

illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-ZeroTM Plus

迅速で柔軟性に富んだ
ソリューションで
トランスクリプトームを
高感度かつ正確に解析

- 高品質RNAの場合はわずか1 ng、分解FFPEサンプルの場合は10 ngのRNAで、高感度を達成
- 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、グロビンRNAも除去
- わずか3時間のハンズオンタイムを含む7時間のライブラリー調製時間

illumina®

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。主なRNA-Seq法の利点には次のようなものがあります。

- 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。
- 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、アプリケーションに対する柔軟性も限られるため、トータルRNA-Seq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るために、Illumina Stranded Total RNA Prepを開発しました (表1)。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。

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)。

* メタトランスクリプトミクス研究の場合では、Illumina Stranded Total RNA PrepをIllumina Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitと組み合わせることができ、複雑な微生物サンプル中に大量にあるrRNAを確実に除去します。

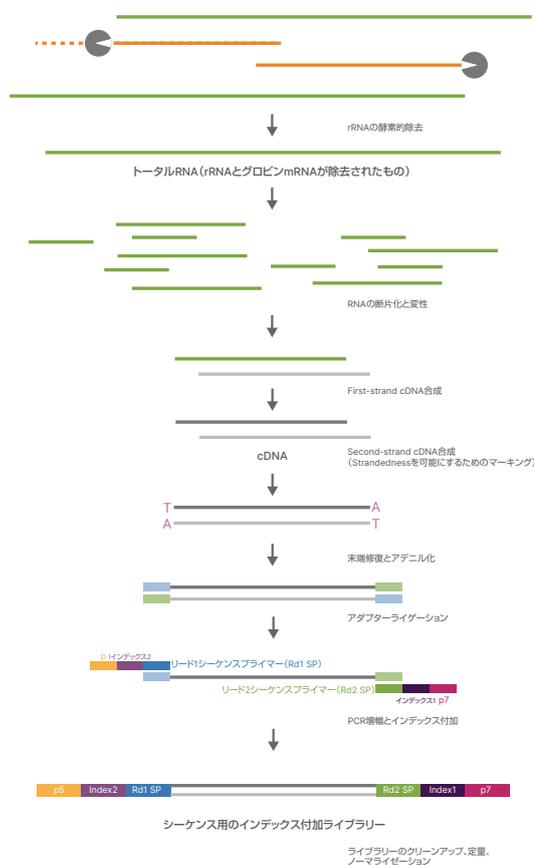


図1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus: rRNAと大量のグロビンmRNA (オレンジ色のライン) が除去され、cDNA合成が完了すると、PCR増幅により、アダプターが連結され、ユニークデュアルインデックスが付加されます。こうして得られた高品質のライブラリーを定量しノーマライズしたうえで、シーケンスを行います。

Ribo-Zero Plusによる効果的な複数種のリボソーム除去

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。単一チューブの酵素的リボソーム除去法は、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)。

表1: Illumina Stranded Total RNA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 RNA ^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
FFPEに対応	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の場合、1~1,000 ng (RIN値が7超)、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。最善の結果のためには、インプットRNA量を10 ngとすることを推奨します。
 b. 略語: UDI=ユニークデュアルインデックス、RIN=RNA Integrity Number

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

DNAプローブとのターゲット化した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。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を使用した場合では、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)。

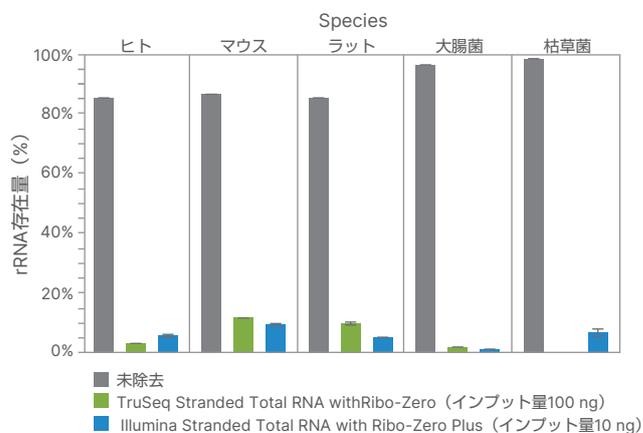


図2: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusを使用した複数生物種のrRNA除去: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusを使用することで、ヒト、マウス、ラット、細菌のrRNAを単一チューブ反応で効率的に除去することができます。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Goldを使用した哺乳類での結果と、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Bacteriaを使用した大腸菌での結果(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

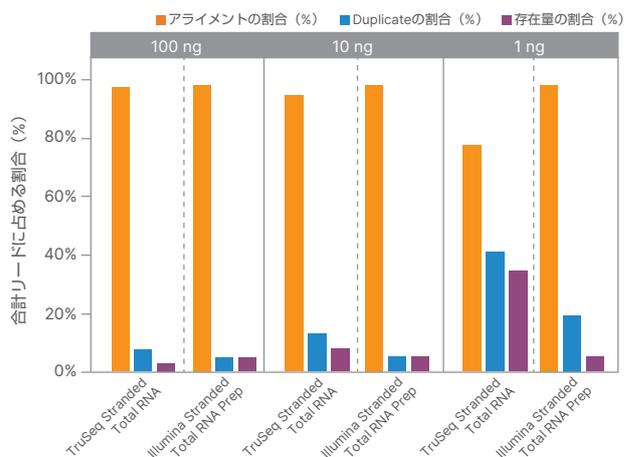


図3: ライブラリー調製性能の比較: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusを使用した場合と、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zeroを使用した場合を比較しました。Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusを使用した場合では、特にトータルUHR RNA量10 ngおよび1 ngという少ないインプット量において、アライメントリードが増加し、DuplicateとrRNA量が減少し、より高い効率性が認められました。ライブラリーはNextSeq 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。

表3: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusによるヒト末梢血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	99.97%	110,406	16	99.99%
HBB	154,614	78	99.95%	173,704	86	99.95%
HBG1	22	0	96.29%	37	1	99.69%
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メトリクス^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 (%)	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を使用しました。

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です。

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。

遺伝子検出効率

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、トータルRNAがわずか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)。

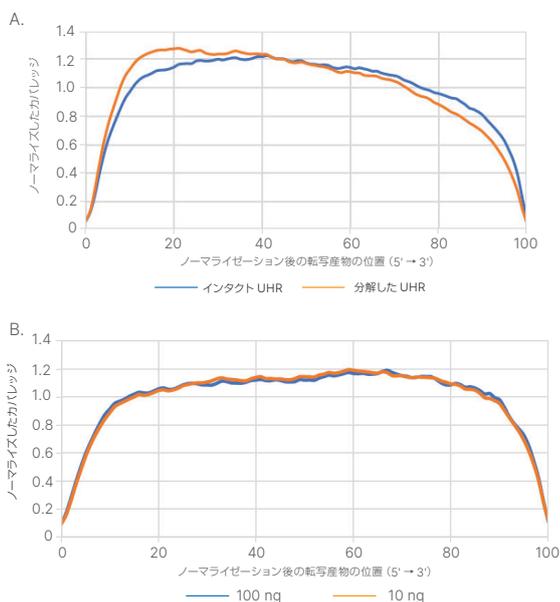


図4：高いカバレッジ均一性：Illumina Stranded Total RNA Prepは、(A) 高品質UHR RNAや人工的に分解したUHR RNA (RIN値=2) および (B) インプット量100 ngおよび10 ngのFFPE RNAで、高いカバレッジ均一性を示します。FFPEサンプルのDV₂₀₀クオリティスコアは55%でした。ライブラリーはすべて、NovaSeq 6000システムにて50Mリードでシーケンスしました。データ解析にはBaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1を使用しました。

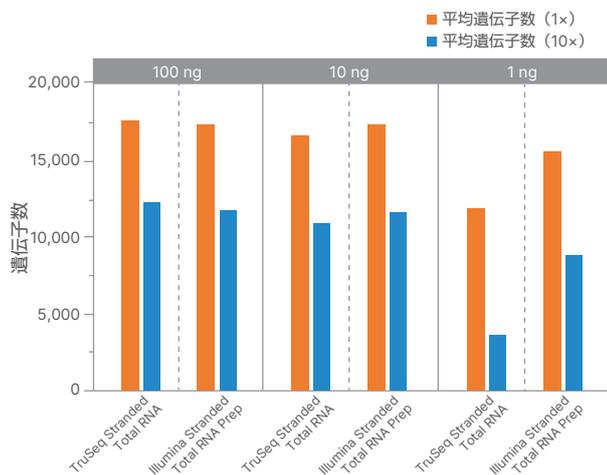


図5：少ないインプット量でより多くの遺伝子を検出：サブサンプリング後のペアエンドリードPF 30Mでの検出遺伝子数を測定したところ、Illumina Stranded Total RNA Prepは、TruSeq Stranded Total RNAと比べて、少ないRNAインプット量でより多くの遺伝子を検出することができました。Illumina Stranded Total RNA Prepは、1xでより多くの遺伝子を検出したことから、より高い感度を有すると言えます。

優れたデータ一致率

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6A) や、FFPEサンプルから抽出した少ないインプット量のRNAのテクニカルリプリケート間のデータ一致率 (図6B) 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7A：インプット量は両製品とも同じ。図7B：インプット量はStranded Total RNA Prepのほうが少ない)。

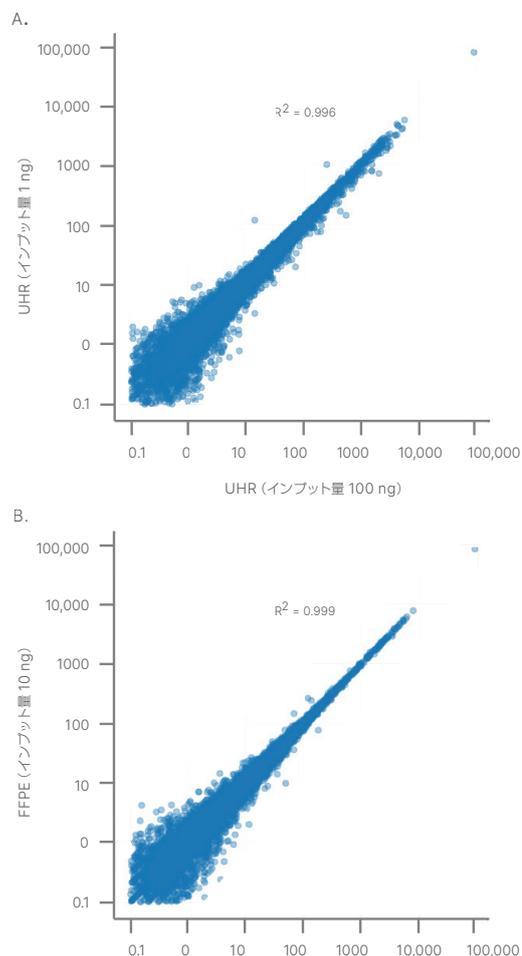


図6：高いデータ一致率：Illumina Stranded Total RNA Prepは、UHR RNAインプット量1 ngと100 ngとの間 (A) でも、また10 ngのFFPE RNAのテクニカルレプリケート間 (B) でも、高いデータ一致率を示しました。ライブラリーはNovaSeq 6000システムにて74 bp × 2でシーケンスしました。データ解析にはBaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1を使用しました。

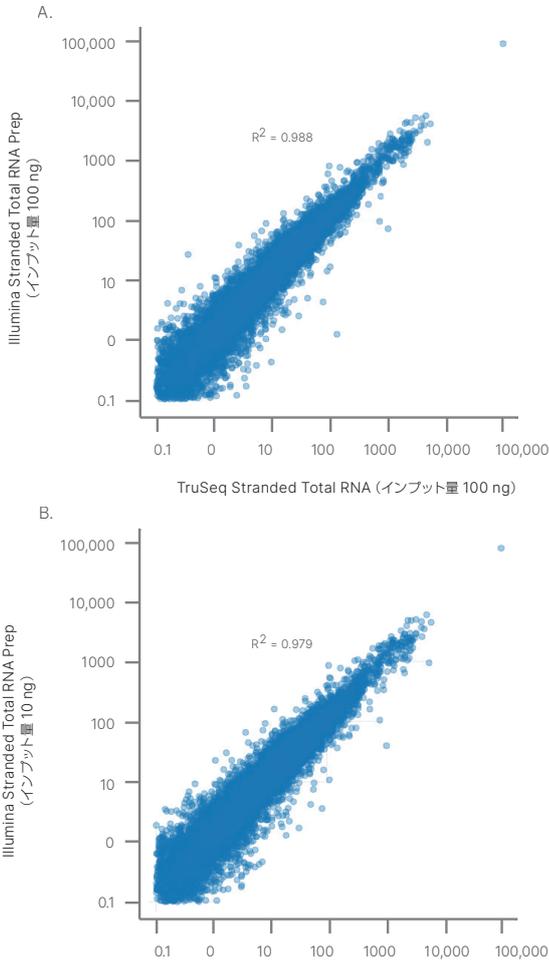


図7: 従来製品との高い一致率: Illumina Stranded Total RNA Prepでは、TruSeq Stranded Total RNAとの一致率の高いデータが得られます (A: インプット量は両製品とも同じ。B: インプット量はIllumina Stranded Total RNA Prepのほうが少ない)。

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、サンプルクリーンアップ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8)。



図8: 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。時間は、使用する機器、処理するサンプル数、自動化の手順、またはユーザーエクスペリエンスによって異なる場合があります。

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 (または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 6000 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。本ソリューションはさまざまなサンプルタイプに柔軟に対応し、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です。Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kitにより、ヒト、マウス、ラット、細菌などの複数生物種から不要なrRNAを極めて効率的に除去できます。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](#)または
[Ribo-Zero Plus Microbiome](#)

製品情報

製品	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
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 samples)	20072063
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091661

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

© 2024 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。

