

TruSeq™ Stranded mRNA und Total RNA

Erhalten Sie eine deutliche und umfassende Ansicht des Transkriptoms mit einer optimierten, kostengünstigen und skalierbaren Lösung für mRNA- oder Gesamt-Transkriptom-Analysen.

Vorteile

- Genauere Messung der Strangausrichtung**
 Ermöglicht die Erkennung der Antisense-Transkription, verbessert die Transkriptnotation und erhöht die Alignment-Effizienz
- Ausgezeichnete Abdeckungsqualität**
 Ermöglicht eine genaue und umfassende Zuordnung alternativer Transkripte und Genfusionen
- Geeignet für mehrere Probentypen**
 Ermöglicht die Analyse verschiedener Proben, einschließlich Proben von geringer Qualität, formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter Proben (FFPE) und Blutproben
- Hervorragende Flexibilität**
 Bietet eine hervorragende Flexibilität beim Versuchsdesign mit bis zu 96 eindeutigen doppelten Indizes (Unique Dual Indexes, UDIs) für ein zuverlässiges Proben-Multiplexing



Abbildung 1: TruSeq Stranded RNA – TruSeq Stranded mRNA und Total RNA ermöglichen die zuverlässige Abfrage sowohl von Standardproben als auch von Proben geringer Qualität und umfassen Workflows, die für zahlreiche Studiendesigns geeignet sind.

Häufigkeit der Sense- und Antisense-Expression bietet eine Transparenz für regulatorische Interaktionen, die ohne diese Möglichkeit fehlen könnte.

Während die wichtigen biologischen Rollen nicht codierender RNA (ncRNA) weiterhin anerkannt werden, bietet die Gesamt-Transkriptom-Analyse oder Gesamt-RNA-Sequenzierung ein umfassenderes Bild der Expressionsdynamik. Die durch die Reduzierung der ribosomalen RNA (rRNA) ermöglichte Gesamt-RNA-Sequenzierung eignet sich für FFPE-Proben, die potenziell kritische biologische Informationen enthalten. TruSeq Stranded RNA bietet sowohl für mRNA- als auch für Gesamt-Transkriptom-Analysen eine einzigartige Kombination von hervorragender Datenqualität. Zudem ermöglicht der Workflow die zuverlässige Abfrage sowohl von Standardproben als auch von Proben geringer Qualität. Außerdem ist er für zahlreiche Studiendesigns geeignet (Abbildung 1).

Effektive ribosomale Reduzierung

TruSeq Stranded RNA (Tabelle 1) kombiniert bewährte Chemie zur ribosomalen Reduzierung und Bibliotheksvorbereitungs-Chemie in einem einzigen, optimierten Protokoll. Anders als PolyA-basierte Abfangmethoden, entfernen Ribo-Zero™-Kits rRNA mithilfe biotinylierter Proben, die rRNA-Spezies selektiv binden. Das Sonden-rRNA-Hybrid wird von magnetischen Beads abgefangen und mittels Pull-down entfernt, sodass die gewünschte rRNA-bereinigte RNA in der Lösung verbleibt. Dieser Prozess minimiert die ribosomale Kontamination und maximiert den Prozentsatz an eindeutig zugeordneten Reads, wobei sowohl mRNA- als auch ein breites Spektrum an ncRNA-Spezies von Interesse abgedeckt werden, darunter lange intergenische nicht codierende RNA (lincRNA), kleine nukleäre RNA (snRNA), kleine nukleoläre RNA (snoRNA) und sonstige RNA-Spezies.²

Einleitung

Die RNA-Sequenzierung ist eine leistungsstarke Methode für die Erkennung, das Profiling und die Quantifizierung von RNA-Transkripten. Dank der Verwendung von Illumina-Sequenzierungstechnologie der nächsten Generation (NGS) erfordert die RNA-Sequenzierung keine spezies- oder transkriptspezifischen Sonden, sodass die Daten nicht durch vorherige Annahmen über das Transkriptom beeinflusst werden. Daher ermöglicht die RNA-Sequenzierung hypothesenfreie Versuchsdesigns aller Spezies, einschließlich Spezies mit schlechter oder fehlender Genomnotation. Über die Messung von Genexpressionsänderungen hinaus kann die RNA-Sequenzierung für Erkennungsanwendungen, z. B. das Identifizieren alternativer Spleißereignisse, Genfusionen, die allelspezifische Expression sowie das Untersuchen seltener und neuartiger Transkripte verwendet werden.

Aufgrund eines gewachsenen Verständnisses der Komplexität der Genregulation ist das Erfordernis der Erfassung zusätzlicher Daten entstanden. Stranginformationen geben an, aus welchem der beiden DNA-Stränge ein bestimmtes RNA-Transkript abgeleitet wurde. Diese Informationen erhöhen die Zuverlässigkeit der Transkriptnotation, insbesondere bei nicht humanen Proben. Das Identifizieren des Strangursprungs erhöht den Prozentsatz der sich alignierenden Reads, was die Sequenzierungskosten pro Probe senkt. Die Beibehaltung der Strangausrichtung ermöglicht auch die Identifizierung der Antisense-Expression, eines wichtigen Mediators der Genregulation.¹ Die Möglichkeit zum Erfassen der relativen

Tabelle 1: Anvisierte RNA-Spezies für die Reduzierung

Anvisierte RNA-Spezies	Bibliotheksvorbereitung
• Zytoplasmatische rRNA	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat
• Zytoplasmatische rRNA • Mitochondriale rRNA	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold
• Zytoplasmatische rRNA • Mitochondriale rRNA • Globin-mRNA	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Globin

Hochwertige Stranginformationen

TruSeq Stranded RNA-Chemie bietet eine hervorragende Datenqualität. Die Strangmessung oder der Prozentsatz an eindeutig zugeordneten Reads, die basierend auf gut charakterisierter universeller humaner Referenz-RNA (UHR) genaue Informationen zum Strangursprung liefern, beträgt mit TruSeq Stranded mRNA $\geq 99\%$ und mit TruSeq Stranded Total RNA $\geq 98\%$. Diese äußerst genauen Informationen dienen zur Steigerung des Prozentsatzes an eindeutigen Reads, die sich in der Assemblierung schlecht annotierter Transkriptome alignieren, und bieten die erforderliche Sensitivität für die Erkennung der Antisense-Expression. Die einheitliche, präzise Messung der RNA-Häufigkeit spiegelt sich in einer hohen Reproduzierbarkeit zwischen technischen Replikaten wider (Abbildung 2, $R^2 = 0,9783$).

TruSeq Total RNA für Proben von geringer Qualität

TruSeq Stranded RNA ermöglicht die zuverlässige und effiziente Abfrage von FFPE- und anderen RNA-Proben von geringer Qualität. Es besteht transkriptübergreifend eine hohe und gleichmäßige Abdeckung bei frisch gefrorenen (FF-) und FFPE-Proben, die mit TruSeq Stranded Total RNA vorbereitet wurden (Abbildung 3). Der optimierte Ribo-Zero-Workflow zum Entfernen von rRNA bietet eine praktikable, in hohem Maße skalierbare Lösung für eine effiziente Gesamt-Transkriptom-Analyse von Proben, die in der Regel schwierig zu analysieren sind.

RNA-Analyse von Blutproben

TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Globin ermöglicht die effiziente, zuverlässige Abfrage von aus Blutproben isolierter codierender und nicht codierender RNA. Ein optimierter, automatisierbarer Workflow wendet die Ribo-Zero-Chemie an, um in einem einzigen, schnellen Vorgang gleichzeitig Globin-mRNA sowie zytoplasmatische und mitochondriale rRNA zu entfernen (Tabelle 1). Dieser Workflow kombiniert das Entfernen von Globin-mRNA, das Entfernen von rRNA und die Bibliotheksvorbereitung, um die Sequenzierungsergebnisse zu optimieren. Er verkürzt zudem die Assay-Gesamtdauer, macht zusätzliche Entfernungsschritte überflüssig und senkt die Kosten pro Probe.

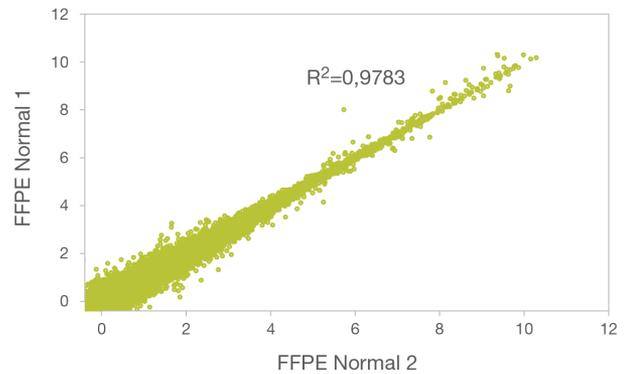


Abbildung 2: Hohe Übereinstimmung zwischen technischen Replikaten: Technische Replikate von FFPE-Gewebe weisen eine hohe Übereinstimmung auf, was auf eine stabile Leistung bei der Bibliotheksvorbereitung hindeutet. Bei den Achsen handelt es sich um die \log_2 -FPKM-Genexpression (Fragments per Kilobase Million). Der R^2 -Wert wird abgebildet.

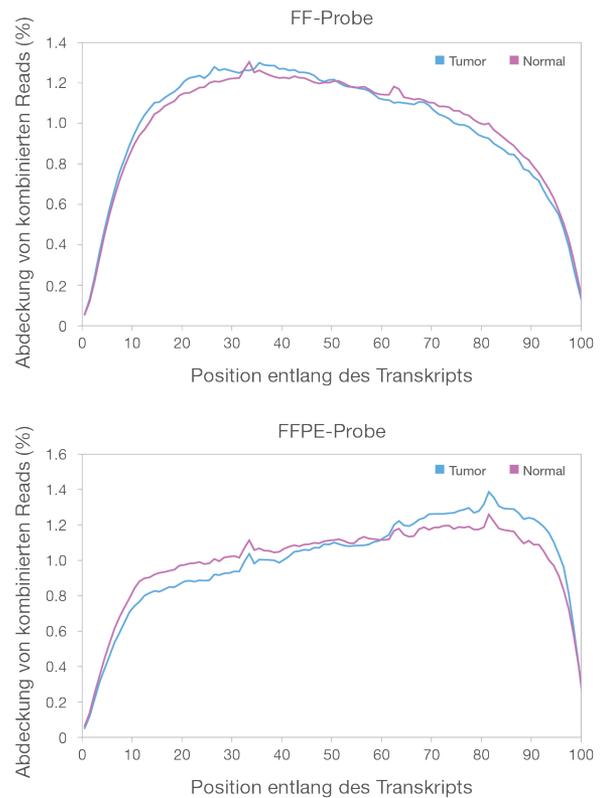


Abbildung 3: Gleichmäßige Abdeckung über Transkripte hinweg: TruSeq Stranded Total RNA bietet eine hervorragende Abdeckung über die wichtigsten 1.000 exprimierten Transkripte hinweg bei FF-Tumorgewebe (oben) und FFPE-Tumorgewebe (unten) sowie passendem normalem Brustgewebe mit $> 98\%$ alignierten Strang-Reads.

Differenzialexpression von nicht codierender RNA

Das Beibehalten der Stranginformationen von RNA-Transkripten ist aus vielen Gründen wichtig, einschließlich der Erkennung differenziell exprimierter Transkripte. Die RNA-Sequenzierungsanalyse von Brusttumor- und normalem Gewebe wurde zwischen TruSeq Stranded Total RNA Kit mit Ribo-Zero und einer PolyA-basierten Standardmethode für die Bibliotheksvorbereitung verglichen. Sowohl bei den mit TruSeq Stranded Total RNA als auch bei den mit PolyA vorbereiteten Bibliotheken wird die Differenzialexpression von *ATP5H* zwischen Tumor- und normalen Proben erkannt. Mit TruSeq Stranded Total RNA wird die Differenzialexpression in umgekehrter Ausrichtung an der Position des Pseudogen-Transkripts AC087651.1 jedoch auch in der erwarteten, entgegengesetzten Strangausrichtung erkannt (Abbildung 4). TruSeq Stranded Total RNA ermöglicht zudem die zuverlässige Erkennung der Differenzialexpression zwischen Tumor- und normalem Gewebe über mehrere Arten von ncRNA hinweg, darunter lincRNA, snRNA, snoRNA und sonstige RNA-Spezies (misc RNA) (Abbildung 5).

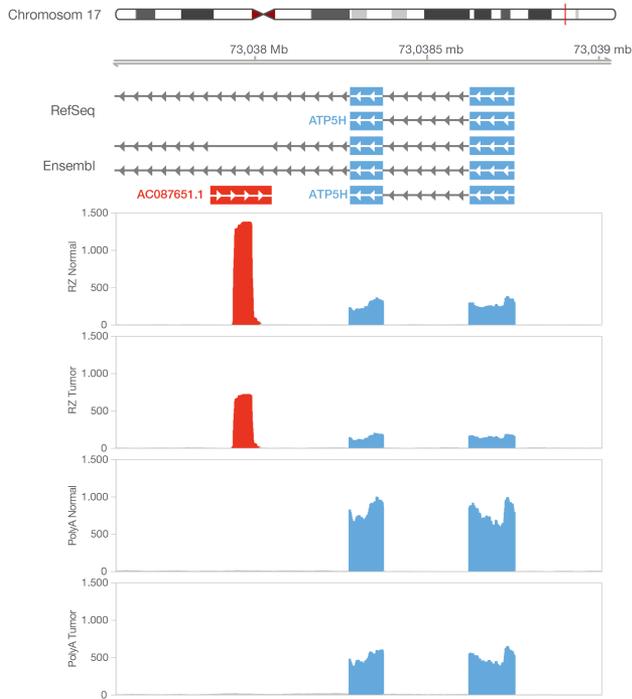


Abbildung 4: Differenzialexpression von ncRNA-Transkripten: *ATP5H*-Expression aus Chromosom 17 wird in Brusttumor- ggü. normalem Gewebe differenziell exprimiert. Die Verwendung von zwei verschiedenen Bibliotheksvorbereitungsmethoden (RZ: Ribo-Zero für Gesamt-RNA oder PolyA: PolyA-basierte mRNA) zeigt die Differenzialexpression in Tumor- gegenüber normalem Gewebe bei beiden Vorbereitungsmethoden (blau). Nur TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero zeigt jedoch die Differenzialexpression an der Position eines Pseudogens (rot, AC087651.1), für das Reads wie erwartet in der entgegengesetzten Ausrichtung erkannt werden. Diese Stranginformationen wären bei einer standardmäßigen mRNA-Vorbereitung verloren gegangen.

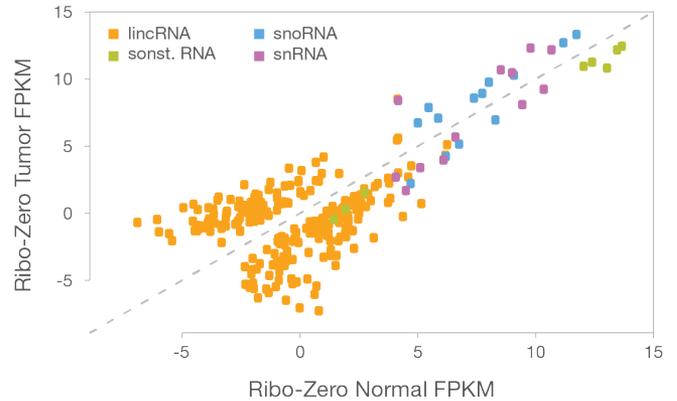


Abbildung 5: Erkennung der ncRNA-Expression: Mit TruSeq Stranded Total RNA kann die Differenzialexpression über mehrere ncRNA-Spezies hinweg, darunter lange intergenische nicht codierende RNA (lincRNA), kleine nukleäre RNA (snRNA), kleine nukleoläre RNA (snoRNA) und sonstige RNA (misc RNA), zwischen Tumor- und normalem Gewebe erkannt werden (vier Replikate pro Probe, Falscherkennungsrate (FDR) = 0,05).

Flexible Workflow-Konfigurationen

TruSeq Stranded mRNA und Total RNA bieten optimierte Lösungen für Ihre individuellen Versuchsanforderungen. Jeder Workflow enthält Niedrigdurchsatz- und Hochdurchsatz-Protokolle, ideal für Projekte mit ≤ 48 Proben bzw. ≥ 48 Proben. Es stehen Stranded Total RNA-Konfigurationen für die gezielte Entfernung von rein zytoplasmatischer rRNA oder von zytoplasmatischer und mitochondrialer rRNA zur Verfügung. Bei einem Vergleich unter Verwendung von UHR-RNA reduzierte sowohl TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat als auch TruSeq Stranded with Ribo-Zero Gold zytoplasmatische rRNA auf $< 2\%$ der alignierten Reads. TruSeq Stranded with Ribo-Zero Gold reduzierte zudem mitochondriale rRNA von 7% auf nur $0,02\%$ der alignierten Reads.

Effizientes Proben-Multiplexing

Die Indizes werden für eine innovative Lösung zum Proben-Multiplexing in einem einfachen Verfahren zu den cDNA-Fragmenten der Probe hinzugefügt. Für eine bessere Betriebseffizienz können bis zu 96 vorgefüllte, eindeutig indizierte Proben gepoolt und zusammen in eine einzige Fließzellen-Lane auf einer beliebigen Illumina-Sequenzierungsplattform sequenziert werden. Nach der Sequenzierung werden die Indizes verwendet, um die Daten zu demultiplexieren und Reads den richtigen Proben im Pool zuzuweisen.

TruSeq Stranded RNA kann eine Strategie mit einfachem Index oder eine Strategie mit doppeltem Index verwenden, die eine eindeutige Kombination aus zwei Indizes zum Demultiplexieren nutzt. Die Adapter mit eindeutigem doppeltem Index (Unique Dual Index, UDI) wurden im Rahmen der Zusammenarbeit von Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) und Illumina entwickelt (separat erhältlich) und verwenden zum Demultiplexieren eindeutige Paare von Indizes. Die neu eingeführten UDIs (24 und 96) bieten eine größere Plexität, die die präzise Zuordnung von Reads und den effizienten Einsatz von Fließzellen ermöglicht. Die Verwendung von UDI-Kombinationen ist eine bewährte Methode, mit der sich sicherstellen lässt, dass Reads mit falschen Indizes die Variantenbestimmung nicht beeinflussen.

Bestellinformationen

Produkt	Ribosomale Entfernung	Konfiguration	Katalog-Nr.
TruSeq Stranded mRNA Library Prep	n. z.	48 Proben	20020594
		96 Proben	20020595
TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat	Zytoplasmatische ribosomale RNA	48 Proben	20020596
		96 Proben	20020597
TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold	Zytoplasmatische und mitochondriale ribosomale RNA	48 Proben	20020598
		96 Proben	20020599
TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant	Zytoplasmatische und chloroplastische ribosomale RNA	48 Proben	20020610
		96 Proben	20020611
TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Globin	Zytoplasmatische und mitochondriale ribosomale RNA sowie Globin-mRNA	48 Proben	20020612
		96 Proben	20020613
Indizes		Konfiguration	Katalog-Nr.
TruSeq RNA Single Indexes Set A		12 Indizes, 48 Proben	20020492
TruSeq RNA Single Indexes Set B		12 Indizes, 48 Proben	20020493
TruSeq RNA CD Indexes		96 Indizes, 96 Proben	20019792
IDT for Illumina-TruSeq RNA UD Indexes		24 Indizes, 96 Proben	20020591
IDT for Illumina-TruSeq RNA UD Indexes		96 Indizes, 96 Proben	Demnächst erhältlich

Zusammenfassung

TruSeq Stranded mRNA und Total RNA bieten eine deutliche und umfassende Ansicht des Transkriptoms und ermöglichen eine genaue Messung der Strangausrichtung, eine einheitliche Abdeckung und eine äußerst zuverlässige Erkennung von Merkmalen wie alternativen Transkripten, Genfusionen und der allelspezifischen Expression. TruSeq Stranded Total RNA vereint alle Vorteile der TruSeq RNA-Bibliotheksvorbereitung mit Ribo-Zero-Chemie zur ribosomalen Reduzierung und bietet somit eine zuverlässige und in hohem Maße skalierbare Lösung zur Vorbereitung sequenzierfähiger Bibliotheken für die Gesamt-Transkriptomanalyse, die mit einer Vielzahl an Proben kompatibel ist, darunter nicht humane und FFPE-Proben.

Quellen

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.