

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment

Un flux de travail rapide et intégré
pour une détection précise
et authentique des transcrits

- Sensibilité élevée avec seulement 10 à 20 ng d'ARN total provenant d'échantillons frais, congelés ou FFIP
- Préparation des bibliothèques en neuf heures, dont moins de deux heures sont consacrées à la manipulation
- Multiplexage de jusqu'à 384 échantillons en une seule analyse avec des index doubles uniques

Introduction

Le séquençage d'ARN (RNA-Seq) avec séquençage nouvelle génération (SNG) est une méthode puissante pour découvrir, réaliser le profilage et quantifier des transcrits d'ARN. Les avantages des principales méthodes de RNA-Seq comprennent :

- Le RNA-Seq ciblé analyse l'expression dans un ensemble ciblé de gènes d'intérêt. L'enrichissement permet d'effectuer une analyse rentable de l'exome de l'ARN grâce à la capture de séquences spécifiques des régions de codage du transcriptome. Il est idéal pour les échantillons fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) de basse qualité.
- Le RNA-Seq total fournit une approche authentique 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 (mRNA)-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.

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation offre une solution rationalisée pour le RNA-Seq ciblé. Cette trousse permet une grande souplesse en ce qui concerne le type et la quantité d'entrée afin de prendre en charge une gamme d'applications de RNA-Seq et ainsi permettre des études de détection et de découverte, notamment l'expression spécifique d'allèles, la détection des fusions, le criblage de biomarqueurs et plus. La combinaison de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment et d'Illumina Exome Panel offre une vue exhaustive du transcriptome codant, offrant un potentiel de découverte optimal à une profondeur de séquençage de loin inférieure.

Flux de travail d'enrichissement d'ARN simple et facile

Illumina RNA Prep with Enrichment utilise la tagmentation sur billes, suivie d'une étape d'hybridation unique et simplifiée de 90 minutes afin de permettre un flux de travail rapide (figure 1). La tagmentation sur billes présente des transposomes liés aux billes pour l'enrichissement (TLBe) et optimisés pour le séquençage d'ARN (TLBeL), lesquels servent d'agents médiateurs pour produire une réaction de tagmentation uniforme, éliminant ainsi la nécessité d'étapes de fragmentation distinctes afin de gagner du temps.

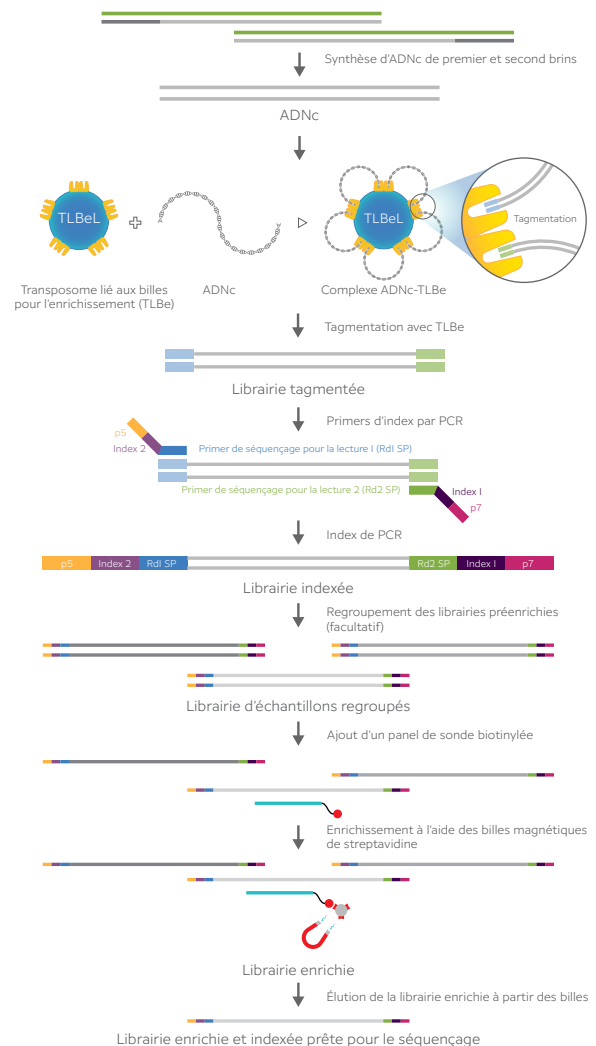


Figure 1 : Chimie d'Illumina RNA Prep with Enrichment – Après la synthèse d'ADNc, une réaction de tagmentation uniforme induite par les TLBeL suivie par une réaction d'hybridation unique de 90 minutes permet un flux de travail rapide et flexible.

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 TruSeq^{MC} RNA Exome (figure 2). En plus de la préparation manuelle, Illumina RNA Prep with Enrichment est conçue pour être compatible avec les plateformes de manipulation de liquides pour rendre possible un flux de travail automatisé et ainsi permettre la manipulation d'échantillons hautement reproductibles, un risque réduit d'erreurs humaines et une durée de manipulation plus courte.



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

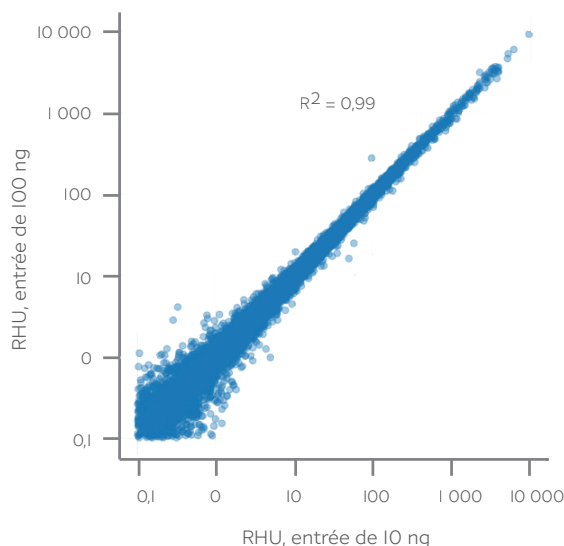


Figure 3 : Données de qualité élevée issues d'échantillons à faible entrée – La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment permet d'obtenir des données de concordance élevées entre des quantités d'entrée d'ARN total de 10 ng et de 100 ng à partir de références humaines universelles (RHU). Des librairies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

Données de haute qualité

Des données très précises provenant d'échantillons à faible entrée ou d'échantillons FFIP

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, Illumina RNA Prep with Enrichment produit des données de qualité avec une concordance élevée entre des quantités variables d'entrée d'ARN extrait d'échantillons frais ou congelés (figure 3). Tumeur – Les échantillons de biopsie normaux ou les échantillons de tissu archivé FFIP fournissent une source riche d'informations biologiques pour le profilage de l'expression génique. Cependant, ils peuvent être difficiles à étudier en raison de la dégradation de l'acide nucléique du processus de fixation et de stockage¹. Illumina RNA Prep with Enrichment produit des données de qualité à partir de seulement 20 ng d'entrée d'ARN extrait d'échantillons FFIP. L'ensemble de ces résultats démontre qu'Illumina RNA Prep with Enrichment constitue une solution idéale pour les échantillons dégradés dont la quantité de matériel initial est limitée.

Détection de la fusion des gènes dans les échantillons à faible entrée ou FFIP

Pour démontrer la capacité de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment à reconnaître les variants structuraux dans les transcrits d'ARN, des échantillons frais/congelés et des échantillons FFIP ont été enrichis à l'aide de l'Illumina Exome Panel et séquencés 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 répliquats 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).

Tableau 1 : Détection de la fusion des gènes

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

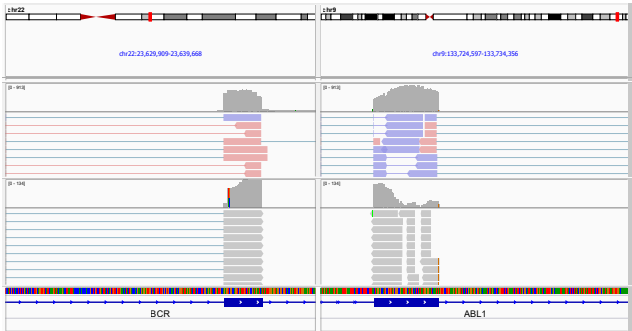


Figure 4 : Détection de la fusion des gènes *BCR-ABL1* –
La préparation de bibliothèques à partir de 10 ng d'ARN de lignée cellulaire K-562 à l'aide de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment et d'Illumina Exome Panel a permis la détection de la fusion des gènes *BCR-ABL1* avec l'outil Integrative Genomics 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*.

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 (RHU) et d'ARN FFPE à l'aide de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment. Les bibliothèques obtenues ont été séquencées à l'aide d'un système NovaSeq 6000 à 2 × 100 pb (25 millions de lectures). Des analyses de données avec Enrichment App dans BaseSpace^{MC} Sequence Hub ont montré que la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment fournissait une couverture exonique exceptionnelle. 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 5, 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. 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.

RNA-Seq ciblé et abordable

Couverture exonique exceptionnelle

Illumina RNA Prep with Enrichment peut être utilisée en combinaison avec Illumina Exome Panel, qui offre un ensemble de sondes hautement optimisé produisant une couverture complète des séquences d'ARN codant (tableau 2).

Tableau 2 : Spécifications d'Illumina Exome Panel

Spécifications de couverture	Illumina Exome Panel
Nbre de gènes cibles	21 415
Nbre de régions exoniques ciblées	214 126
Nbre de sondes	425 437
Pourcentage couvert de l'exome RefSeq	98,3 %

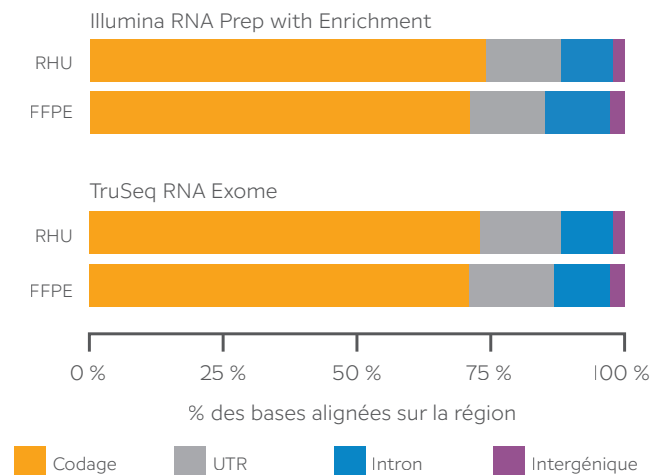


Figure 5 : Couverture des régions de codage avec la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment – Les bibliothèques préparées à partir de 10 ng d'ARN de RHU et de 20 ng d'ARN FFPE à l'aide de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment et d'Illumina Exome Panel produisent des données dont plus de 85 % sont alignées sur le codage et les régions non traduites. Les données des bibliothèques TruSeq RNA Exome sont présentées à des fins de comparaison. Les bibliothèques ont été séquencées à l'aide d'un système NovaSeq 6000 à 2 × 100 pb, sous-échantillonnées à 25 millions de lectures.

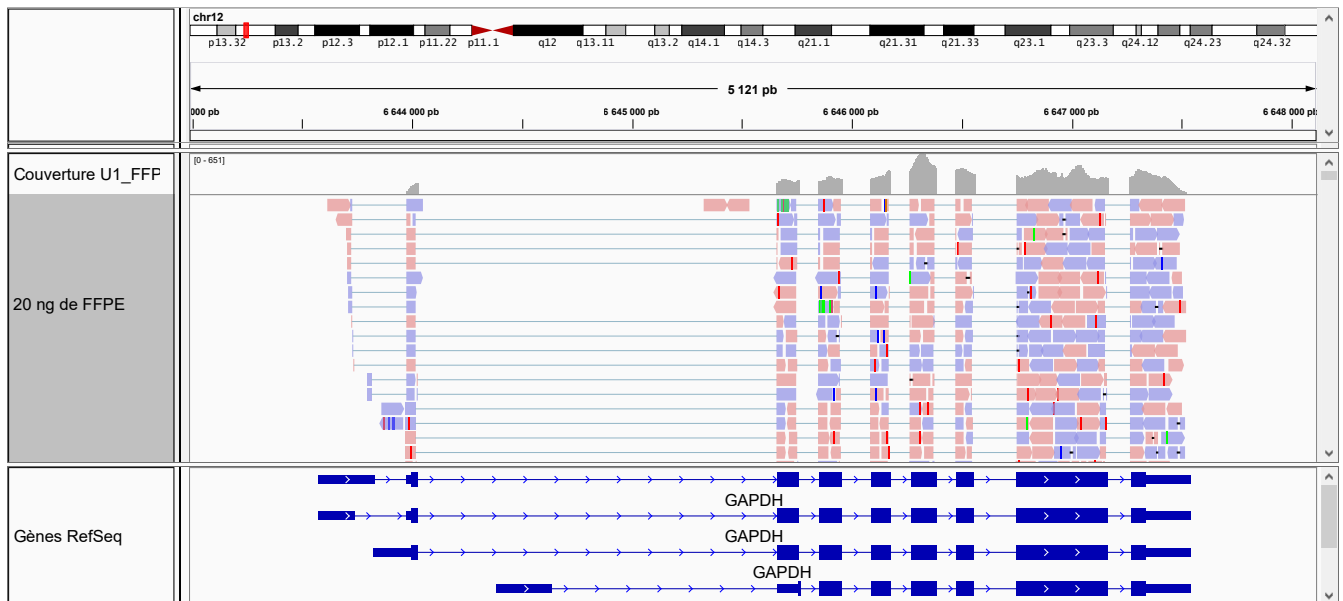


Figure 6 : Couverture des régions de codage par la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment – Une librairie préparée à partir d'un échantillon FFIP de basse qualité de 20 ng et enrichi à l'aide d'Illumina Exome Panel a été séquencée à 25 millions de lectures. La couverture du gène de régulation *GAPDH* à l'aide de IGV de Broad est présentée, montrant des lectures alignées sur les exons codants et présentant une bonne capture de cibles.

Concordance avec la trousse TruSeq RNA Exome

Une comparaison des données générées à partir des librairies de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment avec celles générées par les librairies 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 la recombinaison d'index.

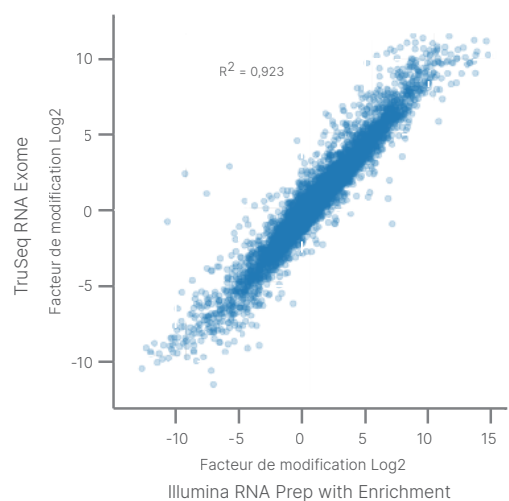


Figure 7 : Concordance de la trousse TruSeq RNA Exome – La trousse Illumina RNA Prep with Enrichment montre une concordance élevée avec la trousse TruSeq RNA Exome, telle que mesurée à l'aide de la modification de facteur log₂ pour l'ARN de RHU (Agilent, référence n° 740000) par rapport à l'ARN total dans le cerveau humain (Thermo-Fisher, référence n° AM7962). Toutes les librairies ont été préparées à partir de 10 ng d'entrée. Les librairies de la trousse TruSeq RNA Exome ont été enrichies en multiplexage à 4 niveaux; les librairies de la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment ont été enrichies en multiplexage à 3 niveaux. Toutes les données sont sous-échantillonnées à 25 millions d'amplifiats par librairie. 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 systèmes de séquençage à débit élevé ou modéré d'Illumina comme les systèmes NextSeq^{MC} 550 et NovaSeq 6000, les laboratoires peuvent séquencer beaucoup plus d'échantillons par analyse sans compromettre la qualité des données. Pour augmenter encore davantage le débit d'échantillons, la trousse Illumina RNA Prep with Enrichment prend en charge le multiplexage avec 384 index doubles uniques. En plus de prévenir la mauvaise attribution d'index, les index doubles uniques contribuent à réduire les coûts de séquençage en permettant le chargement de jusqu'à 384 échantillons sur une seule Flow Cell NovaSeq 6000 S4, ce qui augmente nettement le débit.

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 personnalisés et fixes de différentes tailles pour la conception d'études avancées dans divers domaines. Les exemples comprennent l'Illumina Exome Panel pour l'analyse des régions de codage du transcriptome ainsi que le Respiratory Virus Oligos Panel, plus ciblé, qui présente environ 7 800 sondes conçues pour détecter les virus respiratoires, les souches récentes du virus de la grippe ainsi que le SARS-CoV-2. Des ajustements en matière de validation 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 RNA-Seq 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 RNA-Seq dans les régions d'intérêt, notamment à l'aide d'Illumina Exome Panel et du Respiratory Virus Oligos Panel, permettant la réalisation d'études de détection et de découverte comme l'expression spécifique d'allèles, la détection des fusions, le criblage de biomarqueurs et plus.

En savoir plus

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02145 FRA v1.0

Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 échantillons) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 échantillons) ^b	20040537
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091661
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina Respiratory Virus Oligo Panel v2	20044311
Viral Surveillance Panel, RUO (96 réactions)	20088154
Pan-Coronavirus Panel, RUO (96 réactions)	20088155

a. La trousse comprend des réactifs pour 16 réactions d'enrichissement simples.
b. La trousse comprend des réactifs pour 32 réactions d'enrichissement à 3 niveaux.

Références

- 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.