

Illumina RNA Prep with Enrichment

正確でバイアスのない転写産物の
検出に対応した迅速な一体化
ワークフロー

- 新鮮、凍結、またはFFPEサンプルからのわずか10~20 ngのトータルRNAから高感度を達成
- 9時間のライブラリー調製と2時間未満のハンズオンタイム
- ユニークデュアルインデックスにより、1回のランで最大384サンプルのマルチプレックスが可能



はじめに

次世代シーケンサー (NGS) を用いたRNAシーケンス (RNA-Seq) は、RNA転写産物の発見、プロファイリング、定量を可能にする強力な手法です。主なRNA-Seq手法の利点には次のようなものがあげられます。

- ターゲットRNA-Seqでは、特定の対象遺伝子群に絞って発現を解析することができます。濃縮を行うことにより、トランスクリプトームのコーディング領域を配列特異的にキャプチャーし、コスト効率の高いRNAエクソーム解析を行うことができます。低品質のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルに最適です。
- トータルRNA-Seqでは、バイアスのない仮説不要なアプローチにより、トランスクリプトームを網羅的に解析することができます。遺伝子や転写産物の存在量を正確に測定し、コーディングRNAやさまざまな形態のノンコーディングRNAの既知の配列だけでなく未知の配列も正確に検出することができます。
- メッセンジャーRNA (mRNA) -Seqでは、遺伝子発現の定量、コーディングトランスクリプトーム中の既知および未知のアイソフォームの同定、そしてアリル特異的発現の測定を、高感度かつ高精度に行うことができます。

Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentationは、ターゲットRNA-Seqの効率化を実現するソリューションです。本キットは幅広いRNA-Seqアプリケーションに対応するため、インプットのタイプやインプット量に対する高い柔軟性があり、アリル特異的発現解析、遺伝子融合検出、バイオマーカースクリーニングなど、さまざまな検出や探索が可能です。Illumina RNA Prep with EnrichmentにIllumina Exome Panelを組み合わせれば、わずかなシーケンス深度で最大限の検出力が得られ、コーディングトランスクリプトームの全体像を捉えることができます。

迅速かつシンプルなRNA濃縮ワークフロー

Illumina RNA Prep with Enrichmentは、ビーズ上でのタグメンテーションを行った後、1回のシンプルな90分間のハイブリダイゼーションステップに進む、迅速なワークフローを採用しています (図1)。ビーズ上でのタグメンテーションの特徴は、濃縮ビーズ結合トランスポソーム (eBLT) 法をRNA用に最適化したeBLTL法です。eBLTL法による均一なタグメンテーション反応により、断片化ステップを別途踏む必要がなく、時間を短縮できます。

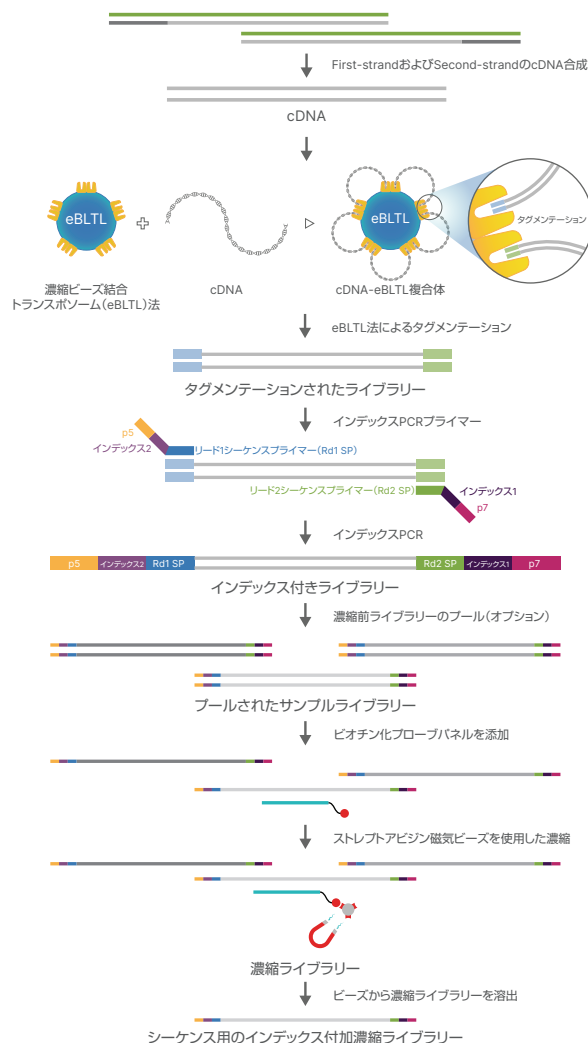


図1: Illumina RNA Prep with Enrichmentのケミストリー: cDNA合成後、eBLTL法による均一なタグメンテーション反応を経て、90分間1回のハイブリダイゼーション反応を行う、迅速で柔軟なワークフローです。

ハイブリダイゼーション反応でのさまざまな技術革新との組み合わせで、Illumina RNA Prep with Enrichmentのワークフローは、TruSeq™ RNA Exomeに比べてステップ数が少なく、インキュベーション時間が短く、セーフストップポイントが多数あり、合計アッセイ時間が50%以上短縮されました (図2)。またIllumina RNA Prep with Enrichmentは、手動調製のみならず、自動化ワークフローが可能になる各種のリキッドハンドリングプラットフォームにも対応しているため、サンプルハンドリングの再現性が高まり、人的ミスリスクも軽減され、ハズオンタイムも短縮されます。



図2: Illumina RNA Prep with Enrichmentの迅速なワークフロー: ピーズ上でのタグメンテーションと90分間1回のハイブリダイゼーションステップの組み合わせにより、TruSeq RNA Exomeに比べて迅速でステップ数の少ないワークフローが実現します。

高品質のデータ

インプット量の少ないサンプルやFFPEサンプルから高精度のデータを

高いキャプチャー効率とカバレッジ均一性により、最小限のシーケンス深度で、バイアスを混入させずに発現レベルを正確に測定することができます。10 ngという少量のトータルRNAからスタートできるIllumina RNA Prep with Enrichmentでは、新鮮/凍結サンプルから抽出したさまざまなインプット量間でのデータ一致率が高く、高品質のデータが得られます(図3)。腫瘍/正常生検検体やFFPE保存組織検体からは遺伝子発現プロファイリングに必要な生物学的情報が豊富に得られますが、このような検体やサンプルは固定や保存の過程で核酸が分解されているため解析が困難となる場合があります。¹ Illumina RNA Prep with Enrichmentでは、FFPEサンプルから抽出したわずか20 ngのインプット量のRNAからも高品質のデータが得られます。これらのことから、Illumina RNA Prep with Enrichmentは、出発物質が限られている分解したサンプルにも対応する理想的なソリューションであると言えます。

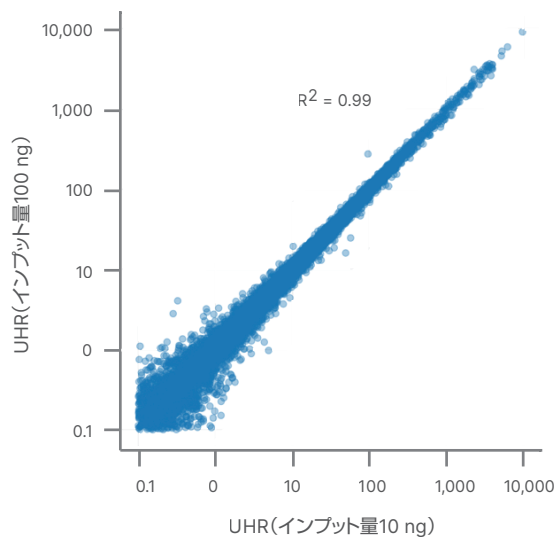


図3: インプット量の少ないサンプルからの高品質データ: Illumina RNA Prep with Enrichmentは、Universal Human Reference (UHR) から抽出したトータルRNAのインプット量、10 ngと100 ngとの間で、高いデータ一致率を示しました。UHR RNAライブラリーをNovaSeq 6000システムでシーケンスし、ライブラリーあたり25Mクラスターにサブサンプリングしました。データ解析にはBaseSpace RNA-Seq Alignmentアプリ1.1.1を使用しました。

少ないインプット量のサンプルやFFPEサンプルで遺伝子融合検出

Illumina RNA Prep with EnrichmentのRNA転写産物内の構造多型認識能を実証するため、新鮮/凍結サンプルおよびFFPEサンプルをIllumina Exome Panelで濃縮し、NovaSeq™ 6000システムでシーケンスしました。その結果、K-562細胞株 (RNA Integrity Number (RIN) = 7.4, DV200 = 90%) および大腸がん細胞株 (RIN = 2.5, DV200 = 85%) の全6個のレプリケートでBCR-ABL1遺伝子融合(図4) およびTPM3-NTRK1遺伝子融合のコールレートがそれぞれ100%となりました(表1)。

表1: 遺伝子融合検出

融合(ソース)	RIN	RNAインプット量	検出結果
BCR-ABL1 (K-562)	7.4	10 ng	6レプリケート中6 (100%)
TPM3-NTRK1 (大腸がん)	2.5	20 ng	6レプリケート中6 (100%)

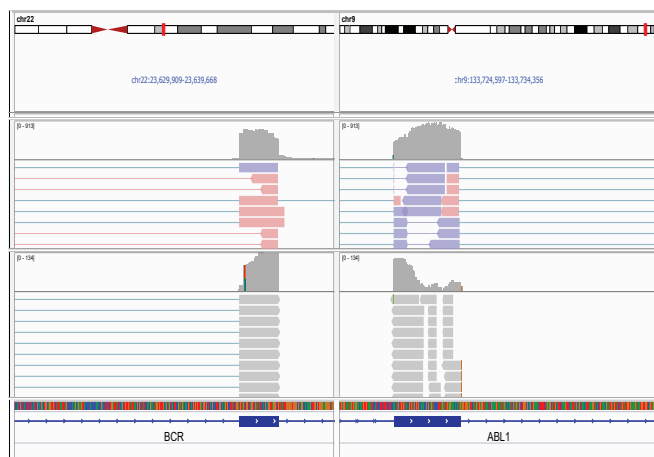


図4: *BCR-ABL1*遺伝子融合の検出: Illumina RNA Prep with EnrichmentとIllumina Exome Panelを使用してK-562細胞株RNA 10 ngから調製したライブラリーで、*BCR-ABL1*遺伝子融合を検出することができました (Broad Integrative Genomics Viewer (IGV) を使用)。上部のアライメントトラックはすべてのリードを示しています。下のトラックには、*BCR-ABL1*遺伝子融合を裏付けるリードのみを示しています。

手頃なコストでフォーカスを絞ったRNA-Seq

優れたエクソンカバレッジ

Illumina RNA Prep with Enrichmentに、コーディングRNA配列を網羅的にカバーする高度に最適化されたプローブセット、Illumina Exome Panelを組み合わせることもできます (表2)。

表2: Illumina Exome Panelの仕様

カバレッジの仕様	Illumina Exome Panel
ターゲット遺伝子数	21,415
ターゲットエクソン領域数	214,126
プローブ数	425,437
RefSeqエクソームカバー率	98.3%

Illumina RNA Prep with Enrichmentのエクソームシーケンス能を調べるため、同製品を使用してUniversal Human Reference (UHR) RNAとFFPE RNAからライブラリーを調製しました。これらのライブラリーをNovaSeq 6000システムにて100 bp × 2 (25 Mリード) でシーケンスしました。BaseSpace™ Sequence HubのEnrichmentアプリでデータを解析した結果、Illumina RNA Prep with Enrichmentは優れたエクソンカバレッジを示し、カバーされた塩基の85%以上がRNAのコーディング配列領域および非翻訳領域 (UTR) にアライメントを示し、TruSeq RNA Exomeと同等の性能を有することがわかりました (図5、図6)。

これらの結果から、Illumina RNA Prep with Enrichmentは、有益な情報を含むRNAコーディング領域にフォーカスを絞ってシーケンスしており、高いキャプチャー効率を示していることがわかります。このように、フォーカスを絞ってシーケンスを行うIllumina RNA Prep with Enrichmentは、これまでよりも少ないシーケンス深度でより小さなデータセットを生成するため、時間とコストの削減につながります。

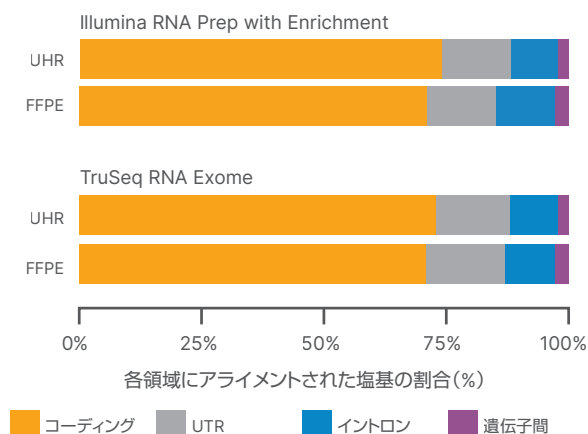


図5: Illumina RNA Prep with Enrichmentを使用した場合のコーディング領域のカバレッジ: Illumina RNA Prep with EnrichmentとIllumina Exome Panelを使用してUHR RNA 10 ngおよびFFPE RNA 20 ngから調製したライブラリーでは、85%を超えるデータがコーディング領域およびUTRにアライメントを示しました。比較対象として、TruSeq RNA Exomeを使用したライブラリーのデータを提示しています。ライブラリーはNovaSeq 6000システムにて100 bp × 2でシーケンスし、25 Mリードにサブサンプリングしました。

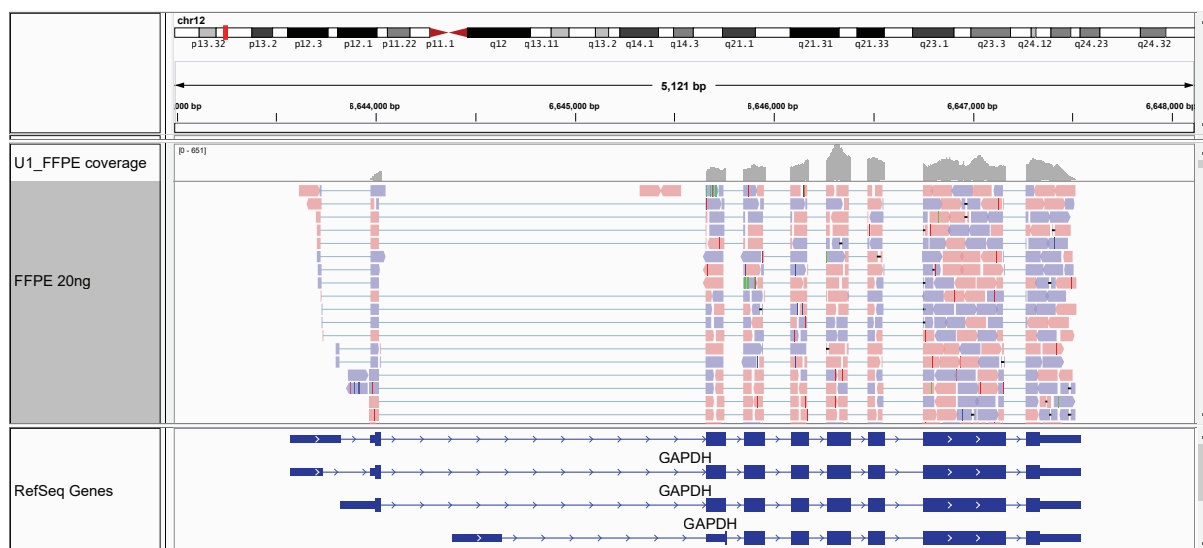


図 6: Illumina RNA Prep with Enrichment を使用した場合のコーディング領域のカバレッジ: 低品質の FFPE サンプル 20 ng から調製し、Illumina Exome Panel で濃縮したライブラリーを、25M リードでシーケンスしました。上の図は、Broad IGV で見た GAPDH コントロール遺伝子のカバレッジです。コーディングエクソン全体にリードのアライメントが認められることから、優れたターゲットキャプチャー法であることがわかります。

TruSeq RNA Exomeとの高い一致率

Illumina RNA Prep with Enrichmentのライブラリーから得られたデータを、標準的なRNA濃縮ツールであるTruSeq RNA Exomeのライブラリーから得られたデータと比較したところ、高い一致率が認められました (図7)。データプロットがS字状になっているのは、TruSeq RNA Exomeで使用したアダプターによりインデックスホッピングが発生したためです。重要な点として、Illumina RNA Prep with Enrichmentには、インデックスの組み換えが起こらないユニークデュアルインデックス (UDI) が使用されています。

柔軟で拡張性のあるスループット

Illumina RNA Prep with Enrichmentに、NextSeq™ 550システムやNovaSeq 6000システムなどのイルミナのミッドスループットまたはハイスループットシーケンスシステムを組み合わせれば、データ品質を維持したまま、1回のランではるかにより多くのサンプルをシーケンスすることができます。サンプルスループットをさらに上げるため、Illumina RNA Prep with Enrichmentは、384のユニークデュアルインデックス (UDI) を用いたマルチプレックスにも対応しています。UDIはインデックスのミスアサインメントを排除するだけでなく、1枚のNovaSeq 6000 S4フローセル上に最大384のサンプルをロードでき、スループットを大幅に上げられるため、シーケンスコストを抑えることができます。

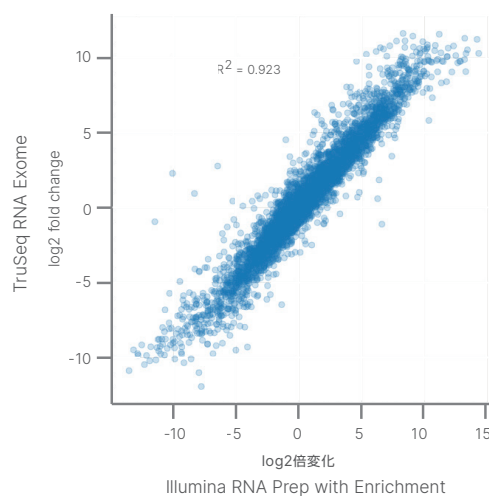


図7: TruSeq RNA Exomeとの一致率: UHR RNA (アジレント社、カタログ番号740000) とHuman Brain Total RNA (サーモフィッシャーサイエントフィック社、カタログ番号AM7962) でそれぞれlog2倍の変化を測定したところ、Illumina RNA Prep with Enrichmentのプロットは、TruSeq RNA Exomeとの高い一致率を示しました。ライブラリー調製はすべて、インプット量10 ngで行いました。TruSeq RNA Exomeのライブラリーは4-plexで濃縮し、Illumina RNA Prep with Enrichmentのライブラリーは3-plexで濃縮しました。データはすべて、ライブラリーあたり25Mクラスターにダウンサンプリングしました。データ解析にはBaseSpace Cufflinks Assembly & DE App v 2.1.0を使用しました。

幅広いRNAアプリケーションに対応するモジュール設計

RNAライブラリー調製と濃縮機能に、精度実証済みの独自の Sequence by Synthesis (SBS) 法² を組み合わせることで、Illumina RNA Prep with Enrichmentはさまざまな分野の高度な研究デザインに用いられる各種サイズの固定パネルおよびカスタムパネルに対応しています。例えば、トランスクリプトームのコーディング領域を解析するIllumina Exome Panelや、より焦点を絞った Respiratory Virus Oligos Panel (呼吸器系ウイルス、新型インフルエンザウイルス株およびSARS-CoV-2を検出するために設計された約7,800プローブを特徴とする) があげられます。Illumina RNA Prep with Enrichmentとカスタムパネルを組み合わせる場合、検証とプロトコールの調整が必要となることがあります。

まとめ

Illumina RNA Prep with Enrichmentは効率化を実現したソリューションであり、シンプルな迅速ワークフローによるターゲットRNA-Seqを可能にします。分解サンプルをはじめとするさまざまなインプットに対して優れた柔軟性を発揮し、少ないインプット量にも対応します。Illumina Exome PanelやIllumina Respiratory Virus Oligos Panelなど、さまざまな領域の幅広いRNA-Seqアプリケーションに対応するモジュール設計で、アリル特異的発現解析、遺伝子融合検出、バイオマーカースクリーニングなど、さまざまな検出や探索が可能です。

詳細はこちら

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件： jp.illumina.com/tc

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.
すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。
商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

製品情報

製品	カタログ番号
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. キットには、1-plex、濃縮反応16回分の試薬が含まれます。
b. キットには、3-plex、濃縮反応32回分の試薬が含まれます。

参考文献

- 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.

販売店

