

illumina Stranded mRNA Prep, ligazione

Analisi sensibile e accurata del trascrittoma di codifica in una soluzione rapida e flessibile.

Punti principali

- Elevata qualità dei dati da campioni con input ridotto**
 Permette di ottenere risultati a elevata sensibilità a partire da soli 25 ng di RNA
- Flusso di lavoro di preparazione delle librerie rapido**
 Permette di preparare le librerie in meno di 7 ore e con una durata degli interventi manuali inferiore a 3 ore: circa il 40% più veloce di TruSeq™ Stranded mRNA.
- Sequenziamento a elevata processività con costo totale ridotto**
 Multiplex fino a un massimo di 384 campioni in una singola corsa con indici doppi univoci.

Introduzione

Il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) con un sequenziatore di nuova generazione (NGS) è un metodo efficace per la scoperta, l'identificazione del profilo e la quantificazione dei trascritti dell'RNA. I vantaggi di RNA-Seq includono:

- L'RNA messaggero (mRNA)-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.
- Il sequenziamento dell'RNA totale fornisce un approccio imparziale e privo di ipotesi per un'analisi completa del trascrittoma. Misura accuratamente l'abbondanza di geni e trascrizioni e rileva sia le caratteristiche note che quelle nuove nella codifica e nelle forme multiple di RNA non codificanti.
- Il sequenziamento dell'RNA mirato analizza l'espressione genica in un insieme mirato di geni di interesse. Il sequenziamento dell'RNA mirato attraverso l'arricchimento consente un'analisi dell'esoma dell'RNA a costi contenuti utilizzando l'acquisizione specifica della sequenza delle regioni di codifica del trascrittoma. È ideale per campioni di bassa qualità fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

TruSeq™ Stranded mRNA è una soluzione robusta per l'analisi dell'espressione genica e le applicazioni di scoperta nel trascrittoma di codifica. Tuttavia, i requisiti di input relativamente elevati, la lunga durata totale del saggio e i lunghi tempi per gli interventi manuali hanno limitato la sua utilità nelle applicazioni di sequenziamento dell'RNA. Per risolvere questi problemi, Illumina ha sviluppato Illumina Stranded mRNA Prep. Questa soluzione avanzata offre una preparazione delle librerie rapida e basata sulla ligazione (Figura 1), che supporta input di campioni ridotti (Tabella 1) e un'ampia gamma di applicazioni di sequenziamento dell'mRNA.

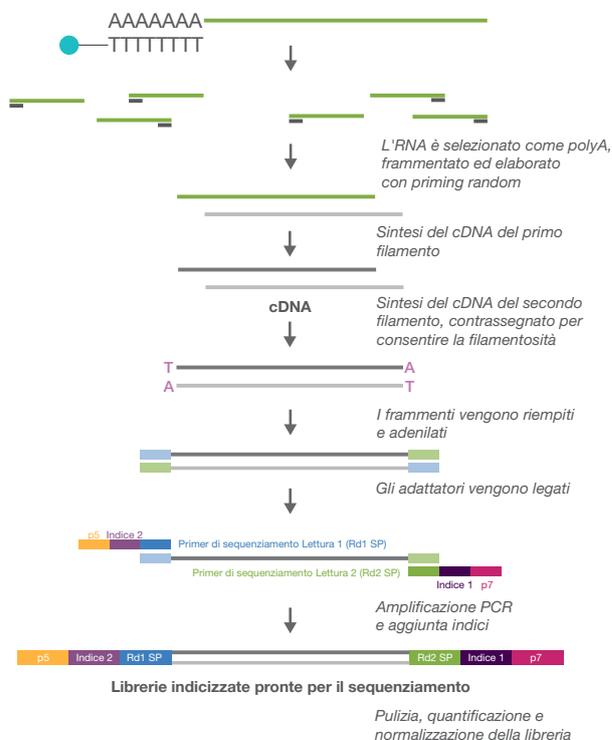


Figura 1: Illumina Stranded mRNA Prep. Quando la selezione polyA e la sintesi del cDNA sono complete, la ligazione degli adattatori degli indici doppi univoci e l'amplificazione PCR producono librerie di alta qualità che vengono quantificate e normalizzate prima del sequenziamento.

Tabella 1: Specifiche di Illumina Stranded Total RNA Prep

| Caratteristica | TruSeq Stranded mRNA | Illumina Stranded mRNA Prep |
|---------------------------|----------------------|-----------------------------|
| UDI max. | 96 | 384 |
| Quantità di input di RNA | 100-1000 ng | 25-1000 ng |
| Durata totale del saggio | 10,5 ore | 6,5 ore |
| Durata interventi manuali | < 7 ore | < 3 ore |
| Configurazione del kit | 48 o 96 campioni | 16 o 96 campioni |

UDI = indici doppi univoci

Elevata qualità dei dati

Espressione genica

Ilumina Stranded mRNA Prep produce librerie di sequenziamento a partire da input di quantità ridotta, che si traducono in metriche di alta qualità per l'analisi dell'espressione genica (Tabella 2, Figura 2). Insieme, questi risultati indicano le eccezionali prestazioni di Illumina Stranded mRNA Prep per applicazioni di espressione genica. Il sequenziamento dell'mRNA offre numerosi vantaggi rispetto ai metodi non-NGS, tra cui:

- Progettazione sperimentale priva di ipotesi, che non richiede alcuna conoscenza previa del trascrittoma.
- Maggiore potere di scoperta per individuare trascritti noti e nuovi.
- Maggiore capacità di processività per quantificare da centinaia a migliaia di regioni in ogni saggio.
- Gamma dinamica più ampia, per avere una misurazione più accurata dell'espressione genica.
- Maggior quantità di dati per saggio, con informazioni complete sulla sequenza e sulle varianti

Tabella 2: Metriche prestazionali per Illumina Stranded mRNA Prep

| | Input di RNA totale 100 ng | | Input di RNA totale 25 ng | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | TruSeq Stranded mRNA | Illumina Stranded mRNA Prep | TruSeq Stranded mRNA | Illumina Stranded mRNA Prep |
| % rRNA (28S/18S) | 5,1 | 1,8 | 5,3 | 1,5 |
| % Filamentosità | 99,6 | 99,4 | 99,6 | 99,4 |
| Mediana CV di copertura | 0,49 | 0,46 | 0,50 | 0,47 |
| % Duplicati | 5,4 | 3,7 | 8,5 | 3,3 |
| % Allineati | 97,1% | 97,8 | 96,8 | 97,8 |

I risultati sono tratti dall'applicazione RNA Seq Alignment v 2.0.1 dopo 30 M di letture. I duplicati sono riportati dopo 4 M di letture paired-end sottocampionate attraverso il filtro.

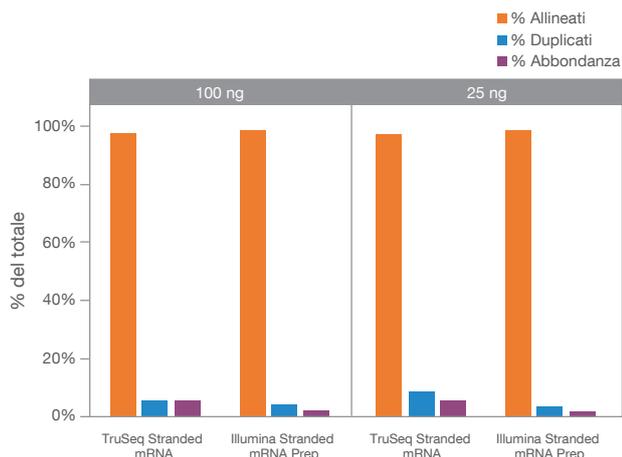


Figura 2: Confronto tra metriche prestazionali. Illumina Stranded mRNA Prep è stato confrontato con TruSeq Stranded mRNA. Illumina Stranded mRNA Prep ha mostrato prestazioni migliori, in particolare con un input di 25 ng di RNA UHR. Le librerie sono state sottocampionate a 30 M di letture e analizzate usando l'applicazione BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1. I duplicati sono riportati dopo 4 M di letture paired-end attraverso il filtro (PF) sottocampionate.

Efficienza nella scoperta dei geni

Per confrontare le prestazioni di Illumina Stranded mRNA Prep e quelle di TruSeq Stranded mRNA per applicazioni di scoperta di geni, sono state sequenziate quantità variabili di RNA umano universale di riferimento (UHR) dopo 30 M di letture ed è stato valutato il numero di geni con copertura 1x e 10x. I risultati mostrano che Illumina Stranded mRNA Prep permette una maggiore rilevazione dei geni, specialmente con quantità di input ridotte (Figura 3).

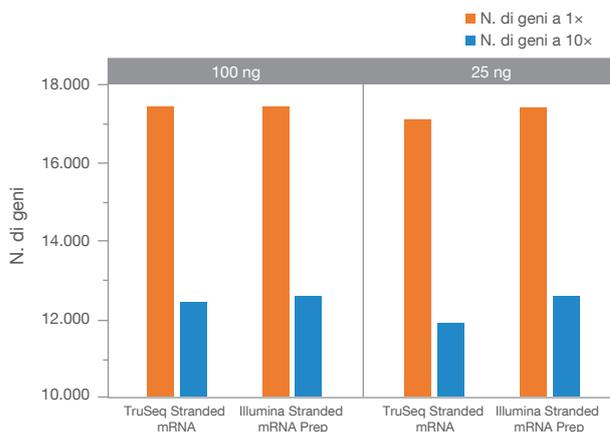


Figura 3: Maggiore rilevazione dei geni con input ridotto.

Illumina Stranded mRNA Prep permette una maggiore rilevazione di geni in caso di input di RNA ridotto, rispetto a TruSeq Stranded mRNA. Il numero di geni rilevati è riportato dopo 30 M di letture paired-end PF sottocampionate. La quantità maggiore di geni rilevati con copertura 1x, come nel caso di Illumina Stranded mRNA Prep, è indice di maggiore sensibilità.

Eccezionale concordanza dei dati

Illumina Stranded mRNA Prep produce dati di qualità con un'elevata concordanza tra repliche tecniche (Figura 4A) e quantità variabili di input di RNA UHR (Figura 4B). Questi risultati dimostrano che Illumina Stranded mRNA Prep è una soluzione ideale per campioni preziosi in cui la quantità di materiale di partenza è limitata. Inoltre, Illumina Stranded mRNA Prep mostra un'elevata concordanza di dati rispetto TruSeq Stranded mRNA, sia con input equivalente (Figura 5A), sia con input ridotto (Figura 5B).

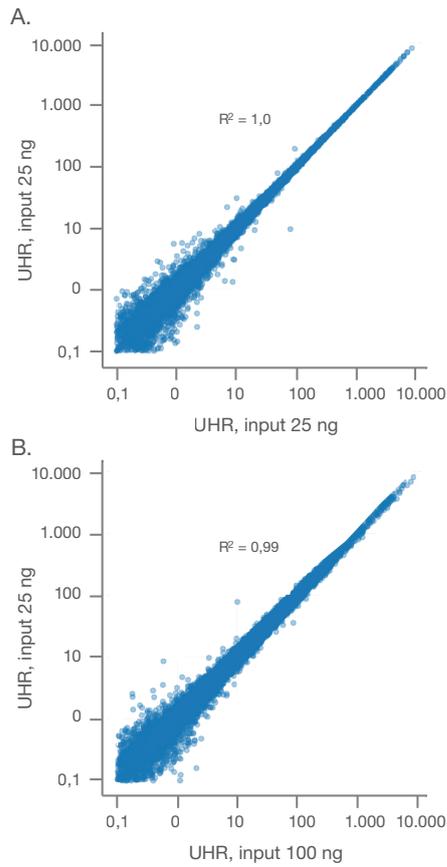


Figura 4: Concordanza dei dati elevata. Illumina Stranded mRNA Prep raggiunge un'elevata concordanza dei dati tra (A) repliche tecniche di 25 ng di RNA UHR e (B) tra input di 25 ng e input di 100 ng di RNA UHR. Le librerie sono state sequenziate a 2 × 74 bp e sottocampionate dopo 30 M di letture. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la app BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1.

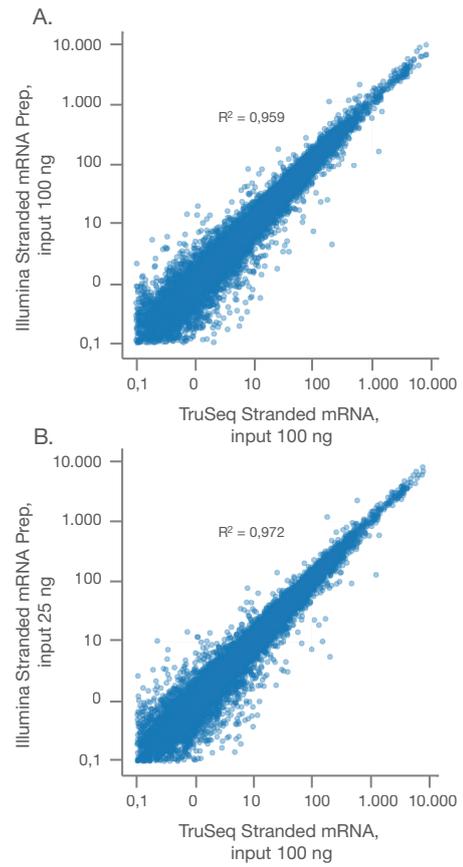


Figura 5: Elevata concordanza con i kit precedenti. Illumina Stranded mRNA Prep produce dati altamente concordanti con TruSeq Stranded mRNA: (A) in caso di livelli di input equivalenti, pari a 100 ng UHR RNA e (B) in caso di livelli di input ridotti, pari a 25 ng e confrontati con input pari a 100 ng UHR RNA.

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie ottimizzato

Illumina Stranded mRNA Prep utilizza un flusso di lavoro veloce e flessibile per la preparazione basata sulla ligazione delle librerie di RNA (Figura 1). Le innovazioni al flusso di lavoro, compresi i tempi di incubazione più brevi e le fasi di pulizia del campione ridotte, si traducono in un tempo totale del saggio che è circa del 40% inferiore rispetto al tempo impiegato da TruSeq Stranded mRNA (Figura 6).

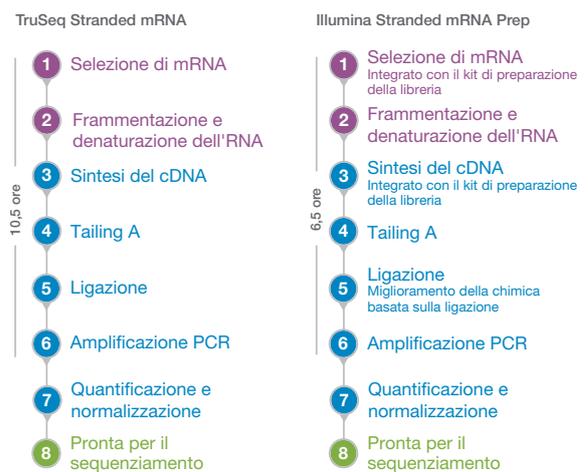


Figura 6. Flusso di lavoro Illumina Stranded mRNA Prep. Illumina Stranded mRNA Prep prevede un flusso di lavoro rapido con una durata inferiore degli interventi manuali. I tempi possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni elaborati, alle procedure automatizzate e all'esperienza dell'utente.

Aumento della processività con indici doppi univoci

Unendo Illumina Stranded mRNA Prep e strumenti ad alta processività come i sistemi NextSeq™ 550 e NovaSeq™ 6000, i laboratori possono sequenziare un numero significativamente maggiore di campioni per ogni corsa senza compromettere la qualità dei dati. Per aumentare ulteriormente la processività dei campioni, Illumina Stranded Total RNA Prep supporta il multiplexing con 384 indici doppi univoci (UDI).* Oltre a eliminare l'impatto dell'errata assegnazione dell'indice, ovvero il salto dell'indice, gli UDI consentono di ridurre i costi di sequenziamento grazie alla possibilità di caricare fino a 384 campioni su una singola cella a flusso NovaSeq S4, aumentando quindi la processività.

Riepilogo

Illumina Stranded mRNA Prep offre una soluzione semplificata per un'analisi chiara e completa del trascrittoma di codifica. Offre una straordinaria flessibilità per il tipo di input e supporta basse quantità di input: fino a 25 ng di RNA di alta qualità. Illumina Stranded mRNA Prep permette di misurare con precisione l'orientamento del filamento, la copertura uniforme e la scoperta di caratteristiche quali nuove isoforme, fusioni geniche e l'espressione allele-specifica con un livello elevato di affidabilità.

* Al momento del lancio del prodotto saranno supportati fino a 192 UDI. Ulteriori UDI saranno disponibili più avanti nel corso del 2020.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su Illumina Stranded mRNA Prep, visitare la pagina www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-mrna-prep.html

Informazioni per gli ordini

| Preparazione delle librerie | N. di catalogo |
|--|--------------------------------|
| Illumina Stranded mRNA Prep, ligazione (16 campioni) | 20040532 |
| Illumina Stranded mRNA Prep, ligazione (96 campioni) | 20040534 |
| Indici | N. di catalogo |
| IDT per Illumina RNA Set A indici UD RNA, Ligazione (96 indici, 96 campioni) | 20040553 |
| IDT per Illumina RNA Set B indici UD RNA, Ligazione (96 indici, 96 campioni) | 20040554 |
| IDT per Illumina RNA Set C indici UD RNA, Ligazione (96 indici, 96 campioni) | 20040555 Presto disponibile |
| IDT per Illumina RNA Set D indici UD RNA, Ligazione (96 indici, 96 campioni) | 20040556 Presto disponibile |