

Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero™ Plus

柔軟性に優れた解析で、トランスクリプトームの明確な全体像を捉える

特長

- Ribo-Zero™ Plus で rRNA を効率的に除去**
 単一チューブ反応で、ヒト、マウス、ラット、細菌から rRNA を除去し、またグロビン RNA を除去
- インプット量の少ない解析困難なサンプルから高品質のデータを**
 高品質 RNA であれば 1 ng ほどの少量で、分解 FFPE サンプルの場合は 10 ng の RNA で、高感度を達成
- RNA-Seq の迅速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、ハンズオンタイムは 3 時間で、TruSeq Stranded Total RNA よりも 40% 以上速く
- 総コストを抑えて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 回のランで数百サンプルのマルチプレックス

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。

- 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。
- 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。
- 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。

TruSeq™ Stranded Total RNA では、標準的なサンプルや低品質のサンプルでも確実に全トランスクリプトーム解析を行うことができます。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が長く、応用範囲も狭いため、トータル RNA-Seq アプリケーションでの使用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 Total RNA Prep を開発しました。Illumina Stranded Total RNA 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により、インプット量の少ないサンプルや幅広い RNA-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 (表 1)。さらに高品質のシーケンスを実現するため、ヒト、マウス、ラット、細菌などの複数の生物種からリボソーム RNA (rRNA) を 1 回の反応で効率的に除去する Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit も、Illumina Stranded Total RNA Prep に含めました (図 1)。

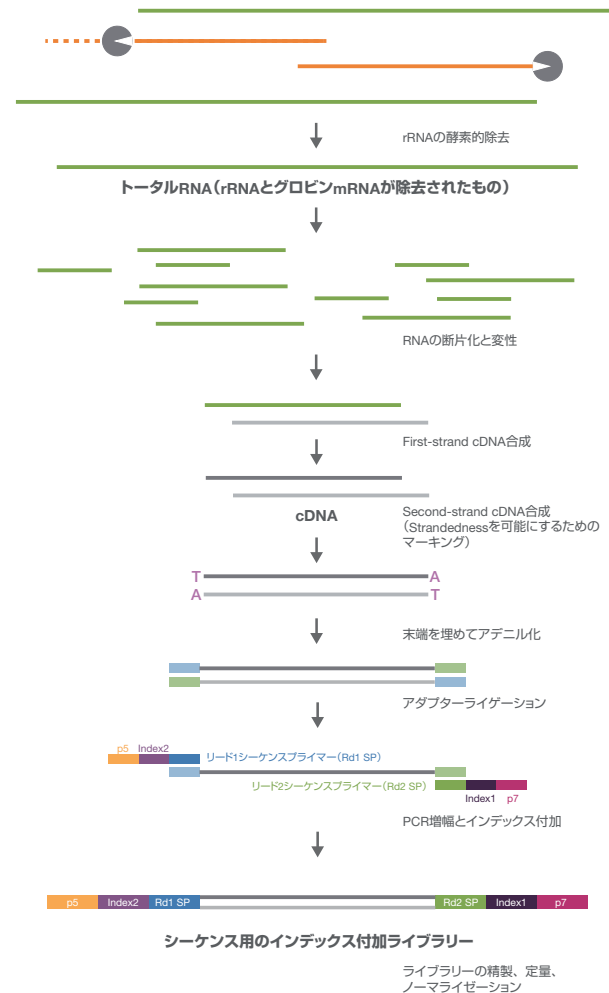


図 1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus rRNA と大量のグロビン mRNA (オレンジ色のライン) が除去され、cDNA 合成が完了すると、PCR 増幅により、アダプターが連結され、ユニークデュアルインデックスが付加されます。こうして得られた高品質のライブラリーを定量しノーマライズしたうえで、シーケンスを行います。

Ribo-Zero Plus で複数生物種の rRNA を効率的に除去

RNA-Seq の前に rRNA やグロビン RNA などの大量の RNA を除去しておくことで、トランスクリプトーム中の情報価値の高い部位を解析することに集中でき、シーケンスコストも抑えられます。Illumina Stranded Total RNA には、rRNA やグロビン RNA を除去して大量のトランスクリプトームデータを解析しやすくする Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit が含まれています。単一チューブで酵素的に rRNA を除去するこの手法は、少ないインプット量 (1 ng) に対応しており、原核生物種や真核生物種の rRNA を減らすことができます (表 2)。DNA プローブとの標的ハイブリダイゼーションとその後の RNase H を介する切断により、トータル RNA から大量の rRNA やグロビン RNA を除去します (図 2、表 3)。その後、rRNA を除去したサンプルのライブラリー調製を行います。

表 1: Illumina Stranded Total RNA Prep の仕様

特長	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
除去する大量 RNA	ヒト、マウス、ラットの rRNA または グロビン mRNA	ヒト、マウス、ラット、細菌の rRNA および グロビン mRNA
最大 UDI 数	96	384
RNA インプット量	100 ~ 1,000 ng	1 ~ 1,000 ng ^a
合計アッセイ時間	11.5 時間	7 時間
ハンズオンタイム	5.5 時間	3 時間未満
FFPE 対応	あり	あり
キット構成	48 または 96 サンプル	16 または 96 サンプル

a. 高品質 RNA (RIN 値が 7 超) の場合、1 ~ 1,000 ng、分解 RNA (RIN 値が 2 ~ 7) または FFPE RNA (DV₂₀₀ 値が 55 超) の場合、10 ~ 1,000 ng。最大限の性能を引き出すために、RNA インプット量を 10 ng とすることを推奨します。

略語: UDI = Unique Dual Indexes (ユニークデュアルインデックス)、RIN = RNA Integrity Number

Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus を使用したときの rRNA 除去およびライブラリー調製の性能を評価するため、さまざまなトータル RNA インプット量で、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero を使用した場合との比較検証を行いました。Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus を使用した場合は、特に少ないインプット量で、性能に優位性が認められました (図 3、表 4)。

高品質のデータ

カバレッジ均一性

Illumina Stranded Total RNA Prep では、高品質および分解 Universal Human Reference (UHR) インプット RNA (図 4A) や、少ないインプット量の FFPE RNA (図 4B) を用いて、転写産物を均一にカバーしたシーケンスライブラリーを調製することができます。

表 2: 除去される RNA 種

サンプル	除去される rRNA
ヒト細胞質 rRNA	28S、18S、5.8S、5S
ヒトミトコンドリア rRNA	12S、16S
ヒトβグロビン転写産物	HBA1、HBA2、HBB、HBG1、HBG2
マウス/ラット rRNA	16S、28S
グラム陰性菌 rRNA	大腸菌 5S、16S、23S
グラム陽性菌 rRNA	枯草菌 5S、16S、23S

表 3: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus によるヒト末梢白血球からのグロビン mRNA 除去

遺伝子	トータル RNA インプット量 100 ng			トータル RNA インプット量 10 ng		
	除去なし	除去あり	除去率 (%)	除去なし	除去あり	除去率 (%)
HBA1	7,489	2	99.97%	13,685	4	99.97%
HBA2	66,045	18	99.99%	110,406	16	99.97%
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%

表 4: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を使用した場合の性能指標^a

	トータル RNA インプット量 100 ng		トータル RNA インプット量 10 ng		トータル RNA インプット量 1 ng	
	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus
rRNA の割合 (28S/18S) (%)	2.0	3.8	7.2	4.4	32.8	4.5
Strandedness (%)	99	99	99	99	99	99
カバレッジの CV 中央値	0.44	0.46	0.48	0.47	0.52	0.51
Duplicate の割合 (%) ^b	7.5	4.5	12.8	5.3	40.9	19.2
アライメントの割合 (%)	96.9	96.9	94.2	97.5	76.6	97.5
存在量の割合 (%)	3.0	4.9	8	5.2	35.8	5.0

a. データ解析には BaseSpace™ RNA-Seq Alignment app v2.0.1 を使用。

b. Duplicate の割合は、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。

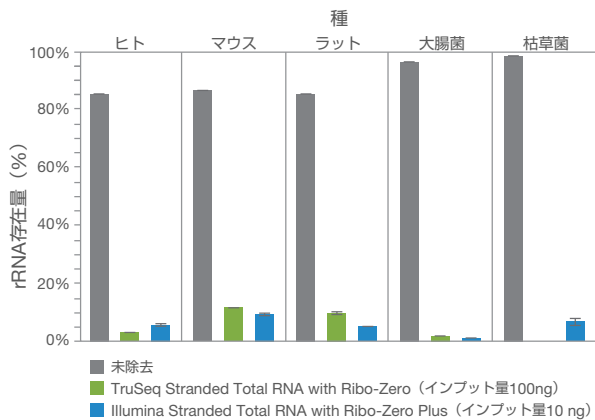


図 2: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を使用した複数生物種の rRNA 除去。Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を使用することで、ヒト、マウス、ラット、細菌の rRNA を単一チューブ反応で効率的に除去することができます。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold を使用した哺乳類での結果と、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Bacteria を使用した大腸菌での結果（枯草菌についてはデータの提示なし）を比較しました。

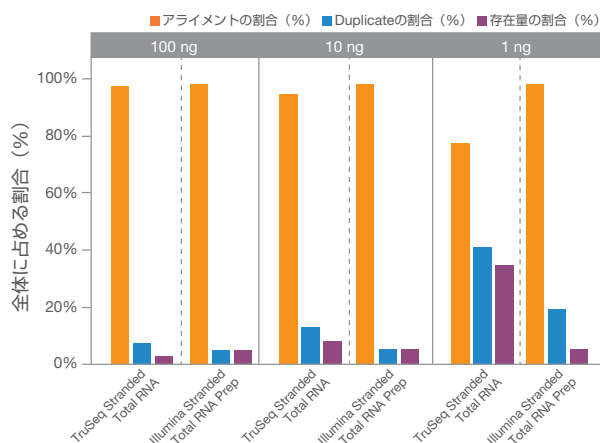


図 3: 性能指標の比較。Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を使用した場合と、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero を使用した場合とで比較しました。Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を使用した場合で、特にトータル UHR RNA 量 10 ng および 1 ng という少ないインプット量において、より高い効率性が認められました。ライブラリーを NextSeq 550 システムでシーケンスし、30M リードにサブサンプリングしました。4M リードにサブサンプリングし、BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0 で解析して、Duplicate の割合を算出しました。

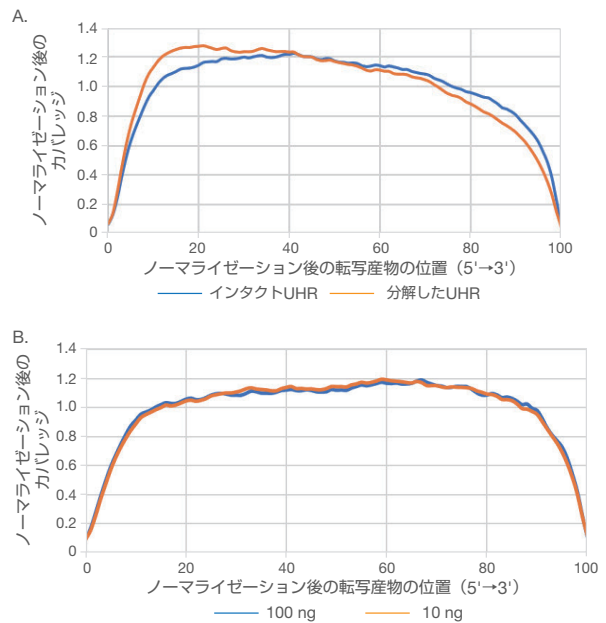


図 4: 高いカバレッジ均一性。Illumina Stranded Total RNA Prep は、(A) 高品質 UHR RNA や人工的に分解した UHR RNA (RIN 値=2) や、(B) インプット量 100 ng および 10 ng の FFPE RNA で、高いカバレッジ均一性を示します。FFPE サンプルの DV₂₀₀ クオリティスコアは 55% でした。ライブラリーはすべて、NovaSeq 6000 システムにて 50M リードでシーケンスしました。データ解析には BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 を使用しました。

遺伝子の検出効率

Illumina Stranded Total RNA Prep と TruSeq Stranded Total RNA の遺伝子検出性能を比較するため、さまざまな UHR RNA インプット量にて 30M ペアエンド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 Total RNA Prep は、1 ng という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 5)。

傑出したデータ一致率

Illumina Stranded Total RNA Prep では、さまざまなインプット量の UHR RNA 間のデータ一致率 (図 7A) や、FFPE サンプルから抽出した少ないインプット量の RNA のテクニカルレプリケート間のデータ一致率 (図 7B) 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 Total RNA Prep は、出発物質が限られている貴重なサンプルや分解した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 Total RNA Prep は、TruSeq Stranded Total RNA との間でも高いデータ一致率を示しました (図 8A: インプット量は両製品とも同じ。図 8B: インプット量は Illumina Stranded Total RNA Prep のほうが少ない。)

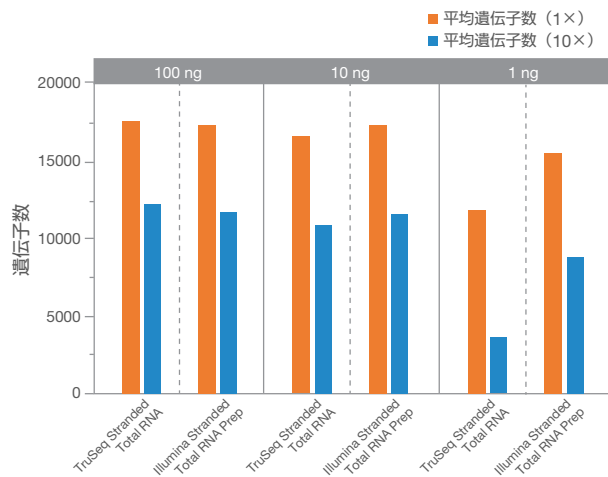


図5: 少ないインプット量でより多くの遺伝子を検出 サブサンプリング後のペアエンドリード PF 30M での検出遺伝子数を測定したところ、Illumina Stranded Total RNA Prep は、TruSeq Stranded Total RNA と比べて、少ない RNA インプット量でより多くの遺伝子を検出することができました。Illumina Stranded Total RNA Prep は、1×でより多くの遺伝子を検出したことから、より高い感度を有すると言えます。

効率化されたライブラリー調製ワークフロー

Illumina Stranded Total RNA 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、合計アッセイ時間が TruSeq Stranded Total RNA よりも 40% 以上短くなりました (図 6)。

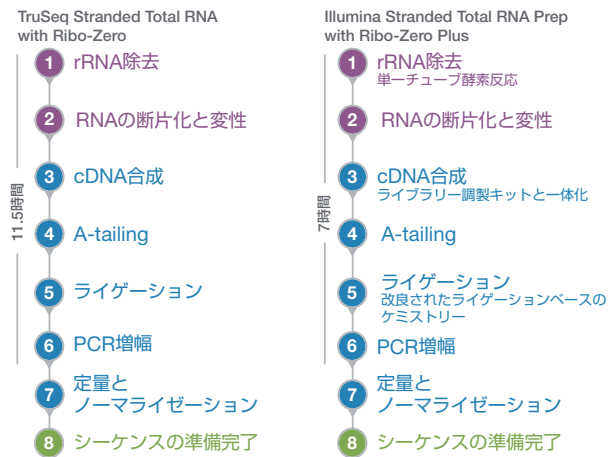


図6: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を使用する場合のワークフロー Illumina Stranded Total RNA Prep には迅速なワークフローが採用されているため、ハンズオンタイムが短縮されます。ハンズオンタイムは、使用する装置、処理サンプル数、自動化手順、ユーザーの経験値によって異なります。

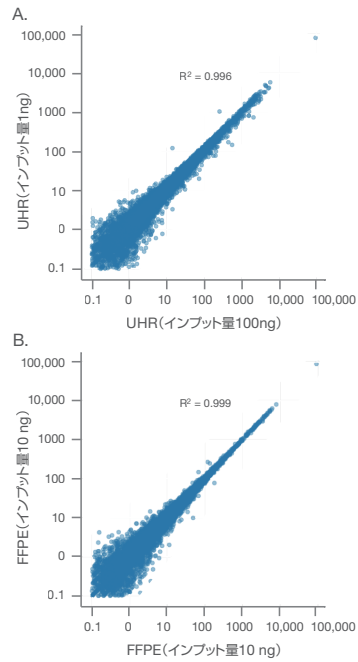


図7: 高いデータ一致率 Illumina Stranded Total RNA Prep は、UHR RNA インプット量 1 ng と 100 ng との間 (A) でも、また 10 ng の FFPE RNA のテクニカルレプリケート間 (B) でも、高いデータ一致率を示しました。ライブラリーを NovaSeq 6000 システムにて 74 bp × 2 でシーケンスしました。データ解析には BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 を使用しました。

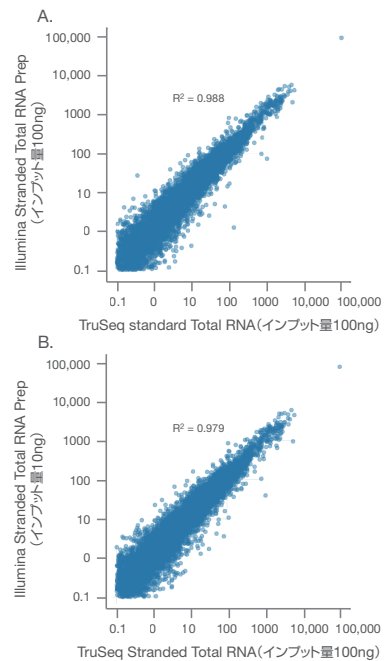


図8: 従来製品との高い一致率 Illumina Stranded Total RNA Prep では、TruSeq Stranded Total RNA との一致率の高いデータが得られます (A: インプット量は両製品とも同じ。B: インプット量は Illumina Stranded Total RNA Prep のほうが少ない。)

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 Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 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機器を組み合わせれば、データ品質を維持したまま、1回のランではるかにより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、インデックスミスアサインメント(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 Total RNA Prep は効率化を実現した RNA-Seq ソリューションであり、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やインプット量に柔軟に対応し、高品質 RNA に至っては 1 ng という少ないインプット量でのシーケンスが可能。ヒト、マウス、ラット、細菌などの複数生物種から妨害物質である rRNA を極めて効率的に除去できる Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit にも対応しています。ILLUMINA Stranded Total RNA 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、選択的転写産物、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高い信頼度で検出することができます。

詳細はこちら

ILLUMINA Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus の詳細については、jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html をご覧ください。

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

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/illuminakk

ご注文案内

ライブラリー調製	カタログ番号
ILLUMINA Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 samples)	20040525
ILLUMINA Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 samples)	20040529
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

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. 470-2020-003-A-JPN QB10100 04SEP2020

illumina®