

TruSeq™ Stranded mRNA y Total RNA (Hoja de datos de ARN total y ARNm monocatenario TruSeq)

Obtenga una visión clara y exhaustiva del transcriptoma con una solución simplificada, rentable y flexible de análisis de ARNm o del transcriptoma completo.

Puntos destacados

- Medida precisa de la orientación de la cadena**
 Detecta la transcripción de cadenas no codificantes, mejora la anotación de transcritos y aumenta la eficiencia de la alineación
- Excelente calidad de cobertura**
 Ofrece un mapa preciso y exhaustivo de transcripciones distintas y fusiones génicas
- Compatible con diversos tipos de muestras**
 Analiza distintas muestras, entre ellas muestras de baja calidad, fijadas en formol, embebidas en parafina (FFPE) y de sangre
- Flexibilidad excepcional**
 Ofrece una flexibilidad excepcional en el diseño experimental con hasta 96 índices dobles únicos (UDI) para poder multiplexar las muestras con seguridad



Figura 1: ARN monocatenario TruSeq: El ARNm monocatenario y el ARN total TruSeq permiten una interrogación fiable tanto de muestras estándar como de baja calidad y son compatibles con una amplia variedad de diseños de estudio.

Su capacidad para capturar la relativa abundancia de expresión de cadenas codificantes y no codificantes hace visibles las interacciones de regulación que de otra forma sería imposible observar.

A medida que se van conociendo las importantes funciones biológicas del ARN no codificante (ARNnc), el análisis de transcriptoma completo (o secuenciación completa del ARN) aporta una visión más amplia de la dinámica de la expresión. RNA-Seq total facilitado por la reducción de ARN ribosómico (ARNr), es compatible con muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés), que contienen información biológica que puede ser crítica. El ARN monocatenario TruSeq proporciona una combinación única de datos de calidad excepcional tanto para análisis de ARNm como del transcriptoma completo. Además, el flujo de trabajo permite un análisis fiable tanto de muestras estándar como de baja calidad y es compatible con una amplia variedad de diseños de estudio (figura 1).

Reducción de ribosomas eficaz

El ARN monocatenario TruSeq (tabla 1) combina la reducción de ribosomas de eficacia probada y los procesos químicos de preparación de bibliotecas en un único flujo de protocolo racionalizado. A diferencia de los métodos de captura basados en poli-A, los kits Ribo-Zero™ eliminan el ARN ribosómico (ARNr) mediante sondas con biotina capaces de enlazar de forma selectiva los ARNr. Las bolas magnéticas capturan el híbrido sonda ARNr y se eliminan mediante despliegue, de forma que solamente queda en la solución el ARN deseado desprovisto de ARNr. Este proceso minimiza la contaminación de ribosomas y maximiza el porcentaje de lecturas asignadas exclusivamente para ARNm y una amplia

Introducción

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) es un potente método para localizar, definir y cuantificar los ARN transcritos. Gracias a la demostrada tecnología de secuenciación de última generación (NGS) de Illumina, la secuenciación de ARN no precisa sondas específicas de especies o de transcripciones, por lo que los supuestos previos sobre el transcriptoma no sesgan los datos. Por tanto, la secuenciación de ARN permite elaborar diseños de experimentos sin hipótesis de cualquier especie, incluso de aquellas con escasa o ninguna anotación genómica. Aparte de servir para medir los cambios de la expresión genética, la secuenciación de ARN puede utilizarse en aplicaciones de detección, como la identificación de otros procesos de empalme, la fusión de genes, la expresión específica de alelos y el estudio de transcritos infrecuentes y nuevos.

A medida que se iba conociendo mejor la complejidad de la regulación genética, ha surgido la necesidad de recoger datos adicionales. La información monocatenaria identifica de cuál de las dos cadenas de ADN proviene un ARN transcrito. Esta información aumenta la confianza en la anotación de transcritos, sobre todo con muestras no humanas. Identificar el origen de la cadena aumenta el porcentaje de lecturas alineadas, lo que disminuye los costes de secuenciación por cada muestra. Mantener la orientación de la cadena también permite identificar la expresión de cadenas no codificantes, un importante agente en la regulación genética.¹

variedad de ARNnc de interés, como el ARN largo intergénico no codificante (ARNlinc), el ARN nuclear pequeño (ARNnp), el ARN nucleolar pequeño (ARNnop) y otros ARN.²

Tabla 1: Tipo de ARN blanco de la reducción

ARN objetivo	Preparación de bibliotecas
• ARNr citoplasmático	ARN monocatenario total TruSeq con Ribo-Zero Human/Mouse/Rat
• ARNr citoplasmático • ARN mitocondrial	ARN monocatenario total TruSeq con Ribo-Zero Gold
• ARNr citoplasmático • ARNr mitocondrial • ARNr de la globina	ARN monocatenario total TruSeq con globina Ribo-Zero

Información de monocatenarios de alta calidad

El proceso químico de ARN monocatenario TruSeq ofrece una calidad de datos excepcional. La medida monocatenaria, o porcentaje de lecturas asignadas de forma exclusiva que devuelven información precisa del origen de la cadena según un ARN de referencia humana universal (UHR, por sus siglas en inglés) bien identificado, es igual o superior al 99 % si se utiliza ARNm monocatenario TruSeq, e igual o superior al 98 % si se utiliza ARN monocatenario total TruSeq. Esta información tan precisa aumenta el porcentaje de lecturas que se alinean de forma exclusiva en el conjunto de transcriptomas con poca anotación y agudiza la detección de la expresión de cadenas no codificantes. La medida uniforme y precisa de la abundancia de ARN se refleja en una alta reproducibilidad entre las réplicas técnicas (figura 2, $R^2 = 0,9783$).

ARN total TruSeq para muestras de baja calidad

El ARN monocatenario TruSeq ofrece una interrogación fiable y eficiente de muestras FFEP y de otras muestras de ARN de baja calidad. La cobertura entre transcripciones es elevada y equilibrada tanto en muestras frescas congeladas (FF, por sus siglas en inglés) y FFPE preparadas con ARN total monocatenario TruSeq (figura 3). El flujo de trabajo optimizado de eliminación del ARNr de Ribo-Zero ofrece una solución viable y muy flexible para el análisis completo del transcriptoma en muestras que hasta el momento eran difíciles de analizar.

Análisis de ARN de muestras de sangre

Los kits de ARN total monocatenario TruSeq con Ribo-Zero Globin permiten una interrogación eficiente y fiable de ARN codificantes y ARNnc aislados a partir de muestras de sangre. Un flujo de trabajo racionalizado y fácilmente automatizable aplica el proceso químico de Ribo-Zero para retirar el ARNm de la globina, simultáneamente con el ARNr citoplasmático y mitocondrial, en un paso único y rápido (tabla 1). El flujo de trabajo combina la eliminación del ARNm de la globina, la eliminación del ARNr y la preparación de bibliotecas para optimizar los resultados de secuenciación. También reduce la duración total del ensayo, elimina la necesidad de llevar a cabo otros procesos químicos de eliminación y disminuye el coste por muestra.

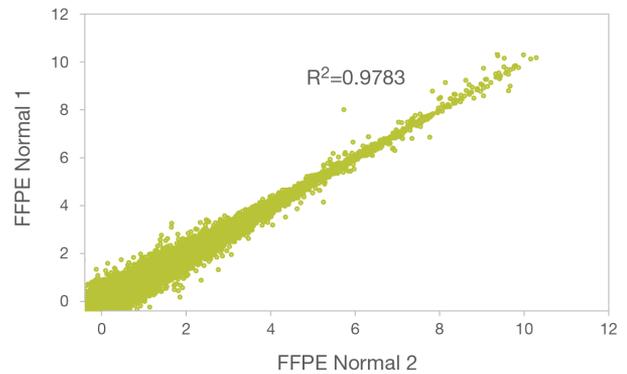


Figura 2: Concordancia elevada entre las réplicas técnicas—Las réplicas técnicas de tejido FFPE muestran una concordancia elevada, lo que indica que el rendimiento de la preparación de bibliotecas es sólido. Los ejes son trazados de expresiones génicas de fragmentos por millón de kilobases (FPKM) en base logarítmica 2. Se muestra el valor de R^2 .

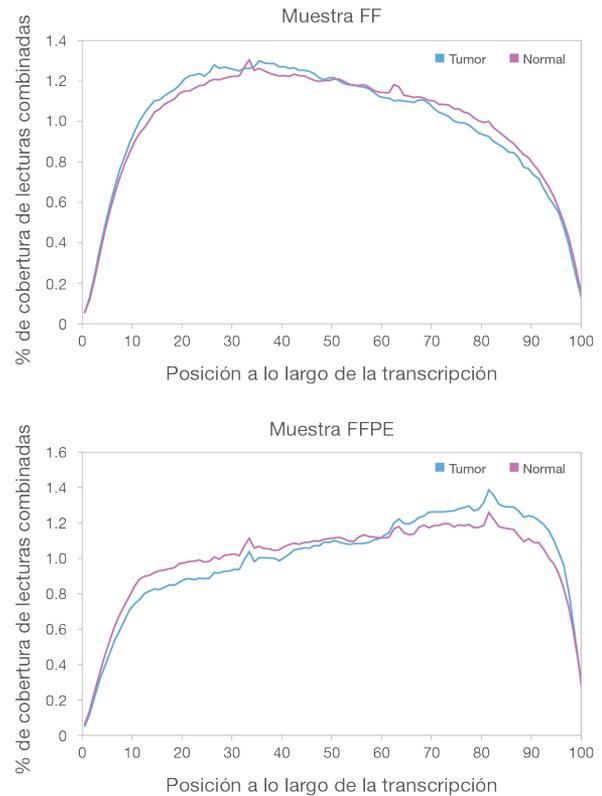


Figura 3: Cobertura uniforme en todas las transcripciones: el ARN total monocatenario TruSeq aporta una cobertura excelente en las primeras 1000 transcripciones expresadas en tumores frescos congelados FF (arriba) y FFPE (abajo), así como en tejido mamario normal compatible, con lecturas monocatenarias alineadas superiores al 98 %.

Expresión diferencial del ARN no codificante

Mantener la información de la cadena de las transcripciones de ARN es importante por muchos motivos, entre ellos, la detección de transcripciones de distinta expresión. Se compararon los análisis de secuenciación de ARN del tejido de un tumor de mama y tejido normal de ARN monocatenario total TruSeq con Ribo-Zero con los de un método estándar basado en poli-A de preparación de bibliotecas. Las bibliotecas preparadas con ARN monocatenario total TruSeq y con el método poli-A detectaron la expresión diferencial del gen *ATP5H* entre tumores y muestras normales. Sin embargo, al utilizar ARN monocatenario total TruSeq, también se detecta, en la orientación de la cadena opuesta previsible, la expresión diferencial en orientación opuesta en la posición de la transcripción del pseudogén AC087651.1 (figura 4). El ARN monocatenario total TruSeq también permite la detección fiable de la expresión diferencial entre distintas formas de ARNnc, incluido ARNlinc, ARNnp, ARNnop y otros tipos de ARN (ARN varios) entre tejidos tumorales y normales (figura 5).

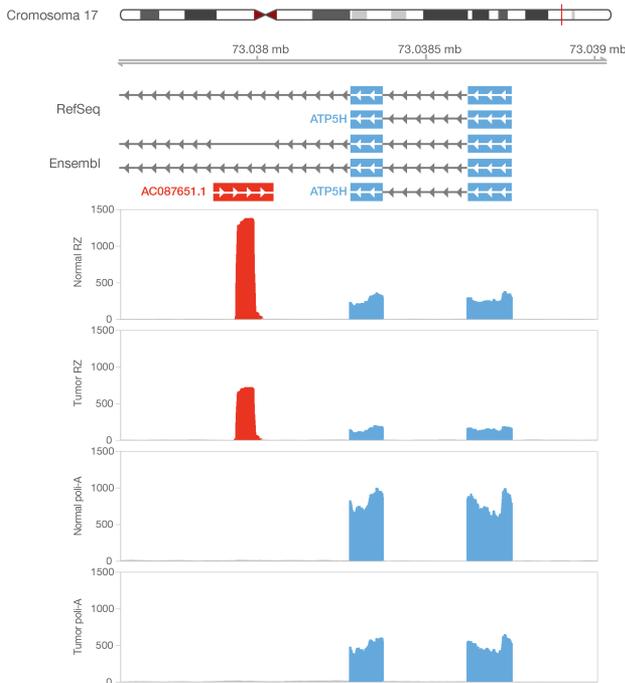


Figura 4: Expresión diferencial de transcripciones de ARNnc: Expresión del gen *ATP5H* en el cromosoma 17 con expresión diferencial en un tumor de mama en comparación con un tejido normal. Al utilizar dos métodos diferentes de preparación de bibliotecas (RZ, Ribo-Zero, para el ARN total o Poli-A, basado en poli-A para el ARNm), se muestra una expresión diferencial en un tumor en comparación con tejidos normales en ambas preparaciones (azul). Sin embargo, solo el ARN total monocatenario TruSeq con Ribo-Zero manifiesta la expresión diferencial en el locus de un pseudogén (rojo, AC087651.1), para el que se detectan lecturas en la orientación opuesta, como cabe esperar. Esta información monocatenaria se habría perdido en una preparación de ARNm estándar.

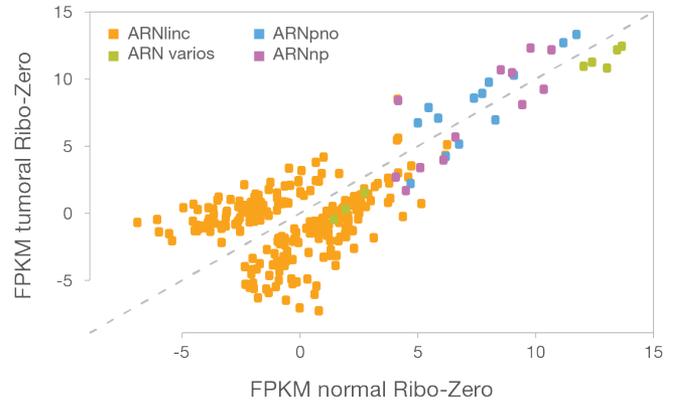


Figura 5: Detección de la expresión de ARNnc: Con el ARN total monocatenario TruSeq, puede detectarse la expresión diferencial entre un tumor y tejidos normales en varios ARN no codificantes, como el ARN largo intergénico no codificante (ARNlinc), el ARN nuclear pequeño (ARNnp), el ARN nucleolar pequeño (ARNnop) y otros ARN (ARN varios) (cuatro réplicas por muestra; tasa de descubrimientos falsos, FDR = 0,05).

Flexibilidad de configuración del flujo de trabajo

ARNm monocatenario y ARN total TruSeq ofrecen soluciones optimizadas para sus experimentos. Cada flujo de trabajo incluye protocolos de alto rendimiento y de bajo rendimiento que se adaptan perfectamente a proyectos con ≤ 48 muestras y ≥ 48 muestras, respectivamente. El ARN monocatenario total dispone de una configuración para eliminar solo el ARNr citoplasmático y de otra para eliminar tanto ese como el ARNr mitocondrial. En una comparación con el uso de ARN de referencia humana universal, el ARN monocatenario total TruSeq con Ribo-Zero Human/Mouse/Rat y el Gold redujeron el ARNr citoplasmático a $< 2\%$ de lecturas alineadas. El ARN monocatenario total TruSeq con Ribo-Zero Gold también redujo el ARNr del 7% a tan solo el 0,02% de lecturas alineadas.

Multiplexado de muestras eficaz

Gracias a un procedimiento sencillo, se añaden índices a los fragmentos de ADNc de las muestras para proporcionar una solución innovadora de multiplexado de muestras. A fin de lograr la máxima eficiencia operativa, se pueden agrupar y secuenciar juntas en un solo carril de una celda de flujo de cualquier plataforma de secuenciación de Illumina hasta 96 muestras colocadas previamente en placas e indexadas de forma única. Después de la secuenciación, se emplean los índices para demultiplexar los datos y asignar lecturas de forma precisa a las muestras adecuadas del conjunto.

Con ARN monocatenario TruSeq se puede utilizar una estrategia de indexado única o una doble, que emplea una combinación única de dos índices para demultiplexar. Los adaptadores de índice único doble (UDI) se desarrollaron en colaboración entre Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e Illumina (disponibles por separado) y emplean pares únicos de índices para demultiplexar. Los UDI recientemente introducidos (24 y 96) ofrecen una mayor plexicidad que permite una asignación precisa de lecturas y un uso eficiente de las celdas de flujo. El uso de combinaciones de UDI es una práctica recomendable para garantizar que las lecturas con índices correctos no afecten a la llamada de variante.

Datos para realizar pedidos

Producto	Eliminación de ribosomas	Configuración	N.º de catálogo
Preparación de bibliotecas de ARNm monocatenario TruSeq	N/D	48 muestras	20020594
		96 muestras	20020595
Preparación de bibliotecas de ARN monocatenario total TruSeq Human/Mouse/Rat	ARN ribosómico citoplasmático	48 muestras	20020596
		96 muestras	20020597
Preparación de bibliotecas de ARN monocatenario total TruSeq Gold	ARN ribosómico citoplasmático y mitocondrial	48 muestras	20020598
		96 muestras	20020599
Preparación de bibliotecas de ARN monocatenario total TruSeq Plant	ARN ribosómico citoplasmático y de cloroplasto	48 muestras	20020610
		96 muestras	20020611
Preparación de bibliotecas de ARN monocatenario total TruSeq Globin	ARN ribosómico citoplasmático y mitocondrial y ARNm de la globina	48 muestras	20020612
		96 muestras	20020613
Índices		Configuración	N.º de catálogo
TruSeq RNA Single Indexes Set A		12 índices y 48 muestras	20020492
TruSeq RNA Single Indexes Set B		12 índices y 48 muestras	20020493
TruSeq RNA CD Indexes		96 índices y 96 muestras	20019792
IDT para Illumina: TruSeq RNA UD Indexes		24 índices y 96 muestras	20020591
IDT para Illumina: TruSeq RNA UD Indexes		96 índices y 96 muestras	Disponible próximamente

Resumen

El ARNm monocatenario y el ARN total TruSeq proporcionan una visión clara y completa del transcriptoma, lo que permite medir de forma precisa la orientación de la cadena, una cobertura uniforme y una alta fiabilidad en la localización de características, como, por ejemplo, distintas transcripciones, fusiones de genes y expresión específica de alelos. El ARN monocatenario total TruSeq combina todas las ventajas de la preparación de bibliotecas de ARN TruSeq con el proceso químico de reducción de ribosomas Ribo-Zero. Esto proporciona una solución sólida y muy flexible en la preparación de bibliotecas listas para la secuenciación para el análisis completo del transcriptoma. Esta solución es compatible con una amplia variedad de muestras, entre las que se incluyen las muestras no humanas y las muestras FFEP.

Referencias

1. Nagai K, Kohno K, Chiba M, et al. Differential expression profiles of sense and antisense transcripts between HCV-associated hepatocellular carcinoma and corresponding noncancerous liver tissue. *Int J Oncol.* 2012(40):1813-20.
2. Benes V, Blake J, Doyle K. Ribo-Zero Gold Kit: Improved RNA-Seq results after removal of cytoplasmic and mitochondrial ribosomal RNA. *Nat Methods.* 2011(8):10.1038/nmeth.f.352.