

Illumina RNA Prep with Enrichment

Un flux de travail rapide et intégré pour les applications d'enrichissement d'ARN.

Points saillants

- Flux de travail d'enrichissement d'ARN simples et faciles**
 Préparez des bibliothèques en aussi peu que 9 heures, avec une durée de manipulation inférieure à 2 heures
- Qualité exceptionnelle de données à partir d'échantillons difficiles à exploiter**
 Obtenez une sensibilité élevée à partir d'aussi peu que 10 ng d'ARN total provenant d'échantillons frais ou congelés ou à partir de 20 ng d'ARN total provenant d'échantillons tissulaires FFPE dégradés
- Séquençage d'ARN ciblé et abordable**
 Maximisez votre potentiel de découverte grâce à une capture fiable et efficace et à une profondeur de séquençage réduite produisant une détection exacte et objective
- Débit souple et ajustable**
 Effectuez le multiplexage de jusqu'à 384 échantillons en une seule analyse avec des index doubles uniques

Introduction

Le séquençage d'ARN (ARN-Seq) à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération (NGS) est une méthode efficace pour découvrir, réaliser le profilage et quantifier des transcrits d'ARN. Les avantages du séquençage d'ARN comprennent les éléments suivants :

- Le séquençage d'ARN ciblé analyse l'expression dans un ensemble de gènes d'intérêt ciblé. L'enrichissement permet une analyse rentable des exomes d'ARN grâce à la capture de séquences spécifiques des régions de codage du transcriptome. Il est idéal pour les échantillons fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE) de basse qualité.
- Le séquençage complet de l'ARN fournit une approche objective 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 les caractéristiques connues et nouvelles de codage et les formes multiples d'ARN non codant.
- Le séquençage de l'ARN messager (ARNm) quantifie l'expression génique de façon sensible et exacte, identifie les isoformes connus et nouveaux dans le transcriptome de codage et mesure l'expression spécifique d'allèle.

La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation offre une solution rationalisée pour le séquençage d'ARN ciblé. Cette technologie permet une grande souplesse en ce qui concerne le type et la quantité d'entrée afin de fournir un vaste éventail d'applications de séquençage d'ARN et ainsi permettre des études de détection et de découverte, notamment l'expression spécifique d'allèles, la détection des fusions et le criblage de biomarqueurs. La combinaison de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment et du panel d'exomes d'Illumina offre une vue exhaustive du transcriptome de codage, offrant un potentiel de découverte optimal à une profondeur de séquençage de loin inférieure.

Flux de travail d'enrichissement d'ARN simples et faciles

La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment utilise la tagmentation sur bille, suivie d'une étape unique et simplifiée d'hybridation de 90 minutes afin de permettre un flux de travail rapide (Figure 1).

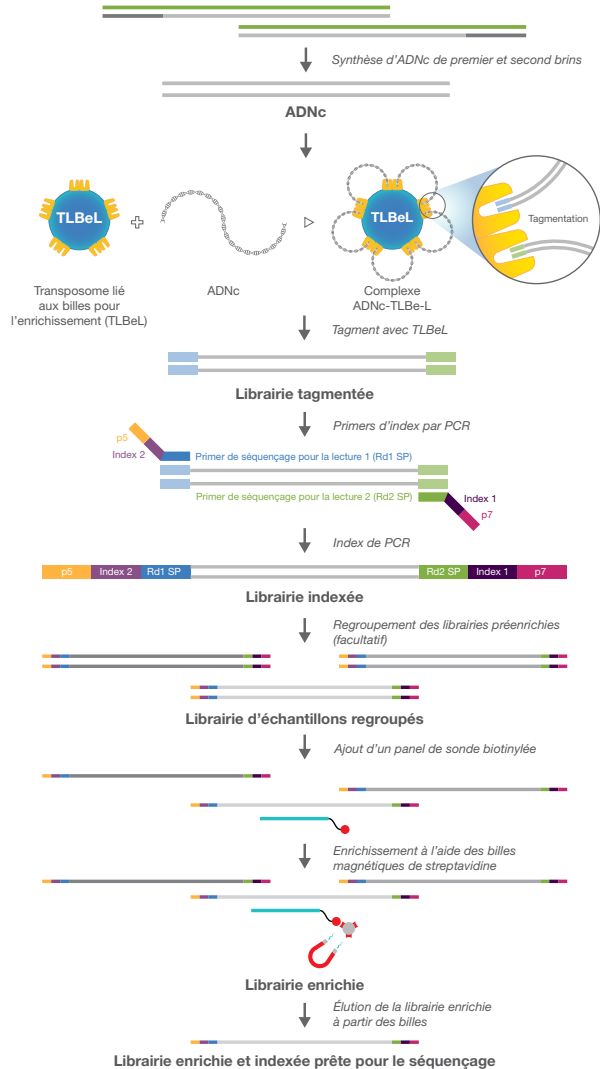


Figure 1: Chimie d'enrichissement de la préparation d'ARN d'Illumina – Après la synthèse d'ADNc, une réaction de tagmentation uniforme induite par les TLBeL suivie par une réaction d'hybridation unique de 90 minutes permet un flux de travail rapide et flexible.

La tagmentation sur bille présente des transposomes liés aux billes pour l'enrichissement (TLBe) et optimisés pour le séquençage d'ARN (TLBeL), pour médier une réaction de tagmentation uniforme, éliminant ainsi la nécessité d'une étape de fragmentation distincte afin de gagner du temps. En plus d'innovations sur le plan de la réaction d'hybridation, le flux de travail permet un nombre d'étapes moindre, un temps d'incubation plus court, de nombreux points d'arrêt de sécurité et une durée de test totale au moins 50 % plus rapide que la trousse TruSeq^{MC} RNA Exome Enrichment (Figure 2). En plus de la préparation manuelle, la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment est conçue pour être compatible avec les plateformes de manipulation des liquides pour rendre possible un flux de travail automatisé et ainsi permettre la manipulation d'échantillons de haute reproductivité, un risque réduit d'erreurs humaines et une durée de manipulation plus courte.

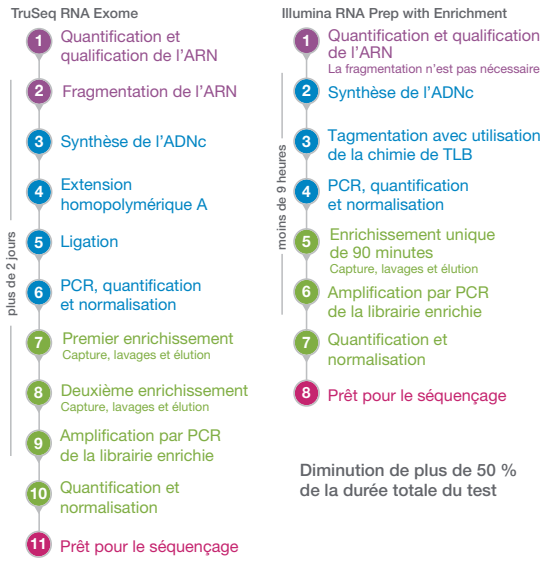


Figure 2 : La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment permet un flux de travail rapide; la tagmentation sur bille combinée à une seule étape d'hybridation de 90 minutes permettent un flux de travail plus rapide et un nombre réduit d'étapes par rapport à la trousse TruSeq RNA Exome.

Données de qualité élevée

Des données de qualité élevée provenant d'échantillons à faible entrée ou d'échantillons FFPE

La grande efficacité de la capture et la grande uniformité de la couverture minimisent la profondeur de séquençage requise pour définir les niveaux d'expression de manière exacte et sans distorsion. À partir de seulement 10 ng d'ARN total, la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment produit des données de qualité avec une concordance élevée entre des quantités variables d'entrée d'ARN issus d'échantillons frais ou congelés (Figure 3). Les précieux échantillons de tumeur et de référence ou les échantillons de tissus FFPE d'archives comportent de l'information biologique d'une grande richesse pour le profilage de l'expression génique; il peut toutefois être difficile de les étudier en raison de la dégradation des acides nucléiques qui se produit lors du processus de fixation et du stockage.¹ La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment produit des données de qualité à partir de seulement 20 ng d'entrée d'ARN issu d'échantillons FFPE. L'ensemble de ces résultats démontre que la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment constitue une solution pour les échantillons précieux ou dégradés dont la quantité de matériel initial est limitée.

Détection des fusions géniques dans les échantillons à faible entrée ou FFPE

Pour démontrer la capacité de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment à reconnaître les variants structurels dans les transcrits d'ARN, des échantillons frais ou congelés et des échantillons FFPE ont été enrichis à l'aide du panel d'exomes d'Illumina et séquençés à l'aide du système NovaSeq^{MC} 6000. Les résultats démontrent un taux de définition de 100 % pour la fusion des gènes de *BCR-ABL1* (Figure 4) et de *TPM3-NTRK1* sur six réplicats de la lignée cellulaire K-562 (numéro d'intégrité de l'ARN, NIA = 7,4, DV₂₀₀ = 90 %) et d'une lignée cellulaire de cancer colorectal (NIA = 2,5, DV₂₀₀ = 85 %), respectivement (Tableau 1).

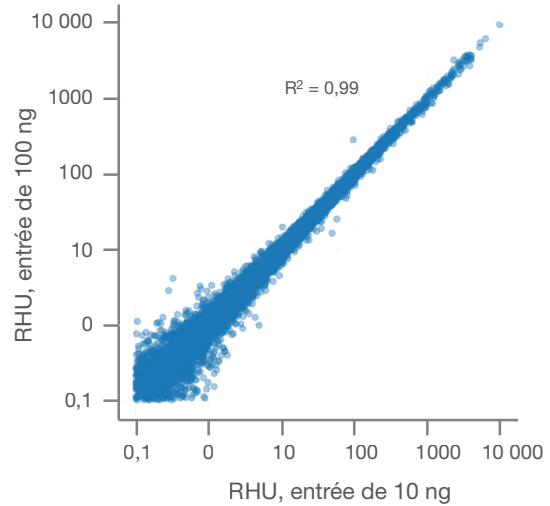


Figure 3 : Données de qualité élevée issues d'échantillons à faible entrée – La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment permet d'obtenir des données de concordance élevées entre des quantités d'entrée d'ARN total de 10 ng et de 100 ng à partir de références humaines universelles (RHU). Des bibliothèques d'ARN de RHU ont été séquençées à l'aide d'un système NovaSeq 6000 sous-échantillonnées à 25 M d'amplifiats par bibliothèque. Les données ont été analysées à l'aide de l'application BaseSpace RNA-Seq Alignment v1.1.1.

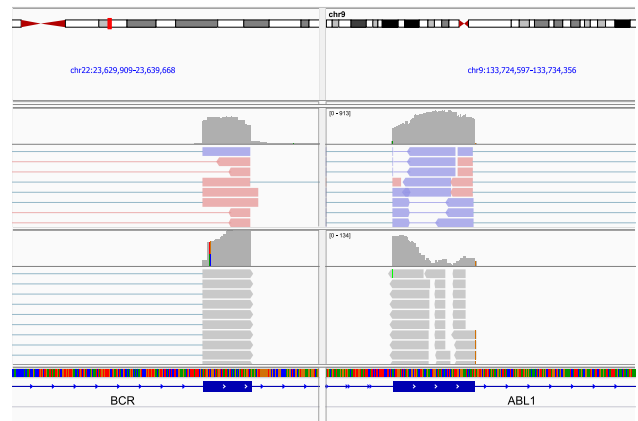


Figure 4 : Détection de la fusion des gènes *BCR-ABL1* – La préparation de bibliothèques à partir de 10 ng d'ARN de lignée cellulaire K-562 à l'aide d'Illumina RNA Prep with Enrichment et du panel d'exomes d'Illumina a permis la détection de la fusion des gènes *BCR-ABL1* avec l'outil Integrative Genome Viewer (IGV) de Broad. La piste d'alignement du haut montre toutes les lectures; celle du bas présente seulement les lectures sur lesquelles se trouve la fusion *BCR-ABL1*.

Tableau 1: Détection des fusions géniques

Fusion (source)	NIA	Entrée d'ARN	Détection
<i>BCR-ABL1</i> (K-562)	7,4	10 ng	6/6 réplicats (100 %)
<i>TPM3-NTRK1</i> (cancer colorectal)	2,5	20 ng	6/6 réplicats (100 %)

Séquençage d'ARN ciblé et abordable

Couverture exceptionnelle de contenu exonique

La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment peut être utilisée en combinaison avec le panel d'exomes d'Illumina, qui offre un ensemble de sondes hautement optimisé produisant une couverture exhaustive des séquences d'ARN codant (Tableau 2).

Tableau 2: Spécifications du panel d'exomes d'Illumina

Spécifications de couverture	Panel d'exomes d'Illumina
Nombre de gènes ciblés	21 415
Nombre de régions exoniques ciblées	214 126
Nombre de sondes	425 437
Pourcentage couvert de l'exome RefSeq	98,3 %

Afin d'évaluer la performance de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment pour le séquençage d'exomes, des bibliothèques ont été préparées à partir d'ARN de référence humaine universelle et d'ARN FFPE à l'aide de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment. Les bibliothèques obtenues ont été séquencées à l'aide du système NovaSeq 6000 à 2 × 100 pb (25 M lectures). Des analyses de données à l'aide de l'application d'enrichissement BaseSpace^{MC} Sequence Hub ont montré que la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment fournissait une couverture des exons exceptionnelle (Figure 5). En effet, plus de 85 % des bases couvertes s'alignaient sur la séquence de codage et sur les régions d'ARN non traduites, des résultats comparables à la trousse TruSeq RNA Exome (Figure 6).

Ces résultats démontrent que la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment offre des captures extrêmement efficaces permettant de cibler les efforts de séquençage sur le contenu à valeur élevée des régions de codage de l'ARN. La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment s'appuie sur du contenu plus ciblé, ce qui réduit la profondeur de séquençage nécessaire et la taille des ensembles de données, permettant des économies de temps et d'argent.

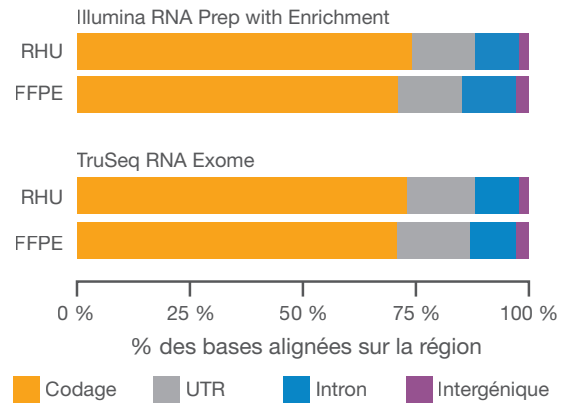


Figure 6 : Couverture des régions de codage avec la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment – Les bibliothèques préparées à partir de 10 ng d'ARN de RHU et de 20 ng d'ARN FFPE à l'aide de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment et du panel d'exomes d'Illumina produisent des données dont plus de 85 % sont alignées sur le codage et les UTR. Les données des bibliothèques TruSeq RNA Exome sont présentées à des fins de comparaison. Les bibliothèques ont été séquencées à l'aide du système NovaSeq 6000 à 2×100 pb, sous-échantillonnées à 25 M lectures).

Concordance avec la trousse TruSeq RNA Exome

Une comparaison des données générées à partir des bibliothèques de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment avec celles générées par les bibliothèques de la trousse TruSeq RNA Exome, une solution standard pour l'enrichissement d'ARN, a démontré une concordance élevée (Figure 7). Veuillez prendre note que la forme sigmoïde du diagramme de données est due à la commutation d'index d'adaptateurs utilisés avec la trousse TruSeq RNA Exome. Essentiellement, la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment utilise des index doubles uniques (IDU), conçus pour éliminer l'index de recombinaison.

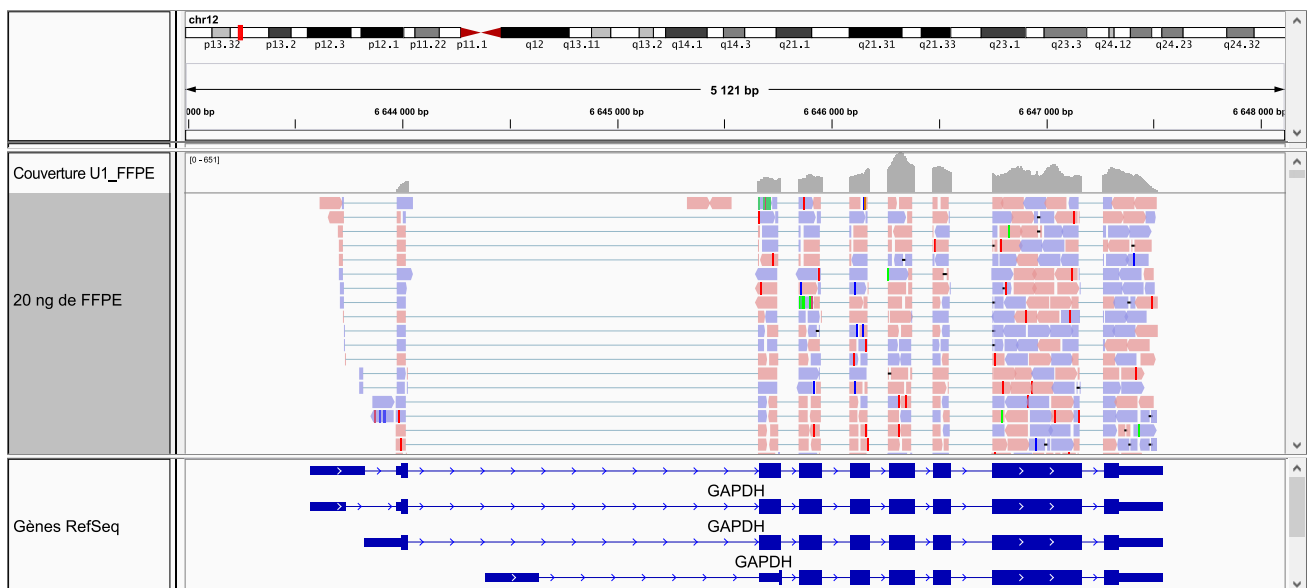


Figure 5 : Couverture des régions codantes par la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment – Une bibliothèque préparée à partir d'un échantillon de basse qualité de 20 ng et enrichi à l'aide du panel d'exomes d'Illumina a été séquencée à 25 M lectures. La couverture du gène de régulation GAPDH à l'aide de IGV de Broad est présentée, montrant des lectures alignées sur les exons codants et présentant une bonne capture de cibles.

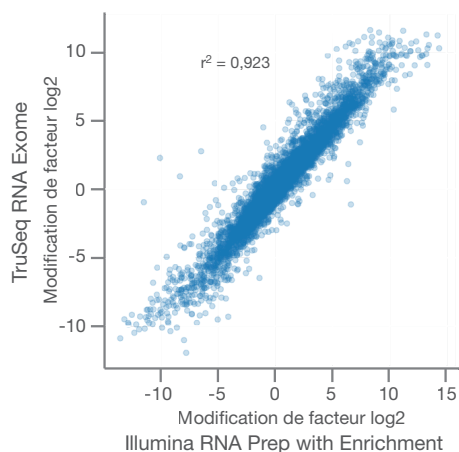


Figure 7 : Le diagramme de concordance de la trousse TruSeq RNA Exome – La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment montre une concordance élevée avec la trousse TruSeq RNA Exome, telle que mesurée à l’aide de la modification de facteur log2 pour l’ARN de RHU (Agilent, référence n° 740000) par rapport à l’ARN total dans le cerveau humain (Thermo-Fisher, référence n° AM7962). Toutes les bibliothèques ont été préparées à partir d’entrées de 10 ng. Les bibliothèques de la trousse TruSeq RNA Exome ont été enrichies en multiplexage à 4 niveaux; les bibliothèques de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment ont été enrichies en multiplexage à 3 niveaux. Toutes les données sont sous-échantillonnées à 25 M amplifiées par bibliothèque. Les données ont été analysées à l’aide de BaseSpace Cufflinks Assembly & DE App v 2.1.0.

Débit souple et ajustable

En combinant la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment avec des instruments à débit élevé comme les systèmes NextSeq^{MC} 550 et NovaSeq 6000, les laboratoires peuvent séquencer beaucoup plus d’échantillons par analyse, et ce sans compromettre la qualité des données. Pour augmenter encore davantage le débit d’échantillon, la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment prend en charge le multiplexage de 384 échantillons avec index doubles uniques.* En plus de prévenir la mauvaise attribution d’index, les échantillons avec index doubles uniques réduisent les coûts de séquençage en permettant le chargement de jusqu’à 384 échantillons en une seule Flow Cell NovaSeq S4, offrant un débit beaucoup plus élevé.

Conception modulaire pour un vaste éventail d’applications d’ARN

En combinant la préparation de bibliothèques d’ARN et la performance d’enrichissement avec l’exactitude éprouvée de la chimie de séquençage par synthèse (SBS) d’Illumina², la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment prend en charge les panels préconçus et personnalisés de diverses tailles pour les clients qui ont besoin d’une conception d’études avancées dans divers domaines. Les exemples comprennent le panel d’exomes d’Illumina pour l’analyse des régions codantes du transcriptome ainsi que le panel d’oligos de virus respiratoire, plus ciblé, qui présente environ 7800 sondes conçues pour détecter les troubles respiratoires, les souches récentes du virus de la grippe ainsi que SARS-CoV-2, la nouvelle souche du coronavirus (CoV), responsable de la pandémie de COVID-19. Des ajustements en matière de validation

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

et de protocole peuvent être nécessaires lors de la combinaison de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment à un panel personnalisé.

Résumé

La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment offre une solution rationalisée et un flux de travail rapide et simple pour le séquençage d’ARN ciblé. Elle offre une grande souplesse en matière de type d’entrée, notamment les échantillons dégradés, et prend en charge de petites quantités d’entrée. Sa conception modulaire prend en charge un vaste éventail d’applications de séquençage d’ARN dans les régions d’intérêt, notamment à l’aide du panel d’exomes d’Illumina et du panel d’oligos de virus respiratoires, permettant la réalisation d’études de détection et de découverte notamment l’expression spécifique d’allèles, la détection des fusions et le criblage de biomarqueurs.

En savoir plus

Pour obtenir de plus amples renseignements à propos de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment et pour connaître les options disponibles concernant le contenu du panel, consultez la page www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html.

Renseignements relatifs à la commande

Préparation de bibliothèques	N° de référence
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 échantillons) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 échantillons) ^a	20040537
Index	N° de référence
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 index, 96 échantillons) ^b	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 index, 96 échantillons) ^b	20027214
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20042666 Disponible prochainement
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 index, 96 échantillons)	20042667 Disponible prochainement
Panel d’enrichissement	N° de référence
Panel d’exomes d’Illumina	20020183
Panel d’oligos de virus respiratoire v2 d’Illumina	20044312 Disponible prochainement

- La trousse de 16 échantillons contient suffisamment de réactifs pour 16 enrichissements en multiplexage à 1 niveau; la trousse de 96 échantillons contient suffisamment de réactifs pour 32 enrichissements en multiplexage à 3 niveaux.
- * IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes » sont les nouveaux noms donnés aux trousse « IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes »; le contenu des trousse demeure le même.

Références

- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K et Schlimpberger M. **Determinants of RNA quality from FFPE samples.** *PLoS ONE.* 2007; 2(12) : e1261.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. **Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry.** *Nature.* 2008; 456 : 53-59.