

Illumina Stranded Total RNA Prep, ligation avec Ribo-Zero^{MC} Plus

Obtenez une vue claire et complète du transcriptome avec une flexibilité exceptionnelle dans la conception des études.

Points saillants

- Élimination efficace des ARNr avec Ribo-Zero^{MC} Plus**
 Élimination des ARNr des humains, souris, rats et espèces bactériennes et les ARN de globine en une seule réaction en tube
- Données de haute qualité à partir d'échantillons à faible entrée difficiles à exploiter**
 Sensibilité élevée avec seulement 1 ng d'ARN de haute qualité ou 10 ng d'ARN provenant d'échantillons FFPE dégradés
- Flux de travail rapide de préparation des bibliothèques de séquençage de l'ARN**
 Préparation des bibliothèques en 7 heures avec 3 heures de manipulation, > 40 % plus rapidement qu'avec TruSeq Stranded Total RNA
- Séquençage à débit élevé, coût total réduit**
 Prise en charge du multiplexage de centaines d'échantillons en une seule analyse avec des index doubles uniques

Introduction

Le séquençage de l'ARN (ARN-Seq) par séquençage nouvelle génération (SNG) est une méthode efficace pour découvrir, réaliser le profilage et quantifier des transcrits d'ARN. Avantages de l'ARN-Seq :

- L'ARN-Seq total fournit une approche impartiale et sans hypothèse pour une analyse complète du transcriptome. Il mesure de façon précise l'abondance des gènes et des transcrits, et détecte à la fois des caractéristiques connues et nouvelles dans l'ARN codant ainsi que dans différentes formes d'ARN non codant.
- L'ARN messager (ARNm)-Seq quantifie l'expression génique de façon sensible et précise, identifie les isoformes connues et nouvelles dans le transcriptome codant et mesure l'expression spécifique d'allèles.
- L'ARN-Seq ciblé analyse l'expression génique dans un ensemble ciblé de gènes d'intérêt. L'ARN-Seq ciblé avec enrichissement permet d'effectuer une analyse à faible coût de l'exome de l'ARN en procédant à une capture spécifique à la séquence des régions codantes du transcriptome.

TruSeq^{MC} Stranded Total RNA est une solution solide pour des analyses du transcriptome complet sur des échantillons de qualité standard ou faible. Cependant, la nécessité d'utiliser des quantités relativement élevées, l'ampleur de la durée totale du test et de la durée de manipulation ainsi que les limites du champ d'application ont restreint son utilité en matière d'applications RNA-Seq. Pour surmonter ces obstacles, Illumina a mis au point Illumina Stranded mRNA Prep. Cette solution de pointe garantit une préparation des bibliothèques rapide, efficace et basée sur la ligation qui prend en charge les petites quantités d'échantillons et une grande variété d'applications ARN-Seq (Tableau 1). Pour centrer les études sur les séquences à valeur élevée, Illumina Stranded Total RNA Prep comprend la trousse Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion qui permet d'éliminer efficacement l'ARN ribosomal (ARNr) d'une multitude d'espèces, dont les humains, les souris, les rats et les bactéries, en une seule réaction (Figure 1).

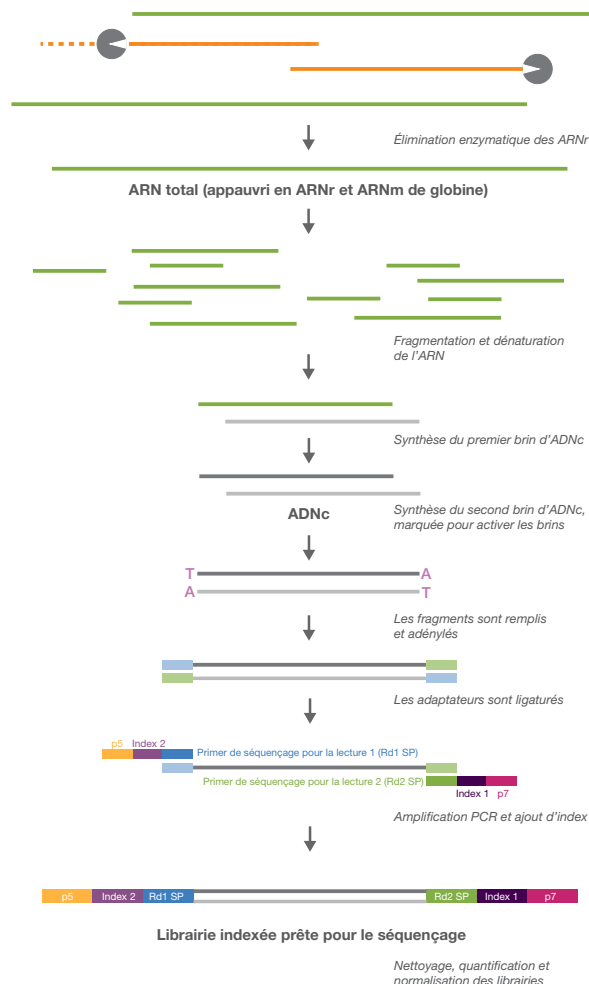


Figure 1 : Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus – Une fois que les ARNr et les ARNm de globine abondants ont été éliminés (lignes oranges) et que la synthèse de l'ADNc est terminée, on procède à la ligation des adaptateurs et à l'ajout d'index doubles uniques par amplification PCR pour produire des bibliothèques de haute qualité qui sont quantifiées et normalisées avant le séquençage.

Élimination multi-espèces efficace des ARNr avec Ribo-Zero Plus

L'élimination des ARN abondants, y compris des ARNr et des ARN de globine, avant le séquençage de l'ARN permet aux chercheurs de se concentrer sur l'analyse de parties informatives à valeur élevée du transcriptome, tout en diminuant les coûts de séquençage. La trousse Illumina Stranded Total RNA inclut la trousse Ribo-Zero Plus rRNA Depletion, ce qui facilite les analyses riches du transcriptome en éliminant les ARNr et les ARN de globine. La méthode d'élimination enzymatique des ARNr par tube unique est compatible avec les faibles entrées (1 ng) et élimine partiellement les ARNr des espèces procaryotiques et eucaryotiques (Tableau 2). Les ARNr et ARN de globines abondants sont éliminés de l'ARN total par hybridation

Tableau 1 : Caractéristiques d'Illumina Stranded Total RNA Prep

Caractéristique	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
Appauvrissement de l'ARN abondant	ARNr d'humains, de souris et de rats ou ARNm de globine	ARNr d'humains, de souris, de rats et de bactéries et ARNm de globine
IDU max.	96	384
Quantité d'entrée d'ARN	100 à 1 000 ng	1 à 1 000 ng ARN ^a
Durée totale du test	11,5 heures	7 heures
Durée de manipulation	5,5 heures	< 3 heures
Compatible FFPE?	Oui	Oui
Configurations de la trousse	48 ou 96 échantillons	16 ou 96 échantillons

a. 1 à 1 000 ng d'ARN de haute qualité^a (RIN > 7), 10 à 1 000 ng d'ARN dégradé (RIN 2-7) ou d'ARN FFPE (DV₂₀₀ > 55). Les meilleurs résultats sont obtenus avec 10 ng d'ARN en entrée.
Abréviations : IDU, index doubles uniques; RIN, numéro d'intégrité de l'ARN

ciblée sur des sondes ADN, puis par clivage par médiation H de la ribonucléase (Figure 2, Tableau 3). Les échantillons appauvris en ARNr sont ensuite soumis à l'étape de préparation des bibliothèques.

Pour évaluer l'appauvrissement en ARNr et le rendement de préparation des bibliothèques obtenus avec Illumina Stranded Total RNA avec Ribo-Zero Plus, une gamme d'entrées d'ARN total a été comparée à TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA avec Ribo-Zero Plus s'est distingué par une efficacité supérieure, notamment avec des entrées faibles (Figure 3, Tableau 4).

Données de haute qualité

Uniformité de la couverture

Illumina Stranded Total RNA Prep produit des bibliothèques de séquençage garantissant une couverture hautement uniforme des transcrits à partir d'un ARN d'entrée de référence humaine universelle (RHU) de haute qualité ou dégradé (Figure 4A), avec de faibles quantités d'entrée d'ARN FFPE (Figure 4B).

Tableau 3 : Appauvrissement des ARNm de globine provenant de leucocytes périphériques humains à l'aide d'Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus

Gène	Entrée de 10 ng d'ARN total			Entrée de 10 ng d'ARN total		
	Non appauvri	Appauvri	% appauvri	Non appauvri	Appauvri	% appauvri
HBA1	7 489	2	99,97 %	13 685	4	99,97 %
HBA2	66 045	18	99,99 %	110 406	16	99,99 %
HBB	154 614	78	99,95 %	173 704	86	99,95 %
HBG1	22	0	96,69 %	37	1	99,29 %
HBG2	203	0	100 %	143	0	100 %

Tableau 4 : Indicateurs de rendement d'Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus^a

	Entrée de 10 ng d'ARN total		Entrée de 10 ng d'ARN total		Entrée de 1 ng d'ARN total	
	TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus
% d'ARNr (28S/18S)	2,0	3,8	7,2	4,4	32,8	4,5
% de brins	99	99	99	99	99	99
CV médian de couverture	0,44	0,46	0,48	0,47	0,52	0,51
% de duplicats ^b	7,5	4,5	12,8	5,3	40,9	19,2
% d'alignement	96,9	96,9	94,2	97,5	76,6	97,5
% d'abondance	3,0	4,9	8	5,2	35,8	5,0

a. Les données ont été analysées à l'aide de l'application BaseSpace^{MC} RNA-Seq Alignment v2.0.1.

b. Les pourcentages de duplicats correspondent à la situation après sous-échantillonnage à 4 M de lectures appariées passant le filtre (PF).

Tableau 2 : Espèces d'ARNr ciblées pour la réduction

Échantillon	ARNr ciblés
ARNr cytoplasmiques humains	28S, 18S, 5.8S, 5S
ARNr mitochondriaux humains	12S, 16S
Transcrits de globine bêta humaine	HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2
ARNr de souris et de rats	16S, 28S
ARNr bactérien Gram (-)	<i>E. coli</i> 5S, 16S, 23S
ARNr bactérien Gram (+)	<i>B. subtilis</i> 5S, 16S, 23S

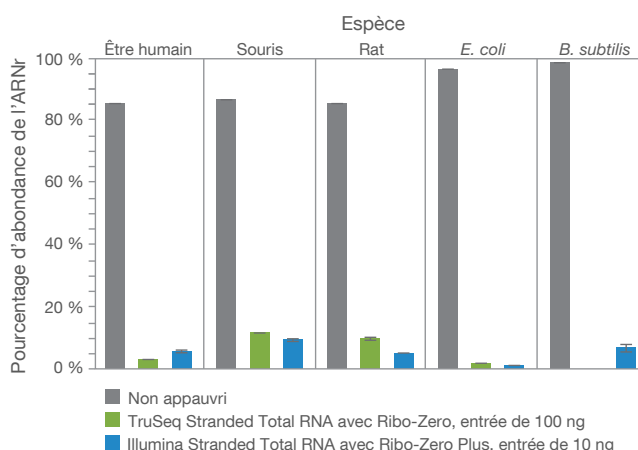


Figure 2 : Appauvrissement multi-espèces des ARNr au moyen de la préparation Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus – Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus diminue efficacement les niveaux d'ARNr issus d'humains, de souris, de rats ou de bactéries dans une réaction en tube unique. Les résultats sont comparés à TruSeq Stranded Total RNA associé à Ribo-Zero Gold pour des espèces de mammifères et Ribo-Zero Bacteria pour les *E. coli* (données pour *B. subtilis* non représentées).

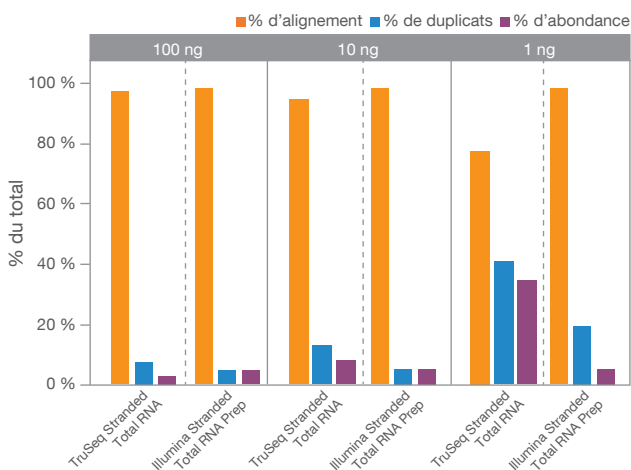


Figure 3 : Comparaison des indicateurs de rendement – Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus a été comparé à TruSeq Stranded Total RNA avec Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus s'est révélée plus efficace, notamment avec des niveaux d'entrée faibles de 10 ng et de 1 ng d'ARN RHU total. Les bibliothèques ont été séquençées sur un système NextSeq 550, avec un sous-échantillonnage à 30 M de lectures. Les pourcentages de duplicats ont été calculés en sous-échantillonnage à 4 M de lectures et analysés au moyen de l'application BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.

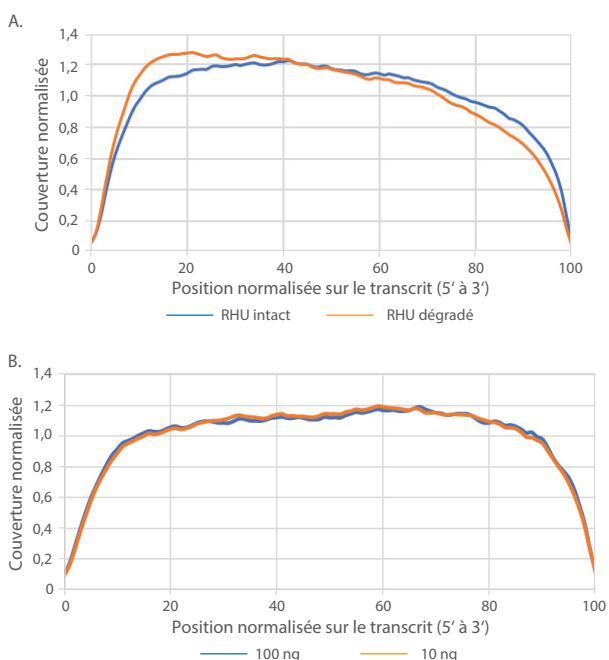


Figure 4 : Uniformité élevée de couverture – Illumina Stranded Total RNA Prep assure une uniformité élevée de couverture pour (A) les ARN RHU de haute qualité et synthétiquement dégradés (RIN = 2) et (B) les ARN FFPE à des niveaux d'entrée de 100 ng et 10 ng. L'échantillon FFPE présentait un score de qualité DV₂₀₀ de 55 %. Toutes les bibliothèques ont été séquençées sur un système NovaSeq 6000 à 50 M de lectures. Les données ont été analysées à l'aide de l'application BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

Efficacité en matière d'identification de gènes

Pour comparer le rendement d'Illumina Stranded Total RNA Prep à TruSeq Stranded Total RNA pour les applications d'identification de gènes, différentes quantités d'ARN RHU d'entrée ont été séquençées à 30 M de lectures appariées. Le nombre de gènes a ensuite été évalué avec une couverture de 1x et de 10x. Les résultats montrent qu'Illumina Stranded Total RNA Prep assure une meilleure détection des gènes à des niveaux d'entrée faibles de 1 ng (Figure 5).

Concordance exceptionnelle des données

Illumina Stranded Total RNA Prep génère des données de qualité, avec un niveau élevé de concordance entre différentes quantités d'ARN RHU d'entrée (Figure 7A) et entre les réplicats techniques de faibles quantités d'ARN d'entrée issus d'échantillons FFPE (Figure 7B). Ces résultats prouvent qu'Illumina Stranded Total RNA Prep est une solution idéale pour des échantillons précieux ou dégradés provenant d'un matériel de départ limité. En outre, Illumina Stranded Total RNA Prep présente un niveau élevé de concordance des données avec TruSeq Stranded Total RNA, tant pour des entrées équivalentes (Figure 8A) que réduites (Figure 8B).

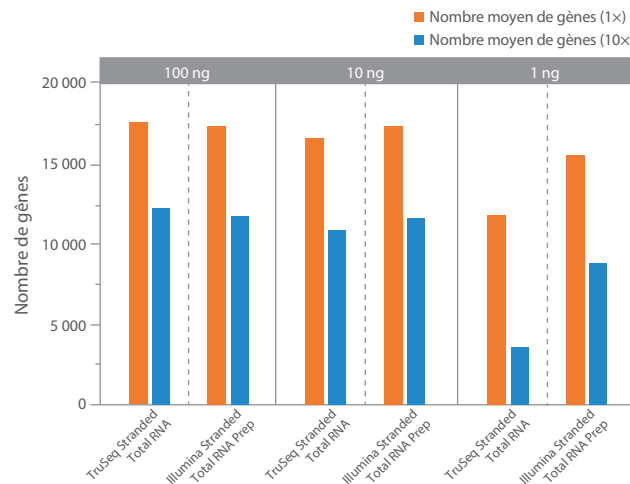


Figure 5 : Meilleure identification des gènes à faible entrée – Illumina Stranded Total RNA Prep offre une meilleure détection des gènes à faible entrée d'ARN par rapport à TruSeq Stranded Total RNA lorsque l'on mesure le nombre de gènes détectés à 30 M de lectures appariées sous-échantillonnées passant le filtre (PF). Le fait qu'Illumina Stranded Total RNA Prep détecte davantage de gènes à 1x est un indicateur de plus grande sensibilité.

Flux de travail rationalisé pour la préparation des bibliothèques

Illumina Stranded Total RNA Prep utilise un flux de travail souple et rapide pour la préparation basée sur la ligation de bibliothèques d'ARN (Figure 1). Les innovations apportées au flux de travail, notamment des temps d'incubation plus courts et des étapes de nettoyage des échantillons réduites, se traduisent par une durée totale de test plus de 40 % plus courte que TruSeq Stranded Total RNA (Figure 6).

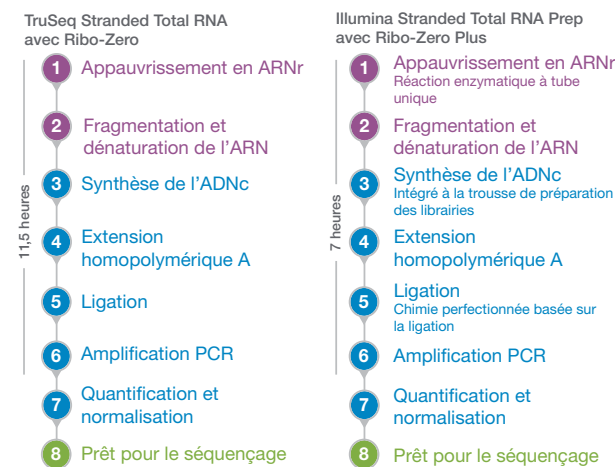


Figure 6 : Flux de travail d'Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus – Illumina Stranded Total RNA Prep assure un flux de travail rapide avec un temps de manipulation réduit. Les durées peuvent varier selon le matériel utilisé, le nombre d'échantillons traité, l'automatisation des procédures et le niveau d'expérience de l'utilisateur.

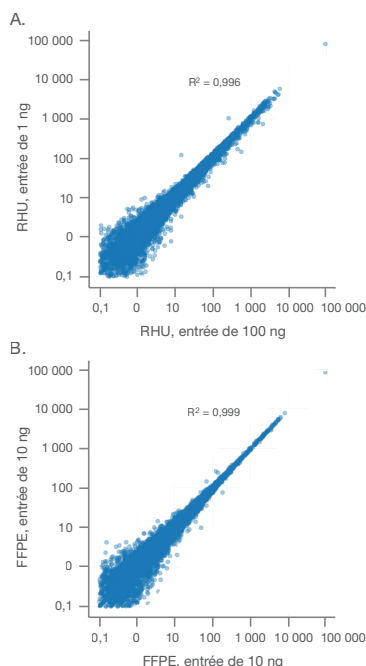


Figure 7 : Concordance élevée des données – Illumina Stranded Total RNA Prep atteint une concordance élevée des données entre (A) des quantités d’entrée de 1 ng et de 100 ng d’ARN RHU et (B) des réplicats techniques de 10 ng d’ARN FFPE. Les bibliothèques ont été séquençées sur un système NovaSeq 6000 à 2 x 74 pb. Les données ont été analysées à l’aide de l’application BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

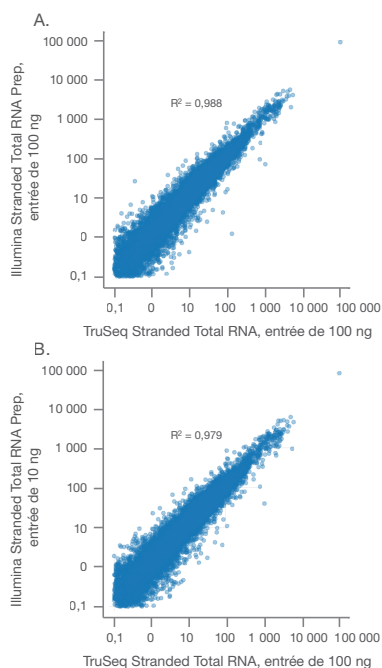


Figure 8 : Concordance élevée avec l’ancienne trousse – Illumina Stranded Total RNA Prep génère des données à concordance élevée avec TruSeq Stranded Total RNA à des entrées (A) équivalentes et (B) inférieures.

Débit plus élevé avec des index doubles uniques

En combinant Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus et des instruments à haut débit comme les systèmes NextSeq^{MC} 550 et NovaSeq^{MC} 6000, les laboratoires sont en mesure de séquençer un nombre sensiblement plus important d’échantillons par analyse sans compromettre la qualité des données. Pour obtenir une augmentation supplémentaire du débit des échantillons, Illumina Stranded Total RNA Prep prend en charge le multiplexage avec 384 index doubles uniques (IDU)*. En plus d’éliminer l’impact d’une mauvaise attribution d’index, c’est-à-dire d’une commutation d’index, les IDU contribuent à réduire les coûts de séquençage en donnant la possibilité de charger jusqu’à 384 échantillons sur une seule Flow Cell NovaSeq S4, ce qui augmente nettement le débit.

Résumé

Illumina Stranded Total RNA Prep est une solution rationnelle de séquençage de l’ARN qui permet de réaliser une analyse claire et complète du transcriptome. Elle offre une souplesse extraordinaire en ce qui concerne le type d’entrée et prend en charge les faibles quantités d’entrée, jusqu’à 1 ng d’ARN de haute qualité. Elle est compatible avec la trousse Ribo-Zero Plus rRNA Depletion, qui permet d’éliminer avec une haute efficacité les ARNr interférents d’une multitude d’espèces, dont les humains, les souris, les rats et les bactéries. Illumina Stranded Total RNA Prep garantit une mesure précise de l’orientation du brin, une couverture uniforme et une détection hautement fiable de caractéristiques telles que les autres transcrits, les fusions de gènes et l’expression spécifique d’allèles.

En savoir plus

Pour en savoir plus sur Illumina Stranded Total RNA Prep avec Ribo-Zero Plus, cliquez sur www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html

Renseignements relatifs à la commande

Préparation de bibliothèque	N° de référence
Illumina Stranded Total RNA Prep, ligation avec Ribo-Zero Plus (16 échantillons)	20040525
Illumina Stranded Total RNA Prep, ligation avec Ribo-Zero Plus (96 échantillons)	20040529
Index	N° de référence
Technologies intégrées d’ADN pour Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20040553
Technologies intégrées d’ADN pour Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20040554
Technologies intégrées d’ADN pour Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20040555 Disponible prochainement
Technologies intégrées d’ADN pour Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20040556 Disponible prochainement

* Jusqu’à 192 IDU seront pris en charge au lancement du produit. Des IDU supplémentaires seront disponibles plus tard en 2020.