

Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation

迅速で柔軟性に富んだソリューションで、コーディングトランスクリプトームを非常に正確に解析

- 25 ngというわずかなRNAから高品質なデータを取得し遺伝子検出を向上
- 7時間のライブラリー調製時間と3時間未満のハンズオンタイム
- 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が可能



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法には次のようなものがあげられます。

- 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。
- 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。
- 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。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。

TruSeq™ Stranded mRNAは、コーディングトランスクリプトームにおける遺伝子発現を解析し検出する各種アプリケーションに対応した強力なソリューションです。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も長いため、RNA-Seqアプリケーションで使用する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 mRNA Prepを開発しました。Illumina Stranded mRNA 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（図1）により、インプット量の少ないサンプル（表1）や幅広いmRNA-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。

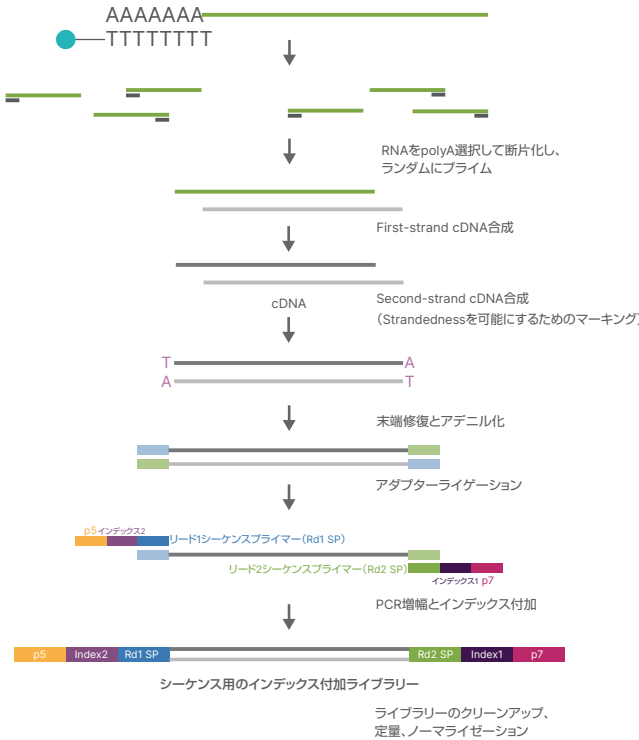


図1: Illumina Stranded mRNA Prep: polyA選択とcDNA合成が完了すると、ユニークデュアルインデックスアダプターのライゲーションとPCR増幅により高品質のライブラリーが得られます。このライブラリーを定量しノーマライズしたうえで、シーケンスを行います。

表1: Illumina Stranded mRNA Prepの仕様

機能	TruSeq Stranded mRNA Prep	Illumina Stranded mRNA Prep
最大UDI数	96	384
RNAインプット量	100～1,000 ng	25～1,000 ng
合計アッセイ時間	10.5時間	6.5時間
ハンズオンタイム	<7時間	<3時間
キット構成	48または96サンプル	16または96サンプル
UDI=ユニークデュアルインデックス		

高品質のデータ

遺伝子発現

Illumina Stranded mRNA Prepは、少ないインプット量でも、遺伝子発現解析のメトリクスにおいて高品質を示すシーケンスライブラリーを調製します (表2、図2)。これらの結果は、各種の遺伝子発現アプリケーションに対応するIllumina Stranded mRNA Prepの優れた性能を示します。mRNA-Seqには、NGS以外の手法に比べ、以下のような数多くの利点があります。

- 仮説不要の実験デザインであるため、研究対象のトランスクリプトームに関する予備知識が不要
- 既知および未知の転写産物をより高い検出力で検出
- より優れたハイスループットにより、1回のアッセイで数百から数千の領域を定量
- より広範なダイナミックレンジで、遺伝子発現をより正確に測定
- 1回のアッセイでより多くのデータを取得でき、配列とバリエーションの全情報が得られる

表2: Illumina Stranded mRNA Prep, Ligationの性能メトリクス

メトリクス	RNAインプット量100 ng		RNAインプット量25 ng	
	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
rRNAの割合 (28S/18S) (%)	5.1	1.8	5.3	1.5
Strandedness	99.6	99.4	99.6	99.4
カバレッジの CV中央値	0.49	0.46	0.50	0.47
Duplicateの割合 (%)	5.4	3.7	8.5	3.3
アライメントの割合 (%)	97.1	97.8	96.8	97.8
表中のデータは、30MリードでRNA Seq Alignment App v2.0.1を使用したときのものです。Duplicateは、4Mのパスフィルターペアエンドリードにサブサンプリングしたときのものです。				

遺伝子検出効率

Illumina Stranded mRNA PrepとTruSeq Stranded mRNAの遺伝子検出性能を比較するため、さまざまなUniversal Human Reference (UHR) RNA量にて30M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 mRNA Prepは、特に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3)。

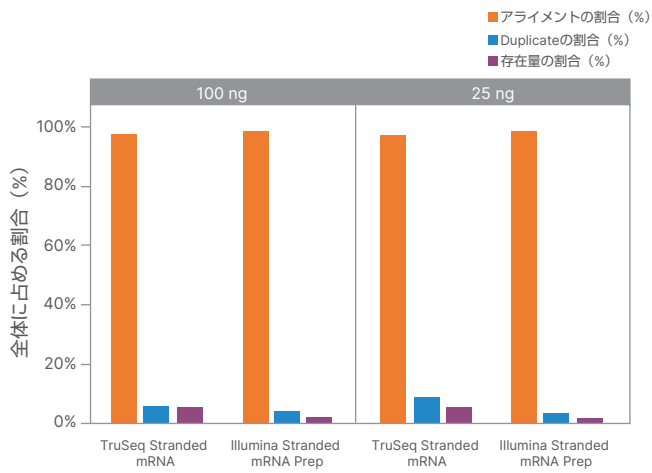


図2: 性能メトリクスの比較: Illumina Stranded mRNA PrepをTruSeq Stranded mRNAと比較しました。その結果、Illumina Stranded mRNA Prepは、特にインプット量25 ngのUHR RNAで、より優れた性能を示しました。ライブラリーを30Mリードにサブサンプリングし、BaseSpace™ RNA-Seq Alignment App v2.0.1で解析しました。Duplicateは、4Mのペアエンドリードパスフィルターにサブサンプリングしたときのものです。

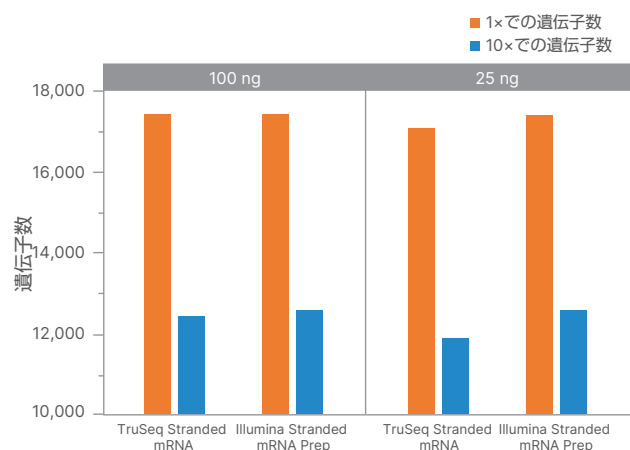


図3：少ないインプット量でより多くの遺伝子を検出：Illumina Stranded mRNA Prepは、少ないRNAインプット量で、TruSeq Stranded mRNAよりも多くの遺伝子を検出することができました。検出遺伝子数は、30Mのペアエンドリードパスフィルターにサブサンプリングしたときのものです。Illumina Stranded mRNA Prepは、1xのカバレッジでより多くの遺伝子を検出したことから、より高い感度を有すると言えます。

優れたデータ一致率

Illumina Stranded mRNA Prepでは、テクニカルレプリケート間のデータ一致率（図4A）や、さまざまなインプット量のUHR RNA間のデータ一致率（図4B）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 mRNA Prepは、出発物質が限られている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 mRNA Prepは、TruSeq Stranded mRNAとの間でも高いデータ一致率を示しました（図5A：インプット量は両製品とも同じ。図5B：インプット量はIllumina Stranded mRNA Prepのほうが少ない）。

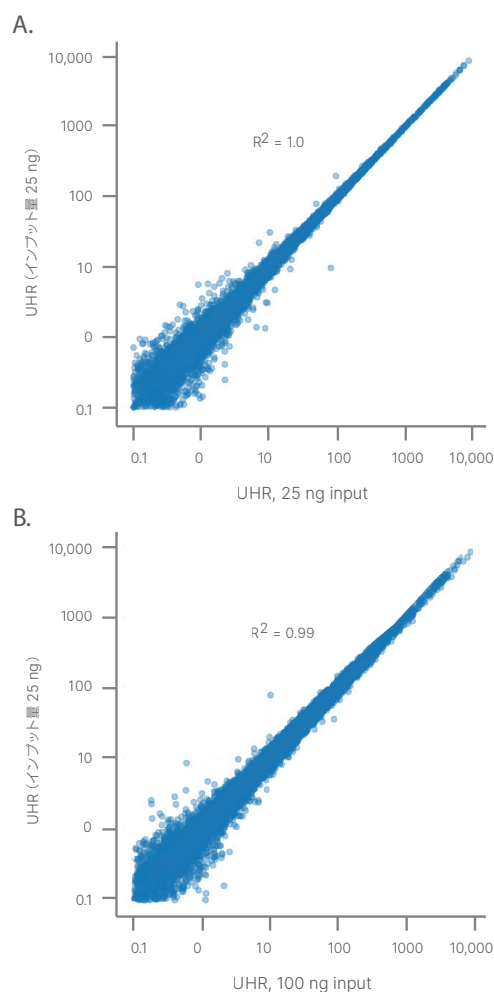


図4：高いデータ一致率：Illumina Stranded mRNA Prepは、25 ngのUHR RNAのテクニカルレプリケート間（A）でも、またUHR RNAインプット量25 ngと100 ngとの間（B）でも、高いデータ一致率を示しました。ライブラリーを74 bp × 2でシーケンスし、30Mリードにサブサンプリングしました。データ解析にはBaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1を使用しました。

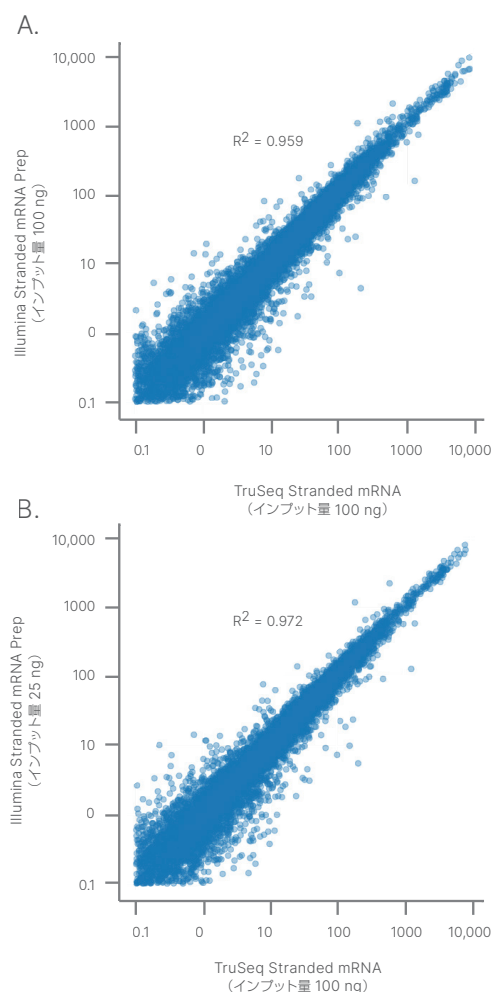


図5：従来製品との高い一致率：Illumina Stranded mRNA Prepでは、TruSeq Stranded mRNAとの一致率の高いデータが得られます（A：UHR RNAインプット量は両製品とも同じで100 ng、B：UHR RNAインプット量はIllumina Stranded mRNA Prepのほうが25 ngと少なく、TruSeq Stranded mRNAは100 ng）。

効率化されたライブラリー調製ワークフロー

Illumina Stranded mRNA 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 mRNAよりも約40%短くなりました（図6）。



図6：Illumina Stranded mRNA Prepのワークフロー：Illumina Stranded mRNA 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 mRNA Prep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な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、インデックスミスマサインメント（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 mRNA Prepは効率化を実現したソリューションであり、コーディング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25 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。Illumina Stranded mRNA 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、未知のアイソフォーム、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確実に検出することができます。

詳細はこちら

[Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation](#)

製品情報

製品	カタログ番号
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 samples)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 samples)	20040534
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。

illumina®