

illumina Stranded mRNA Prep, Ligation

Sensitive und genaue Analyse des codierenden Transkriptoms mit einer schnellen und flexiblen Lösung.

Vorteile

- **Hochwertige Daten aus Proben von geringer Menge**
Hochgradig sensitive Ergebnisse mit nur 25 ng RNA
- **Schneller Bibliotheksvorbereitungs-Workflow**
Bibliotheken in < 7 Stunden mit < 3 Stunden manuellem Aufwand vorbereiten (ca. 40 % schneller als mit TruSeq™ Stranded mRNA)
- **Sequenzierung mit hohem Durchsatz zu niedrigen Gesamtkosten**
Multiplexierung von bis zu 384 Proben in einem einzigen Lauf mit eindeutigen doppelten Indizes

Einleitung

RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) mit NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ist eine leistungsstarke Methode für die Erkennung, das Profiling und die Quantifizierung von RNA-Transkripten. RNA-Seq bietet folgende Vorteile:

- Messenger-RNA(mRNA)-Seq quantifiziert mit hoher Sensitivität und Genauigkeit die Genexpression, ermittelt bekannte und neue Isoformen im codierenden Transkriptom und misst die allelspezifische Expression.
- Gesamt-RNA-Seq bietet einen unverzerrten, hypothesenfreien Ansatz für die umfassende Transkriptomanalyse. Gen- und Transkripthäufigkeit werden mit dem Verfahren genau bestimmt. Außerdem lassen sich sowohl bekannte als auch neue Merkmale in codierender sowie in zahlreichen Formen nicht codierender RNA ermitteln.
- Bei der zielgerichteten RNA-Seq wird die Expression einer spezifischen Gruppe von Genen analysiert. Die zielgerichtete RNA-Seq per Anreicherung ermöglicht eine kostengünstige RNA-Exomanalyse anhand der sequenzspezifischen Erfassung von codierenden Regionen des Transkriptoms. Das Verfahren ist bestens für FFPE-Proben (formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Proben) von minderer Qualität geeignet.

TruSeq™ Stranded mRNA bietet eine zuverlässige Lösung für die Analyse der Genexpression und Forschungsanwendungen in Bezug auf das codierende Transkriptom. Die relativ hohe erforderliche Zugabemenge, die lange Assay-Gesamtzeit und der hohe manuelle Aufwand haben bislang jedoch die Eignung für RNA-Seq-Anwendungen eingeschränkt. Mit der Entwicklung von illumina Stranded mRNA Prep hat illumina Abhilfe geschaffen. Diese fortschrittliche Lösung bietet eine optimierte und schnelle Bibliotheksvorbereitung auf Ligationsbasis (Abbildung 1), die sich für geringe Probenzugabemengen (Tabelle 1) und ein breites Spektrum an mRNA-Sequenzierungsanwendungen eignet.

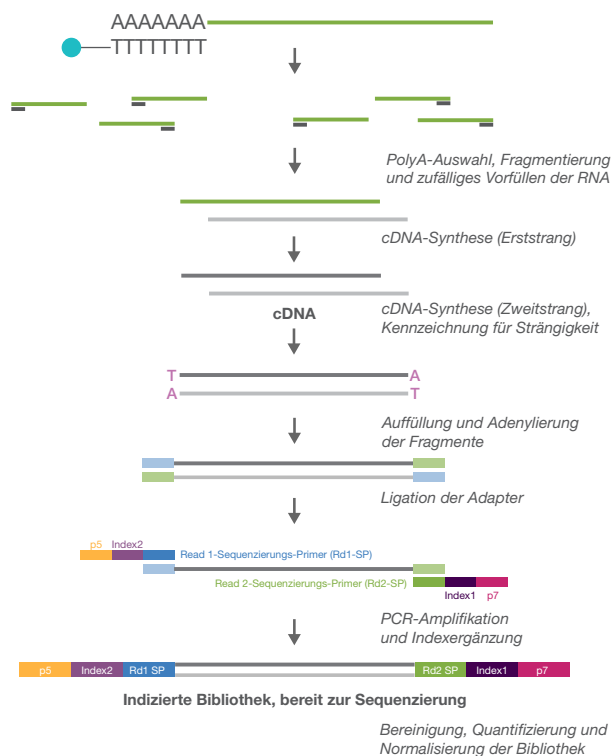


Abbildung 1: illumina Stranded mRNA Prep: Nach Abschluss von polyA-Auswahl und cDNA-Synthese liefern die Ligation eindeutiger doppelter Indexadapter und die PCR-Amplifikation hochwertige Bibliotheken, die vor der Sequenzierung quantifiziert und normalisiert werden.

Tabelle 1: illumina Stranded Total RNA Prep – Spezifikationen

Merkmals	TruSeq Stranded mRNA	illumina Stranded mRNA Prep
UDI (max.)	96	384
RNA-Zugabemenge	100–1.000 ng	25–1.000 ng
Assay-Zeit insgesamt	10,5 Stunden	6,5 Stunden
Manueller Aufwand	< 7 Stunden	< 3 Stunden
Kit-Konfigurationen	48 oder 96 Proben	16 oder 96 Proben

UDI = Unique Dual Index, eindeutiger doppelter Index

Qualitativ hochwertige Daten

Genexpression

Illumina Stranded mRNA Prep generiert aus geringen Zugabemengen Sequenzierungsbibliotheken, die hochwertige Metriken für die Analyse der Genexpression liefern (Tabelle 2, Abbildung 2). Gemeinsam unterstreichen diese Ergebnisse die herausragende Eignung von Illumina Stranded mRNA Prep für Genexpressionsanwendungen. mRNA-Seq bietet gegenüber Verfahren ohne NGS zahlreiche Vorteile, darunter:

- Hypothesenfreies Versuchsdesign ohne vorherige Kenntnis des Transkriptoms
- Höhere Erkennungsleistung in Bezug auf bekannte und neue Transkripte
- Höhere Durchsatzkapazität zur Quantifizierung Tausender Regionen in jedem Assay
- Breiterer Dynamikbereich zur genaueren Messung der Genexpression
- Mehr Daten pro Assay zur Bereitstellung vollständiger Sequenz- und Varianteninformationen

Tabelle 2: Leistungsmetriken für Illumina Stranded mRNA Prep

	100 ng RNA-Zugabe insgesamt		25 ng RNA-Zugabe insgesamt	
	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
% rRNA (28S/18S)	5,1	1,8	5,3	1,5
% Strängigkeit	99,6	99,4	99,6	99,4
Mittlerer CV der Coverage	0,49	0,46	0,50	0,47
% Dubletten	5,4	3,7	8,5	3,3
% Alignment	97,1	97,8	96,8	97,8

Ergebnisse aus der RNA Seq Alignment App v 2.0.1 bei 30 Mio. Reads. Die Dubletten wurden bei Teilproben mit 4 Mio. Paired-End-Reads nach Filterung bestimmt.

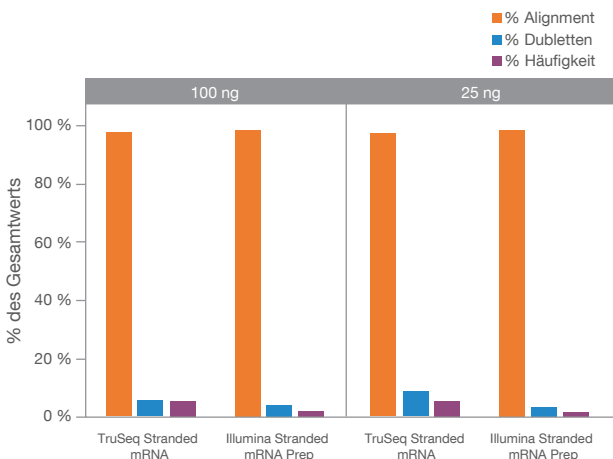


Abbildung 2: Vergleich von Leistungsmetriken: Illumina Stranded mRNA Prep wurde mit TruSeq Stranded mRNA verglichen. Illumina Stranded mRNA Prep zeigte eine überlegene Leistung, insbesondere bei einer Zugabe von 25 ng UHR-RNA. Die Bibliotheken wurden in Teilproben mit 30 Mio. Reads aufgeteilt und mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 analysiert. Die Dubletten wurden bei Teilproben mit 4 Mio. Paired-End-Reads nach Filterung (Passing Filter, PF) bestimmt.

Effizienz der Generkennung

Zum Vergleich der Leistung von Illumina Stranded mRNA Prep und TruSeq Stranded mRNA bei Generkennungsanwendungen wurden unterschiedliche Mengen UHR-RNA (Universal Human Reference, universelle humane Referenz) bei 30 Mio Reads sequenziert und die Anzahl der Gene mit 1-facher und 10-facher Coverage ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die höhere Generkennungsleistung von Illumina Stranded mRNA Prep, insbesondere bei geringen Zugabemengen (Abbildung 3).

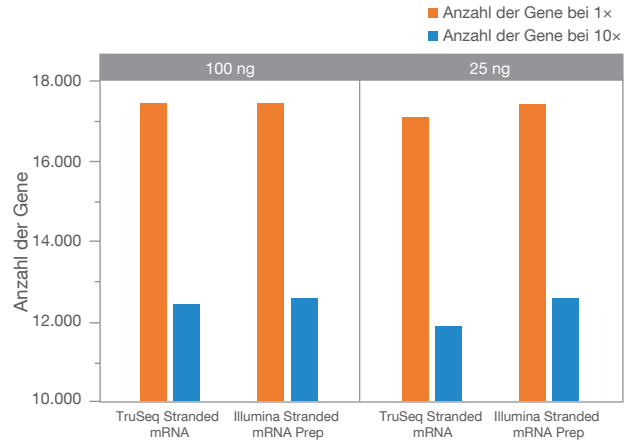


Abbildung 3: Höhere Generkennungsleistung bei geringer Zugabe: Illumina Stranded mRNA Prep ermöglicht bei geringen RNA-Zugabemengen im Vergleich zu TruSeq Stranded mRNA eine höhere Generkennungsleistung. Die Anzahl erkannter Gene wurde bei Teilproben mit 30 Mio. Paired-End-Reads nach Filterung gemessen. Die Erkennung von mehr Genen bei 1-facher Coverage wie bei Illumina Stranded mRNA Prep weist auf eine höhere Sensitivität hin.

Herausragende Übereinstimmung der Daten

Illumina Stranded mRNA Prep liefert hochwertige Daten mit hoher Übereinstimmung zwischen technischen Replikaten (Abbildung 4A) und unterschiedlichen UHR-RNA-Zugabemengen (Abbildung 4B). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass es sich bei Illumina Stranded mRNA Prep um eine ideale Lösung für wertvolle Proben mit begrenztem Ausgangsmaterial handelt. Zusätzlich zeigt Illumina Stranded mRNA Prep eine hohe Übereinstimmung mit TruSeq Stranded mRNA sowohl bei äquivalenter Zugabe (Abbildung 5A) als auch bei verringerter Zugabe (Abbildung 5B).

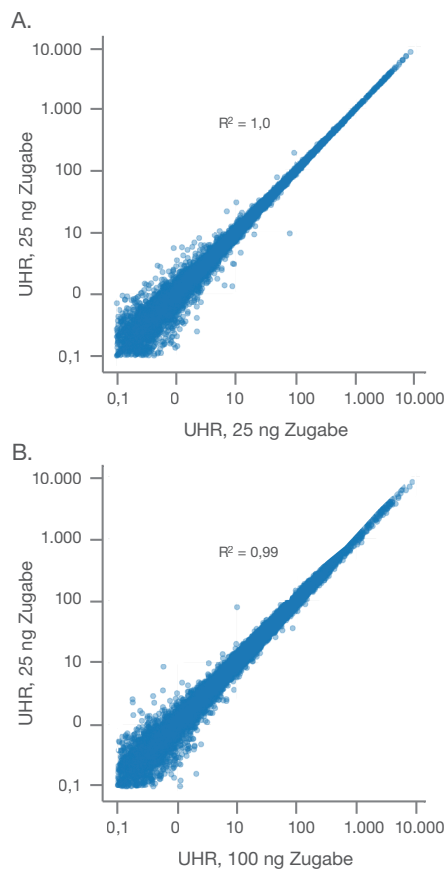


Abbildung 4: Hohe Datenübereinstimmung: Illumina Stranded mRNA Prep erreicht eine hohe Übereinstimmung zwischen (A) technischen Replikaten von 25 ng UHR-RNA und (B) zwischen Zugabemengen von 25 ng und 100 ng UHR-RNA. Die Bibliotheken wurden bei 2×74 bp (in Teilproben mit 30 Mio. Reads) sequenziert. Die Daten wurden mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 analysiert.

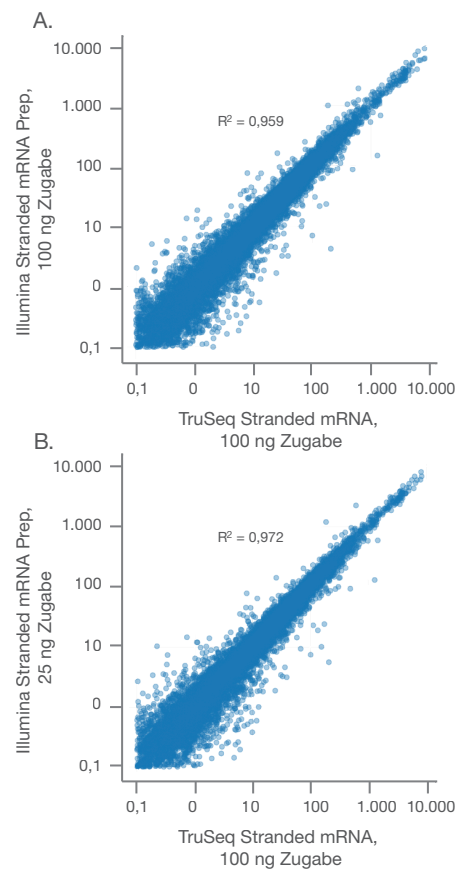


Abbildung 5: Hohe Übereinstimmung mit Legacy-Kit: Illumina Stranded mRNA Prep liefert Daten mit hoher Übereinstimmung im Vergleich zu Daten, die TruSeq Stranded mRNA bei (A) äquivalenten Zugabemengen von 100 ng UHR RNA und (B) bei verringerter Zugabe von 25 ng gegenüber 100 ng UHR-RNA bietet.

Optimierter Bibliotheksvorbereitungs-Workflow

Illumina Stranded mRNA Prep verwendet einen schnellen und flexiblen Workflow zur Vorbereitung von RNA-Bibliotheken auf Ligationsbasis (Abbildung 1). Neuerungen beim Workflow, einschließlich kürzerer Inkubationszeiten und der Verringerung der Probenbereinigungsschritte, sorgen für eine Assay-Gesamtzeit, die ca. 40 % unter der von TruSeq Stranded mRNA liegt (Abbildung 6).

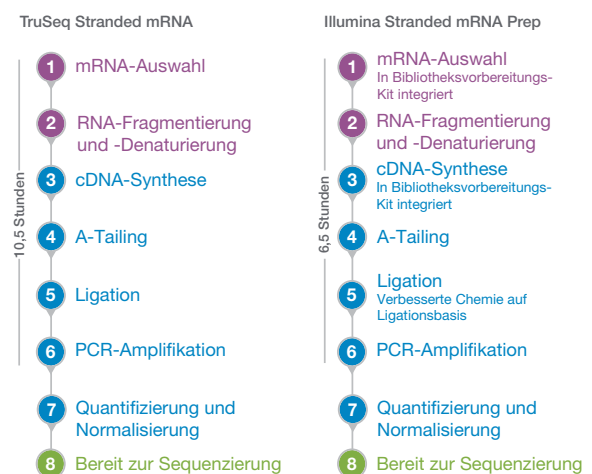


Abbildung 6: Illumina Stranded mRNA Prep-Workflow: Illumina Stranded mRNA Prep bietet einen schnellen Workflow mit geringerem manuellem Aufwand. Die Dauer kann abhängig von den verwendeten Gerätschaften, der Anzahl der verarbeiteten Proben sowie den Automatisierungsverfahren oder der Erfahrung des Benutzers variieren.

Höherer Durchsatz mit eindeutigen doppelten Indizes

Durch die Kombination von Illumina Stranded mRNA Prep mit Hochdurchsatzgeräten wie dem NextSeq™ 550- und dem NovaSeq™ 6000-System können Labors deutlich mehr Proben pro Lauf sequenzieren, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung der Datenqualität führt. Für eine zusätzliche Steigerung des Probendurchsatzes unterstützt Illumina Stranded Total RNA Prep das Multiplexing mit 384 eindeutigen doppelten Indizes (Unique Dual Indexes, UDIs).* UDI unterbindet nicht nur Index-Fehlanpassungen, d. h. Index-Hopping, sondern senkt auch die Sequenzierungskosten, da sich bis zu 384 Proben auf eine einzige NovaSeq S4-Fließzelle laden lassen, was einen deutlich höheren Durchsatz ermöglicht.

Zusammenfassung

Illumina Stranded mRNA Prep bietet eine optimierte Lösung für die klare und umfassende Analyse des codierenden Transkriptoms. Das Produkt zeichnet sich durch herausragende Flexibilität beim Zugabetyp aus und eignet sich auch für geringe Zugabemengen bis nur 25 ng. Illumina Stranded mRNA Prep ermöglicht eine genaue Messung der Strangausrichtung, eine einheitliche Coverage und eine äußerst zuverlässige Erkennung von Merkmalen wie neuen Isoformen, Genfusionen und der allelspezifischen Expression.

* Bei der Produkteinführung werden bis zu 192 UDIs unterstützt. Zusätzliche UDIs sind im weiteren Verlauf des Jahres 2020 erhältlich.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zu Illumina Stranded mRNA Prep finden Sie unter www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-mrna-prep.html.

Bestellinformationen

Bibliotheksvorbereitung	Katalog-Nr.
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Proben)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 Proben)	20040534
Indizes	Katalog-Nr.
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)	20040553
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)	20040554
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)	20040555 In Kürze erhältlich
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)	20040556 In Kürze erhältlich