

TruSeq™ RNA Exome

Una soluzione riproducibile ed economica per analizzare l'RNA isolato da tessuti fissati in formalina, inclusi in paraffina (FFPE) e altri campioni di bassa qualità.

Punti principali

- Dati di elevata qualità da campioni difficili**
 Campioni degradati valutati, compresi tessuti FFPE, per il sequenziamento dell'RNA
- Copertura eccezionale con contenuto mirato**
 Massimizza la potenza della scoperta a una ridotta profondità di sequenziamento, mirando alle regioni di codifica del trascrittoma
- Basso input di campione**
 Mantiene un'elevata qualità di dati partendo da soli 10 ng di RNA totale
- Soluzione del flusso di lavoro flessibile e integrata**
 Il flusso di lavoro completo ottimizza il sequenziamento dell'RNA con cattura dell'esoma e supporta plexing singolo o multiplexing fino a quattro plex

Questo genera visualizzazioni del trascrittoma significativamente diverse, riducendo l'affidabilità dei dati e aumentando i requisiti di budget.

Dati di elevata qualità da campioni difficili

Per superare questa sfida e rendere più semplice l'accesso a informazioni utili in campioni FFPE e altri campioni di bassa qualità, Illumina offre TruSeq RNA Exome, in precedenza in commercio con il nome di TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Figura 1). Questo flusso di lavoro permette ai ricercatori di applicare la potenza della tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS) agli studi dell'espressione genica su RNA isolato da campioni di bassa qualità. Concentrandosi sulle regioni di codifica di RNA, TruSeq RNA Exome richiede meno input di RNA e meno letture, aumentando il numero di campioni per corsa per un'analisi del trascrittoma efficace in termini di costi.

Introduzione

Milioni di campioni di tessuto fissati in formalina inclusi in paraffina (FFPE) forniscono un'enorme e inestimabile banca dati di informazioni per la ricerca sulle malattie, specialmente sul cancro. Di solito, questi campioni sono associati con dati fenotipici a lungo termine che possono fornire una visione approfondita dei cambiamenti dell'espressione genica che si verifica in diversi stadi della malattia. Sfortunatamente, il processo di fissazione e conservazione dei campioni FFPE può portare ad elevata degradazione dell'RNA, il che rende difficile eseguire studi del profilo dell'espressione genica riproducibili e affidabili con il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq).^{1,2} È possibile estrarre RNA utilizzabile da campioni FFPE, ma i metodi di analisi attuali producono risultati variabili o richiedono un sequenziamento profondo e costoso.

Copertura eccellente

TruSeq RNA Exome fornisce un set di sonde altamente ottimizzate per la copertura completa di sequenze di codifica di RNA. TruSeq RNA Exome include più di 425.000 sonde, ciascuna fabbricata sul genoma di riferimento NCBI37/hg19, che copre il 98,3% dell'esoma RefSeq. Il gruppo di sonde è stato progettato per la cattura di più di 210.000 target, che coprono 21.415 geni di interesse (Tabella 1).

Tabella 1: Dettagli sulla copertura di TruSeq RNA Exome

Specifiche della copertura	TruSeq RNA Exome
N. di geni target	21.415
N. di regioni di esoni target	214.126
N. di sonde	425.437
Percentuale coperta dall'esoma RefSeq	98,3%



Figura 1: Flusso di lavoro di TruSeq RNA Exome: TruSeq RNA Exome fa parte di una soluzione integrata NGS che comprende la preparazione della libreria e la cattura del trascrittoma codificante semplificate, il sequenziamento e una semplice analisi dei dati da parte dell'operatore.

Contenuto mirato

TruSeq RNA Exome fornisce un'elevata efficacia di cattura che concentra gli sforzi del sequenziamento su contenuti di elevato valore delle regioni di codifica di RNA. Per dimostrarlo, le librerie sono state preparate da campioni FFPE normali e tumorali (polmone) usando TruSeq Stranded Total RNA e TruSeq RNA Exome.

Il sequenziamento e l'analisi con l'applicazione BaseSpace TopHat Alignment hanno rivelato che con TruSeq RNA Exome si ottiene più dell'85% delle basi coperte che si allineano alla sequenza di codifica e alle regioni non tradotte (untranslated regions, UTR) di RNA, rispetto a una percentuale inferiore al 40% con TruSeq Stranded Total RNA (Figura 3). Lavorando con un contenuto più mirato, TruSeq RNA Exome produce serie di dati più brevi che consentono un'analisi più veloce e una più semplice gestione dei dati.

Basso input di campione

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 bias. Partendo da solo 10 ng di RNA totale, è possibile ottenere la profondità di sequenziamento necessaria all'accurata quantificazione e rilevamento dei trascritti e fusioni geniche. Grazie ai requisiti di basso input, TruSeq RNA Exome è una soluzione ideale per campioni preziosi con materiali di partenza limitati.

Flusso di lavoro semplice e scalabile

TruSeq RNA Exome è stato progettato e completamente ottimizzato per essere flessibile rispetto alle necessità di multiplexing in quanto fornisce una soluzione semplice e scalabile che fa parte del flusso di lavoro integrato NGS Illumina che comprende la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati (Figura 1).

Preparazione delle librerie ottimizzate

Le librerie per il sequenziamento di Stranded RNA sono preparate usando la precisa e comprovata chimica TruSeq. Questo metodo aggiunge oligonucleotidi univoci a ciascuna libreria, marcandoli per il pooling a valle in una corsia (Figura 2A). Questa fase di pooling a più campioni permette di caricare più campioni in una singola corsa di sequenziamento, rendendo possibili gli studi a rendimento elevato. Dopo il pooling, le librerie vengono sottoposte alla fase di cattura che produce librerie mirate con deplezione di RNA ribosomiale e regioni intrinche o intergeniche. Le librerie sottoposte a pooling vengono ibridizzate su sonde marcate con biotina, specifiche per le regioni di codifica di RNA (Figura 2B). I target specifici entro il gruppo sono quindi catturati aggiungendo microsferi coniugate con la streptavidina che si legano alle sonde biotinilate (Figura 2C). I magneti attirano i frammenti di RNA legato dalla soluzione (Figura 2D). I frammenti di RNA catturato vengono eluiti dalle microsferi e ibridizzati per una seconda reazione di arricchimento. Dopo l'amplificazione, una libreria mirata è pronta per la generazione di cluster e per il successivo sequenziamento. I reagenti vengono forniti in quantità sufficienti a consentire la flessibilità nel plexing dei campioni, dal sequenziamento a singolo plex al

sequenziamento multiplex a 4 plex. I reagenti Master Mix permettono un avvio veloce e una facile automazione.

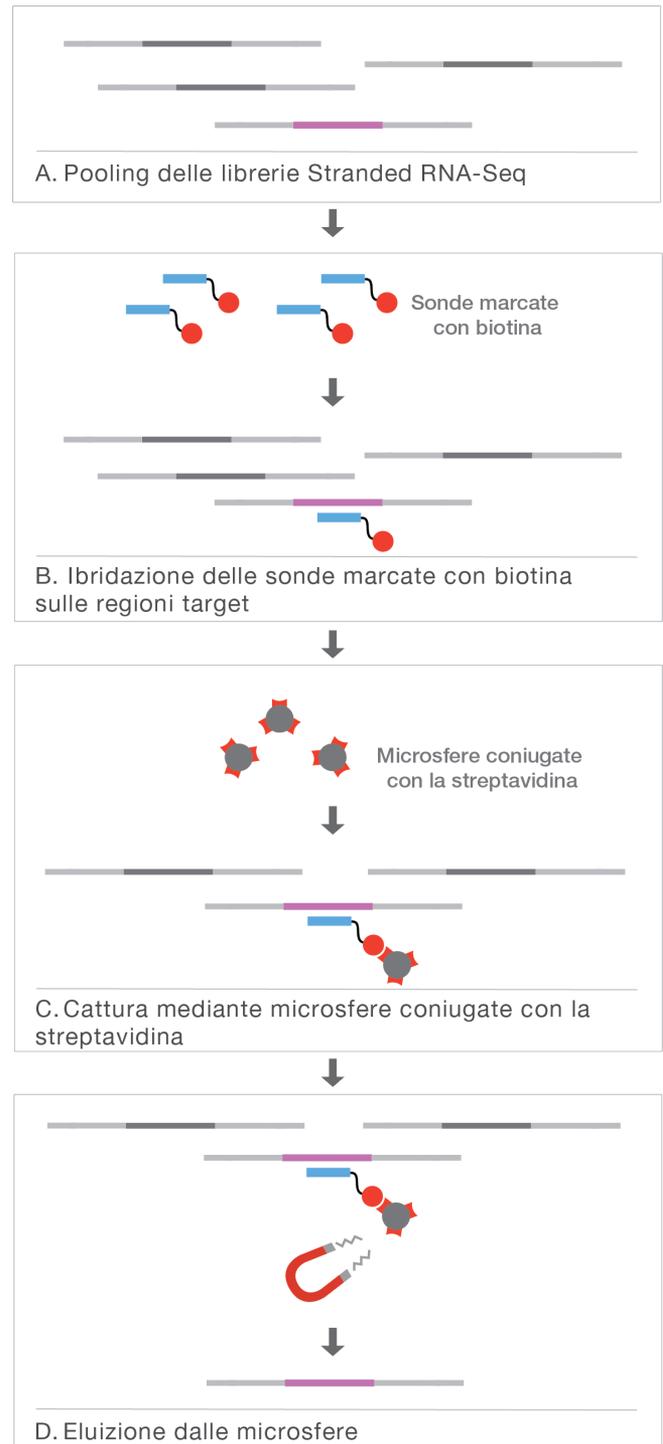
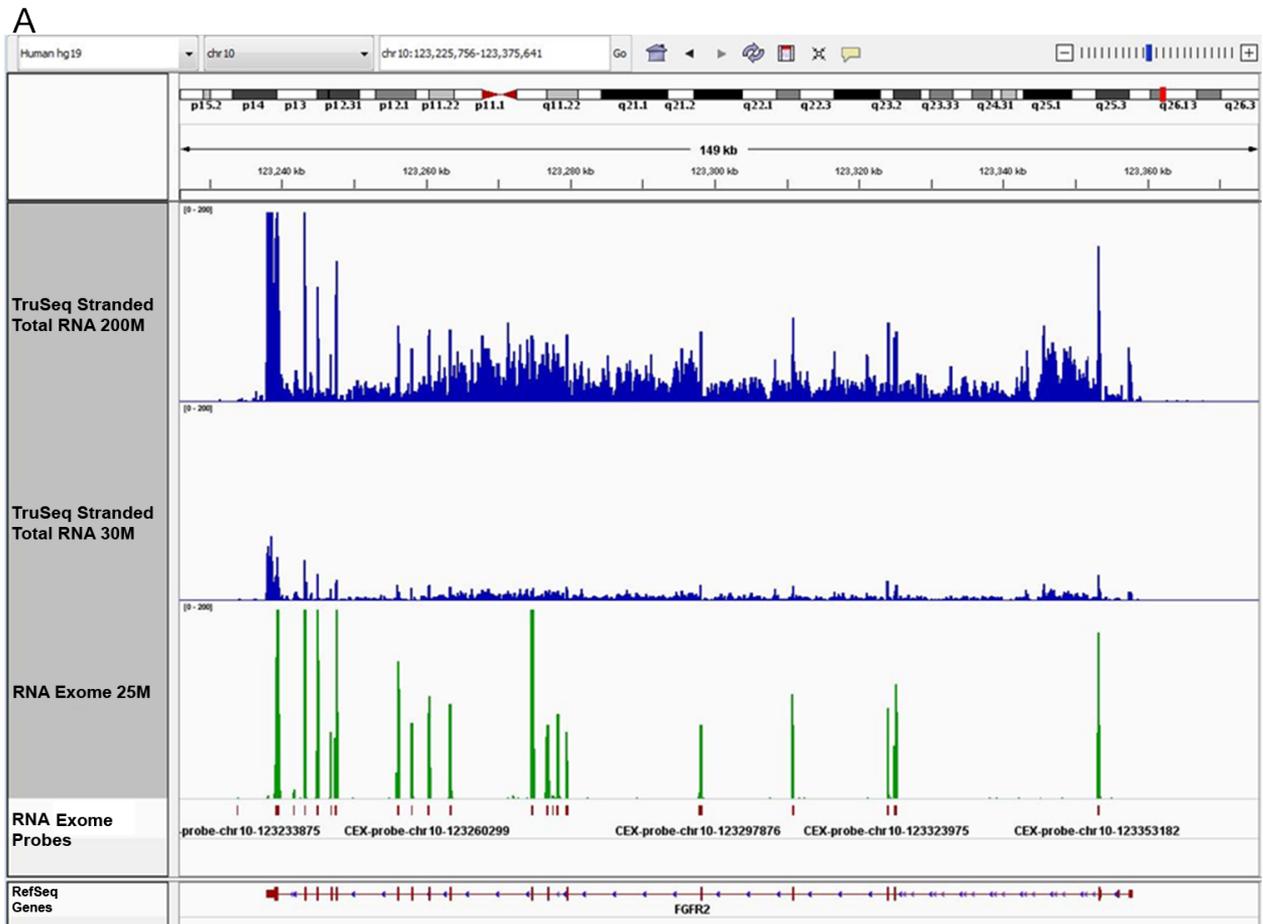


Figura 2: Chimica per la cattura con TruSeq RNA Exome: TruSeq RNA Exome fornisce un protocollo semplice e ottimizzato per isolare regioni di interesse mirate dai campioni.



B

% di basi allineate alla regione

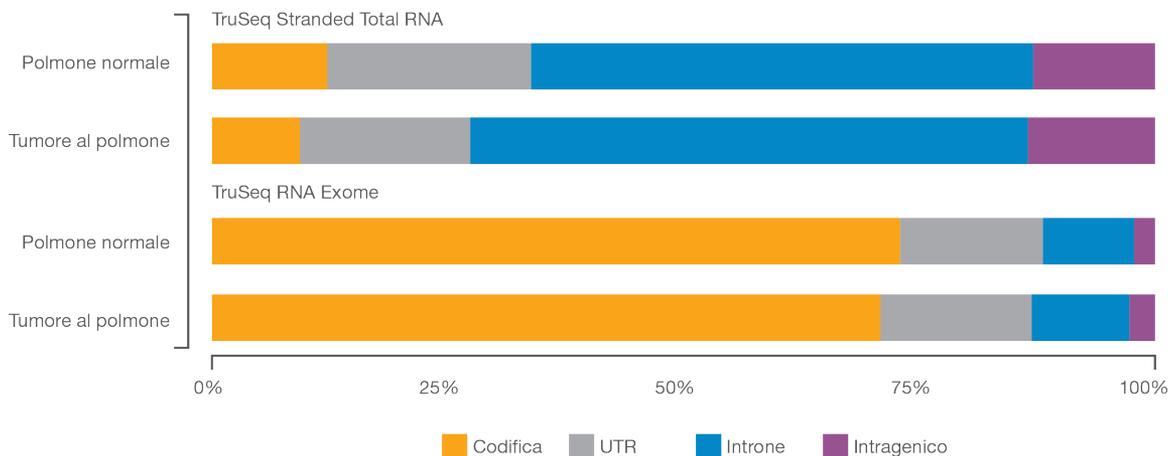


Figura 3: Focus sulle regioni di codifica di RNA con TruSeq RNA Exome: i campioni FPPE normali e di tumore al polmone sono stati preparati con TruSeq Stranded Total RNA e TruSeq RNA Exome. Il sequenziamento delle librerie è avvenuto a 200 M e 25 M di letture, rispettivamente. (A) I campioni preparati con TruSeq RNA Exome mostrano una più profonda copertura degli esoni, anche a 1/8 del numero di letture. I dati ottenuti dal TruSeq Stranded Total RNA erano stati sottoposti a decimazione (downsampling) a 30 M di letture per il confronto. (B) Usando l'applicazione BaseSpace TopHat Alignment, oltre l'85% dei dati generati usando TruSeq RNA Exome si è allineato ai trascritti (di codifica e UTR).

Sequenziamento efficace in termini di costi

Concentrandosi sulle regioni di codifica di RNA e combinando TruSeq RNA Exome con strumenti a rendimento elevato quali le serie di sistemi NextSeq, HiSeq e NovaSeq, i laboratori possono sequenziare un numero di campioni per corsa cinque volte superiore senza sacrificare la qualità dei dati (Figure 3 e 4). TruSeq RNA Exome produce informazioni altamente accurate che aumentano la percentuale di letture esoniche utilizzabili nel gruppo delle regioni di codifica di RNA altamente frammentato. Le letture si concentrano sulle regioni di interesse, massimizzando i budget di lettura (Tabella 2) senza sacrificare la potenza della scoperta delle fusioni geniche (Figura 5).

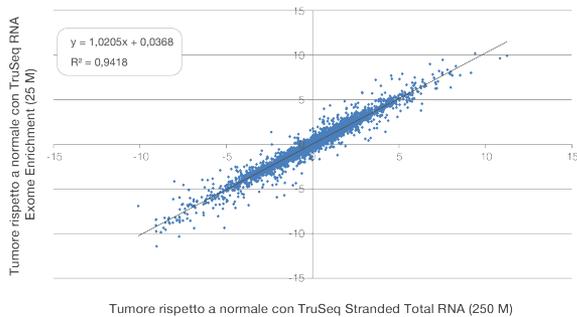


Figura 4: Dati accurati con una frazione delle letture: le librerie sono preparate con TruSeq RNA Exome (25 M di letture) e TruSeq Stranded Total RNA (250 M di letture) da campioni FFPE normali e di tumore al polmone. L'analisi dell'espressione differenziale rileva che i valori del log₂ hanno un'elevata correlazione per tutto il range dinamico (R² = 0,9418).

Tabella 2: TruSeq RNA Exome massimizza il budget di letture

Sistema di sequenziamento	Sequenziamento di RNA con campione fresco/congelato o FFPE ^a
Sistema MiSeq™ chimica v3	un campione per corsa
Sistema NextSeq 500 cella a flusso Mid-Output (output medio)	cinque campioni per corsa
Sistema NextSeq 500 cella a flusso High-Output (output elevato)	16 campioni per corsa
Sistema HiSeq 2500 modalità Rapid-Run (corsa rapida)	24 campioni per corsa
Sistema HiSeq 2500 modalità High-Output (output elevato)	160 campioni per corsa
Sistema NovaSeq 6000 cella a flusso S2	132 campioni per corsa

a. Sequenziamento a 25 M di letture per campione (2 × 75 bp).

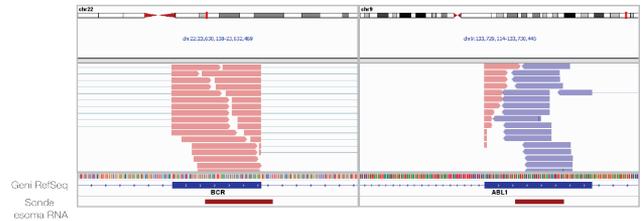


Figura 5: Scoperta delle fusioni geniche efficaci: TruSeq RNA Exome consente il rilevamento di trascritti di fusione espressi senza la necessità di progettare sonde specifiche per la giunzione di fusione. La ben caratterizzata fusione BCR-ABL1 viene rilevata efficacemente nel campione di RNA umano di riferimento universale (Universal Human Reference RNA, UHRF) a 25 M di letture.

Analisi dei dati facile e conveniente

Le serie di dati TruSeq RNA Exome possono essere analizzate usando le applicazioni del software RNA-Seq in BaseSpace Sequence Hub dotate degli strumenti di analisi dei dati preferiti dagli esperti e di interfacce utente intuitive e immediate, progettate per i meno esperti di informatica. TopHat 2 fornisce un allineamento di elevata sicurezza per la misurazione dell'abbondanza come anche il rilevamento di giunzioni di splicing, fusioni geniche e SNPs. CuffDiff permette la scoperta di trascritti sensibili e l'analisi dell'espressione differenziale. TopHat Fusion fornisce il rilevamento robusto e di elevata sicurezza di fusioni geniche, mentre l'architettura pipeline di Isaac™ Illumina permette l'identificazione affidabile di varianti.³ I file in uscita possono essere utilizzati per un'ampia gamma di soluzioni di analisi secondaria. Le applicazioni RNA-Seq permettono l'aggregazione di report a campioni multipli, la notifica del completamento del lavoro su un dispositivo mobile e l'organizzazione efficiente dei file per la collaborazione e la condivisione.

Riepilogo

I campioni FFPE offrono una ricchezza di informazioni alle quali era storicamente difficile accedere. In quanto parte di una soluzione integrata per il sequenziamento Illumina, TruSeq RNA Exome offre un metodo riproducibile ed economico per il sequenziamento di RNA da campioni FFPE e altri campioni di bassa qualità.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su sequenziamento dell'RNA e cattura dell'esoma, consultare www.illumina.com/techniques/sequencing/ma-sequencing/ma-exome-capture-sequencing.html.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSeq RNA Library Prep for Enrichment (48 campioni)	20020189
TruSeq RNA Enrichment (fino a 48 campioni a quattro plex, 12 arricchimenti)	20020490
TruSeq RNA Single Indexes Set A (12 indici, 48 campioni)	20020492
TruSeq RNA Single Indexes Set B (12 indici, 48 campioni)	20020493
Exome Panel (45 Mb)	20020183

Bibliografia

1. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlimpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1261.
2. Penland SK, Keku TO, Torrice C, et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Lab Invest*. 2007;794:383–391.
3. Raczky C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041–2043.