

Illumina RNA Prep with Enrichment

RNA 濃縮アプリケーションに対応した迅速な一体化ワークフロー

特長

● 迅速かつシンプルな RNA 濃縮ワークフロー

9 時間という短時間でライブラリーを調製
ハンズオンタイムは 2 時間未満

● 解析困難なサンプルでも優れたデータ品質

新鮮／凍結サンプルのトータル RNA であれば 10 ng、
分解 FFPE サンプルのトータル RNA でも 20 ng ほどの
少量で高感度を達成

● 手頃なコストでフォーカスを絞った RNA シーケンス

これまでよりも少ないシーケンス量で高い
キャプチャー効率を発揮するため、最大限の検出力で
バイアスなしに正確に検出

● 柔軟で拡張性のあるスループット

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

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。

- ターゲット RNA-Seq では、特定の対象遺伝子群に絞って発現を解析することができます。濃縮を行うことにより、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し、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。
- 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、そしてアリ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。

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation は、ターゲット RNA-Seq の効率化を実現するソリューションです。幅広い RNA-Seq アプリケーションに対応するため、さまざまなサンプルタイプやインプット量に対する柔軟性があり、アリル特異的発現解析、遺伝子融合検出、バイオマーカースクリーニングなど、さまざまな検出や探索が可能です。Illumina RNA Prep with Enrichment に Illumina Exome Panel を組み合わせれば、わずかなシーケンス量で最大限の検出力が得られ、コーディングトランスクリプトームの全体像を捉えることができます。

迅速かつシンプルな RNA 濃縮ワークフロー

Illumina RNA Prep with Enrichment は、ビーズ上でのタグメンテーションを行った後、1 回のシンプルな 90 分間のハイブリダイゼーションステップに進む、迅速なワークフローを採用しています (図 1)。

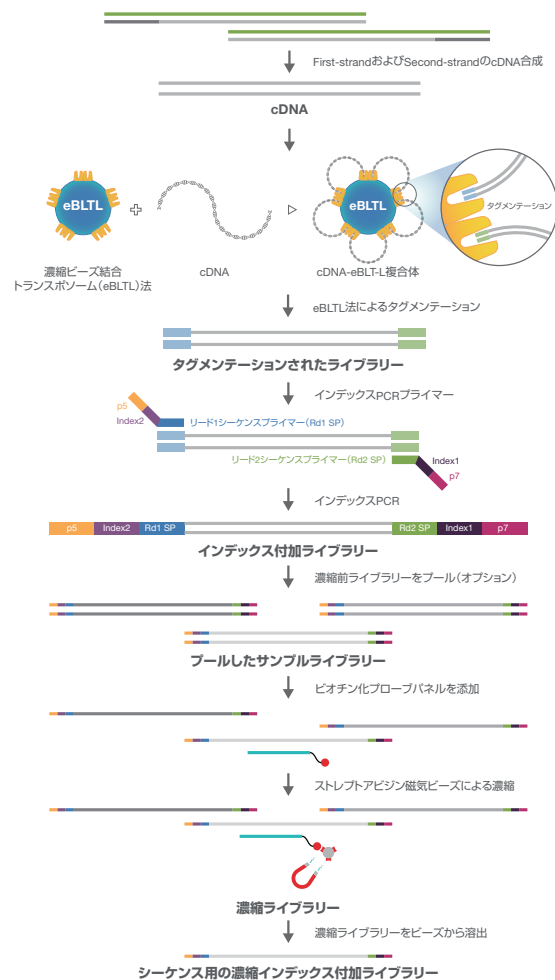


図 1 : Illumina RNA Prep with Enrichment のケミストリー cDNA 合成後、eBLTL 法による均一なタグメンテーション反応を経て、90 分間 1 回のハイブリダイゼーション反応が続くことで、迅速で柔軟なワークフローが実現します。

ビーズ上でのタグメンテーションの特徴は、濃縮ビーズ結合トランスポソーム (eBLTL) 法を RNA 用に最適化した eBLTL 法です。eBLTL 法による均一なタグメンテーション反応により、断片化ステップを別途踏む必要がなく、時間を短縮できます。ハイブリダイゼーション反応でのさまざまな技術革新との組み合わせで、Illumina RNA Prep with Enrichment のワークフローは、

TruSeq™ RNA Exome に比べてステップ数が少なく、インキュベート時間が短く、セーフティストップポイントが多数あり、合計アッセイ時間が 50% 以上短縮されました (図 2)。また Illumina RNA Prep with Enrichment は、手動調製のみならず、自動化ワークフローが可能になる各種のリキッドハンドリングプラットフォームにも対応しているため、サンプルハンドリングの再現性が高まり、人的ミスのリスクも軽減され、ハンズオンタイムも短縮されます。



図 2: Illumina RNA Prep with Enrichment の迅速なワークフロー ビーズ上でのタグメンテーションと 90 分間 1 回のハイブリダイゼーションステップの組み合わせにより、TruSeq RNA Exome に比べて迅速でステップ数の少ないワークフローが実現します。

高品質のデータ

インプット量の少ないサンプルや FFPE サンプルから高精度のデータを

高いキャプチャー効率とカバレッジ均一性により、最小限のシーケンス量で、バイアスを混入させずに発現レベルを正確に測定することができます。10 ng という少量のトータル RNA からスタートできる Illumina RNA Prep with Enrichment では、新鮮/凍結サンプルから抽出したさまざまなインプット量間でのデータ一致率が高く、高品質のデータが得られます (図 3)。貴重な腫瘍/正常検体や FFPE 保存組織サンプルからは遺伝子発現プロファイリングに必要な生物学的情報が豊富に得られますが、このような検体やサンプルは固定や保存の過程で核酸が分解されているため解析が困難となる場合があります。¹ Illumina RNA Prep with Enrichment では、FFPE サンプルから抽出したわずか 20ng のインプット量の RNA から高品質のデータが得られます。これらことから、Illumina RNA Prep with Enrichment 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。

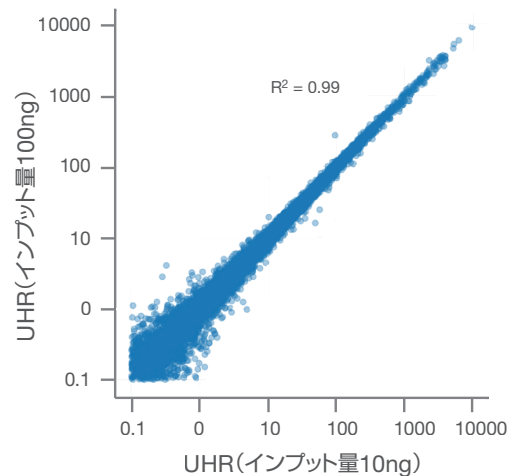


図 3: インプット量の少ないサンプルから高品質のデータを Illumina RNA Prep with Enrichment は、Universal Human Reference (UHR) から抽出したトータル RNA のインプット量、10 ng と 100 ng との間で、高いデータ一致率を示しました。UHR RNA ライブラリーを NovaSeq 6000 システムでシーケンスし、ライブラリーあたり 25M クラスターにサブサンプリングしました。データを BaseSpace RNA-Seq Alignment v 1.1.1 アプリケーションで解析しました。

少ないインプット量のサンプルや FFPE サンプルで遺伝子融合検出

Illumina RNA Prep with Enrichment の RNA 転写産物内の構造多型認識能を実証するため、新鮮/凍結サンプルおよび FFPE サンプルを Illumina Exome Panel で濃縮し、NovaSeq™ 6000 システムでシーケンスしました。その結果、K-562 細胞株 (RNA Integrity Number (RIN) = 7.4, DV₂₀₀ = 90%) および大腸がん細胞株 (RIN = 2.5, DV₂₀₀ = 85%) の全 6 個のレプリケートで BCR-ABL1 遺伝子融合 (図 4) および TPM3-NTRK1 遺伝子融合のコールレートがそれぞれ 100% となりました (表 1)。

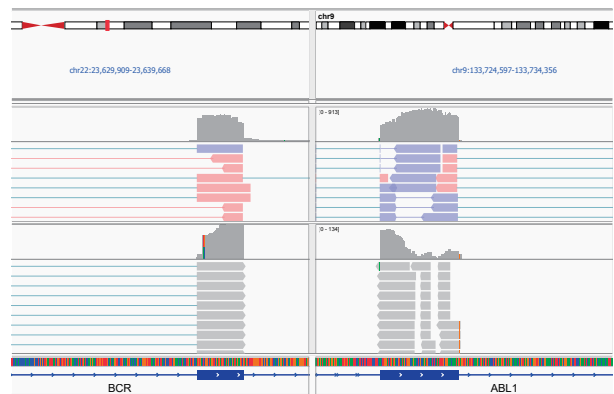


図 4: BCR-ABL1 遺伝子融合の検出 Illumina RNA Prep with Enrichment と Illumina Exome Panel を使用して K-562 細胞株 RNA 10 ng から調製したライブラリーで、BCR-ABL1 遺伝子融合を検出することができました (Broad Integrative Genomics Viewer (IGV) を使用)。上のアライメントトラックはすべてのリードを示し、下のアライメントトラックは BCR-ABL1 融合を裏付けるリードのみを示しています。

表 1: 遺伝子融合検出

融合 (ソース)	RIN	RNA インプット量	検出結果
BCR-ABL1 (K-562)	7.4	10 ng	6レプリケート中6 (100%)
TPM3-NTRK1 (大腸がん)	2.5	20 ng	6レプリケート中6 (100%)

手頃なコストでフォーカスを絞った RNA-Seq

優れたエクソンカバレッジ

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment に、コーディング RNA 配列を網羅的にカバーする高度に最適化されたプローブセット、ILLUMINA Exome Panel を組み合わせることもできます (表 2)。

表 2: ILLUMINA Exome Panel の仕様

カバレッジの仕様	ILLUMINA Exome Panel
ターゲット遺伝子数	21,415
ターゲットエクソン領域数	214,126
プローブ数	425,437
RefSeq エクソームカバー率	98.3%

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment のエクソームシーケンス能を調べるため、同製品を使用して Universal Human Reference (UHR) RNA と FFPE RNA からライブラリーを調製しました。これらのライブラリーを NovaSeq 6000 システムにて 100 bp × 2 (25 Mリード) でシーケンスしました。BaseSpace™ Sequence Hub の Enrichment アプリでデータを解析した結果、ILLUMINA RNA Prep with Enrichment は優れたエクソンカバレッジを示し (図 5)、カバーされた塩基の 85% 以上が RNA のコーディング配列領域および非翻訳領域 (UTR) にアライメントを示し、TruSeq RNA Exome と同等の性能を有することがわかりました (図 6)。

これらの結果から、ILLUMINA RNA Prep with Enrichment は、有益な情報を含む RNA コーディング領域にフォーカスを絞ってシーケンスしており、高いキャプチャー効率を示していることがわかります。このように、フォーカスを絞ってシーケンスを行う ILLUMINA RNA Prep with Enrichment は、これまでよりも少ないシーケンス量でより小さなデータセットを生成するため、時間とコストの削減につながります。

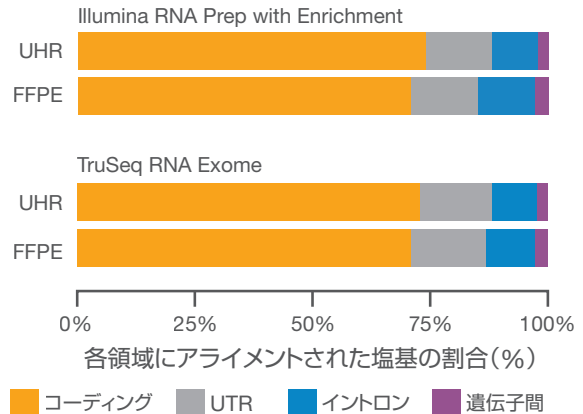


図 6: ILLUMINA RNA Prep with Enrichment を使用した場合のコーディング領域のカバレッジ ILLUMINA RNA Prep with Enrichment と ILLUMINA Exome Panel を使用して UHR RNA 10 ng および FFPE RNA 20 ng から調製したライブラリーでは、85% を超えるデータがコーディング領域および UTR にアライメントを示しました。比較対象として、TruSeq RNA Exome を使用したライブラリーのデータを提示しています。ライブラリーは NovaSeq 6000 システムにて 100 bp × 2 でシーケンスし、25 Mリードにサブサンプリングしました。

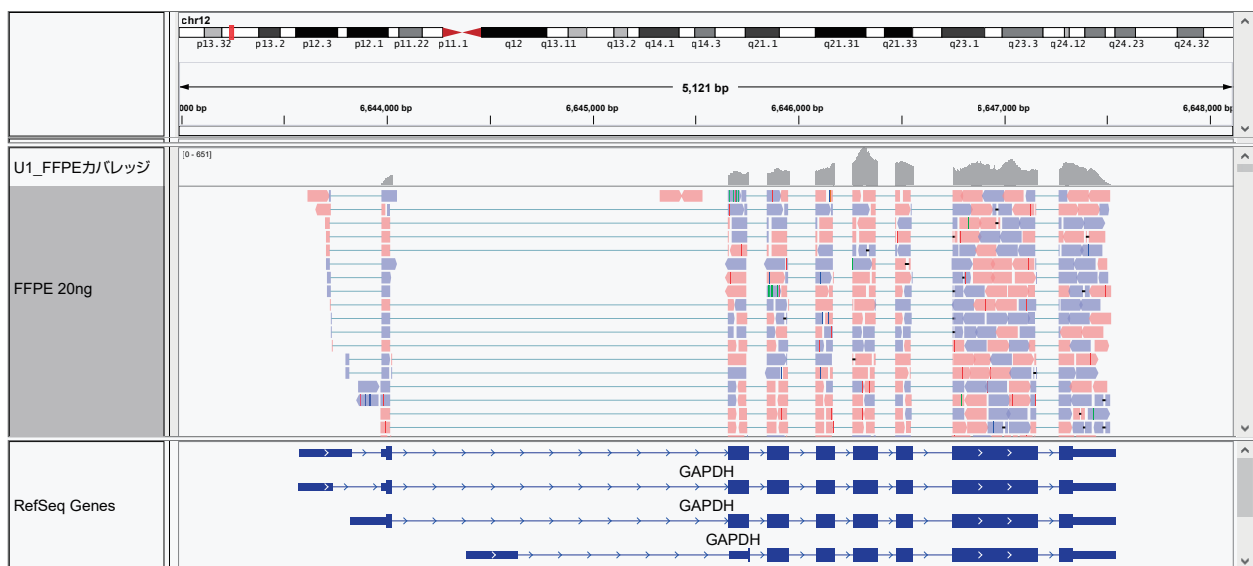


図 5: ILLUMINA RNA Prep with Enrichment を使用した場合のコーディング領域のカバレッジ 低品質の FFPE サンプル 20 ng から調製し、ILLUMINA Exome Panel で濃縮したライブラリーを、25Mリードでシーケンスしました。上の図は、Broad IGV で見た GAPDH 制御遺伝子のカバレッジです。コーディングエクソン全体にリードのアライメントが認められることから、優れたターゲットキャプチャー法であることがわかります。

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。

TruSeq RNA Exome との高い一致率

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment のライブラリーから得られたデータを、標準的な RNA 濃縮ツールである TruSeq RNA Exome のライブラリーから得られたデータと比較したところ、高い一致率が認められました (図 7)。注目すべき点として、データプロットが S 字状になっているのは、TruSeq RNA Exome で使用したアダプターによりインデックスホッピングが発生したためです。重要な点として、ILLUMINA RNA Prep with Enrichment には、インデックスの組み換えが起こらないユニークデュアルインデックス (UDI) が使用されています。

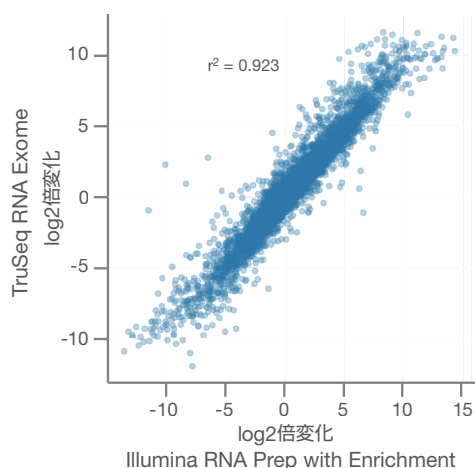


図 7: TruSeq RNA Exome との一致率 UHR RNA (アジレント社、カタログ番号 740000) と Human Brain Total RNA (サーモフィッシャー社、カタログ番号 AM7962) でそれぞれ log2 倍の変化を測定したところ、ILLUMINA RNA Prep with Enrichment のプロットは、TruSeq RNA Exome との高い一致率を示しました。ライブラリー調製はすべて、インプット量 10 ng で行いました。TruSeq RNA Exome のライブラリーは 4-plex で濃縮し、ILLUMINA RNA Prep with Enrichment のライブラリーは 3-plex で濃縮しました。データはすべて、ライブラリーあたり 25M クラスターにダウンサンプリングしました。データ解析には BaseSpace Cufflinks Assembly & DE App v 2.1.0 を使用しました。

柔軟で拡張性のあるスループット

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment 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 RNA Prep with Enrichment 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 はインデックスのミスアサインメント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。

* 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。

幅広い RNA アプリケーションに対応するモジュール設計

RNA ライブラリー調製と濃縮機能に、精度実証済みの独自の Sequence by Synthesis (SBS) 法² を組み合わせることで、ILLUMINA RNA Prep with Enrichment はさまざまな分野の高度な研究デザインに用いられる各種サイズの固定パネルおよびカスタムパネルに対応しています。例えば、トランスクリプトームコーディング領域の解析を行う ILLUMINA Exome Panel や、フォーカスを絞った ILLUMINA Respiratory Virus Oligos Panel (呼吸器系ウイルスや、新型インフルエンザウイルス株、また新型コロナウイルス (CoV) 株の SARS-CoV-2 を約 7,800 のプロンプで検出) などがあります。ILLUMINA RNA Prep with Enrichment をカスタムパネルと組み合わせる場合には、バリデーションやプロトコールの調整が必要となることがあります。

まとめ

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment は効率化を実現したソリューションであり、シンプルな迅速ワークフローによるターゲット RNA-Seq を可能にします。分解サンプルをはじめとするさまざまなインプットに対して優れた柔軟性を発揮し、少ないインプット量にも対応します。ILLUMINA Exome Panel や ILLUMINA Respiratory Virus Oligos Panel など、さまざまな領域の幅広い RNA-Seq アプリケーションに対応するモジュール設計で、アリル特異的発現解析、遺伝子融合検出、バイオマーカースクリーニングなど、さまざまな検出や探索が可能です。

詳細はこちら

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment の詳細については、jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html をご覧ください。また、こちらのサイトでは現在使用可能なパネルコンテンツオプションもご覧いただけます。

ご注文案内

ライブラリー調製	カタログ番号
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples) ^a	20040537
インデックス	カタログ番号
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^b	20027213
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^b	20027214
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20042666 近日発売予定
IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20042667 近日発売予定
濃縮パネル	カタログ番号
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina Respiratory Virus Oligos Panel v2	20044311

a. 16 サンプルキットには、1-plex、濃縮反応 16 回分の試薬、96 サンプルキットには、3-plex、濃縮反応 32 回分の試薬が入っています。

b. 「IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes」は「IDT for Illumina Nextera DNA UD Indexes」の新製品名です。キットの中身は同じです。

参考文献

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

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

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. 470-2020-001-A-JPN QB9931 02SEP2020

illumina®