

Illumina Stranded mRNA Prep, ligadura

Análisis sensible y preciso del transcriptoma codificante con una solución rápida y flexible.

Puntos destacados

- Datos de alta calidad a partir de muestras de escaso aporte**
 Obtenga resultados muy sensibles con tan solo 25 ng de ARN
- Flujo de trabajo rápido de preparación de bibliotecas**
 Prepare bibliotecas en menos de 7 horas con menos de 3 horas de tiempo de participación activa, aproximadamente un 40 % más rápido que TruSeq™ Stranded mRNA (ARNm monocatenario TruSeq)
- Secuenciación de alto rendimiento con un bajo coste total**
 Multiplexe hasta 384 muestras en un solo experimento con índices dobles únicos

Introducción

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) con secuenciación de próxima generación (NGS) es un potente método para localizar, definir y cuantificar los ARN transcritos. Entre las ventajas de la secuenciación de ARN, se incluyen:

- La secuenciación de ARN mensajero (ARNm) cuantifica la expresión genética de forma sensible y precisa, identifica las isoformas nuevas y conocidas del transcriptoma codificante y mide la expresión específica del alelo.
- La secuenciación completa del ARN ofrece un enfoque sin sesgo y sin hipótesis para el análisis completo del transcriptoma. Asimismo, mide de forma precisa la abundancia genética y de transcripciones, y detecta las características nuevas y conocidas de la codificación y las diversas formas de ARN no codificante.
- La secuenciación selectiva de ARN analiza la expresión genética en una serie orientada de genes de interés. La secuenciación selectiva de ARN mediante enriquecimiento permite un análisis de exomas rentable a través de la captura de secuencias específicas de las regiones de codificación del transcriptoma. Resulta ideal para muestras de baja calidad, fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE).

TruSeq™ Stranded mRNA ofrece una sólida solución de análisis de expresión genética y aplicaciones de detección en el transcriptoma codificante. Sin embargo, el relativamente alto aporte necesario y la prolongación de la duración total del ensayo y del tiempo de participación activa ha limitado su utilidad en las aplicaciones de secuenciación de ARN. Para superar estos desafíos, Illumina ha desarrollado Illumina Stranded mRNA Prep. Esta avanzada solución ofrece una preparación de bibliotecas rápida, optimizada y mediante ligaduras (figura 1) que admite aportes de muestras reducidos (tabla 1) y una amplia gama de aplicaciones de secuenciación de ARNm.

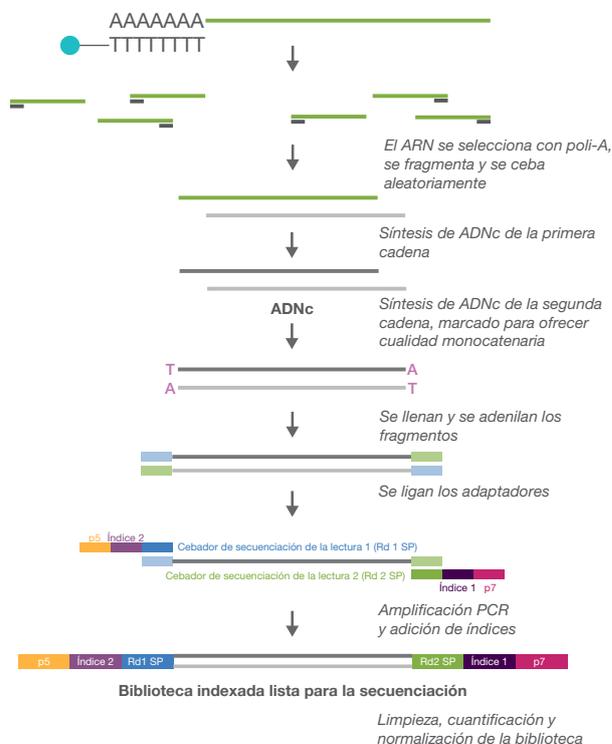


Figura 1: Illumina Stranded mRNA Prep. Una vez finalizadas la selección de poli-A y la síntesis de ADNc, la ligadura de los exclusivos adaptadores de índices dobles y la amplificación PCR produce bibliotecas de gran calidad que se cuantifican y normalizan antes de la secuenciación.

Tabla 1: Especificaciones de Illumina Stranded Total RNA Prep

Característica	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
UDI máximo	96	384
Cantidad de entrada de ARN	100-1000 ng	25-1000 ng
Duración total del ensayo	10,5 horas	6,5 horas
Tiempo de participación activa	Menos de 7 horas	Menos de 3 horas
Configuración del kit	48 o 96 muestras	16 o 96 muestras

UDI = índice doble único

Datos de alta calidad

Expresión genética

Illumina Stranded mRNA Prep produce bibliotecas de secuenciación a partir de aportes reducidos, que ofrecen criterios de medición de alta calidad para el análisis de la expresión genética (tabla 2, figura 2). En combinación, estos resultados indican el excepcional rendimiento de Illumina Stranded mRNA Prep para las aplicaciones de expresión genética. La secuenciación de ARNm ofrece numerosas ventajas sobre los métodos ajenos a NGS (secuenciación de nueva generación), como:

- Diseño de experimentos sin hipótesis, sin que sean necesarios conocimientos previos del transcriptoma
- Mayor potencial de detección para detectar transcripciones, tanto conocidas como nuevas
- Capacidad de mayor rendimiento para cuantificar cientos de miles de regiones en cada ensayo
- Rango dinámico más amplio, lo que ofrece una medición más precisa de la expresión genética
- Más datos por ensayo, lo que ofrece información completa sobre las secuencias y las variantes

Tabla 2: Criterios de medición de rendimiento de Illumina Stranded mRNA Prep

	Entrada de ARN total de 100 ng		Entrada de ARN total de 25 ng	
	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
Porcentaje de ARNr (28S/18S)	5,1	1,8	5,3	1,5
Porcentaje monocatenario	99,6	99,4	99,6	99,4
Coefficiente de variación medio de cobertura	0,49	0,46	0,50	0,47
Porcentaje de duplicados	5,4	3,7	8,5	3,3
Porcentaje de alineación	97,1	97,8	96,8	97,8

Resultados procedentes de RNA Seq Alignment App v 2.0.1 a 30 millones de lecturas. Los duplicados se notifican a 4 millones de lecturas "paired-end" de las que se hayan obtenido submuestras y que hayan superado el filtro.

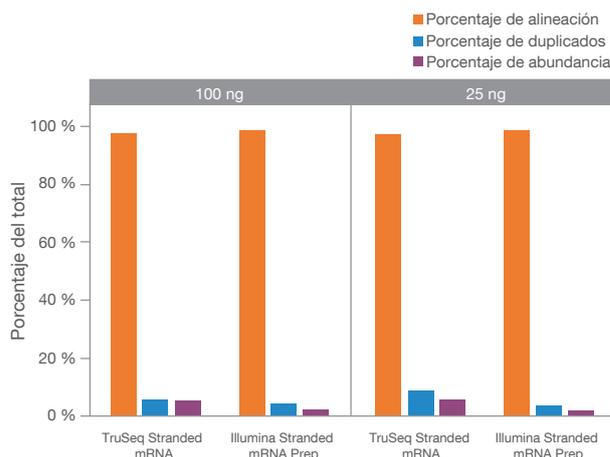


Figura 2: Comparación de criterios de medición de rendimiento: se ha comparado Illumina Stranded mRNA Prep con TruSeq Stranded mRNA. Illumina Stranded mRNA Prep mostró un rendimiento superior, en particular con un aporte de ARN de referencia humana universal de 25 ng. Se obtuvieron submuestras de las bibliotecas a 30 millones de lecturas y se analizaron con la BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1. Los duplicados se notifican a 4 millones de lecturas "paired-end" de las que se hayan obtenido submuestras y que hayan superado el filtro (PF).

Eficacia de la detección genética

Para comparar el rendimiento de Illumina Stranded mRNA Prep con TruSeq Stranded mRNA para las aplicaciones de detección genética, se secuenciaron diversas cantidades de ARN de referencia humana universal (UHR) a 30 millones de lecturas y se evaluó el número de genes con cobertura de 1x y 10x. Según los resultados, Illumina Stranded mRNA Prep ofrece una mejor detección genética, sobre todo con aportes reducidos (figura 3).

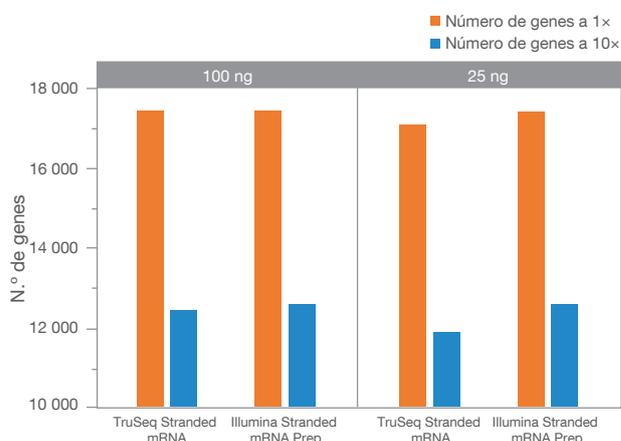


Figura 3: Mayor detección genética con aporte reducido. Illumina Stranded mRNA Prep ofrece una mejor detección genética con aportes reducidos de ARN en comparación con TruSeq Stranded mRNA. El número de genes detectados se registra a 30 millones de lecturas "paired-end" de las que se hayan obtenido submuestras y que hayan pasado el filtro. La detección de más genes con cobertura de 1x, como es el caso de Illumina Stranded mRNA Prep, indica una mayor sensibilidad.

Excepcional concordancia de datos

Ilumina Stranded mRNA Prep produce datos de calidad con una alta concordancia entre réplicas técnicas (figura 4A) y diversas cantidades de aporte de ARN de referencia humana universal (Figura 4B). Según estos resultados, Illumina Stranded mRNA Prep es una solución ideal para las muestras de gran valor con un material de partida limitado. Asimismo, Illumina Stranded mRNA Prep muestra una gran concordancia de datos con TruSeq Stranded mRNA, tanto con aportes equivalentes (figura 5A) como con aportes reducidos (figura 5B).

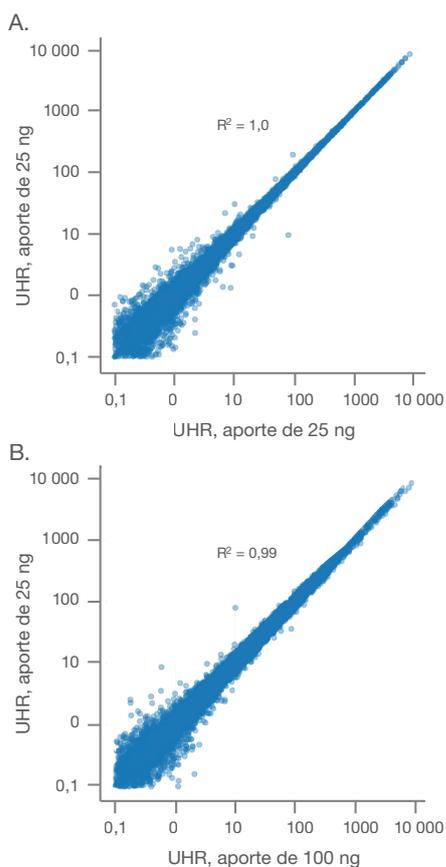


Figura 4: Alta concordancia de datos. Illumina Stranded mRNA Prep logra una elevada concordancia de datos entre réplicas técnicas (A) de 25 ng de ARN de referencia humana universal y (B) entre aportes de 25 ng y 100 ng de ARN de referencia humana universal. Se secuenciaron bibliotecas a 2×74 bp y se obtuvieron submuestras a 30 millones de lecturas. Se llevó a cabo un análisis de datos con la BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1.

Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas optimizado

Illumina Stranded mRNA Prep usa un flujo de trabajo rápido y flexible para la preparación de bibliotecas de ARN con ligaduras (figura 1). Las innovaciones en el flujo de trabajo, incluidos los tiempos de incubación más breves y el menor número de pasos de limpieza de muestras, suponen una duración total del ensayo aproximadamente un 40 % más rápido que TruSeq Stranded mRNA (figura 6).

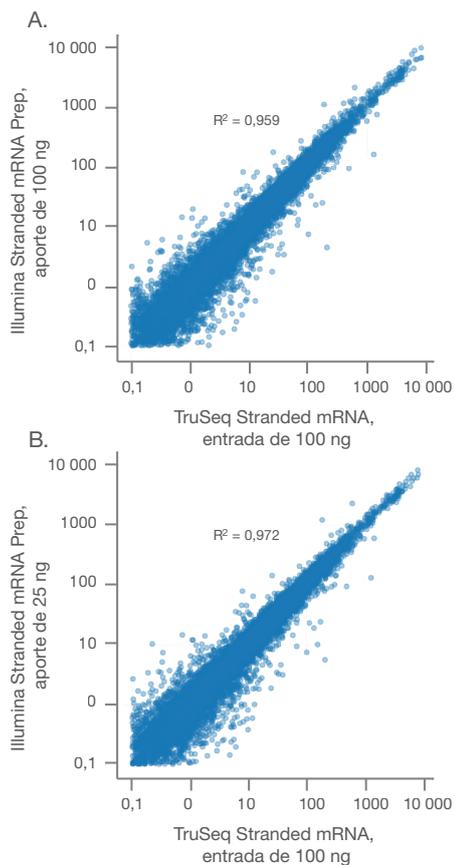


Figura 5: Alto concordancia con el kit heredado. Illumina Stranded mRNA Prep produce datos de gran concordancia con TruSeq Stranded mRNA a (A) aportes equivalentes de ARN de referencia humana universal de 100 ng y (B) con un aporte reducido de ARN de referencia humana universal de 25 ng frente a 100 ng.



Figura 6: Flujo de trabajo de Illumina Stranded mRNA Prep. Illumina Stranded mRNA Prep ofrece un flujo de trabajo rápido con un menor tiempo de participación activa. El tiempo puede variar dependiendo del equipo empleado, el número de muestras procesadas, los procesos de automatización o la experiencia del usuario.

Mayor rendimiento con índices dobles únicos

Al combinar Illumina Stranded mRNA Prep y los instrumentos de alto rendimiento como los sistemas NextSeq™ 550 y NovaSeq™ 6000, los laboratorios pueden secuenciar significativamente más muestras por experimento sin poner en peligro la calidad de los datos. Para aumentar aún más la productividad de las muestras, Illumina Stranded Total RNA Prep ofrece multiplexado con 384 índices dobles exclusivos (UDI).* Además de eliminar el impacto de la asignación incorrecta de índices, los UDI ayudan a disminuir los costes de secuenciación al permitir la carga de hasta 384 muestras en una sola celda de flujo NovaSeq S4 para aumentar la productividad de forma significativa.

Resumen

Illumina Stranded mRNA Prep ofrece una solución optimizada para un análisis claro y completo del transcriptoma codificante. Además, proporciona una extraordinaria flexibilidad en cuanto al tipo de aporte y permite aportes reducidos de hasta 25 ng de ARN de alta calidad. Illumina Stranded mRNA Prep ofrece mediciones precisas de la orientación de la cadena, una cobertura uniforme y una alta fiabilidad en la localización de características, como las isoformas nuevas, las fusiones de genes y la expresión específica de alelos.

* En el lanzamiento del producto se ofrecerán hasta 192 UDI. A lo largo de 2020 habrá más UDI disponibles

Información adicional

Para obtener más información sobre Illumina Stranded mRNA Prep, visite www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-mrna-prep.html

Datos para realizar pedidos

Preparación de bibliotecas	N.º de catálogo
Illumina Stranded mRNA Prep, ligadura (16 muestras)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, ligadura (96 muestras)	20040534
Índices	N.º de catálogo
Juego de A de IDT para índices UD de ARN Illumina, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040553
Juego de B de IDT para índices UD de ARN Illumina, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040554
Juego de C de IDT para índices UD de ARN Illumina, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040555 Disponible próximamente
Juego de D de IDT para índices UD de ARN Illumina, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040556 Disponible próximamente