

TruSeq™ RNA Exome

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプルや低品質サンプルから分離した RNA を解析するための再現性の高い低コストソリューション

特長

● 難しいサンプルでも高品質データ

FFPE 組織を含む RNA シーケンス用の分解サンプルを評価

● 卓越したカバレッジとフォーカスコンテンツ

トランスクリプトームのコーディング領域を標的にすることにより、低いシーケンス深度で検出力を最大化

● 少ないサンプルインプット量

わずか 10 ng のトータル RNA から質の高いデータを提供

● 統合された柔軟なワークフロー

包括的なワークフローにより RNA エクソームキャプチャーシーケンスを効率化し、シングルプレックスまたは最大 4 プレックスまでのマルチプレックスをサポート

難しいサンプルからの高品質データ

このような課題を克服し、FFPE サンプルおよびその他の低品質サンプルに含まれる貴重な情報を、より簡単に評価するために、イルミナは TruSeq RNA Exome（旧称は TruSeq RNA Access Library Prep Kit）を提供しています（図 1）。このワークフローにより、研究者は次世代シーケンサー（NGS）テクノロジーを用いて、低品質サンプルから分離された RNA に関する遺伝子発現研究を行うことができます。RNA のコード領域にフォーカスすることにより、TruSeq RNA Exome では RNA インプット量およびリード数が少量ですみます。ランごとのサンプル数が増えるため、よりコスト効率のよいトランスクリプトーム解析を行うことができます。

卓越したカバレッジ

TruSeq RNA Exome は、コード領域 RNA 配列を包括的にカバーする高度に最適化されたプローブセットを特長としています。TruSeq RNA Exome には 425,000 を超えるプローブが含まれています。それぞれ NCBI37/hg19 リファレンスゲノムを対象として構築され、RefSeq エクソームの 98.3% をカバーしています。プローブセットは 210,000 を超えるターゲットを捉えるようにデザインされており、遺伝子数は 21,415 に及びます（表 1）。

表 1：TruSeq RNA Exome のカバレッジ詳細

カバレッジの仕様	TruSeq RNA Exome
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 エクソームカバレッジ	98.3%

はじめに

無数の FFPE 保存組織サンプルは、疾患研究、特にがんにおいて非常に貴重な多くの情報を提供します。一般的に、これらのサンプルは表現型の長期的なデータに関連しており、さまざまな疾患状態で起こる遺伝子発現の変化に洞察をもたらすことができます。しかしながら、固定化のプロセスや FFPE サンプルの保存条件により、しばしば RNA の分解が生じるため、RNA シーケンシング（RNA-Seq）により信頼性と再現性のある遺伝子発現プロファイリング研究を行うことは困難です^{1, 2}。FFPE サンプルから使用可能な RNA を抽出することはできますが、現在の解析法では、ばらつきの大きい結果が得られるか、費用負担の大きいディープシーケンスが必要になります。その結果、トランスクリプトームの結果に極めて多様な見解が生じることとなり、データの信頼性が低下するとともに、より多くの予算が必要になります。

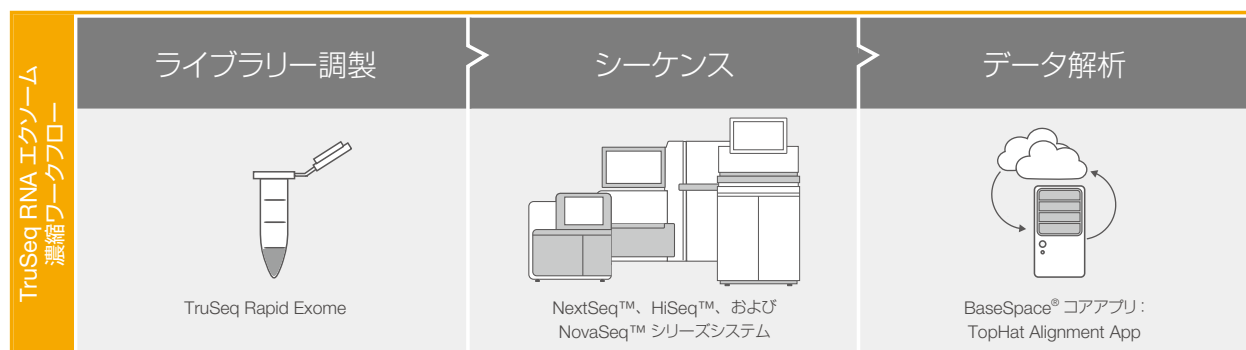


図 1：TruSeq RNA Exome ワークフロー TruSeq RNA Exome は、ライブラリー調製の簡素化、コーディングトランスクリプトームのキャプチャー、シーケンス、およびユーザーフレンドリーなデータ解析を実現した NGS 統合ソリューションの一部です。

フォーカスしたコンテンツ

TruSeq RNA Exome は高いキャプチャー性能を備えており、RNA コード領域の重要なコンテンツにシーケンスの成果をフォーカスすることができます。これを実証するために、TruSeq Stranded Total RNA および TruSeq RNA Exome を用いて FFPE 肺腫瘍サンプルおよび正常サンプルからライブラリーを調製しました。BaseSpace TopHat Alignment App を用いてシーケンスおよび解析を行うと、TruSeq RNA Exome ではカバーした塩基の 85% 超が RNA のコーディングシーケンスと非翻訳領域 (UTR) にアライメントされたのに対し、TruSeq Stranded Total RNA では 40% 未満でした (図 3)。TruSeq RNA Exome は、よりフォーカスしたコンテンツを用いた研究を行うことによって、規模の小さいデータセットが作成され、より迅速なデータ解析と簡単なデータ操作を実現します。

少ないサンプルインプット量

高いキャプチャー率とカバレッジ均一性により、最小限のシーケンス深度で、高精度かつバイアスのない発現レベルの検出が可能になります。わずか 10 ng のトータル RNA で、転写産物や融合遺伝子の正確な定量や、検出に必要なシーケンス深度を得ることができます。TruSeq RNA Exome は必要なインプット量が少ないため、初期量の少ない貴重なサンプルに最も適したソリューションです。

シンプルで拡張性のあるワークフロー

マルチプレックスで求められる柔軟性を発揮できるよう十分に最適化された TruSeq RNA Exome は、イルミナの統合された NGS ワークフローの一つである、シンプルで拡張性のあるソリューションを提供します。ワークフローには、ライブラリー調製、シーケンス、およびデータ解析が含まれます (図 1)。

効率的なライブラリー調製

精度が高く実績のある TruSeq ケミストリーを用いて、標準的な RNA-Seq ライブラリーを調製します。この手法では、各ライブラリーに固有のオリゴヌクレオチドを添加して、あとで 1 つのレーンにプールできるようタグ化します (図 2A)。複数サンプルをプールするこのステップにより、1 回のシーケンスランで多くのサンプルを解析できるようになり、ハイスループット研究が実現します。ライブラリーがプールされると、キャプチャーステップで、リボソーム RNA とイントロン領域または遺伝子間領域を排除したターゲットライブラリーが作成されます。プールされたライブラリーは、コード RNA 領域に特異的なビオチン標識プローブにハイブリダイズされます (図 2B)。その後、ビオチン化プローブに結合するストレプトアビジンビーズを添加して、プール内の特定のターゲットを捉えます (図 2C)。結合した RNA 断片を磁気により溶液からプルダウンします (図 2D)。捉えられた RNA 断片をビーズから溶出し、ハイブリダイゼーションにより 2 回目の濃縮反応を行います。増幅後、ターゲットライブラリーはクラスター形成、さらにはシーケンスに使用されます。試薬は、シングルプレックス解析から 4 プレックスのマルチプレックスまで、サンプルのプレックスに柔軟に対応できる十分な量が提供されます。マスターミックス試薬によりすぐにアッセイを始められ、自動化も簡単に行えます。

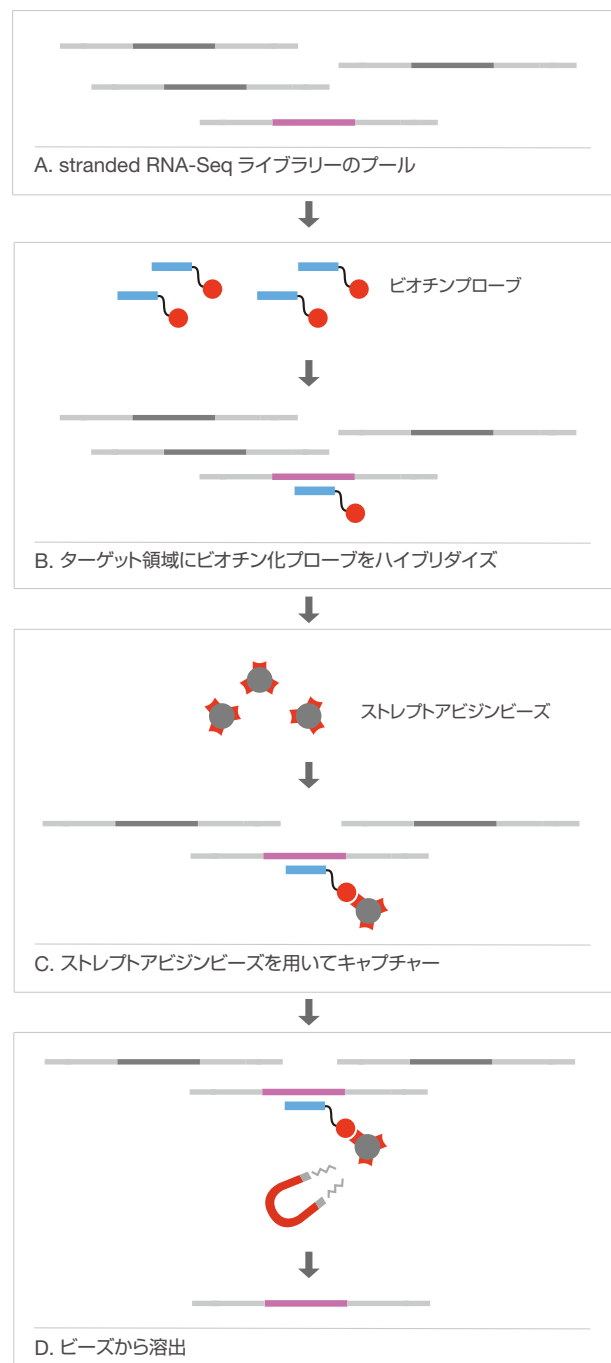
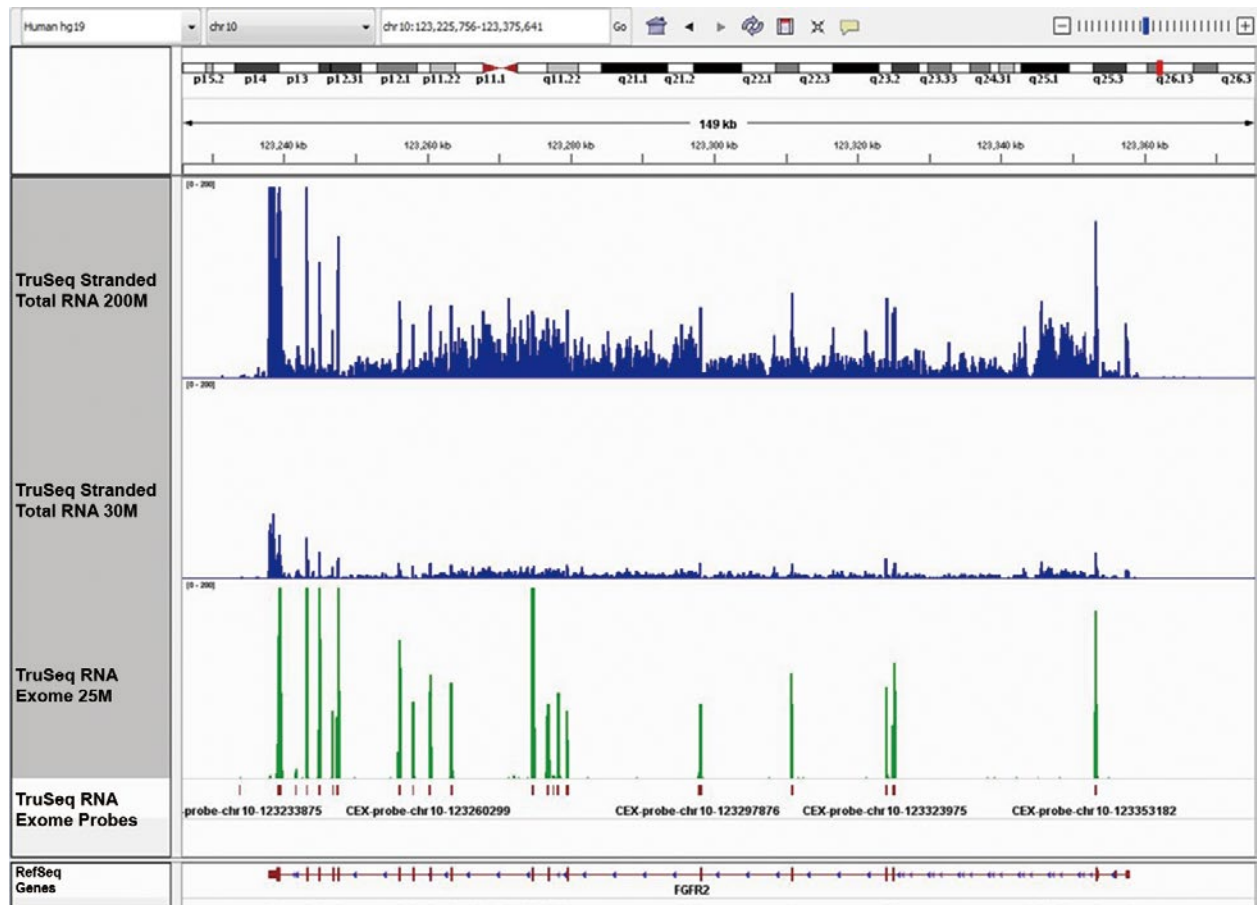


図 2: TruSeq RNA Exome キャプチャーケミストリー TruSeq RNA Exome は、シンプルかつ効率的なプロトコルで関心のあるターゲット領域をサンプルから抽出します。

A



B

各領域にアライメントされた塩基の割合

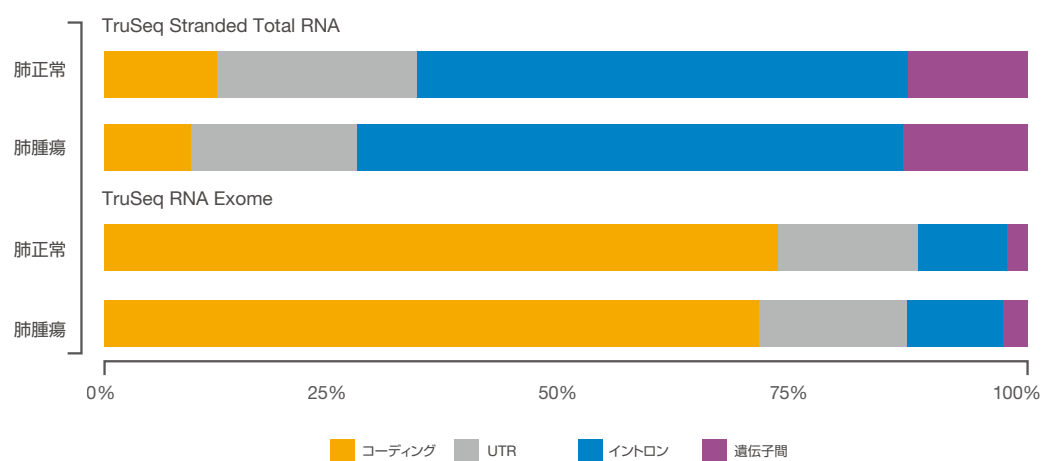


図3: TruSeq RNA Exome を用いた RNA コード領域のフォーカス TruSeq Stranded Total RNA および TruSeq RNA Exome を用いて FFPE 肺腫瘍サンプルおよび正常サンプルを調製。ライブラリーはそれぞれ 2 億リードと 2,500 万リードでシーケンスしました。(A) TruSeq RNA Exome を用いて調製したサンプルは、リード数が 1/8 であるにもかかわらず、エクソンのカバレッジが大きいことが示されました。TruSeq Stranded Total RNA データは、比較のために 3,000 万リードまでダウンサンプルしました。(B) BaseSpace TopHat Alignment App を使用すると、TruSeq RNA Exome を用いて得られたデータの 85% 超が転写産物（コード領域および UTR 領域）にアライメントされました。

コスト効率のよいシーケンス

RNA のコード領域にフォーカスし、また TruSeq RNA Exome と NextSeq、HiSeq、NovaSeq Series などのハイスループット装置とを組み合わせることで、データの品質を損なうことなく、1 回のランにつき 5 倍を超えるシーケンスを行うことができます (図 3、4)。

TruSeq RNA Exome は極めて正確な情報をもたらすため、高度に断片化された RNA のコード領域をアセンブルする際に、使用できるエクソンリードの割合が上昇します。また、リードに関心のある領域にフォーカスすることで、融合遺伝子の検出力を損なうことなく、リード量 (図 2) を効果的に拡大することができます (図 5)。

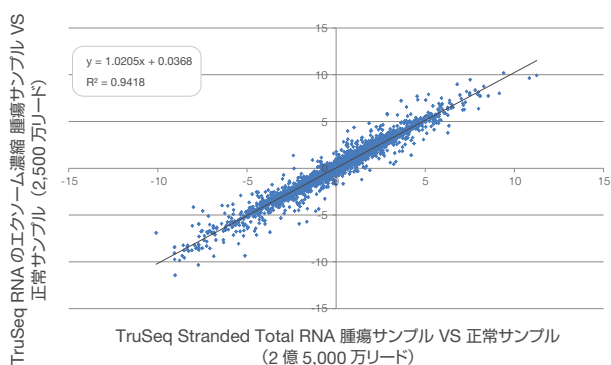


図 4: 少ないリードで高精度なデータ ライブラリーは TruSeq RNA Exome (2,500 万リード) および TruSeq Stranded Total RNA (2 億 5,000 万リード) を用いて肺腫瘍サンプルおよび正常 FFPE サンプルから調製しました。差次的発現解析の結果から、全体のダイナミックレンジは、 \log^2 fold-change 数と高く相関することが明らかとなりました ($R^2 = 0.9418$)。

表 2: TruSeq RNA Exome によるリード量の拡大

システム名	新鮮 / 凍結または FFPE RNA-Seq ^a
MiSeq™ System v3 Chemistry	ランあたり 1 サンプル
NextSeq 500 System Mid-Output Flow Cell	ランあたり 5 サンプル
NextSeq 500 System High-Output Flow Cell	ランあたり 16 サンプル
HiSeq 2500 System Rapid-Run Mode	ランあたり 24 サンプル
HiSeq 2500 System High-Output Mode	ランあたり 160 サンプル
NovaSeq 6000 System S2 Flow Cell	ランあたり 132 サンプル

a. 各サンプルにつき 2,500 万リードでシーケンス (2 × 75 bp)。

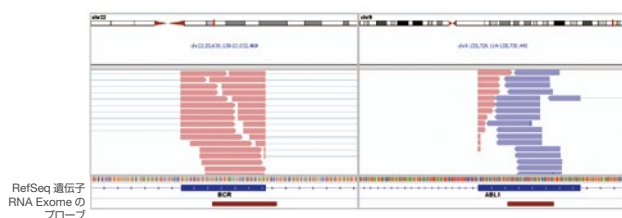


図 5: 効率的な融合遺伝子の検出 TruSeq RNA Exome により、融合ジャンクション専用プローブをデザインしなくても、発現融合転写産物を検出できるようになりました。特徴的な BCR-ABL 融合体は、2,500 万リード解析した Universal Human Reference RNA (UHR) サンプルで効率的に検出されています。

便利で簡単なデータ解析

TruSeq RNA Exome のデータセットは、BaseSpace Sequence Hub の RNA-Seq ソフトウェアアプリを用いて解析することができます。インフォマティクス初心者でも 1 クリックでスタートできるようデザインされた直感的なユーザーインターフェースを備えたこのアプリでは、専門家も汎用するデータ解析ツールが提供されています。TopHat 2 により、信頼性の高いアライメントで発現量を測定できるほか、スプライスジャンクション、融合遺伝子や SNP の検出も行えます。CuffDiff では、精度の高い転写産物の検出や差別的遺伝子発現解析が可能となりました。

イルミナの Isaac™ パイプラインが信頼性の高い変異コールを提供するのに対して、TopHat Fusion は、堅牢で信頼性の高い融合遺伝子検出を実現します³。出力ファイルは、幅広い 2 次解析ソリューションで使用することができます。RNA-Seq アプリでは、複数のサンプルレポートを簡単にまとめられ、携帯端末に作業の完了を通知できるほか、ファイルを効率的に変性して協業や共有を図ることも可能です。

まとめ

FFPE サンプルは、これまでアクセスが難しかった多くの情報を提供します。統合されたイルミナシーケンシングソリューションの一つとして、TruSeq RNA Exome は、FFPE サンプルやその他の低品質サンプルから得た RNA のシーケンスに、再現性の高い経済的な手法をもたらします。

詳細はこちらから

RNA エクソームキャプチャーシーケンスの詳細については、こちらをご覧ください。jp.illumina.com/techniques/sequencing/ma-sequencing/rna-exome-capture-sequencing.html

製品情報

製品名	カタログ番号
TruSeq RNA Library Prep for Enrichment (48 Samples)	20020189
TruSeq RNA Enrichment (up to 48 Samples at 4-plex, 12 Enrichments)	20020490
TruSeq RNA Single Indexes Set A (12 Indexes, 48 Samples)	20020492
TruSeq RNA Single Indexes Set B (12 Indexes, 48 Samples)	20020493
Exome Panel (45 Mb)	20020183

参考文献

- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlimpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1261.
- Penland SK, Keku TO, Torrice C, et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Lab Invest*. 2007;79(4):383-391.
- Raczy C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041-2043.

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

© 2018 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. 470-2013-004-B-JPN 13JUL2018

illumina[®]