

# SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット

## 作業を簡素化する、RNA-seq/DNA-seq の 並行ワークフロー

### 主な特長

- キットのモジュール構成により RNA/DNA を並行して作業可能
- FFPE サンプルを含む、少量の total RNA から質の高いストランド特異性のあるライブラリを作製
- 効率化されたワークフローで短いターンアラウンドタイム
- ライブラリの高い複雑性と低い duplication 率で優れた性能
- サンプル数を最大化し、インデックスホッピングを最小化する 384 種の unique dual index (UDI)
- 分子バーコード (MBC) を用いた正確な遺伝子発現解析
- オプションの分子バーコードなしアダプタでシーケンスアウトプットを向上
- ファスト・ハイブリダイゼーションとオーバーナイト・ハイブリダイゼーションのワークフローオプションでワークシフトの柔軟性が向上
- SureSelect エクソームパネルや SureDesign ソフトウェアで作製したカスタム NGS パネルを使用可能

### 概要

アジレントの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットは、ターゲット RNA-Seq の先進的なソリューションです。がんのトランスレーショナル研究で重要なサンプルタイプである、低インプット量のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルに最適化されています。効率化されたワークフローと、90 分のハイブリダイゼーションにより、市場のキットの中で最もターンアラウンドタイムが短い (1 日または 2 日) もののひとつとなりました。オーバーナイト・ハイブリダイゼーションによる 2 日のワークフローはワークシフトにさらなる柔軟性をもたらします。384 種の Unique dual index (UDI) によりインデックスホッピングの影響を最小限に抑えながら、数百ものサンプルを 1 回のシーケンスランに含めることでコストを抑えることができます。

SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットは安定したパフォーマンスでライブラリの複雑性が高く、高い感度で低発現の遺伝子を検出可能です。ライブラリに組み入れられた分子バーコードにより、PCR duplicate を除去し (PCR duplicate でないリードは保持)、とくにインプット量の少ないサンプルで安定した正確な遺伝子発現データを出すことができます。また、オプションの分子バーコードなしアダプタはより多くのシーケンスアウトプットを得るためのオプションとして使用可能です。ビーズ、品質確認、自動化、解析までのアジレントの一貫したソリューションにより、単一ベンダーで購入からサポートまで提供します。

## 作業をシンプルにする DNA、RNA のパラレルなワークフロー

SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットはモジュール構成になっており、必要な NGS プロトコルに合わせて柔軟に選択いただけます。アダプタライゲーションのステップ以降は、DNA 用試薬の SureSelect XT HS2 DNA 試薬キットと同じワークフローになります (図 1A)。どちらのキットも同じ XT HS2 ケミストリで作られているので、サンプルのタイプやインプット量にあわせて異なるキットを最適化する必要はありません。SureSelect ターゲット RNA-seq に加えて、poly-A セレクションによる SureSelect mRNA ライブラリ調製キットも販売しています。こちらのキットも XT HS2 キットと同じモジュール構成で、効率よくフレキシブルなワークフローを実現可能です (図 1B)。

## 最も重要なところにフォーカス

RNA はバイオマーカー探索の次なるフロンティアであり、FFPE サンプルは機能的なバリデーション研究に重要なサンプルタイプです。しかし、FFPE サンプルは固定のプロセスでの分解により RNA の品質が低下しており、全トランスクリプトーム解析や mRNA-Seq 解析がより難しいとされています。

ターゲット RNA-Seq は、このような扱いの難しいサンプルから情報を引き出すための効率的で経済的な方法です。この手法ではターゲットとしている遺伝子に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションを用いて、対象となる遺伝子のみをキャプチャすることが可能です。対象遺伝子のコーディング領域上にマップされるリードの割合が有意に高く (図 2)、全トランスクリプトーム解析や mRNA-Seq との高い相関性も維持されます (表 1)。特定の領域のリードにフォーカスすることでより深いカバレッジを得ることが可能で、融合トランスクリプトを高い感度で検出することができます (図 3)。

## SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットの優れたパフォーマンス

ライブラリの複雑性は、RNA-Seq ライブラリの品質を評価するうえで重要な評価項目です。ライブラリの複雑性が高ければより多くの RNA 分子を捉えていると考えることができ、遺伝子発現解析や RNA fusion 解析の正確性が高まると考えられます。また、複雑性の高いライブラリは免疫腫瘍学のようなアプリケーションで重要となる、低発現のトランスクリプトを検出できる可能性が高くなります。

SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットによるライブラリは高品質な RNA でも FFPE サンプル由来の RNA でも、他社製品で作製されたライブラリよりも高い複雑性を示します (図 4a)。

また Duplicate 率が低く (図 4b)、rRNA のキャリーオーバーが少ない (図 4c) ため、情報の得られないリードを省きより多くのシーケンズリードを有効に解析することができます。エクソン領域の割合が高く、イントロン領域の割合が低いことから、SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットのハイブリダイゼーション効率が高いことが示唆されます (図 4d)。

Duplication 除去は低インプット量の場合や Deep sequence を行った場合に重要な解析ステップです。リードの染色体上でのスタート・ストップ位置を利用した通常の duplication 除去法と比較して、分子バーコードを利用した duplication 除去は、PCR duplicate ではないリードを除去することがなく、より正確なデータを得ることができます。図 4a および 4c からは、染色体上でのスタート・ストップ位置を利用した duplication 除去と比較して、分子バーコードを利用した duplication 除去により duplication 率が大幅に低下し、ライブラリ複雑性が向上していることがわかります。

## 分子バーコードを利用したより正確な遺伝子発現プロファイル

分子バーコードは短いランダムな DNA 配列で、ライゲーションのステップで NGS ライブラリに組み込まれ、NGS データの強力な QC ツールとなります。もし 2 つ以上のリードが同じ分子バーコードを持っていれば、それらのリードは PCR に由来する duplicate であると判断して除去することが可能で、より信頼性が高く感度の高い結果を得ることができます。

分子バーコードは DNA シークエンスでは広く利用されており、とくにアレル頻度の低い変異をより正確に検出するために活用されています。RNA シークエンスにおける分子バーコードの利用は比較的新しい方法ですが、真の PCR duplicate を分子バーコードにより除去することで遺伝子発現解析の正確性を向上できるという証拠が積みあがってきています。この特長は、少ないインプット量や品質の低いサンプルではより重要となります。

ゲノムの位置情報のみを使う duplication 除去では、たまたま同じスタート・ストップを持つリードも除去してしましますが、分子バーコードを用いた duplication 除去は真の PCR duplicate のみを除去することが可能です。このことにより、とくに低発現遺伝子の解析で再現性が向上する効果が期待できます。アジレントのデータでは、分子バーコードを用いた duplication 除去により、duplication 除去なし ( $R^2=0.92$ ) あるいはゲノムの位置情報による duplication 除去 ( $R^2=0.88$ ) と比較して、発現レベルの観測値と期待値の高い相関 ( $R^2=0.93$ ) が得られることを示しています (図 5)。さらに、duplication 除去なしでは全般的に発現値が高く見積もられ (図 5b)、ゲノム位置情報による duplication 除去では高発現領域で発現値が低く見積もられる (図 5c) 傾向があることがわかりました。

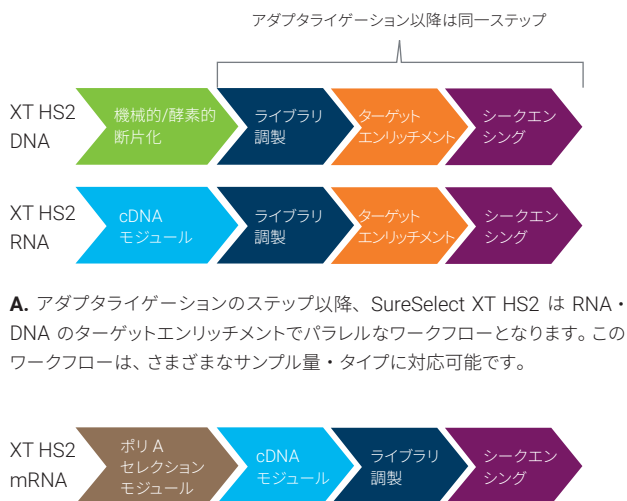


図 1. XT HS2 のフレキシブルなモジュール構成

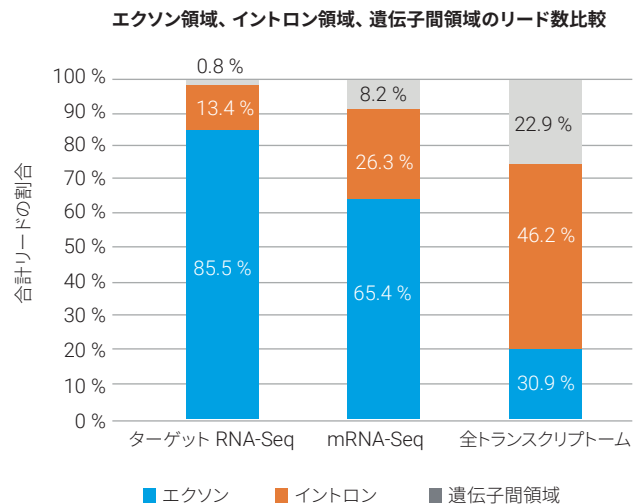


図 2. ターゲット RNA-Seq により遺伝子発現・遺伝子融合を効果的・経済的に検出

肺癌の FFPE サンプル由来の totalRNA (DV200 = 45%) を 100 ng 使用し、ターゲット RNA-Seq はアジレントの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットおよび SureSelect Human All Exon V7 キャプチャライブラリを用いて行いました。mRNA-Seq は、SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製試薬キットを用いて行いました。全トランスクリプトームシーケンスは RiboMinus (Thermo Fisher Scientific 社) と SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製試薬キットを用いて行いました。それぞれのライブラリは、イルミナ社の HiSeq 4000 システムで 2x150 bp でシーケンスし、リード数を 20M にノーマライズしました。ターゲット RNA-Seq ライブラリは、全トランスクリプトームおよび mRNA-Seq と比較して、エクソン領域のリード数が有意に増加しました。

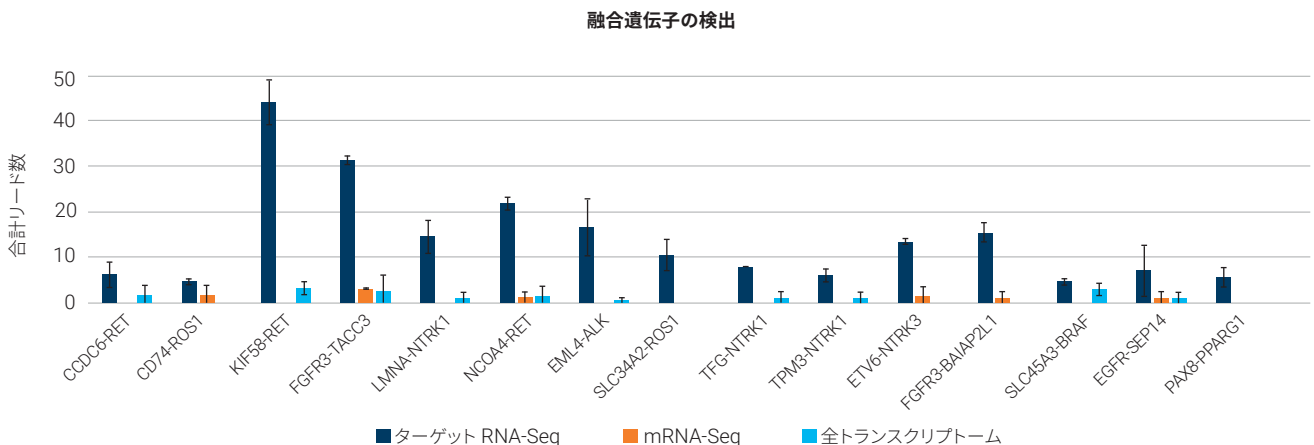


図 3. ターゲット RNA-Seq はより確実に融合遺伝子を検出可能

SeraSeq FFPE Tumor Fusion RNA v4 Reference Material (型番 0710-0496、SeraCare 社) から抽出した total RNA 100 ng を使用し、各ライブラリは 2 レプリケートで作製しました。ターゲット RNA-Seq のライブラリ構築およびターゲットエンリッチメントには、アジレントの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットと SureSelect Human All Exon V7 キャプチャライブラリを使用しました。mRNA-Seq のライブラリには SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製試薬キットを用いて調製しました。全トランスクリプトームのライブラリには RiboMinus (Thermo Fisher Scientific 社) および SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製試薬キットを使用しました。各ライブラリはイルミナ社の HiSeq 4000 システムで 2x150 bp でシーケンスを行い、リード数を 50M にノーマライズして解析を行いました。ターゲット RNA-Seq は、全トランスクリプトーム、mRNA-Seq と比較して、安定して融合遺伝子のリードが多数得られました。

表 1. ターゲット RNA-Seq 発現プロファイルは、全トランスクリプトーム、mRNA-Seq と高い相関を示す

		ターゲット RNA-Seq		mRNA-Seq		全トランスクリプトーム	
		サンプル 1	サンプル 2	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 1	サンプル 2
ターゲット RNA-Seq	サンプル 1						
	サンプル 2	0.98					
mRNA-Seq	サンプル 1	0.87	0.87				
	サンプル 2	0.87	0.87	0.98			
全トランスクリプトーム	サンプル 1	0.9	0.9	0.91	0.91		
	サンプル 2	0.9	0.9	0.91	0.91	0.98	

表は R<sup>2</sup> 値を示しています。乳癌の新鮮凍結サンプル由来の total RNA (DV200 = 95%) 100 ng を使用し、各ライブラリは 2 レプリケートで作製しました。ターゲット RNA-Seq のライブラリ構築およびターゲットエンリッチメントには、アジレントの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットと SureSelect Human All Exon V7 キャプチャライブラリを使用しました。mRNA-Seq のライブラリには SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製試薬キットを使用しました。全トランスクリプトームのライブラリには RiboMinus (Thermo Fisher Scientific) および SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製試薬キットを使用しました。各ライブラリは、イルミナ社の HiSeq 4000 システムで 2x150 bp でシーケンスを行い、リード数を 20M にノーマライズしました。3 種の手法間でオーバーラップする領域を対象として相関解析を行いました。ターゲット RNA-Seq ライブラリは、全トランスクリプトーム、mRNA-Seq のどちらも高い相関を示しました。

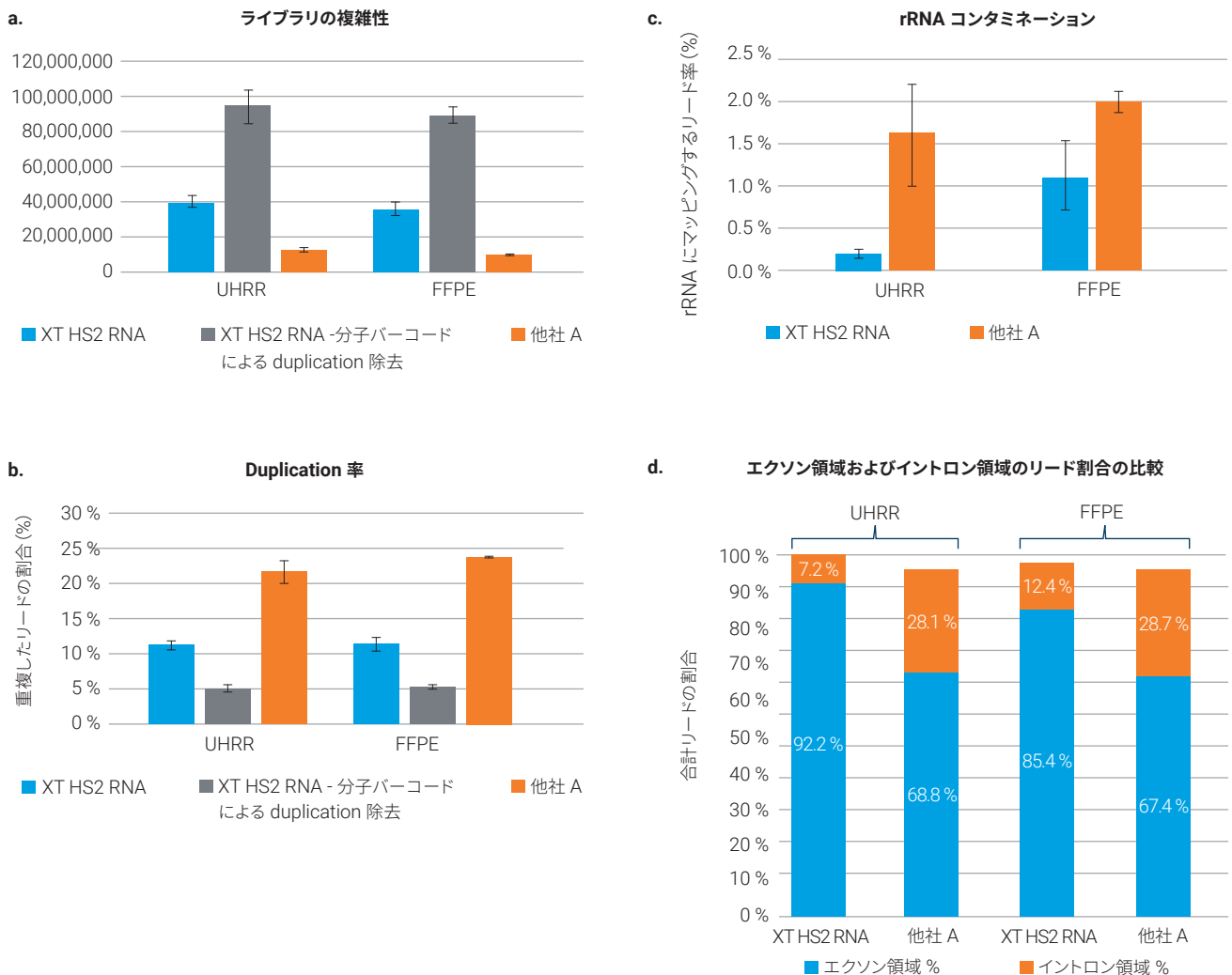


図 4. SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットのすぐれたパフォーマンス

アジレントの Universal Human Reference RNA (UHRR) または SeraCare 社の FFPE Tumor Fusion RNA Reference Material v2 (FFPE) の total RNA 100 ng を使用し、各ライブラリは 2 レプリケートで作製しました。ターゲット RNA-seq のライブラリ構築、ターゲットエンリッチメントにはアジレントの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットと SureSelect Human All Exon V7 キャプチャライブラリを使用しました。A 社製品については、ライブラリ構築およびターゲットエンリッチメントに、A 社の RNA Exome キットを使用しました。ライブラリはイルミナ社の HiSeq 4000 システムで 2x150 bp でシーケンスを行いました。SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットで調製したライブラリについては、ゲノムの位置情報による duplication 除去と、分子バーコードの情報を利用した duplication 除去の双方で解析を行いました。A 社製品には分子バーコードが付加されていないので、ゲノムの位置情報による duplication 除去のみを行いました。リード数は 20M にノーマライズし、以降の解析を行いました。(次ページへ続く)

(図 4 の説明続き)

SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットで調製したライブラリは A 社キットで調製したライブラリと比較して、どの duplication 除去条件でも有意に高いライブラリ複雑性 (パネル a) および低い duplication 排除率 (パネル b) を示しました。また、SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットは A 社キットと比較して rRNA コンタミネーション率が低く、on-target 率が高く (エクソン領域にマップする率が高く)、全体的にすぐれたパフォーマンスを示しました。

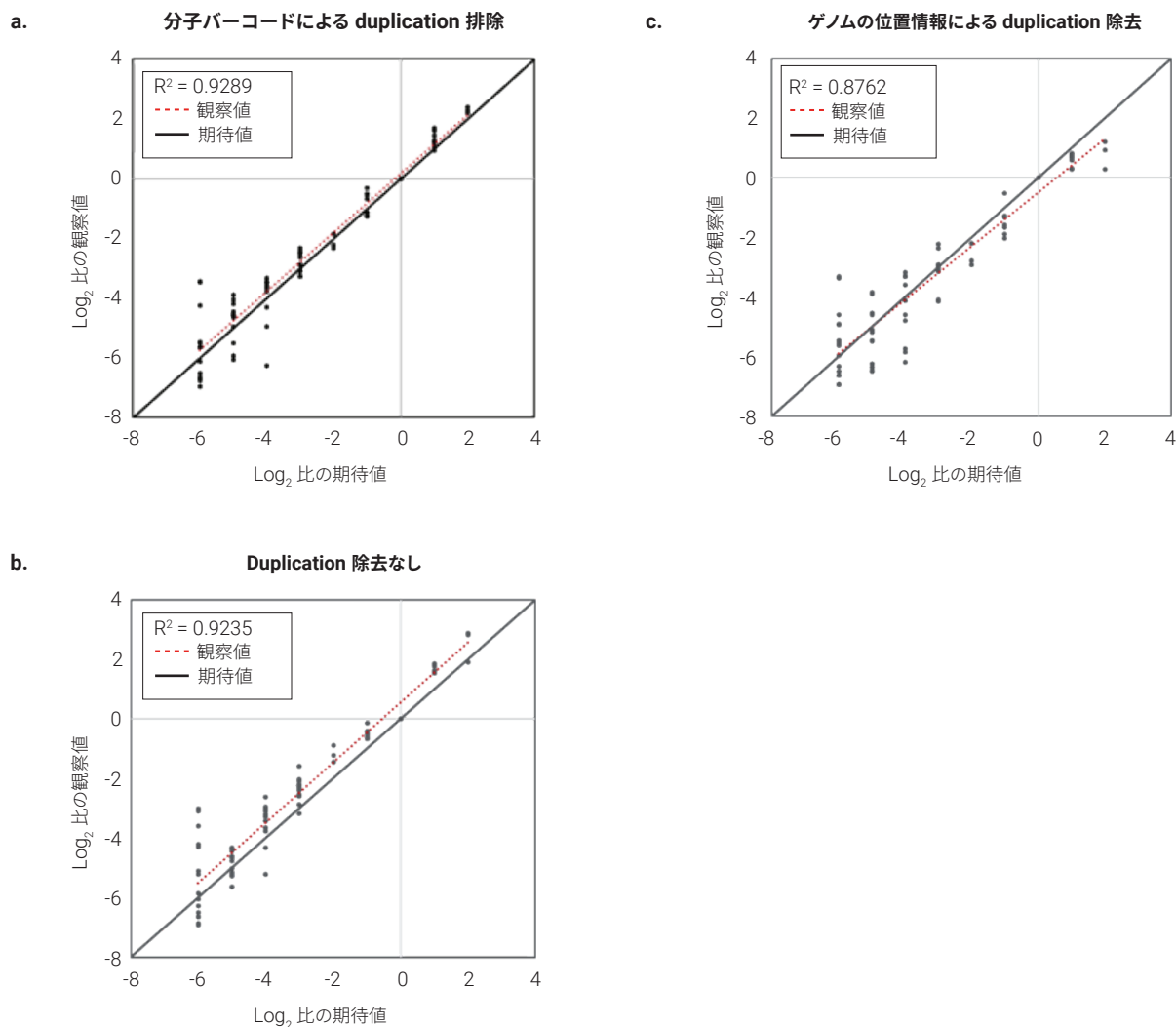


図 5. 分子バーコードを用いた duplication 除去による、遺伝子発現プロファイルの正確性の向上

アジレントの Universal Human Reference RNA (UHRR) に 10,000 倍希釈した ERCC RNA Spike-In Mix (Thermo Fisher Scientific 社) を混合しました。10 ng の total RNA をインプットとして使用し、アジレントの SureSelect XT HS2 RNA 試薬キットと SureSelect Human All Exon V7 キャプチャライブラリを用い、トリプリケートでライブラリを作製しました。ライブラリは、イルミナ社の HiSeq 4000 システムでシーケンシングを行いました (2 × 150 bp)。26 種の ERCC 分子 (> 100 attomoles/μL) のデータを以降の解析に使用しました。これらの ERCC 分子の発現レベルは、ERCC-0004 (転写産物 ID DQ516752) でノーマライズしました。リード数は 1M にノーマライズして解析に用いました。

分子バーコードによる duplication 除去 (パネル a) は、duplication 除去なし (パネル b)、ゲノムの位置情報による duplication 除去 (パネル c) と比較し、観察値と期待値の相関が高いという結果が得られました。

## 製品仕様

SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット	ファスト・ハイブリダイゼーション	オーバーナイト・ハイブリダイゼーション
アプリケーション	ターゲット RNA-Seq	
インプット	10 ~ 200 ng の total RNA	
サンプルタイプ	FFPE、新鮮凍結および血液	
ストランド特異性	対応	
ターンアラウンドタイム	11 時間	2日
ハイブリダイゼーション時間	90 分	16時間
多サンプル処理	384 種の Unique dual index (UDI)	
分子バーコード	対応 (選択可能)	
自動化対応	対応 (Bravo)	

## オーダー情報

ターゲット RNA-Seq	
製品名	型番
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (index primer pairs 1-16), 16 反応	G9989A
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (AMPure XP/ストレプトアビジンビーズおよび index primer pairs 1-16), 16 反応	G9990A
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (index primer pairs 1-96), 96 反応	G9991A
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (index primer pairs 97-192), 96 反応	G9991B
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (index primer pairs 193-288), 96 反応	G9991C
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (index primer pairs 289-384), 96 反応	G9991D
SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット (分子バーコードなし, index primer pairs 1-96), 96 反応	G9956A
SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット (分子バーコードなし, index primer pairs 97-192), 96 反応	G9956B
SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット (分子バーコードなし, index primer pairs 193-288), 96 反応	G9956C
SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キット (分子バーコードなし, index primer pairs 289-384), 96 反応	G9956D
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (AMPure XP/ストレプトアビジンビーズおよび index primer pairs 1-96), 96 反応	G9992A
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (AMPure XP/ストレプトアビジンビーズおよび index primer pairs 97-192), 96 反応	G9992B
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (AMPure XP/ストレプトアビジンビーズおよび index primer pairs 193-288), 96 反応	G9992C
SureSelect XT HS2 RNA 試薬キット (AMPure XP/ストレプトアビジンビーズおよび index primer pairs 289-384), 96 反応	G9992D
SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 1-96), 96 反応	G9993A
SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 97-192), 96 反応	G9993B
SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 193-288), 96 反応	G9993C
SureSelect XT HS2 RNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 289-384), 96 反応	G9993D
SureSelect XT HS2 RNA ターゲットエンリッチメントキット, 12 ハイブリダイゼーション	G9994A
SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントキット, 96 ハイブリダイゼーション	G9987B
SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントキット, オーバーナイト・ハイブリダイゼーション, 12 ハイブリダイゼーション	G9957A
SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントキット, オーバーナイト・ハイブリダイゼーション, 96 ハイブリダイゼーション	G9957B

mRNA-Seq	
製品概要	型番
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 1-16), 16 反応	G9995A
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure XP ビーズおよび index primer pairs 1-16), 16 反応	G9996A
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 1-96), 96 反応	G9997A
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 97-192), 96 反応	G9997B
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 193-288), 96 反応	G9997C
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (index primer pairs 289-384), 96 反応	G9997D
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure XP ビーズおよび index primer pairs 1-96), 96 反応	G9998A
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure XP ビーズおよび index primer pairs 97-192), 96 反応	G9998B
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure XP ビーズおよび index primer pairs 193-288), 96 反応	G9998C
SureSelect XT HS2 mRNA ライブラリ調製キット (AMPure XP ビーズおよび index primer pairs 289-384), 96 反応	G9998D

### [お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社  
 本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1  
 ●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111  
 mail : email\_japan@agilent.com  
 ※仕様は予告なく変更する場合があります。  
 ※本資料掲載の製品はすべて研究用です。  
 診断目的にご利用いただくことはできません。

G230572

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2023

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、  
 改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、  
 法律で禁止されています。

Printed in Japan, June 1, 2023

5994-2314JAJP



[www.agilent.co.jp/chem/XTHS2RNA](http://www.agilent.co.jp/chem/XTHS2RNA)

