

Решения для секвенирования транскриптома

Просто, быстро и экономично

СЕКВЕНИРОВАНИЕ
ТРАНСКРИПТОМА



Ion Torrent™

life
technologies

A Thermo Fisher Scientific Brand



Области применения секвенирования транскриптома

Секвенирование транскриптома позволяет на фундаментальном уровне понять, как устроены и как регулируются геномы, предоставляя информацию о внутреннем состоянии клеток и транскрипционных сетях.

Понимание природы заболевания на уровне транскриптов

Секвенирование нового поколения — это мощный инструмент, который можно использовать для исследования молекулярных механизмов транскрипции генов и изучения человеческого генома принципиально новым способом.

Направления исследований транскриптома

Основными задачами транскриптомных исследований являются:

1. Создание полного каталога транскриптов генома;¹
2. Измерение изменений уровней экспрессии генов и транскриптов во время индивидуального развития и в других переменных условиях;¹
3. Открытие новых химерных транскриптов и изоформ, являющихся результатом альтернативного сплайсинга;
4. Обнаружение биомаркеров.

Транскрипция генов — это сложный динамический процесс, в который вовлечены несколько типов РНК, в том числе короткие РНК, полиаденилированные РНК и неаденилированные транскрипты.

Секвенирование транскриптома является самым

полным и экономичным методом для выявления и количественной оценки РНК, полученной из разнообразных типов образцов. Важным вопросом при использовании секвенирования нового поколения для исследований человеческих заболеваний является выбор между анализом полного транскриптома, набора целевых генов или регуляторных элементов.

Анализ полного транскриптома

Значение секвенирования и анализа полного транскриптома постоянно возрастает, поскольку ведет к пониманию того, насколько большой вклад изменения в экспрессии вносят в развитие сложных заболеваний — таких, как рак, диабет и сердечно-сосудистые заболевания. Анализ дифференциальной экспрессии РНК предоставляет ученым множество данных о механизмах, регулирующих клеточную жизнедеятельность, а также развитие и прогрессию заболеваний.

Беспрецедентная глубина покрытия и гипотезо-нейтральный подход, которые обеспечивает технология высокопроизводительного секвенирования, позволяет выявлять новые транскрибируемые участки, неизвестные ранее варианты альтернативного сплайсинга и малораспространенные химерные транскрипты при анализе кодирующих и некодирующих РНК.

Анализ экспрессии генов

Количественный и дифференциальный анализ экспрессии генов играет фундаментальную роль для многих исследовательских задач, в том числе при анализе регуляции генов, соотношении экспрессии

генов с фенотипом и при изучении метаболических путей клеток. Современные методы профилирования экспрессии генов включают методики, основанные на гибридизации (ДНК-микрочипы) и на амплификации (обратная транскрипция и количественная ПЦР). Однако такие методы не всегда достаточно точны и не позволяют проводить абсолютный количественный анализ, кроме того, процедура анализа усложняется при работе с деградированным материалом — например, с РНК из фиксированных формалином парафинизированных (FFPE) образцов. Секвенирование РНК с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования позволяет получать абсолютные данные по экспрессии генов с высокой точностью, а также выявлять и характеризовать малораспространенные транскрипты даже из FFPE-образцов.

Поиск биомаркеров

Степень покрытия при использовании высокопроизводительного секвенирования позволяет проводить поиск биомаркеров в масштабах всего транскриптома. Выявление участков генома человека, которые могут иметь связь с определенным заболеванием, с помощью детектирования изменений в транскриптоме позволит исследователям определять маркеры, ассоциированные с этим заболеванием. Особенно полезной эта возможность становится при анализе небольших геномных образцов.

Анализ малых РНК

Малые некодирующие РНК можно объединять в разные классы. Они участвуют в таких биологических процессах, как трансляция, сплайсинг РНК и регуляция экспрессии генов. Исследование влияния нарушения регуляции или изменения профиля малых РНК на экспрессию мРНК может дать ключ к пониманию возникновения и развития заболеваний.



Рис. 1. Технологии Ion Torrent™ предоставляют широкий спектр решений задач, связанных с секвенированием РНК — от анализа специфических участков генома или транскриптома до глобальных генетических исследований транскриптома человека.

Выберете правильный прибор и
нужную пропускную способность для
Вашей задачи



Ion Torrent™

Секвенирование для всех

Системы для секвенирования Ion Torrent™ в сочетании с панелями Ion AmpliSeq™ и наборами для выделения РНК и создания библиотек Ambion® обеспечивают надежную процедуру секвенирования, которая сочетает простую подготовку образцов и библиотек с интуитивно понятным анализом данных, а также гибкость по производительности при использовании различных чипов. Это одно из лучших настольных решений для анализа транскриптома. Никакая другая настольная платформа не может обеспечить такую же скорость, простоту рабочего процесса и гибкость по производительности.

В отличие от анализа на ДНК-микрочипах, для которого характерны ограниченная чувствительность и сложный рабочий процесс, секвенирование транскриптома — это метод анализа с более широким линейным количественным динамическим диапазоном с улучшенной чувствительностью на его границах. Гибкие решения, такие как совместимая с FFPE-образцами простая процедура секвенирования целевых транскриптов или секвенирование полного транскриптома для непредвзятого анализа всех транскриптов генома, делают этот быстрый и экономичный подход источником ценных догадок о структуре и регуляции генома.

СОВМЕСТИМОСТЬ С FFPE-ОБРАЗЦАМИ

Обнаружение распространенных и редких транскриптов в фиксированных формалином парафинизированных (FFPE) образцах с использованием всего лишь 10 нг РНК (Рис. 3)

УЛУЧШЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ

Чувствительность, превосходящая ДНК-микрочипы, для обнаружения дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) с высокой корреляцией с результатами проекта MAQC по исследованию контроля качества микрочипов (Рис. 2)



Секвенатор Ion Proton™

Секвенирование полного транскриптома
Секвенирование мРНК



Секвенатор Ion PGM™

Целевое секвенирование РНК

ВЫСОКАЯ СКОРОСТЬ

От образца РНК до профиля экспрессии генов менее чем за 2 дня, с минимальным временем ручного труда (Рис. 4)

ПРОСТОТА АНАЛИЗА

Используйте существующие алгоритмы, созданные для высокопроизводительного секвенирования или ДНК-микрочипов, для простого автоматизированного анализа дифференциальной экспрессии генов



Раскройте весь потенциал ценных образцов с помощью транскриптомных решений Ion AmpliSeq™



Ion Torrent™

Открывайте новые гены

Программное обеспечение Torrent Suite™, в сочетании со специальными плагинами для анализа данных, выдает файлы с данными по экспрессии генов в простом и удобном формате. Вы сможете проводить простой статистический анализ там же или импортировать эти файлы в другие программы, такие как Bioconductor или Partek®, для более многостороннего анализа.



«РНК-секвенирование с системой Ion Proton™ позволило нам быстро обнаружить химерные транскрипты в процессе исследования лейкемии и получить результаты, которые мы не смогли бы обнаружить с помощью технологии ДНК-микрочипов»

АДАМ АМЕУР

КАФЕДРА ИММУНОЛОГИИ, ГЕНЕТИКИ И ПАТОЛОГИИ,
УПСАЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ШВЕЦИЯ

Улучшенные технические характеристики по сравнению с микрочипами

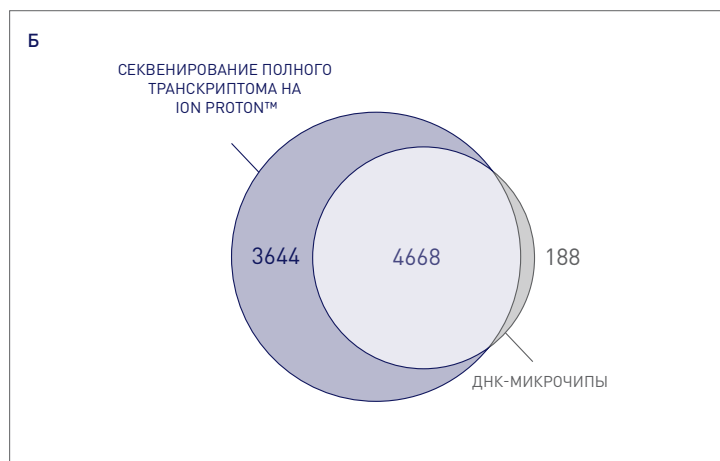
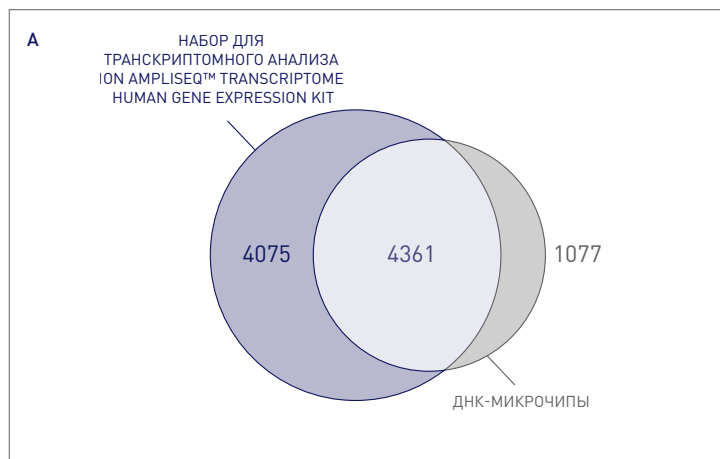


Рис. 2. Обнаружение значимо дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ). На диаграмме Венна показано согласованность списка ДЭГ (изменение в уровне экспрессии между HBRR и UHRR ≥ 2) по данными MAQC (исследование контроля качества микрочипов) с результатами, полученными (А) при помощи Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit (~10 млн картированных прочтений), или (Б) данными по секвенированию полного транскриптома (35 млн прочтений).

Доступный целевой количественный анализ экспрессии генов

Благодаря одновременной амплификации более 20000 RefSeq-генов в одной пробирке, для которой достаточно всего лишь 10 нг тотальной РНК, набор Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit преобразует трансляционные исследования в онкологии по профилированию опухолей и открытию новых биомаркеров.

Подходит для работы с фиксированными формалином парафинизированными образцами



Рис. 3. 10 нг тотальной РНК на образец использовали для приготовления 8 библиотек с штрих-кодами, которые были отсекужены на одном чипе Ion PI™. Показаны (А) результаты секвенирования свежемороженых и FFPE-образцов и (Б) корреляция между повторностями свежемороженых образцов, FFPE повторностями, а также между свежемороженными образцами и FFPE-образцами.

Простая и быстрая процедура

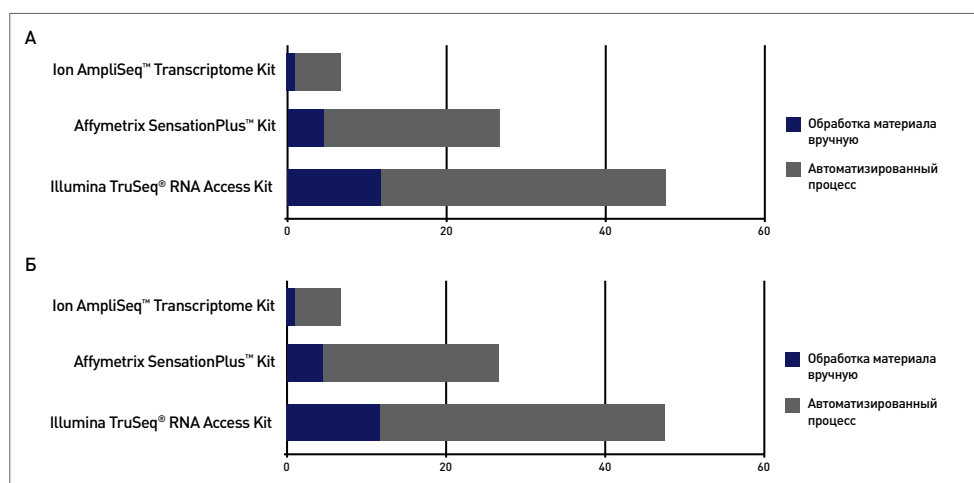


Рис. 4. Сравнение времени ручной обработки материала и полное время эксперимента (в часах). (А) Подготовка библиотеки для высокопроизводительного секвенирования или подготовка образца к гибридизации на ДНК-микрочипе. (Б) Полный рабочий процесс, от образца к файлам с результатами эксперимента.

«Транскриптомная технология Ion AmpliSeq™ — очень полезный инструмент для исследователей, анализирующих образцы с небольшим количеством метариала или FFPE-образцы с помощью РНК-секвенирования. Теперь мы обладаем надежным и эффективным методом создания библиотек для сильно деградированных, небольших или подвергнутых микродиссекции образцов, которые мы не могли раньше анализировать в достаточно эффективной мере».

БРЭД ХЭНКОК

ЛАБОРАТОРИЯ ДОКТОРА МИЛАНА РАДОВИЧА,
КАФЕДРА ХИРУРГИИ МЕДИЦИНСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ИНДИАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА



Важные аспекты исследований транскриптомов

Обогащение РНК

Ключ к успешному секвенированию транскриптома — обогащение образца РНК, дающее достаточное количество и качество РНК для создания библиотеки. Подход к обогащению РНК зависит от задачи исследования и доступного количества РНК (Таблица 1).

Удаление рРНК

Рибосомальная РНК составляет более 80% totalной РНК. Эффективное удаление рРНК — важнейший этап для обеспечения высокого качества секвенирования полного транскриптома, поскольку он повышает покрытие как кодирующих, так и некодирующих РНК и усиливается чувствительность обнаружения редких транскриптов. Набор RiboMinus™ Eukaryote System v2 предоставляет эффективный и надежный метод для удаления цитоплазматической рРНК (5S, 5.8S, 18S и 28S) и митохондриальной рРНК (12S и 16S) из 1–5 мкг totalной РНК за один раунд истощения. Система использует зонды, комплементарные высококонсервативным участкам рРНК, что позволяет использовать ее с образцами РНК, полученными из разных эукариот, таких как человек, мышь или крыса. Набор Low Input RiboMinus™ Eukaryote System v2 превосходит предыдущую систему, удаляя гораздо больше рРНК, и позволяет работать с минимальными количествами (100 нг) totalной РНК.

Обогащение мРНК

Для того, чтобы отделить белок-кодирующие РНК от некодирующих, используется поли(А)-хвост, имеющийся на 3'-конце мРНК. Набор Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit, использующий эту особенность мРНК, менее чем за час выделяет мРНК из

totalной РНК с помощью магнитных частиц, покрытых олиго(dT). Использование этого набора для обработки totalной РНК является надежным и быстрым методом обогащения поли(А)+ РНК с минимальными примесями рРНК.

Обогащение с помощью ПЦР

Благодаря простой и эффективной технологии Ion AmpliSeq™, набор для транскриптомного анализа Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit и РНК-панели Ion AmpliSeq™ требуют менее 10 нг totalной РНК для обратной транскрипции и последующей ультрапроизводительной мультиплексной ПЦР для амплификации целевых транскриптов. Панель для транскриптомного анализа экспрессии генов человека Ion AmpliSeq™ позволяет анализировать >20,000 транскриптов RefSeq, причем время ручного труда составляет всего 1 час. Кроме того, сделанные на заказ с помощью бесплатного онлайн-инструмента Ion AmpliSeq™ Designer РНК-панели Ion AmpliSeq™ позволяют исследовать до 1200 транскриптов в одной пробирке.

Сохранение информации о полярности цепи в РНК

Транскрибированная РНК имеет направление, поскольку каждый РНК-транскрипт синтезирован на матрице одной из двух (+ или -) цепей геномной ДНК. Сохранение информации о полярности цепи позволяет лучше понять регуляцию транскрипции, потенциальные роли смысловой и антисмысловой транскрипции, а также исследовать сложные случаи перекрывающейся транскрипции. РНК-зависимые подавление и активация экспрессии часто зависят от последовательности, поэтому знание о полярности цепи позволяет более точно предсказывать их мишени.

Перейти от данных секвенирования к научной интерпретации теперь можно быстро и без затруднений, благодаря мощным инструментам для статистического анализа и визуализации, интуитивно понятному пользовательскому интерфейсу и рабочим алгоритмам, разработанным специально для людей с биологическим типом мышления.

При создании РНК-библиотек с помощью технологии Ambion®, направленное присоединение адаптеров позволяет сохранять информацию о полярности цепи. В результате картированные прочтения выравниваются с учетом направления транскрипции относительно цепи ДНК, что позволяет глубже исследовать структуру и уровни экспрессии транскрипта, а также открывать новые транскрибируемые участки.

Необходимое покрытие

Каждый эксперимент по анализу транскриптома требует определенной глубины в зависимости от характера задачи. Если целью эксперимента является изучение профиля экспрессии поли(A)+ РНК, то для такого анализа требуется невысокая глубина секвенирования. Если целью является обнаружение новых транскриптов или малораспространенных транскриптов, количество необходимых прочтений возрастает.

«Умная биоинформатика»

Простота использования систем Ion Torrent™ для секвенирования особенно обеспечивается благодаря заранее установленному простому в эксплуатации программному обеспечению Torrent Suite™, которое работает на сервере Torrent Server. Torrent Suite™

автоматизирует процесс анализа, позволяя вам быстро получать из «сырых» данных высококачественные прочтения и выравнивания. Помимо этого, в пакет программ Torrent Suite™ также входит браузер Torrent Browser: веб-интерфейс для планирования, мониторинга и просмотра результатов запусков секвенирования. Всевозможные плагины, предоставляемые программным обеспечением Torrent Suite™ и Ion Community, позволяют проводить широкий спектр дополнительных анализов.

При секвенировании полного транскриптома и мРНК программное обеспечение Torrent Suite™ автоматически предоставляет прочтения в пригодном для экспортирования формате BAM. Впоследствии их можно использовать в других программах, таких как Partek® Flow®, для выравнивания прочтений, проведения подсчета количества транскриптов и дифференциального анализа экспрессии генов в нескольких образцах.

Для целевого секвенирования транскриптов специальный плагин для Torrent Suite™ позволяет проводить дополнительный анализ данных. Итоговые файлы можно использовать для простого статистического анализа или импортировать в программы для более глубокого дальнейшего анализа, таких как Bioconductor и Partek® Genomics Suite®.

Таблица 1. Рекомендуемые продукты для обогащения.

Задача исследования	Количество образца	Обогащение РНК	Продукты
Whole transcriptome RNA-Seq	100 нг–5 мкг	Селективное удаление рибосомальной РНК из тотальной РНК	RiboMinus™ Eukaryote System
Секвенирование мРНК	100 нг–1 мкг	Обогащение мРНК из тотальной РНК	Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit
Таргетное секвенирование РНК	10 нг	Ультра-мультиплексная ПЦР	Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit
	500 пкг–5 нг	Высоко-мультиплексная ПЦР	Ion AmpliSeq™ RNA Cancer Panel
	500 пкг–5 нг	Высоко-мультиплексная ПЦР	Ion AmpliSeq™ RNA Apoptosis Panel
	500 пкг–5 нг	Высоко-мультиплексная ПЦР	Ion AmpliSeq™ RNA Custom Panel

Присоединяйтесь к мировому сообществу разработчиков Ion Torrent™ на сайте lifetechnologies.com/ioncommunity



Рабочий процесс для секвенирования транскриптома

Решения для анализа транскриптома Ion Torrent™ включают налаженный процесс подготовки образцов и специфичный для конкретной задачи анализ данных, тем самым обеспечивая самую низкую стоимость за образец на настольном секвенаторе. Сочетание доступной цены прибора и масштабируемости чипов позволяет вам легко проводить секвенирование транскриптома в ходе исследований образцов разного размера или экспериментов по выявлению редких транскриптов или типов РНК, требующих тщательного подбора условий.

Мы предлагаем полный набор решений для секвенирования транскриптома, которые вы легко сможете использовать — благодаря быстрому рабочему процессу, позволяющему переходить от РНК к количественным данным по экспрессии генов менее чем за 2 дня. Программное обеспечение Torrent Suite™ автоматически предоставляет прочтения в формате, который можно использовать в других программах для удобного анализа и быстрой интерпретации данных.



Выбор мишеней

ЗАДАЧА ИССЛЕДОВАНИЯ

ПРОДУКТЫ

Секвенирование полного транскриптома (с удалением рРНК)

Low Input RiboMinus™ Eukaryote System v2

или

RiboMinus™ Eukaryote System v2

мРНК-секвенирование (селекция поли(A)+ РНК)

Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit

Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit





Целевое РНК-секвенирование

Ion AmpliSeq™ RNA Cancer Panel

Ion AmpliSeq™ RNA Apoptosis Panel

Ion AmpliSeq™ RNA Custom Panel

Сообщество Ion Community позволяет пользователям открыто обмениваться методами и данными для оценки технологии и ее развития. Мы открыли доступ к нашим протоколам, наборам данных и исходным кодам программ, чтобы сообщество пользователей могло развивать нашу технологию.

 <p>Создание библиотеки</p>	 <p>Подготовка матрицы</p>	 <p>Секвенирование</p>	 <p>Анализ данных</p>
<p>Ion Total RNA-Seq Kit v2 ИЛИ Ion Total RNA-Seq Kit для автоматической подготовки с системой AB Library Builder™ Опционально Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode 1-16 Kit</p>	<p>Система Ion OneTouch™ 2 И Ion PI™ Template OT2 200 Kit или Система Ion Chef™ И Ion PI™ IC 200 Kit</p>	<p>Секвенатор Ion Proton™ И Ion PI™ Sequencing 200 Kit И Ion PI™ Chip Kit</p>	<p>ПО Torrent Suite™ И ПО Partek® Flow®</p>
<p>Ion AmpliSeq™ Library Plus Kit Опционально Multiplexed sequencing Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit</p>			<p>ПО Torrent Suite™ И Плагин AmpliSeqRNA И ПО Partek® или пакет программ Bioconductor</p>
<p>Ion AmpliSeq™ RNA Library Kit Опционально Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit</p>	<p>Система Ion Chef™ И Ion PGM™ IC 200 Kit или Система Ion OneTouch™ 2 И Ion PGM™ Template OT2 200 Kit</p>	<p>Система Ion Personal Genome Machine® (PGM™) И Ion 318™ Chip Kit v2 BC</p>	<p>ПО Torrent Suite™ и плагин Coverage Analysis</p>

Секвенирование транскриптома с системами для секвенирования Ion Torrent™

Подходит для работы с FFPE-образцами

Выявление распространенных и редких транскриптов в FFPE-образцах с использованием всего лишь 10 нг исходной РНК с помощью процедуры анализа транскриптома Ion AmpliSeq™.

Быстрый рабочий процесс

От РНК до количественных данных менее чем за 2 дня без лишнего ожидания большого количества образцов.

Простой анализ

Используйте Torrent Suite™ и соответствующие плагины или существующие алгоритмы анализа данных высокопроизводительного секвенирования или ДНК-микрочипов для удобного автоматизированного анализа дифференциальной экспрессии генов.

Улучшенные технические характеристики

Чувствительность, превосходящая ДНК-микрочипы, для обнаружения дифференциально экспрессируемых генов с высокой корреляцией с MAQC-данными, полученными на микрочипах и с помощью кПЦР.

Гибкость

Исследуйте профили дифференциальной экспрессии генов и открывайте новые биомаркеры с помощью единой мощной платформы для секвенирования.

Цитируемая литература

1. Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63

Узнайте больше о транскриптомном секвенировании
с системой Ion Proton™ на сайте
lifetechnologies.com/iontranscriptome

