RNA-Seq mirato. Il kit offre elevata flessibilità per il tipo e la quantità di input al fine di supportare una 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 all'Illumina Exome Panel fornisce una panoramica esaustiva del trascrittoma codificante per ottenere la massima efficacia di scoperta a una ridotta profondità di sequenziamento.

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

Illumina RNA Prep with Enrichment utilizza la tagmentation su microsfere per offrire un rapido flusso di lavoro attenendosi a una singola fase di ibridazione semplificata di 90 minuti (Figura 1). La tagmentation su microsfere offre trasposoni legati a microsfere per l'arricchimento (eBLT, Enrichment Bead-Linked Transposome) ottimizzati per l'RNA (eBLTL) che consentono di mediare una reazione di tagmentation uniforme, eliminando la necessità di fasi separate di frammentazione al fine di risparmiare tempo.

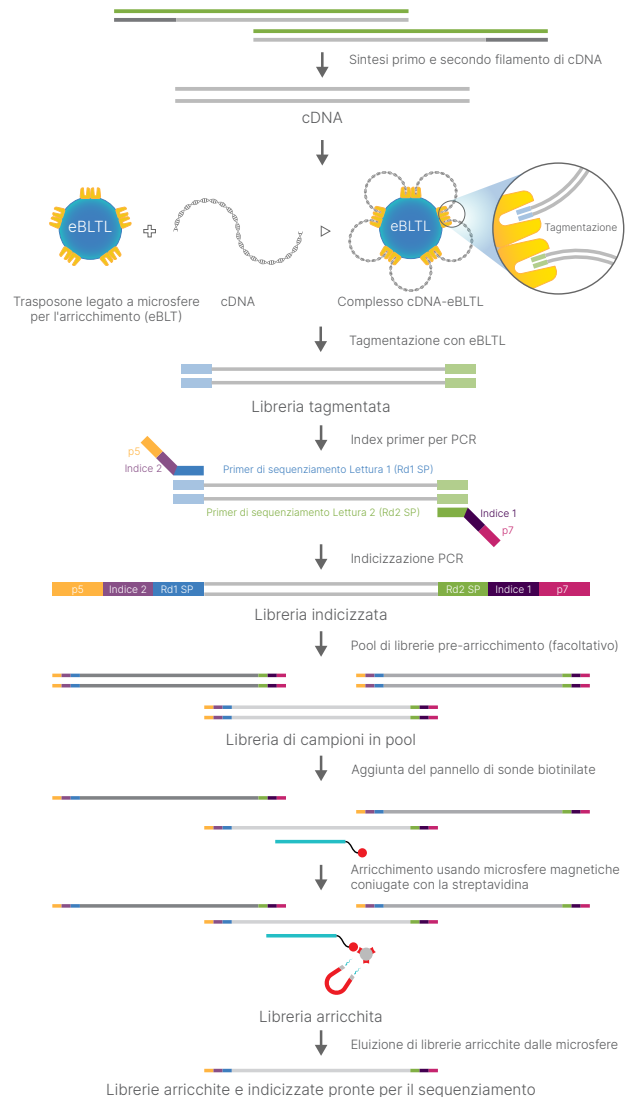


Figura 1: chimica Illumina RNA Prep with Enrichment. Dopo una sintesi di cDNA, una reazione di tagmentation uniforme mediata da eBLTL e seguita da una singola reazione di ibridazione di 90 minuti consente un flusso di lavoro veloce e flessibile.

Unito alle innovazioni apportate alla reazione di ibridazione, il flusso di lavoro è caratterizzato da un numero inferiore di fasi, tempi ridotti di incubazione, numerosi punti di arresto sicuri e da saggi complessivamente più veloci del 50% rispetto a TruSeq™ RNA Exome (Figura 2). Oltre alla preparazione manuale, Illumina RNA Prep with Enrichment è stato progettato per essere compatibile con le piattaforme di gestione dei liquidi per un flusso di lavoro automatizzato, il che garantisce una gestione dei campioni altamente riproducibile, un rischio ridotto di errore umano e meno interventi manuali.

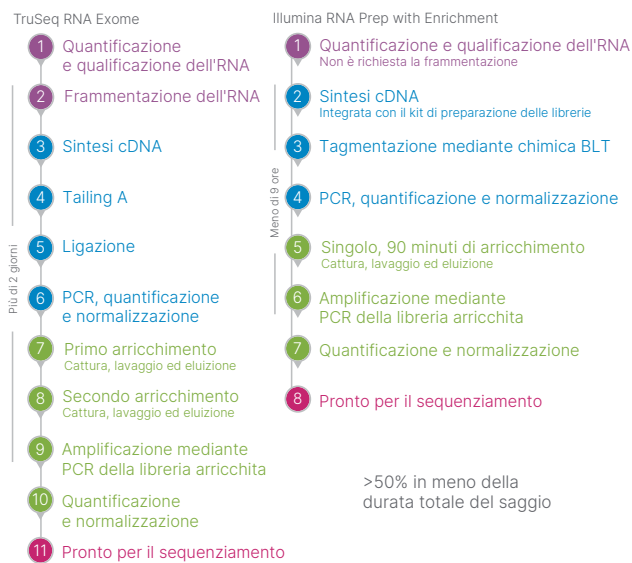


Figura 2: Illumina RNA Prep with Enrichment fornisce un flusso di lavoro veloce. La tagmentazione su microsferi assieme a una singola fase di ibridazione di 90 minuti fornisce un flusso di lavoro più veloce con un numero inferiore di fasi rispetto a TruSeq RNA Exome.

Dati di elevata qualità

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 preparati al momento o congelati (Figura 3). Tumore: i campioni biotipici normali o i campioni di tessuto d'archivio FFPE forniscono una ricca fonte di informazioni biologiche per il profilo dell'espressione genica; tuttavia, possono essere difficili da studiare a causa della degradazione degli acidi nucleici dovuta al processo di fissazione e conservazione.¹ Illumina RNA Prep with Enrichment produce dati di qualità con input di appena 20 ng di input di RNA da campioni FFPE. Questi risultati assieme dimostrano che Illumina RNA Prep with Enrichment è una soluzione ideale per campioni degradati con limitato materiale di partenza.

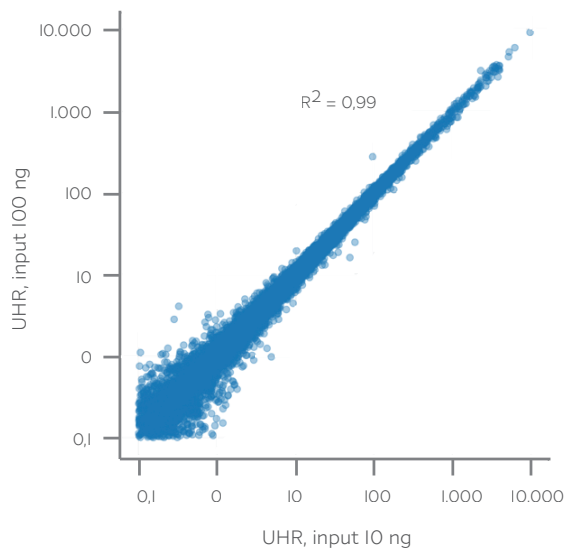


Figura 3: dati di elevata qualità da campioni con basso input. Illumina RNA Prep with Enrichment fornisce elevata concordanza di dati tra quantità di input di 10 ng e 100 ng di RNA totale dal riferimento umano universale (UHR). Le librerie di RNA UHR sono state sequenziate sul NovaSeq 6000 System, sottocampionate a 25 milioni di cluster per libreria. I dati sono stati analizzati con l'applicazione BaseSpace RNA-Seq Alignment v1.1.1.

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 preparati al momento-congelati e in FFPE utilizzando l'Illumina Exome Panel e sequenziati sul NovaSeq™ 6000 System. 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 di cancro colon-retto (RIN = 2,5, DV200 = 85%), rispettivamente (Tabella 1).

Tabella 1: rilevamento della fusione genica

Fusione (fonte)	RIN	Input 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%)

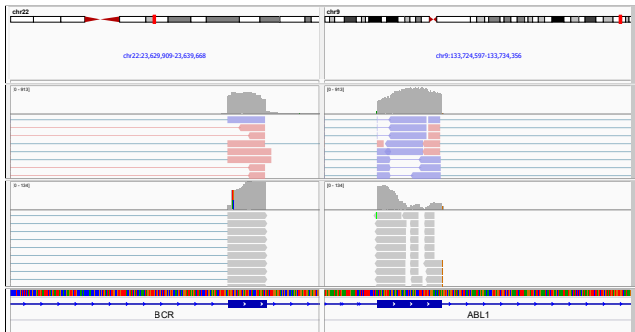


Figura 4: rilevamento della fusione genica *BCR-ABL1*. Le librerie preparate da 10 ng di RNA della linea cellulare K-562 utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment e l'Illumina Exome Panel hanno permesso di rilevare correttamente la fusione genica di *BCR-ABL1* utilizzando Broad Integrative Genomics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

RNA-Seq mirato ed economico

Copertura esonica eccellente

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

Tabella 2: specifiche dell'Illumina Exome Panel

Specifiche della copertura	Illumina Exome Panel
N. di geni target	21.415
N. di regioni esoniche target	214.126
N. di sonde	425.437
Percentuale di esomi 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, universal human reference) e da RNA in FFPE utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment. Le librerie ottenute sono state sequenziate su un NovaSeq 6000 System a 2×100 bp (25 milioni di letture). L'analisi dei dati con l'applicazione Enrichment in BaseSpace™ Sequence Hub ha rivelato un'eccellente copertura esonica di Illumina RNA Prep with Enrichment, con oltre l'85% delle basi coperte e allineate rispetto alla sequenza codificante e alle regioni non tradotte (UTR, Untranslated Region) dell'RNA, a confronto con TruSeq RNA Exome (Figura 5, 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.

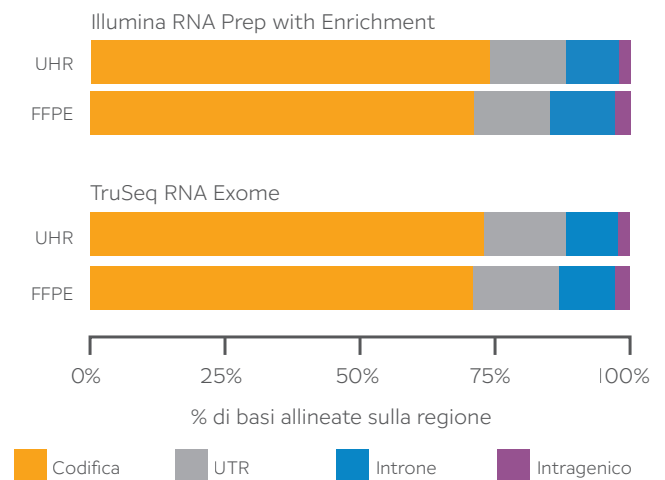


Figura 5: copertura di regioni codificanti con Illumina RNA Prep with Enrichment. Le librerie preparate da 10 ng di RNA UHR e da 20 ng di RNA in FFPE utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment e l'Illumina Exome Panel mostrano più dell'85% di dati allineati sulle regioni codificanti e le regioni UTR. I dati ottenuti dalle librerie generate con TruSeq RNA Exome sono mostrati a scopo di confronto. Le librerie sono state sequenziate su un NovaSeq 6000 System a 2×100 bp, sottocampionate a 25 milioni di letture.

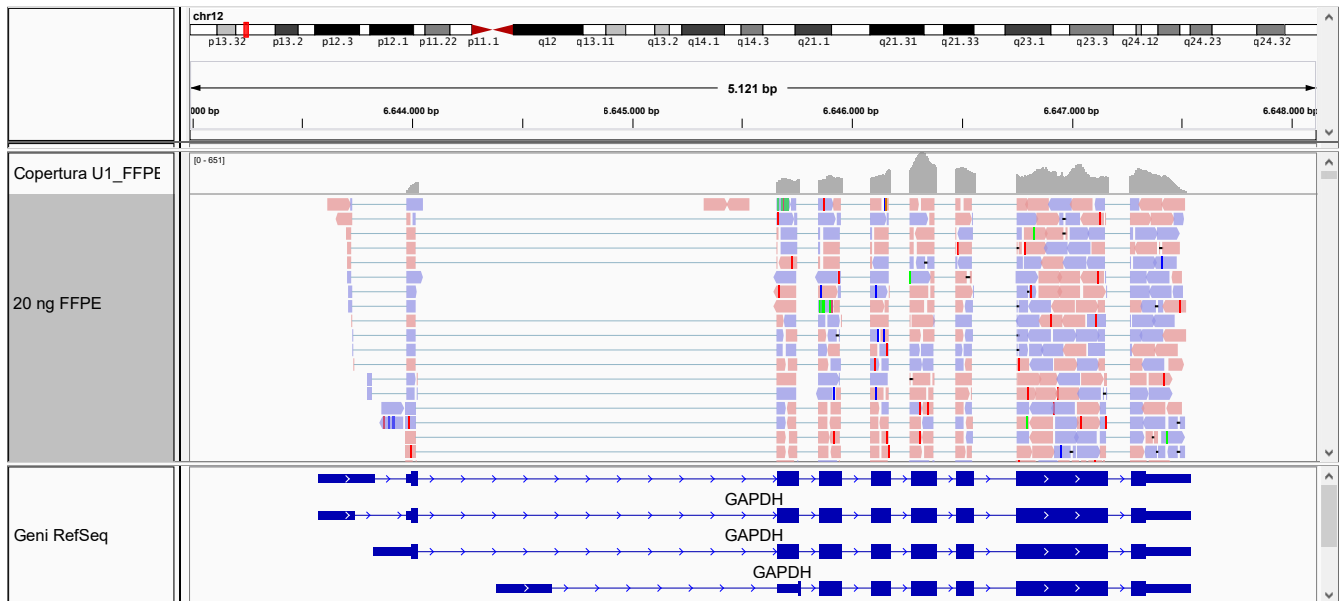


Figura 6: copertura delle regioni codificanti con Illumina RNA Prep with Enrichment. Una libreria preparata da 20 ng di campioni in FFPE di bassa qualità e arricchita con l'Illumina Exome Panel è stata sequenziata a 25 milioni di letture. Il grafico mostra la copertura del gene di controllo *GAPDH* utilizzando Broad IGV e presenta le letture che si allineano sull'esone codificante dimostrando una buona cattura dei target.

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). 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 (UDI, Unique Dual Index) progettati per eliminare la ricombinazione degli indici.

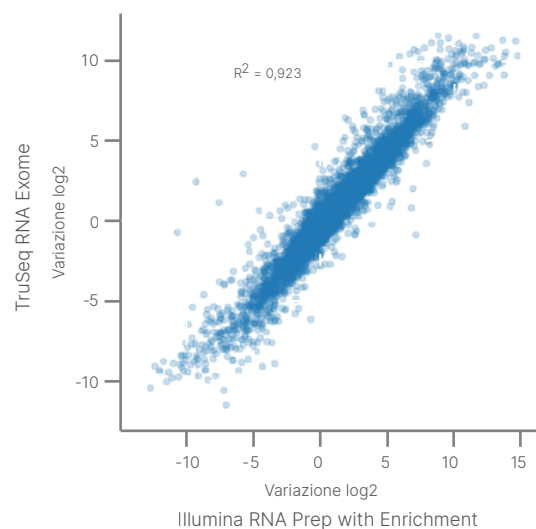


Figura 7: concordanza con TruSeq RNA Exome. Il grafico di Illumina RNA Prep with Enrichment mostra elevata concordanza con TruSeq RNA Exome, come misurato dalla variazione log₂ per RNA UHR (Agilent, n. di catalogo 740000) rispetto a Human Brain Total RNA (ThermoFisher Scientific, n. di catalogo AM7962). Tutte le librerie sono state preparate da input di 10 ng. Le librerie preparate con TruSeq RNA Exome sono state arricchite come 4 plex, le librerie Illumina RNA Prep with Enrichment sono state arricchite come 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 v2.1.0.

Processività flessibile e scalabile

Associando Illumina RNA Prep with Enrichment a strumenti di sequenziamento Illumina a processività media o elevata come NextSeq™ 550 System e NovaSeq 6000 System, i laboratori possono sequenziare un numero significativamente superiore di campioni per corsa senza compromettere la 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 a 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 6000 S4, il che aumenta in modo significativo la processività.

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

Associando la preparazione delle librerie di RNA alle prestazioni di arricchimento e alla comprovata accuratezza della chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) Illumina,² Illumina RNA Prep with Enrichment supporta sia i pannelli fissi sia i pannelli personalizzati di diverse dimensioni per le progettazioni di studi avanzati in diverse aree. Esempi includono l'Illumina Exome Panel per l'analisi delle regioni codificanti del trascrittoma e il Respiratory Virus Oligos Panel, più mirato, che offre circa 7.800 sonde progettate per rilevare virus respiratori, recenti ceppi influenzali e SARS-CoV-2. Quando si combina 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 l'Illumina Exome Panel e il Respiratory Virus Oligos Panel, il che consente rilevamento e studi di scoperta, ad esempio l'espressione specifica per l'allele, il rilevamento della fusione, lo screening di biomarcatori e altro.

Maggiori informazioni

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples) ^b	20040537
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091661
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina Respiratory Virus Oligo Panel v2	20044311
Viral Surveillance Panel, RUO (96 reactions)	20088154
Pan-Coronavirus Panel, RUO (96 reactions)	20088155

a. Il kit include i reagenti per 1-plex, 16 reazioni di arricchimento.
b. Il kit include i reagenti per 3-plex, 32 reazioni di arricchimento.

Bibliografia

- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, and Schlimpberger M. [Determinants of RNA quality from FFPE samples.](#) *PLoS ONE*. 2007;2(12): e1261. doi: 10.1371/journal.pone.0001261.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry.](#) *Nature*. 2008;456:53-59. doi: 10.1038/nature07517.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02145 ITA v1.0