

# TruSeq™ RNA Exome

Eine reproduzierbare und günstige Lösung zum Analysieren von RNA, die aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) und anderen Proben von geringer Qualität isoliert wurde.

## Vorteile

- **Qualitativ hochwertige Daten aus schwierigen Proben**  
Untersucht degradierte Proben, einschließlich FFPE-Gewebe, für die RNA-Sequenzierung
- **Überragende Abdeckung mit fokussierten Inhalten**  
Maximiert die Erkennung bei verringerter Sequenzierungstiefe durch Fokussierung auf die codierenden Bereiche des Transkriptoms
- **Geringer Probenumfang**  
Liefert hohe Datenqualität schon bei 10 ng Gesamt-RNA
- **Lösung mit integriertem, flexiblem Workflow**  
Umfassender Workflow, der die RNA-Exom-Erfassung optimiert und Singleplex- oder Multiplex-Verfahren bis zu Quadruplex unterstützt

## Einleitung

Millionen von FFPE-Archivgewebeproben stellen eine enorm wertvolle Informationsquelle für die Krankheitsforschung dar, insbesondere in Bezug auf Krebs. Für gewöhnlich werden diese Proben mit phänotypischen Langzeitdaten verbunden, die eine Einsicht in Veränderungen der Genexpression bieten, die in verschiedenen Krankheitsstadien auftreten. Leider können der Fixierungsprozess und die Lagerung der FFPE-Proben zu einem hohen RNA-Abbau führen, was die Durchführung zuverlässiger, reproduzierbarer Genexpressions-Profilings-Studien mit RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) erschwert.<sup>1,2</sup> Es ist möglich, nutzbare RNA aus FFPE-Proben zu extrahieren, aber die aktuellen Analysemethoden führen zu äußerst variablen Ergebnissen oder erfordern eine teure Tiefensequenzierung. Hieraus ergeben sich signifikant unterschiedliche Ansichten des Transkriptoms, was die Zuverlässigkeit der Daten verringert und die Budget-Anforderungen erhöht.

## Qualitativ hochwertige Daten aus schwierigen Proben

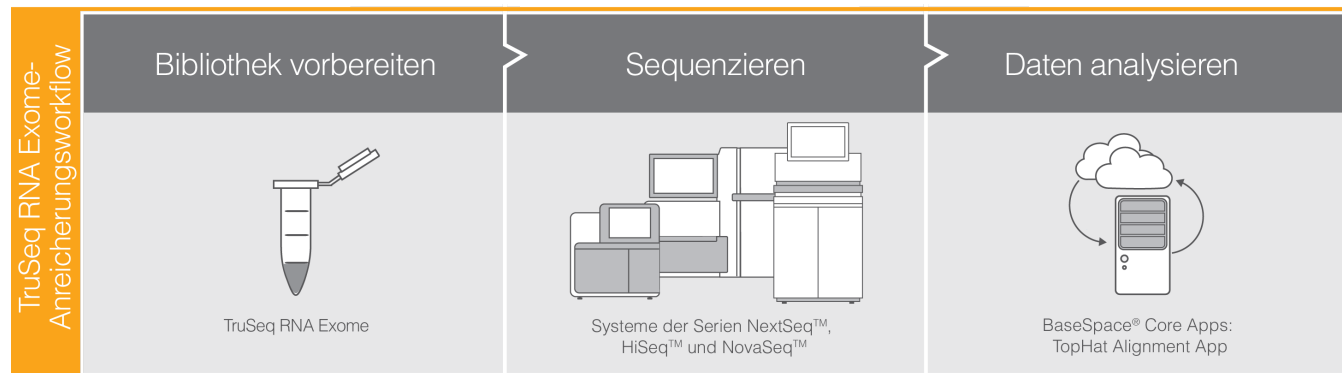
Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen und den Zugriff auf zuverlässige Daten in FFPE- und anderen Proben minderer Qualität zu erleichtern, hat Illumina jetzt TruSeq RNA Exome im Angebot, das früher als TruSeq RNA Access-Bibliotheksvorbereitungs-Kit (TruSeq RNA Access Library Prep Kit) erhältlich war (Abbildung 1). Dieser Workflow ermöglicht Wissenschaftlern die Nutzung der leistungsstarken Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) für Genexpressions-Studien, bei denen RNA aus Proben von geringer Qualität isoliert wird. Durch die Fokussierung auf die codierenden Bereiche der RNA benötigt TruSeq RNA Exome weniger Eingabe-RNA und weniger Reads, was die Anzahl der Proben pro Lauf erhöht und somit eine kostengünstigere Transkriptomanalyse ermöglicht.

## Hervorragende Abdeckung

TruSeq RNA Exome enthält ein hochoptimiertes SONDENSET, das eine umfassende Abdeckung der codierenden RNA-Sequenzen bietet. TruSeq RNA Exome enthält mehr als 425.000 Sonden, wobei jede anhand des Referenzgenoms NCBI37/hg19 konstruiert wurde, sodass 98,3 % des RefSeq-Exoms abgedeckt werden. Das SONDENSET ist für die Erfassung von > 210.000 Zielregionen auf 21.415 relevanten Genen konzipiert (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Informationen zur TruSeq RNA Exome-Abdeckung**

Abdeckung	TruSeq RNA Exome
Anzahl der Zielgene	21.415
Anzahl der exonischen Zielregionen	214.126
Anzahl der Sonden	425.437
RefSeq-Exom-Abdeckung in Prozent	98,3 %



**Abbildung 1: TruSeq RNA Exome-Workflow:** TruSeq RNA Exome ist Teil einer integrierten NGS-Lösung, die eine vereinfachte Bibliotheksvorbereitung und Erfassung des codierenden Transkriptoms sowie die Sequenzierung und eine benutzerfreundliche Datenanalyse umfasst.

## Fokussierter Inhalt

TruSeq RNA Exome bietet eine hohe Erfassungseffizienz und konzentriert Sequenzierungsaufgaben auf die wichtigsten Inhalte der codierenden RNA-Regionen. Daher wurden Bibliotheken aus FFPE-Lungentumor- und normalen Proben mithilfe von TruSeq Stranded Total RNA und TruSeq RNA Exome vorbereitet. Die Sequenzierung und Analyse mit der BaseSpace TopHat Alignment App ergab, dass mit TruSeq RNA Exome > 85 % der erfassten Basen auf die codierende Sequenz und die untranslatierten Bereiche (Untranslated Regions, UTR) der RNA aligniert wurden, mit TruSeq Stranded Total RNA waren es < 40 % (Abbildung 3). Durch die Arbeit mit fokussierteren Inhalten ergaben sich mit TruSeq RNA Exome kleinere Datensätze, was eine schnellere Datenanalyse und eine einfachere Datenbearbeitung ermöglichte.

## Geringer Probenumfang

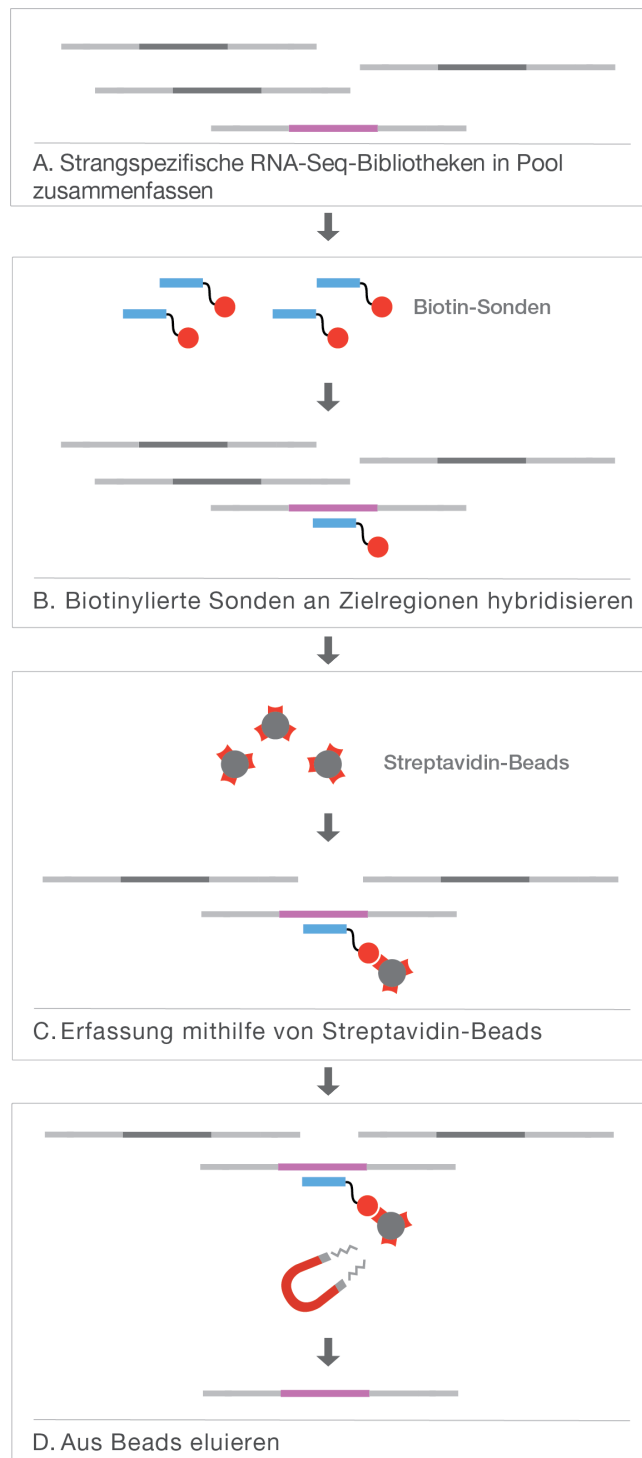
Die hohe Erfassungseffizienz und die hohe Abdeckungseinheitlichkeit minimieren die erforderliche Sequenzierungstiefe, um Expressionsebenen genau und ohne Verzerrungen zu ermitteln. Beginnend mit nur 10 ng Gesamt-RNA ist es möglich, eine Sequenzierungstiefe zu erreichen, die für eine genaue Quantifizierung und Erkennung der Transkripte und Genfusionen erforderlich ist. Durch diese geringen Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe ist TruSeq RNA Exome eine ideale Lösung für wertvolle Proben mit nur geringem Ausgangsmaterial.

## Einfacher, skalierbarer Workflow

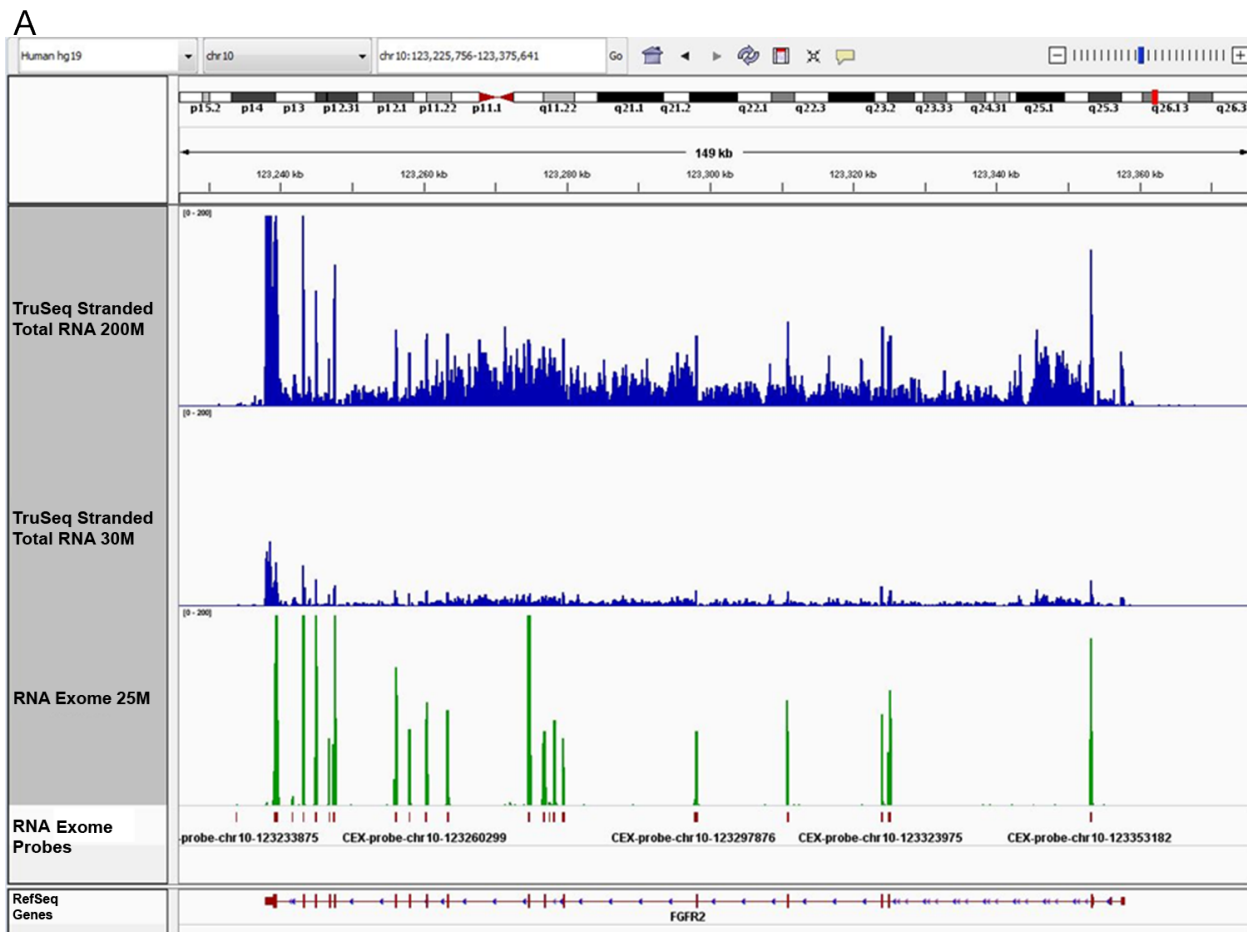
TruSeq RNA Exome ist hinsichtlich eines flexiblen Multiplexings konzipiert und vollständig optimiert. Es bietet eine einfache, skalierbare Lösung, die Teil des integrierten NGS-Workflows von Illumina ist, der die Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung und die Datenanalyse umfasst (Abbildung 1).

## Optimierte Bibliotheksvorbereitung

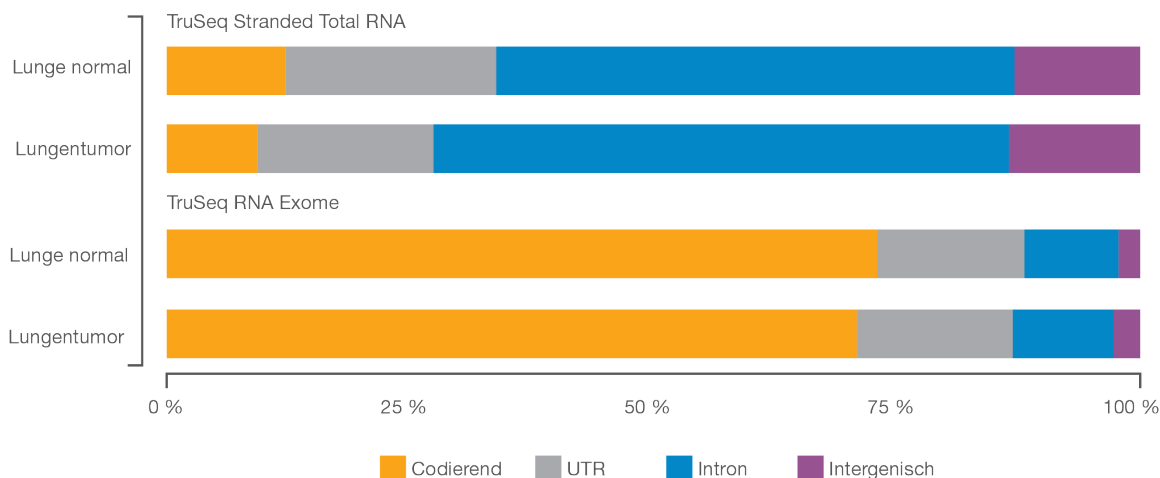
Strangspezifische RNA-Seq-Bibliotheken werden mit präziser, bewährter TruSeq-Chemie vorbereitet. Diese Methode fügt jeder Bibliothek eindeutige Oligonukleotide hinzu und kennzeichnet sie für das nachgeschaltete Pooling in einer Lane (Abbildung 2A). Durch diesen Schritt des Poolings mehrerer Proben können in einem einzelnen Sequenzierungslauf mehr Proben geladen werden, was Untersuchungen mit hohem Durchsatz ermöglicht. Nach dem Pooling der Bibliotheken werden sie einem Erfassungsschritt unterzogen, bei dem eine Zielbibliothek ohne ribosomale RNA und intronische oder intergenische Regionen produziert wird. Pool-Bibliotheken werden zu mit Biotin gekennzeichneten Sonden für spezifische codierende RNA-Regionen hybridisiert (Abbildung 2B). Spezifische Ziele im Pool werden dann erfasst, indem Streptavidin-Beads hinzugefügt werden, die sich an die biotinylierten Sonden binden (Abbildung 2C). Magnete ziehen die gebundenen RNA-Fragmente aus der Lösung heraus (Abbildung 2D). Erfasste RNA-Fragmente werden aus den Beads eluiert und für eine zweite Anreicherungsreaktion hybridisiert. Nach der Amplifikation ist eine Zielbibliothek für die Clusterbildung und die anschließende Sequenzierung bereit. Reagenzien werden in einer Menge bereitgestellt, die eine flexible Probenuntersuchung, von Singleplex- bis hin zu Quadruplex-Multiplex-Sequenzierung, ermöglicht. Master-Mischungs-Reagenzien ermöglichen einen schnellen Start und erleichtern die Automatisierung des Prozesses.



**Abbildung 2: TruSeq RNA Exome-Erfassungsschemie:** TruSeq RNA Exome bietet ein einfaches und optimiertes Protokoll zur Isolierung der Zielbereiche von Interesse in Proben.



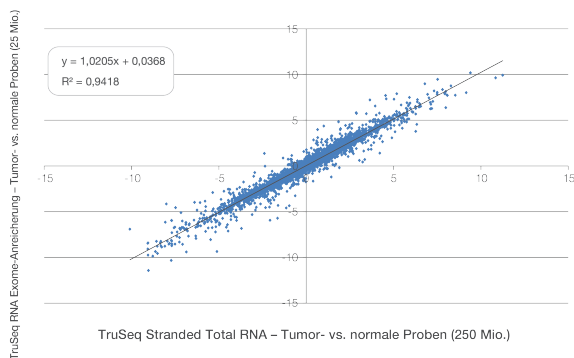
**B** % Basen an Region ausgerichtet



**Abbildung 3: Konzentration auf codierende RNA-Regionen mit TruSeq RNA Exome:** FFPE-Lungentumor- und normale Proben werden sowohl mit TruSeq Stranded Total RNA als auch mit TruSeq RNA Exome vorbereitet. Bibliotheken wurden jeweils bei 200 Mio. und 25 Mio. Reads sequenziert. (A) Die mit TruSeq RNA Exome vorbereiteten Proben zeigten eine deutlich tiefere Abdeckung der Exons, selbst bei einem Achtel der Read-Anzahl. Die TruSeq Stranded Total RNA-Daten wurden zum Vergleich auf 30 Mio. Reads reduziert. (B) Unter Verwendung der BaseSpace TopHat Alignment App wurden über 85 % der mit TruSeq RNA Exome generierten Daten auf Transkripte (codierende Sequenz und UTRs) aligniert.

### Kostengünstige Sequenzierung

Durch die Fokussierung auf die codierenden Regionen der RNA und die Kombination von TruSeq RNA Exome mit Geräten, die einen hohen Durchsatz bieten, wie beispielsweise die Systeme der Serien NextSeq, HiSeq und NovaSeq, können Labore fünfmal mehr Proben je Durchlauf sequenzieren, ohne dabei Abstriche bei der Datenqualität in Kauf nehmen zu müssen (Abbildungen 3 und 4). TruSeq RNA Exome liefert äußerst genaue Daten, die den Prozentsatz nutzbarer exonischer Reads in der Assemblierung der codierenden Regionen stark fragmentierter RNA erhöhen. Die Fokussierung der Reads auf die Regionen von Interesse erhöht die Anzahl möglicher Reads deutlich (Tabelle 2), ohne dass dies die Genfusionserkennung beeinträchtigt (Abbildung 5).

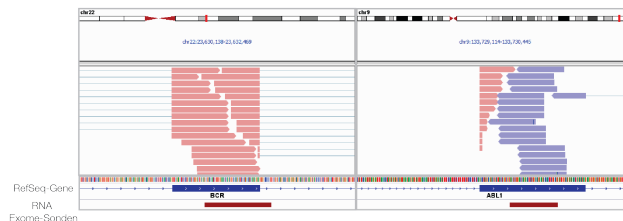


**Abbildung 4: Präzise Daten mit einem Bruchteil der Reads:** Bibliotheken wurden mit TruSeq RNA Exome (25 Mio. Reads) und TruSeq Stranded Total RNA (250 Mio. Reads) aus Lungentumor- und normalen FFPE-Proben vorbereitet. Die differenzielle Expressionsanalyse ergibt, dass die Fold-Change-Werte von Protokoll<sub>2</sub> über den gesamten dynamischen Bereich ( $R^2 = 0,9418$ ) in höchstem Maße korrelieren.

**Tabelle 2: TruSeq RNA Exome erhöht die Anzahl möglicher Reads**

Sequenzierungssystem	Frische/gefrorene oder FFPE-RNA-Seq <sup>a</sup>
MiSeq™ System v3-Chemie	1 Probe pro Lauf
NextSeq 500 System-Fließzelle – mittlere Leistung	5 Proben pro Lauf
NextSeq 500 System-Fließzelle – hohe Leistung	16 Proben pro Lauf
HiSeq 2500 System – Schnelllaufmodus	24 Proben pro Lauf
HiSeq 2500 System – Modus für hohe Leistung	160 Proben pro Lauf
NovaSeq 6000 System S2-Fließzelle	132 Proben pro Lauf

a. Sequenzierung bei 25 Mio. Reads je Probe (2 × 75 bp).



**Abbildung 5: Effiziente Genfusionserkennung:** TruSeq RNA Exome ermöglicht die Erkennung exprimierter Fusionstranskripte, ohne dass dafür für die Fusionsverbindung spezifische Sonden erstellt werden müssen. Die gut charakterisierte BCR-ABL-Fusion wird in der UHRR-Probe (Universal Human Reference RNA) bei 25 Mio. Reads effizient erkannt.

### Praktische, einfache Datenanalyse

TruSeq RNA Exome-Datensätze können im BaseSpace Sequence Hub mithilfe von RNA-Seq Software Apps analysiert werden. Diese Apps enthalten von Experten geschätzte Datenanalysetools mit intuitiven, benutzerfreundlichen Oberflächen, die sich ohne Informatikkenntnisse bedienen lassen. TopHat 2 bietet ein äußerst zuverlässiges Alignment der Häufigkeitsmessung sowie die Erkennung von Spleißstellen, Genfusionen und SNPs. CuffDiff ermöglicht eine empfindliche Transkriptererkennung und differenzielle Expressionsanalyse. TopHat Fusion ermöglicht eine robuste, äußerst zuverlässige Erkennung von Genfusionen, während das Illumina Isaac™-Verfahren ein zuverlässiges Varianten-Calling bietet.<sup>3</sup> Die Ausgabedateien können für eine Vielzahl an systemfremden Analyselösungen verwendet werden. RNA-Seq Apps ermöglichen eine einfache Zusammenfassung von Berichten zu mehreren Proben, die Benachrichtigung über abgeschlossene Aufträge auf Mobilgeräten und eine effiziente Organisation von Dateien für die Zusammenarbeit und gemeinsame Nutzung.

### Zusammenfassung

FFPE-Proben bieten vielfältige Informationen, die früher nur schwer zugänglich waren. Als Teil einer integrierten Sequenzierungslösung von Illumina bietet TruSeq RNA Exome eine reproduzierbare und günstige Methode zum Sequenzieren von RNA aus FFPE- und anderen Proben von geringer Qualität.

### Weitere Informationen

Weitere Informationen zur RNA-Exomerfassungssequenzierung finden Sie unter [www.illumina.com/techniques/sequencing/ma-sequencing/ma-exome-capture-sequencing.html](http://www.illumina.com/techniques/sequencing/ma-sequencing/ma-exome-capture-sequencing.html).

## Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSeq RNA Library Prep for Enrichment (48 Proben)	20020189
TruSeq RNA Enrichment (bis zu 48 Proben bei Quadruplex, 12 Anreicherungen)	20020490
TruSeq RNA Single Indexes Set A (12 Indizes, 48 Proben)	20020492
TruSeq RNA Single Indexes Set B (12 Indizes, 48 Proben)	20020493
Exome Panel (45 Mb)	20020183

## Quellen

1. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlimpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1261.
2. Penland SK, Keku TO, Torrice C, et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Lab Invest*. 2007;794:383–391.
3. Raczky C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041–2043.

**Illumina, Inc.** • Tel. USA (gebührenfrei) 1.800.809.4566 • Tel. außerhalb Nordamerikas +1.858.202.4566 •  
techsupport@illumina.com • www.illumina.com

**Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.**

© 2017 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Illumina, BaseSpace, HiSeq, Isaac, MiSeq, NextSeq, NovaSeq, TruSeq und die Kürbisorange Farbe sind Marken von Illumina, Inc. und/oder ihren Tochtergesellschaften in den USA und/oder anderen Ländern. Pub.-Nr. 470-2013-004-B-DEU

**illumina**<sup>®</sup>