

Pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq™ for Illumina

Pannello mirato per l'RNA per la caratterizzazione della diversità dei recettori delle cellule T.

Punti principali

- **Contenuto del gene di elevato valore**
Copertura completa delle sequenze della catena beta dei recettori delle cellule T
- **Flusso di lavoro veloce e ottimizzato**
Preparazione delle librerie pronte per il sequenziamento in un solo giorno a partire da sangue intero, tessuto fresco/congelato oppure cellule ottenute mediante citofluorometria (FACS)
- **Basso requisito di input**
Generazione di librerie per il sequenziamento di elevata qualità da appena 10 ng di RNA input

Questo pannello pronto all'uso consente ai ricercatori di risparmiare tempo e sforzi nell'identificazione di target, nella progettazione di ampliconi e nell'ottimizzazione delle prestazioni.

Tabella 1: Panoramica del pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina

Parametro	Specifica
N. di geni	Variabile
Target	Catena beta TCR, inclusi CDR1, CDR2 e CDR3
Dimensione amplicone	circa 325 bp
N. di ampliconi	Variabile
Requisito di DNA/RNA input	10-1.000 ng
N. di raggruppamenti in pool per pannello	1
Tipi di campioni supportati	Sangue, tessuto fresco/congelato, cellule FACS
Durata totale del saggio ^a	5-6 ore
Durata interventi manuali	< 1,5 ore
Durata dal DNA ai dati	2,5 giorni

a. La durata si riferisce solo alla preparazione delle librerie e non include la quantificazione, la normalizzazione o il raggruppamento in pool delle librerie

Introduzione

Il recettore delle cellule T (T cell receptor, TCR) è un eterodimero transmembrana che consente alle cellule T di riconoscere e rispondere a materiale estraneo "nonself". La vasta maggioranza dei recettori TCR consiste in una catena alfa e una catena beta che contengono regioni determinanti complementari (Complementary Determining Regions, CDR). La diversità del recettore della cellula T (TCR) descrive il potenziale di un piccolo gruppo di geni che codificano le regioni CDR nel recettore TCR per creare in eccesso di 10^{12} clonotipi di cellule T (popolazioni di cellule T che esprimono i medesimi recettori TCR) mediante ricombinazione, inserzione casuale, delezione e sostituzione.¹ La diversità del recettore TCR ricopre un ruolo fondamentale nella difesa dell'ospite.

L'investigazione di questa diversità potrebbe essere utile nella comprensione della funzione immunitaria, nelle malattie autoimmuni e negli effetti avversi mediati dal sistema immunitario (Immune-Mediated Adverse Effect, IMAE).

Il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina è un pannello per il risequenziamento mirato, altamente in multiplex, progettato per misurare la diversità delle cellule T e l'espansione clonale mediante il sequenziamento delle riorganizzazioni della catena beta del recettore TCR (Tabella 1). Utilizzando un singolo raggruppamento in pool di primer PCR in multiplex, di reagenti della libreria e di codici a barre dei campioni, le librerie possono essere generate da RNA estratto da sangue intero, tessuto fresco/congelato o cellule scelte mediante FACS per il sequenziamento sui sistemi di sequenziamento compatibili Illumina.

Contenuto del gene di elevato valore

Il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina offre la copertura della catena beta del recettore TCR con ampliconi con lunghezza di lettura di circa 325 bp per la caratterizzazione completa di tutte e tre le regioni CDR (CDR1, CDR2 e CDR3).

Flusso di lavoro semplice e ottimizzato

Il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina fa parte di una soluzione dall'RNA ai risultati che offre semplice preparazione delle librerie, sistemi di sequenziamento di facile utilizzo e analisi dei dati semplificata.

La preparazione delle librerie inizia con la conversione dell'RNA totale in cDNA, seguita da un protocollo ottimizzato basato sulla PCR che può essere completato in appena cinque ore, con meno di 1,5 ore di interventi manuali. Le librerie ottenute possono essere normalizzate, raggruppate in pool, quindi caricate su una cella a flusso per il sequenziamento. Le librerie preparate vengono sequenziate utilizzando la comprovata chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) su un qualsiasi sistema di sequenziamento Illumina compatibile (Tabella 2).

I dati ottenuti possono essere facilmente passati in BaseSpace™ Sequence Hub per l'analisi. L'applicazione MiXCR Immune Repertoire Analyzer in BaseSpace Sequence Hub consente l'elaborazione veloce e accurata dei dati del sequenziamento ottenuti da librerie dei recettori delle cellule T e B. L'applicazione allinea le letture su segmenti della linea germinale, raggruppa i clonotipi e corregge gli errori della PCR e del sequenziamento. Gli output forniscono informazioni dettagliate sull'assegnazione dei segmenti delle linee germinali, sull'allineamento e sulle mutazioni.

Tabella 2: Sistemi di sequenziamento Illumina raccomandati per il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina

Strumento
Sistema MiniSeq™ (Mid-Output)
Sistema MiniSeq (High-Output)
Sistema MiSeq™ (chimica v2)
Sistema MiSeq (chimica v3)
Sistema NextSeq™ 550

Dati accurati

Il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina consente l'investigazione della diversità dei recettori TCR nella funzione del sistema immunitario. Per dimostrare le capacità del saggio, sono stati analizzati i campioni utilizzando il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina, il sistema NextSeq 550 e l'applicazione MiXCR Immune Repertoire Analyzer. I risultati mostrano che i campioni con cloni produttivi del repertorio cellulare della risposta immunitaria (linfociti e cellule Jurkat) presentano elevato utilizzo delle letture, mentre un tipo di campione con poca o nessuna espressione dei target del repertorio della risposta immunitaria (tessuto cerebrale) presenta un basso utilizzo delle letture (Figura 1).

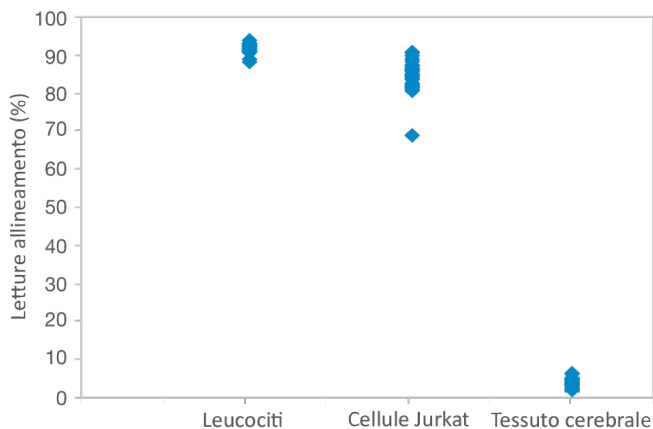


Figura 1: Utilizzo produttivo delle letture: le librerie sono state preparate con il pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina, sequenziate sul sistema NextSeq 550 e analizzate con l'applicazione MiXCR. Il DNA input ottenuto da cloni produttivi del repertorio cellulare della risposta immunitaria (linfociti e cellule Jurkat) mostrano elevato utilizzo delle letture, in contrasto con il DNA input ottenuto da un campione con poca o nessuna espressione dei target del repertorio della risposta immunitaria (tessuto cerebrale) che mostra un basso utilizzo delle letture. Le barre degli errori indicano la variabilità dei replicati tecnici.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni sul pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina, visitate la pagina Web www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-immune-repertoire-panel.html

Per maggiori informazioni sulla soluzione di risequenziamento mirato AmpliSeq for Illumina, consultate la panoramica alla pagina Web www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/ampliseq-for-illumina-targeted-resequencing-solution-data-sheet-770-2017-022.pdf

Informazioni per gli ordini

I prodotti AmpliSeq for Illumina possono essere ordinati online alla pagina Web www.illumina.com

Prodotto	N. di catalogo
Pannello Immune Repertoire Plus, TCR beta AmpliSeq for Illumina (24 reazioni)	20024479
Library PLUS AmpliSeq for Illumina (24 reazioni)	20019101
Library PLUS AmpliSeq for Illumina (96 reazioni)	20019102
Library PLUS AmpliSeq for Illumina (384 reazioni)	20019103
Indici CD AmpliSeq for Illumina - set A (96 indici, 96 campioni)	20019105
Sintesi cDNA AmpliSeq for Illumina (96 reazioni)	20022654

Bibliografia

1. Laydon DJ, Bangham CRM, Asquith B. *Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach.* *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2015;370(1675):20140291.