

Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation

迅速で柔軟性に富んだソリューションで、コーディングトランスクリプトームを高感度かつ正確に解析

特長

- **インプット量の少ないサンプルから高品質のデータを**
25 ng というわずかな RNA で高感度を達成
- **迅速なライブラリー調製ワークフロー**
ライブラリー調製の所要時間は 7 時間未満、操作の所要時間は 3 時間未満、TruSeq™ Stranded mRNA よりも約 40% 迅速
- **低い総コストでハイスループットシーケンスが可能**
ユニークデュアルインデックスにより、1 回のランで最大 384 サンプルのマルチプレックスが可能

はじめに

次世代シーケンサー (NGS) を用いた RNA シーケンス (RNA-Seq) は、RNA 転写産物の発見、プロファイリング、定量を可能にする強力な手法です。RNA-Seq には次のような利点があります。

- メッセンジャー RNA (mRNA) -Seq では、遺伝子発現の定量、コーディングトランスクリプトーム中の既知および未知のアイソフォームの同定、そしてアレル特異的発現の測定を、高感度かつ高精度に行うことができます。
- トータル RNA-Seq では、バイアスのない仮説不要なアプローチにより、トランスクリプトームを網羅的に解析することができます。遺伝子や転写産物の存在量を正確に測定し、コーディング RNA やさまざまな形態のノンコーディング RNA の既知の配列だけでなく未知の配列も正確に検出することができます。
- ターゲット RNA-Seq では、特定の対象遺伝子群に絞って遺伝子発現を解析することができます。濃縮によるターゲット RNA-Seq では、トランスクリプトームのコーディング領域を配列特異的にキャプチャーすることにより、コスト効率の高い RNA エクソーム解析を行うことができます。低品質のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルに最適です。

TruSeq™ Stranded mRNA は、コーディングトランスクリプトームにおける遺伝子発現を解析し検出する各種アプリケーションに対応した強力なソリューションです。しかしながら、比較的多くのインプット量が必要で、合計アッセイ時間およびハンズオンタイムも長いいため、RNA-Seq アプリケーションで使用するには限界がありました。そこで、これらの課題を解消すべく、Illumina Stranded mRNA Prep を開発しました。Illumina Stranded mRNA Prep は、ライゲーションをベースとする効率化された迅速ライブラリー調製 (図 1) により、インプット量の少ないサンプル (表 1) や幅広い mRNA-Seq アプリケーションに対応する高機能のソリューションです。

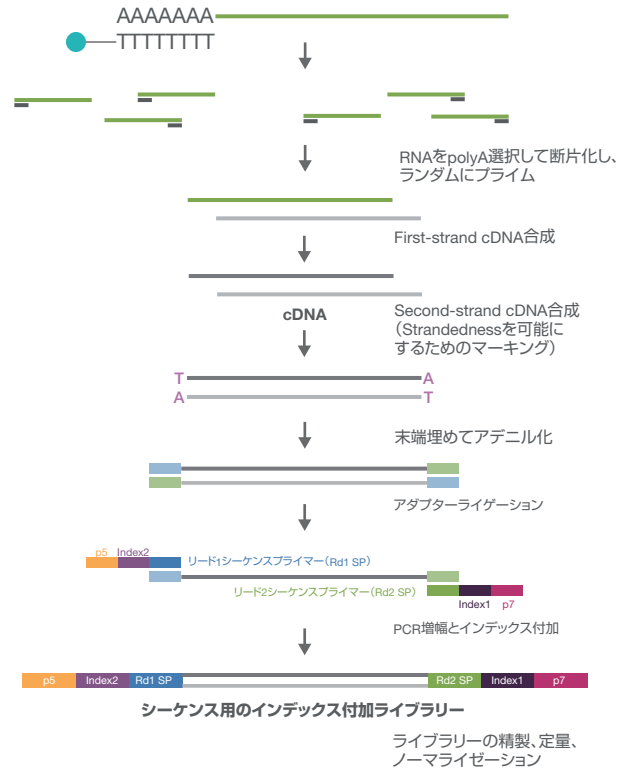


図 1: Illumina Stranded mRNA Prep polyA 選択と cDNA 合成が完了すると、ユニークデュアルインデックスアダプターのライゲーションと PCR 増幅により高品質のライブラリーが得られます。このライブラリーを定量しノーマライゼーションしたうえで、シーケンスを行います。

表 1: Illumina Stranded Total RNA Prep の仕様

特長	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
最大 UDI 数	96	384
RNA インプット量	100 ~ 1,000 ng	25 ~ 1,000 ng
合計アッセイ時間	10.5 時間	6.5 時間
ハンズオンタイム	7 時間未満	3 時間未満
キット構成	48 または 96 サンプル	16 または 96 サンプル

UDI = ユニークデュアルインデックス

高品質のデータ

遺伝子発現

Illumina Stranded mRNA Prep は、少ないインプット量でシーケンスライブラリーを調製し、遺伝子発現解析に必要な指標において高品質を示します (表 2、図 2)。このようなライブラリーと指標が一体となって、各種の遺伝子発現アプリケーションに対応する Illumina Stranded mRNA Prep の優れた性能を実現しています。mRNA-Seq には、NGS 以外の手法に比べ、以下のような数多くの利点があります。

- 仮説不要の実験デザインなので、研究対象のトランスクリプトームに関する予備知識が不要
- 既知および未知の転写産物をより高い検出力で検出
- より優れたハイスループットにより、1 回のアッセイで数百から数千の領域を定量
- より広範なダイナミックレンジで、遺伝子発現をより正確に測定
- 1 回のアッセイでより多くのデータを取得でき、配列とバリエーションの全情報が得られる

表 2: Illumina Stranded mRNA Prep の性能指標

	トータル RNA インプット量 100 ng		トータル RNA インプット量 25 ng	
	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
rRNA の割合 (28S/18S) (%)	5.1	1.8	5.3	1.5
Strandedness (%)	99.6	99.4	99.6	99.4
カバレッジの CV 中央値	0.49	0.46	0.50	0.47
Duplicate の割合 (%)	5.4	3.7	8.5	3.3
アライメントの割合 (%)	97.1	97.8	96.8	97.8

表中のデータは、30 Mリードで RNA Seq Alignment App v 2.0.1 を使用したときのものです。Duplicateは、4Mのパスフィルターペアエンドリードにサブサンプリングしたときのものです。

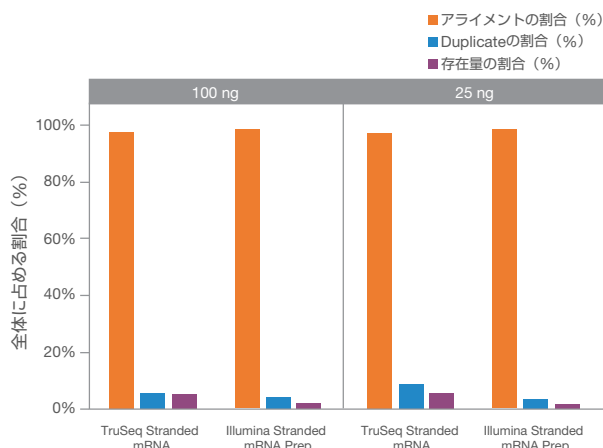


図 2: 性能指標の比較 Illumina Stranded mRNA Prep を TruSeq Stranded mRNA と比較しました。その結果、Illumina Stranded mRNA Prep は、特にインプット量 25 ng の UHR RNA で、より優れた性能を示しました。ライブラリーを 30M リードにサブサンプリングし、BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 で解析しました。Duplicateは、4Mのペアエンドリードパスフィルター (PF) にサブサンプリングしたときのものです。

遺伝子検出効率

Illumina Stranded mRNA Prep と TruSeq Stranded mRNA の遺伝子検出性能を比較するため、さまざまな Universal Human Reference (UHR) RNA 量にて 30M リードでシーケンスし、カバレッジが 1 × および 10 × であった遺伝子の数を調べました。その結果、Illumina Stranded mRNA Prep は、特に少ないインプット量で、より多くの遺伝子を検出することができました (図 3)。

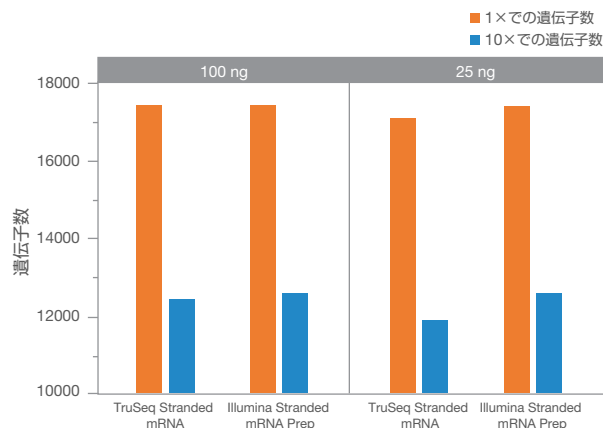


図 3: 少ないインプット量でより多くの遺伝子を検出 Illumina Stranded mRNA Prep は、少ない RNA インプット量で、TruSeq Stranded mRNA よりも多くの遺伝子を検出することができました。検出遺伝子数は、30M のペアエンドリード PF にサブサンプリングしたときのものです。Illumina Stranded mRNA Prep は、1 × のカバレッジでより多くの遺伝子を検出したことから、より高い感度を有すると言えます。

優れたデータ一致率

Illumina Stranded mRNA Prep では、テクニカルレプリケート間のデータ一致率 (図 4A) や、さまざまなインプット量の UHR RNA 間のデータ一致率 (図 4B) が高く、高品質のデータが得られます。これらの結果から、Illumina Stranded mRNA Prep は、出発物質が限られている貴重なサンプルにも対応する理想的なソリューションであると言えます。また、Illumina Stranded mRNA Prep は、TruSeq Stranded mRNA との間でも高いデータ一致率を示しました (図 5A: インプット量は両製品とも同じ。図 5B: インプット量は Illumina Stranded mRNA Prep のほうが少ない)。

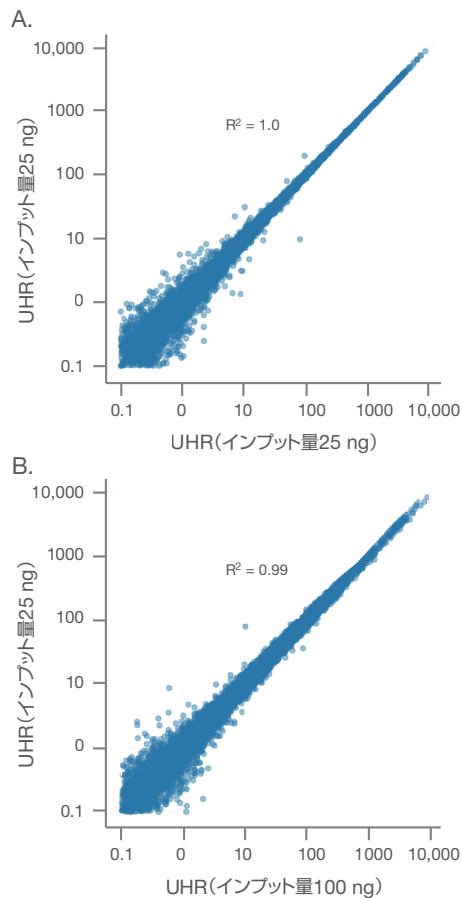


図 4: 高いデータ一致率 Illumina Stranded mRNA Prep は、25 ng の UHR RNA のテクニカルレプリケート間 (A) でも、また UHR RNA インプット量 25 ng と 100 ng との間 (B) でも、高いデータ一致率を示しました。ライブラリーを 74 bp × 2 でシーケンスし、30M リードにサブサンプリングしました。データ解析には BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 を使用しました。

効率化されたライブラリー調製ワークフロー

Illumina Stranded mRNA Prep は、迅速かつ柔軟性の高いワークフローで、ライゲーションをベースとする RNA ライブラリー調製を行います (図 1)。ワークフローに、インキュベーション時間を短縮する、サンプル精製ステップ数を減らすといった改良を加えたことで、合計アクセス時間が TruSeq Stranded mRNA よりも約 40% 短くなりました (図 6)。

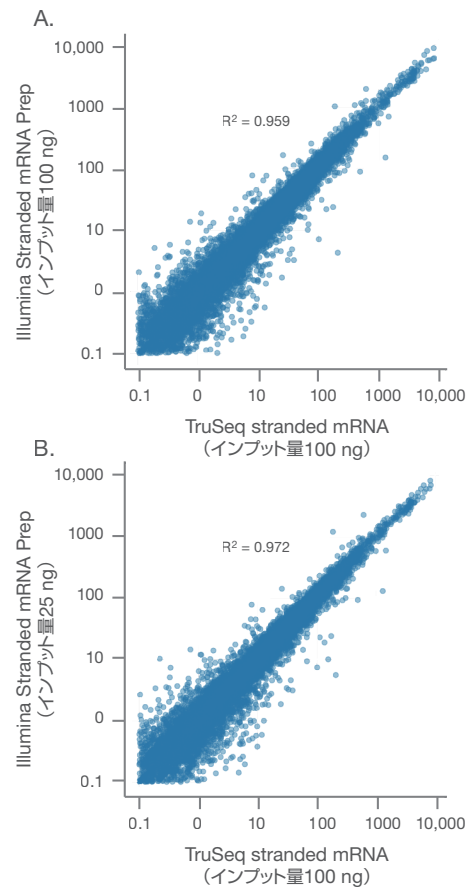


図 5: 従来製品との高い一致率 Illumina Stranded mRNA Prep では、TruSeq Stranded mRNA との一致率の高いデータが得られます (A: UHR RNA インプット量は両製品とも同じで 100 ng、B: UHR RNA インプット量は Illumina Stranded mRNA Prep のほうが 25 ng と少なく、TruSeq Stranded mRNA は 100 ng)。

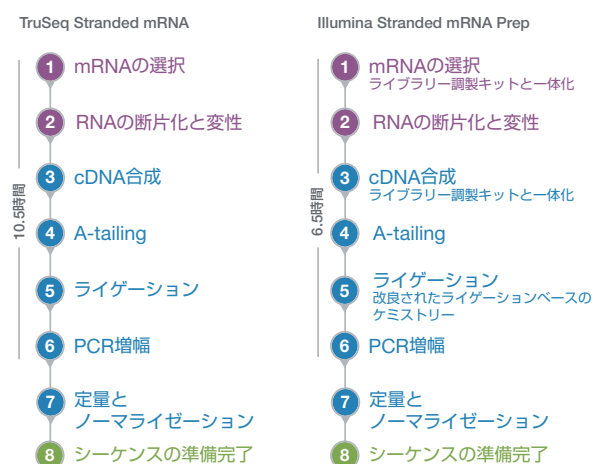


図 6: Illumina Stranded mRNA Prep のワークフロー Illumina Stranded mRNA Prep には迅速なワークフローが採用されているため、ハンズオンタイムが短縮されます。ハンズオンタイムは、使用する装置処理サンプル数、自動化手順、ユーザーの経験値によって異なります。

ユニークデュアルインデックスでスループットが向上

ILLUMINA Stranded mRNA Prep に、NextSeq™ 550 システムや NovaSeq™ 6000 システム などのハイスループットな装置を組み合わせれば、データ品質を維持したまま、1 回のランではるかに多くのサンプルをシーケンスすることができます。サンプルスループットをさらに上げるため、ILLUMINA Stranded Total RNA Prep は、384 のユニークデュアルインデックス (UDI) を用いたマルチプレックスにも対応しています。*UDI は、インデックスミスマッチ (すなわちインデックスホッピング) による影響を排除するだけでなく、1 枚の NovaSeq S4 フローセル上に最大 384 のサンプルをロードでき、スループットを大幅に上げられるため、シーケンスコストを抑えることができます。

まとめ

ILLUMINA Stranded mRNA Prep は効率化を実現したソリューションであり、コーディングトランスクリプトームを明確かつ網羅的に解析することができます。さまざまなサンプルタイプに柔軟に対応し、高品質 RNA に至っては 25 ng という少ないインプット量でのシーケンスが可能です。ILLUMINA Stranded mRNA Prep は、ストランドの向きを正確に測定することができます。また、均一なカバレッジを実現し、未知のアイソフォーム、遺伝子融合、アリル特異的発現といったさまざまな特徴を確実に検出することができます。

* 最大 192 の UDI が使用可能 (発売時点)。2020 年後半には追加の UDI が使用可能。

詳細はこちら

ILLUMINA Stranded mRNA Prep の詳細については、jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-mrna-prep.html をご覧ください。

ご注文案内

ライブラリー調製	カタログ番号
ILLUMINA Stranded mRNA Prep, Ligation (16 samples)	20040532
ILLUMINA Stranded mRNA Prep, Ligation (96 samples)	20040534
インデックス	カタログ番号
IDT for ILLUMINA RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20040553
IDT for ILLUMINA RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20040554
IDT for ILLUMINA RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20040555 近日発売予定
IDT for ILLUMINA RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20040556 近日発売予定

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

jp.illumina.com

 www.facebook.com/illumina

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件: jp.illumina.com/tc

© 2020 ILLUMINA, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、ILLUMINA, Inc または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. 470-2020-002-A-JPN QB10099 07SEP2020

illumina[®]