

# 文库制备中如何保持链特异性

## 概述

- 使用Invitrogen™ Collibri™链特异性RNA文库制备试剂盒(用于Illumina平台)可获得链特异性>98%的测序文库
- 由于链特异性测序结果的高准确度, Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒增强了研究遗传等位基因分配的信心

## 简介

RNA测序(RNA-Seq)数据对于理解疾病发作和发展的重要性日益增加。在过去的几年中, RNA-Seq已成为了解基因表达和基因表达谱动态变化的首选方法。能否检测出基因组的哪条链编码基因转录本, 以及区分在基因组相反链上的两个不同等位基因, 变得非常有价值。链特异性RNA-Seq已被证明比其他方法能更准确地定量诸多基因的表达水平[1]; 很少有方法能像RNA-Seq这样, 可提供链特异性、基因选择性剪接和基因融合的详细和量化数据。

尽管RNA-Seq已经在疾病分子基础研究中非常流行, 但过程中仍然具有挑战。制备测序用RNA样品的流程取决于实验的目标。目前主要有两种主要方法, 一种基于全转录组RNA, 另一种基于样品中的信使RNA(mRNA)。如果需要进行全转录组RNA-Seq, 则在适当的实验条件下从诸如组织、细胞培养物或血液样品中收集RNA, 并且去除诸如核糖体RNA(rRNA)这样的冗余序列。如果选择mRNA测序, 则使用oligo(dT)富集选择poly(A) mRNA。去除rRNA或者分选出mRNA后, 再将所得RNA制备为测序文库(图1)。

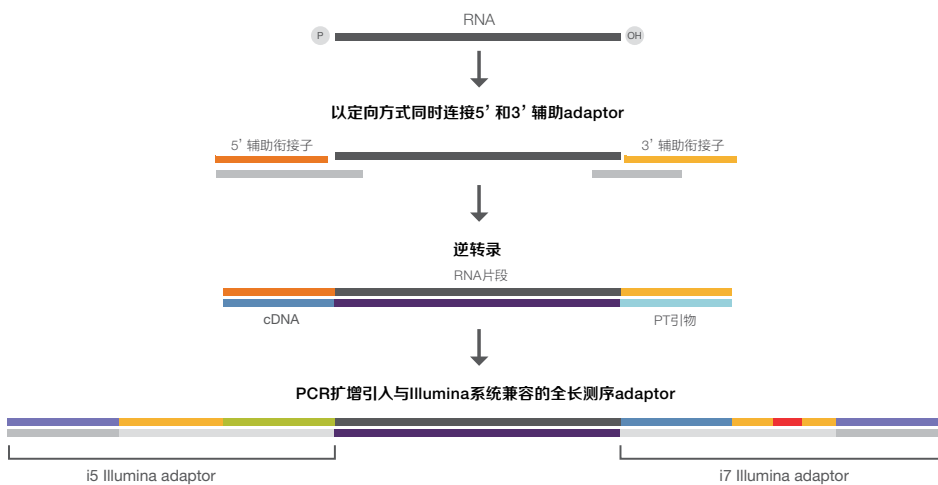


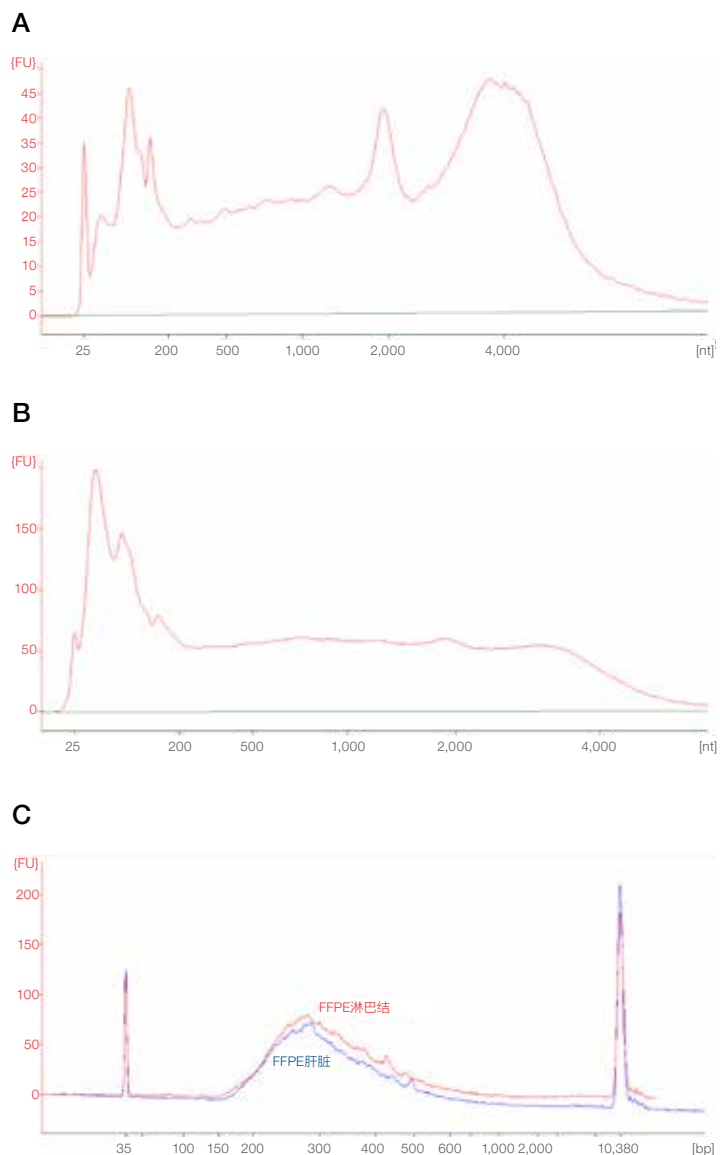
图1. Collibri文库制备方案是直接从小RNA而不是cDNA中制备文库, 这样可以更准确地表征样品的复杂性。

在完成样本收集及相关步骤后,使用Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒(用于Illumina平台)开始进行RNA的酶促片段化以产生适于文库制备的片段。RNA样品在片段化后与辅助adaptor混合物杂交,这种混合物含有一组RNA/DNA寡核苷酸,其一端具有单链简并序列,另一端为确定的序列。然后将连接酶预混液加入上述混合物中以连接杂交的adaptor。接下来,将连接有adaptor的RNA片段以定向方式逆转录成cDNA。然后以辅助adaptor序列作为引物结合位点进行PCR文库扩增。由此,在构建的单index、可即时测序的文库中便拥有与Illumina™系统兼容的全长adaptor,此文库可适用于单端测序或者双端测序。经优化的纯化步骤可有效去除残留的引物和adaptor二聚体,同时保持较高的文库产量。

## 方法

RNA-Seq文库制备样本来自于Agilent™ Universal Human Reference RNA (UHRR)以及来自肝脏和淋巴结的福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织。FFPE样本受知情同意的欧洲注册机构担保。FFPE材料由于高度降解,导致肝脏和淋巴组织的RNA完整性指数 (RIN) 分别为3.1和2.4 (图2)。根据制造商的方案,使用Collibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina (图1)、KAPA™ RNA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR)以及Illumina™ TruSeq™ Stranded Total RNA Library Prep Gold Kit制备这些样品。所有文库测序均在Illumina™ HiSeq™ 4000系统上进行。

使用Illumina™ bcl2fastq2 Conversion Software v2.19对得到的文库进行信号分离,并使用bbduk v.37.90整理和筛选工具进行数据整理。使用seqtk v1.0-r31 sequence processing toolkit,分别对UHRR样品的47 million reads和FFPE样品的62 million reads进行下采样。使用STAR v2.5.3a软件,启用嵌合读取检测,完成数据的比对;其他所有参数是默认选项。使用hg19参考基因组搭配Invitrogen™ External RNA Controls Consortium (ERCC) spike-in control序列完成序列的对齐,通过ENCODE project进行注释。使用QoRTs v1.1.8 program完成质量测量并测定每个基因的reads数。使用RSeQC package v2.6.4分析内含子、外显子和核糖体部分的reads分布。最后,使用DESeq2 package v1.16检测差异基因表达。



**图2. 使用Agilent Bioanalyzer分析检测高度降解的FFPE RNA, 以及使用Collibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina制备的文库。** (A) FFPE肝脏RNA (RIN为3.1)、(B) FFPE淋巴组织RNA (RIN为2.4) 和 (C) 使用Collibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina制备的文库。在上样到Bioanalyzer系统之前,文库经3倍稀释。

## 结果

总RNA-Seq文库从UHRR或FFPE样品中制备, 并通过生物信息学方法检测链特异性reads的百分比(图3, 图A和B)。使用Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒, 超过98%的测序reads能够对齐到相应的RNA链, 即使是从高度降解的FFPE样品制备的文库。

Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒中的辅助adaptor直接结合至RNA, 因此read one (R1)反映原始RNA模板链, read two (R2)反映互补链。常见分析工具中检测链特异性reads的参数包括:

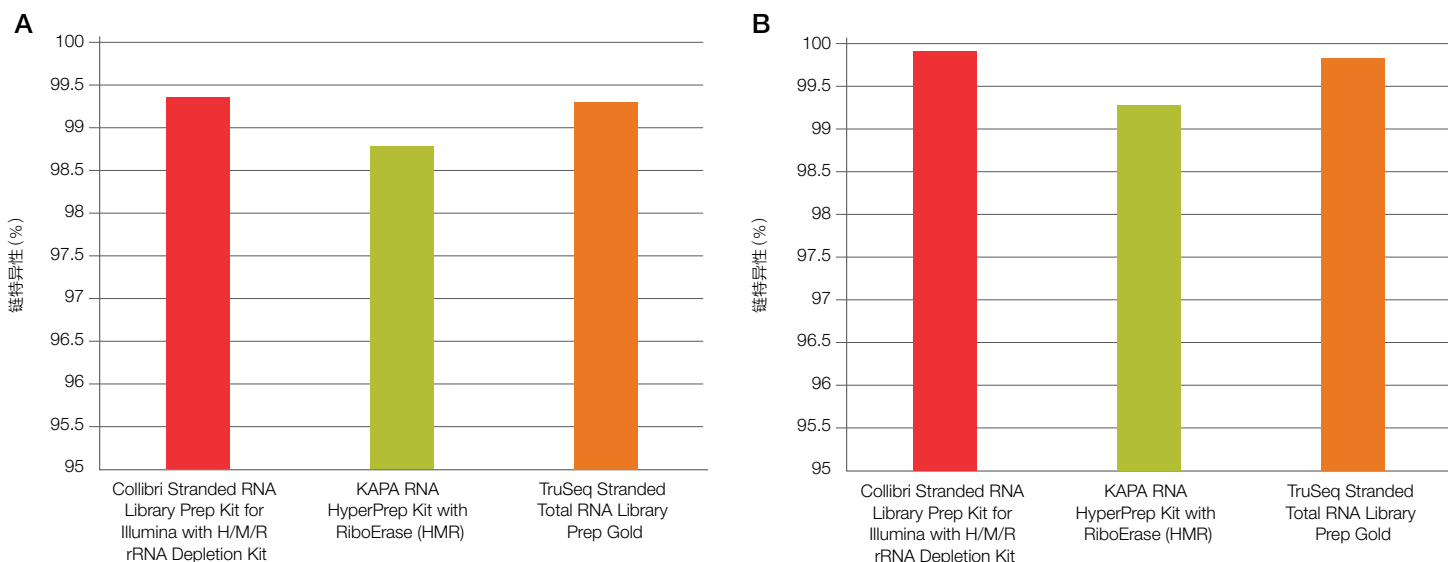
- TopHat, Cufflinks或Cuffdiff: 文库类型fr-secondstrand
- HISAT2: --rna-strandness FR (单端测序时为F)
- HTSeq: --stranded yes
- QoRTS: --stranded\_fr\_secondstrand

## 结论

Collibri链式RNA文库制备试剂盒为研究遗传等位基因分配提供了高信度。通过获得具有高度特异性链特异性信息的RNA文库, 可以从包括高度降解的FFPE材料在内的一系列样品类型中获得超过98%的准确链特异性数据。

## 参考文献

1. Zhao S, Zhang Y, Gordon W et al. (2015) Comparison of stranded and non-stranded RNA-Seq transcriptome profiling and investigation of gene overlap. *BMC Genomics* 16:675.



**图3. Collibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina with H/M/R rRNA Depletion Kit与KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR)和TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold链特异性结果的比较。**结果显示了从(A)通用人类参考RNA和(B)高度降解的FFPE RNA样本中制备的文库链特异性百分比。所有样品测序均在Illumina HiSeq 4000系统上进行, 并分别对通用人类参考RNA样本 47 million的reads和FFPE RNA样本 62 million的reads进行下采样。

## 订购信息

产品	数量	货号
<b>RNA测序</b>		
Collibri链式RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台)*	24次制备	A38994024
	96次制备	A38994096
Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台, 包含H/M/R rRNA去除试剂盒)*	24次制备	A39003024
	96次制备	A39003096
ERCC RNA Spike-In Mix	1个试剂盒	4456740
ERCC ExFold RNA Spike-In Mixes	1个试剂盒	4456739
<b>文库定量</b>		
Collibri文库定量试剂盒*	100次反应	A38524100
	500次反应	A38524500
Qubit 4 荧光计	1个荧光计	Q33226
Qubit 1X dsDNA HS检测试剂盒	100次检测	Q33230
Qubit 4 NGS Starter Kit	1盒	Q33228
<b>文库扩增</b>		
Platinum SuperFi文库扩增预混液	50次反应	A38539050
	250次反应	A38539250
Platinum SuperFi文库扩增预混液, 包含引物混合物*	50次反应	A38540050
	250次反应	A38540250
<b>配套仪器和试剂</b>		
Veriti 96孔热循环仪	1台仪器	4375786
ProFlex 96孔PCR系统	1台仪器	4484075
MicroAmp EnduraPlate光学96孔透明反应板, 带条形码	20块板	4483354
MicroAmp光学96孔反应板	10块板	N8010560
MicroAmp透明粘性封板膜	100张	4306311
MicroAmp 8联管, 带圆顶管盖, 0.2 mL	125条	A30589

H=人, M=小鼠, R=大鼠

\*并非所有国家均提供所有试剂盒。

Find out more at [thermofisher.com/collibri](http://thermofisher.com/collibri)



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982  
信息咨询邮箱: [cnbidmarketing@thermofisher.com](mailto:cnbidmarketing@thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C