

Solución de secuenciación de ARN de NextSeq™ 1000 y NextSeq 2000

Flujo de trabajo integrado y rentable
para la expresión genética y
el análisis del transcriptoma

- Innovadora gama de soluciones de preparación de librerías para análisis de todo el transcriptoma con flexibilidad de muestras y entradas.
- Productividad de secuenciación flexible para admitir una amplia gama de aplicaciones de RNA-Seq.
- Análisis secundario de DRAGEN integrado para una eficiencia óptima del flujo de trabajo.



Introducción

La solución de secuenciación de ARN (RNA-Seq, RNA sequencing) de NextSeq 1000 y NextSeq 2000 ofrece una visión clara y completa del transcriptoma, lo que hace que sea más accesible que nunca. La solución utiliza la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) de Illumina líder del sector, la química optimizada de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis) XLEAP-SBS™, una amplia gama de soluciones de preparación de librerías y herramientas de análisis de datos para ofrecer flujos de trabajo optimizados y eficientes (figura 1). La adaptabilidad y la flexibilidad de NextSeq 1000 Sequencing System y NextSeq 2000 Sequencing System (figura 2) permiten a los usuarios procesar diversos volúmenes de muestras de forma eficiente, lo que garantiza el equilibrio óptimo entre el presupuesto de lectura y la productividad de muestras. La solución de RNA-Seq NextSeq 1000 y NextSeq 2000 es compatible con una serie de aplicaciones de ARN, desde la creación de perfiles de expresiones genéticas básicos hasta análisis complejos del transcriptoma completo.

Ventajas de la RNA-Seq

La RNA-Seq ha surgido rápidamente como la principal estrategia para la creación de perfiles de transcriptoma de alta productividad.^{1,2} Proporciona una instantánea detallada del transcriptoma en un momento dado y ofrece numerosas ventajas sobre la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) cuantitativa, por ejemplo:

- Diseño de experimentos sin hipótesis, sin que sean necesarios conocimientos previos del transcriptoma.
- Capacidad de detección para detectar transcritos, tanto conocidos como nuevos.
- Capacidad de alto rendimiento para cuantificar cientos de miles de regiones en cada ensayo.
- Amplio rango dinámico, lo que ofrece una medición más precisa de la expresión genética.
- Más datos por ensayo, lo que ofrece información completa sobre las secuencias y las variantes.



Figura 2: NextSeq 1000 Sequencing System y NextSeq 2000 Sequencing System. NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System aprovechan la química XLEAP-SBS y el análisis secundario integrado para optimizar los flujos de trabajo de secuenciación.



Figura 1: Flujo de trabajo de RNA-Seq de NextSeq 1000 y NextSeq 2000. NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System forman parte de un flujo de trabajo de NGS sencillo e integrado que ofrece datos de secuenciación de ARN de alta precisión. Los tiempos variarán en función del tipo de ensayo y de experimento.

Flujo de trabajo de NGS integrado

NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System admiten una amplia gama de soluciones de preparación de librerías, que abordan una amplia gama de necesidades de estudios de transcriptoma. Los investigadores pueden elegir entre varios kits de preparación de librerías, lo que les permite encontrar el que mejor se adapte a las necesidades de sus experimentos y ayuda a superar complicaciones comunes, como ARN de partida de baja calidad o disponibilidad limitada de muestras.

Preparación avanzada de librerías de ARN de Illumina

Con una experiencia consolidada en el campo de la RNA-Seq, Illumina ofrece soluciones fiables y probadas para la preparación de librerías de ARN. Los avances en la gama de soluciones de Illumina de kits de preparación de librerías de ARN proporcionan los datos de alta calidad que los investigadores necesitan, con un flujo de trabajo optimizado que se puede completar en un turno de trabajo habitual. Illumina ofrece tres kits de preparación de librerías de ARN (tabla 1):

- **Illumina Stranded Total RNA Prep** permite el análisis del transcriptoma completo con Ribo-Zero™ Plus, que captura el ARN codificante y múltiples formas del no codificante, con el fin de obtener una imagen completa de la biología. Illumina Stranded Total RNA Prep también ofrece un rendimiento sólido cuando se trabaja con muestras de baja calidad fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded).
- **Illumina Stranded mRNA Prep** ofrece una opción rentable para los análisis centrados en el ARN codificante. Illumina Stranded mRNA Prep funciona con cualquier ARN eucariota de muestras de alta calidad.*
- **Illumina RNA Prep with Enrichment** incorpora la tecnología de transposomas vinculados por bolas (BLT, bead-linked transposomes) a la RNA-Seq y proporciona un flujo de trabajo rápido de enriquecimiento de ARN de un solo día con un tiempo de participación activa mínimo (<2 horas). Cuando se secuencian en NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System, los datos de ARN no catenario resultantes proporcionan información valiosa en un gran número de posiciones del genoma.

* Número de integridad del ARN (RIN, RNA integrity number) >8. En el caso de muestras de menor calidad o FFPE, utilice Illumina RNA Prep with Enrichment o Illumina Stranded Total RNA Prep.

Tabla 1: Kits de preparación de librerías de ARN de Illumina

	Illumina Stranded Total RNA Prep	Illumina Stranded mRNA Prep	Illumina RNA Prep with Enrichment
Método	Ligadura con Ribo-Zero Plus ^a	Ligadura	(L) Tagmentación
Detección	Transcriptoma codificante y no codificante	Transcriptoma codificante con cola de poliA	Regiones de codificación selectivas ^b
Compatibilidad con FFPE	Sí	No	Sí
Entrada	1-1000 ng ^c	25-1000 ng	10 ng no FFPE 20 ng FFPE
Duración total del ensayo ^a	7 h	<7 h	<9 h
Tiempo de participación activa ^d	<3 h	<3 h	<2 h
Fácilmente automatizable	Sí	Sí	Sí

a. Ribo-Zero Plus se incluye para eliminar el ARN abundante de múltiples especies, incluidas muestras humanas, de ratón, rata, bacterias y epidemiológicas.

b. Solo para muestras humanas. Probado con Illumina Exome Panel y Respiratory Oligos Panel v2. Illumina RNA Prep with Enrichment no proporciona información sobre la cadena.

c. Entrada mínima para el ARN de alta calidad que se muestra. Se recomienda un mínimo de 10 ng para una calidad óptima y FFPE para Illumina Stranded Total RNA Prep.

d. Tiempo de participación activa y total basado en el procesamiento manual de hasta 24 muestras para los flujos de trabajo de Illumina Stranded Total RNA y mRNA y 1 muestra en el flujo de trabajo de enriquecimiento.

Para los usuarios de BaseSpace™ Clarity LIMS, hay disponibles protocolos preconfigurados para Illumina Stranded mRNA Prep, Illumina Stranded Total RNA Prep, e Illumina RNA Prep with Enrichment para su uso con NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System.

NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System

NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System proporcionan adaptabilidad y flexibilidad para abordar una gama completa de necesidades de análisis del transcriptoma. Los investigadores tienen a su disposición cuatro tipos de celda de flujo que les permiten seleccionar el equilibrio óptimo entre el número de muestras y las lecturas por muestra (tabla 2). Por ejemplo, la creación de perfiles de expresiones genéticas (la medición de la abundancia de características conocidas a nivel génico) puede realizarse eficientemente con capacidad de alta productividad con hasta 170 muestras[†] en un experimento único. El análisis del transcriptoma completo permite el descubrimiento de nuevas características mediante el análisis del ARN codificante y no codificante con un máximo de 34 muestras por experimento; los investigadores también pueden analizar el ARN codificante con un máximo de 68 muestras por experimento (tabla 2, tabla 3). Illumina recomienda consultar la bibliografía principal de su campo y organismo para obtener la orientación más actualizada sobre el diseño de experimentos y la profundidad de secuenciación.

[†] La creación de perfiles de expresión asume 10 millones de lecturas por muestra.

NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System ofrecen adaptabilidad entre todas las aplicaciones, lo que permite a los investigadores realizar una transición fácil entre proyectos de secuenciación. Los sistemas son compatibles con diversos kits de preparación de librerías de Illumina y terceros, lo que permite una transición fácil entre la RNA-Seq masiva, la RNA-Seq de células individuales, la secuenciación del transcriptoma completo, la secuenciación del exoma y otras aplicaciones. Por ejemplo, los investigadores pueden emparejar la RNA-Seq con la secuenciación del exoma en NextSeq 1000 System o NextSeq 2000 System para evaluar si las variantes de codificación afectan a la expresión de transcritos o realizar ensayos de cromatina accesible por transposasa con secuenciación (ATAC-Seq, assay for transposase accessible chromatin with sequencing)[‡] para analizar la accesibilidad de la cromatina y caracterizar mejor la regulación funcional.

Descubra más con la química XLEAP-SBS

Con NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System, los investigadores pueden enriquecer sus estudios con una mayor profundidad de lectura, lo que da como resultado estimaciones de múltiplo de cambio más precisas y una alta sensibilidad en la detección de genes, transcritos y expresión diferencial. NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System cuentan con la química XLEAP-SBS, que es la química de SBS de Illumina más rápida, de mayor calidad y más potente hasta la fecha.

[‡] ATAC-Seq, ensayo de cromatina accesible por transposasa con secuenciación.

Tabla 2: Soluciones de RNA-Seq de Illumina y productividad de muestras por celda de flujo

Método	Medición	Pares de lectura típicos por muestra ^a	Preparación de librerías	N.º de muestras por celda de flujo y experimento						
				NextSeq 1000 y NextSeq 2000				NovaSeq X Series ^d		
				P1	P2	P3 ^c	P4 ^c	1.5B	10B	25B
Cuantificación de la expresión genética	Abundancia a nivel de genes en todas las características conocidas	10 M	Illumina Stranded mRNA Prep ^b	10	40	120	170	150	~1000 ^e	~2500 ^e
mRNA-Seq	Abundancia y detección de ARN codificante	25 M	Illumina RNA Prep with Enrichment	4	16	48	68	~60	~400 ^e	~1000 ^e
RNA-Seq total	Descubrimiento y abundancia de ARN codificante y no codificante	50 M	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus	2	8	24	34	~30	~200	~520 ^e

a. Las longitudes de lectura recomendadas son 2 × 75 pb en el caso de Illumina Stranded Total RNA Prep e Illumina Stranded mRNA Prep y 2 × 100 pb en el caso de Illumina RNA Prep with Enrichment.
 b. Illumina Stranded mRNA Prep no es compatible con muestras FFPE. En el caso de muestras de baja calidad o FFPE, se recomienda Illumina RNA Prep with Enrichment o Illumina Stranded Total RNA Prep.
 c. Los reactivos P3 y P4 solo están disponibles para NextSeq 2000 System.
 d. NovaSeq X Plus System puede realizar experimentos en celdas de flujo únicas o celdas de flujo dobles. NovaSeq X System puede realizar experimentos en celdas de flujo únicas.
 e. Se dispone de un máximo de 384 índices dobles únicos. En el caso de NovaSeq X Series, la carga de carril independiente permite la multiplexación de más muestras.

Tabla 3: Parámetros de rendimiento de NextSeq 1000 y NextSeq 2000 para la RNA-Seq

Celda de flujo	Lecturas «single-end» ^a	Longitud de lectura	Resultado ^a	Duración del experimento ^b	Calidad de los datos ^c	Entrada requerida
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagents ^d	100 M	2 × 150 pb	30 Gb	17 h		
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagents ^d	400 M	2 × 100 pb	80 Gb	19 h	≥85 % de bases por encima de Q30	10 ng-1 µg con Illumina RNA Prep
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagents ^{d,e}	1200 M	2 × 100 pb	240 Gb	31 h		
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagents ^e	1700 M	2 × 100 pb	330 Gb	34 h		

- a. Las especificaciones de rendimiento se basan en un modo de funcionamiento con una sola celda de flujo gracias a la librería de control PhiX de Illumina con densidades de grupos compatibles.
- b. La duración del experimento incluye la generación de grupos, la secuenciación y la llamada de bases en NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System.
- c. Las puntuaciones de calidad se basan en una librería de control PhiX de Illumina. El rendimiento puede variar en función del tipo de librería y su calidad, el tamaño del fragmento, la concentración de la carga y otros factores del experimento. En todo el experimento, se promedia un porcentaje de bases por encima de Q30.
- d. Reactivos XLEAP-SBS para celdas de flujo P1, P2 y P3 disponibles en el segundo trimestre de 2024.
- e. Los reactivos P3 y P4 solo están disponibles para NextSeq 2000 System.

Los reactivos XLEAP-SBS hacen posible el máximo rendimiento de lecturas y el precio más bajo por millón de lecturas de cualquier sistema de secuenciación de sobremesa de Illumina. La reducción del coste por millón de lecturas, junto con la capacidad de secuenciación adicional, proporciona:

- Más lecturas por muestra para capturar información sobre transcritos de menor abundancia.
- Más muestras para impulsar un diseño de experimentos más sólido dentro de un presupuesto de investigación determinado.
- Métodos más completos para capturar facetas más complejas del panorama del ARN para impulsar más descubrimientos.

Las múltiples configuraciones de celdas de flujo de NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System (tabla 3) permiten a los investigadores optimizar el diseño de sus estudios en función del número de muestras y los requisitos de rendimiento. Por ejemplo, la capacidad de secuenciación adicional que ofrece la celda de flujo P4 de NextSeq 2000 hace que sea más fácil y económico diseñar estudios con la capacidad adecuada y hacer que la RNA-Seq sea una parte rutinaria del repertorio de herramientas moleculares de cualquier laboratorio. Si se necesita una mayor productividad de muestras, pueden ampliarse los estudios hasta cientos de muestras por experimento con NovaSeq™ X Series (tabla 2).

El valor de la secuenciación «paired-end»

Con NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System, los investigadores pueden realizar una secuenciación de lectura única o «paired-end». La secuenciación de

lectura única es una opción económica para la creación de perfiles de expresiones genéticas. Sin embargo, la RNA-Seq «paired-end» es necesaria para la información de las cadenas y ofrece ventajas clave. La información de profundidad de lectura generada a partir de ambos extremos de un fragmento permite diferenciar de forma eficaz los isómeros de transcritos, lo que proporciona una detección y cuantificación más precisas de la abundancia a nivel de transcritos. La información «paired-end» mejora sustancialmente la sensibilidad para detectar fusiones génicas y variantes de inserciones/delecciones (indel).

Soluciones de análisis simplificadas de Illumina

Análisis secundario de DRAGEN™

El análisis de datos de RNA-Seq se puede realizar con herramientas del análisis secundario de DRAGEN de Illumina, un paquete de procesos de análisis de datos precisos, completos y eficientes.[§] El proceso DRAGEN RNA de Illumina realiza la alineación precisa del ARN con un genoma de referencia, la llamada y cuantificación de variantes de genes y la caracterización de zonas de corte y empalme y fusiones génicas candidatas (figura 3). El proceso DRAGEN RNA puede configurarse como parte de la configuración del experimento para emplearse en la nube con Illumina Connected Analytics o BaseSpace Sequence Hub o como un flujo de trabajo integrado en el instrumento utilizando el hardware DRAGEN integrado en NextSeq 1000 y NextSeq 2000.

[§] El hardware DRAGEN se encuentra integrado en NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System. El instrumento incluye una licencia de DRAGEN y no es necesario adquirirla por separado.

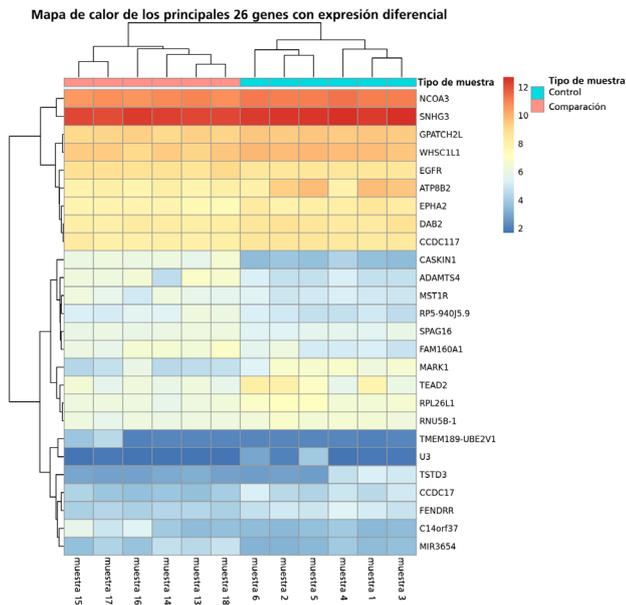


Figura 3: Proceso DRAGEN RNA. Ejemplo de captura de pantalla de un mapa de calor de expresión diferencial con el proceso DRAGEN RNA, disponible integrado en NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System o en la nube con BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics.

El proceso DRAGEN RNA proporciona datos de alta calidad empaquetados en una interfaz de usuario intuitiva. Sus indicaciones son fáciles de seguir y guían a los usuarios a través de todo el proceso, desde la selección de los archivos generados por el secuenciador hasta la visualización de los datos analizados y los resultados. Los resultados del proceso DRAGEN RNA se pueden introducir directamente en una amplia gama de herramientas para análisis sucesivos. Más allá de la plataforma DRAGEN, Illumina Connected Analytics y BaseSpace Sequence Hub proporcionan herramientas para la visualización, el análisis y el intercambio.

Servicio de asistencia técnica integral de Illumina

Illumina proporciona un equipo de asistencia técnica de alto nivel compuesto por científicos expertos en la preparación, secuenciación y análisis de librerías. Este equipo específico incluye ingenieros de servicio de campo (FSE, field service engineers) muy cualificados, científicos de aplicaciones técnicas (TAS, technical applications scientists), científicos de aplicaciones de campo (FAS, field applications scientists), ingenieros de asistencia técnica de sistemas, bioinformáticos y expertos en redes informáticas, todos ellos ampliamente familiarizados con la NGS y las aplicaciones que los clientes de Illumina llevan a cabo en todo el mundo. El [servicio de asistencia técnica](#) está disponible por teléfono cinco días a la semana; también puede acceder a esta en línea las 24 horas del día y los 7 días de la semana, en todo el mundo y en varios idiomas.

Con este servicio y asistencia inigualables, Illumina ayuda a los usuarios a aumentar al máximo la eficacia de sus NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System, formar a nuevos empleados y aprender las últimas técnicas y prácticas recomendadas.

Resumen

La solución de RNA-Seq de NextSeq 1000 y NextSeq 2000 ofrece un flujo de trabajo desde el ARN hasta los resultados optimizado que combina la capacidad, la velocidad y la adaptabilidad de NextSeq 1000 Sequencing System y NextSeq 2000 Sequencing System con una gama de soluciones de preparación de librerías de ARN avanzada y aplicaciones de software de RNA-Seq fáciles de usar. Cuatro tipos de celdas de flujo garantizan la rentabilidad en todos los tipos de proyectos de RNA-Seq, desde la creación de perfiles de expresiones genéticas hasta el descubrimiento del transcriptoma completo.

Información adicional

[Secuenciación de ARN](#)

[Preparación de librerías de ARN de Illumina](#)

[NextSeq 1000 Sequencing System y NextSeq 2000 Sequencing System](#)

[Análisis secundario de DRAGEN](#)

[Datos de demostración en BaseSpace Sequence Hub](#)

Bibliografía

- Geraci F, Saha I, Bianchini M. [Editorial: RNA-Seq Analysis: Methods, Applications and Challenges](#). *Front Genet.* 2020;11:220. doi:10.3389/fgene.2020.00220
- Corchete LA, Rojas EA, Alonso-López D, De Las Rivas J, Gutiérrez NC, Burguillo FJ. [Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis](#). *Sci Rep.* 2020;10(1):19737. doi:10.1038/s41598-020-76881-x

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
NextSeq 2000 Sequencing System	20038897
NextSeq 1000 Sequencing System	20038898
NextSeq 1000 to NextSeq 2000 upgrade	20047256
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b}	20100983
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b}	20100982
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a,b}	20100981
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b}	20100987
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a,b}	20100986
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b}	20100985
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a,b}	20100984
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b}	20100990
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a,b}	20100989
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b}	20100988
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (50 cycles) ^a	20100995
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^a	20100994
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^a	20100993
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^a	20100992
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read and Index Primers ^a	20112856
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Index Primer Kit ^a	20112858

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read Primer Kit ^a	20112859
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 samples)	20040525
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 samples)	20040529
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 samples)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 samples)	20040534
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples)	20040537
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091661
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091660

- a. Los kits de reactivos XLEAP-SBS para los instrumentos NextSeq 1000 y NextSeq 2000 se envían y almacenan a la misma temperatura que los kits de reactivos de SBS estándar.
- b. Reactivos XLEAP-SBS para celdas de flujo P1, P2 y P3 disponibles en el segundo trimestre de 2024.
- c. Los índices de ligadura son compatibles con los kits de preparación de ARNm y total. Los índices de tagmentación son compatibles con kits de preparación de enriquecimiento de ADN y ARN.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-00480 ESP v3.0