



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

“RNAseq Sample Prep”

Alfredo Mendoza Vargas
amendoza@inmegen.gob.mx
Unidad de Secuenciación
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Aplicaciones de RNASeq

Perfil de
Expresión

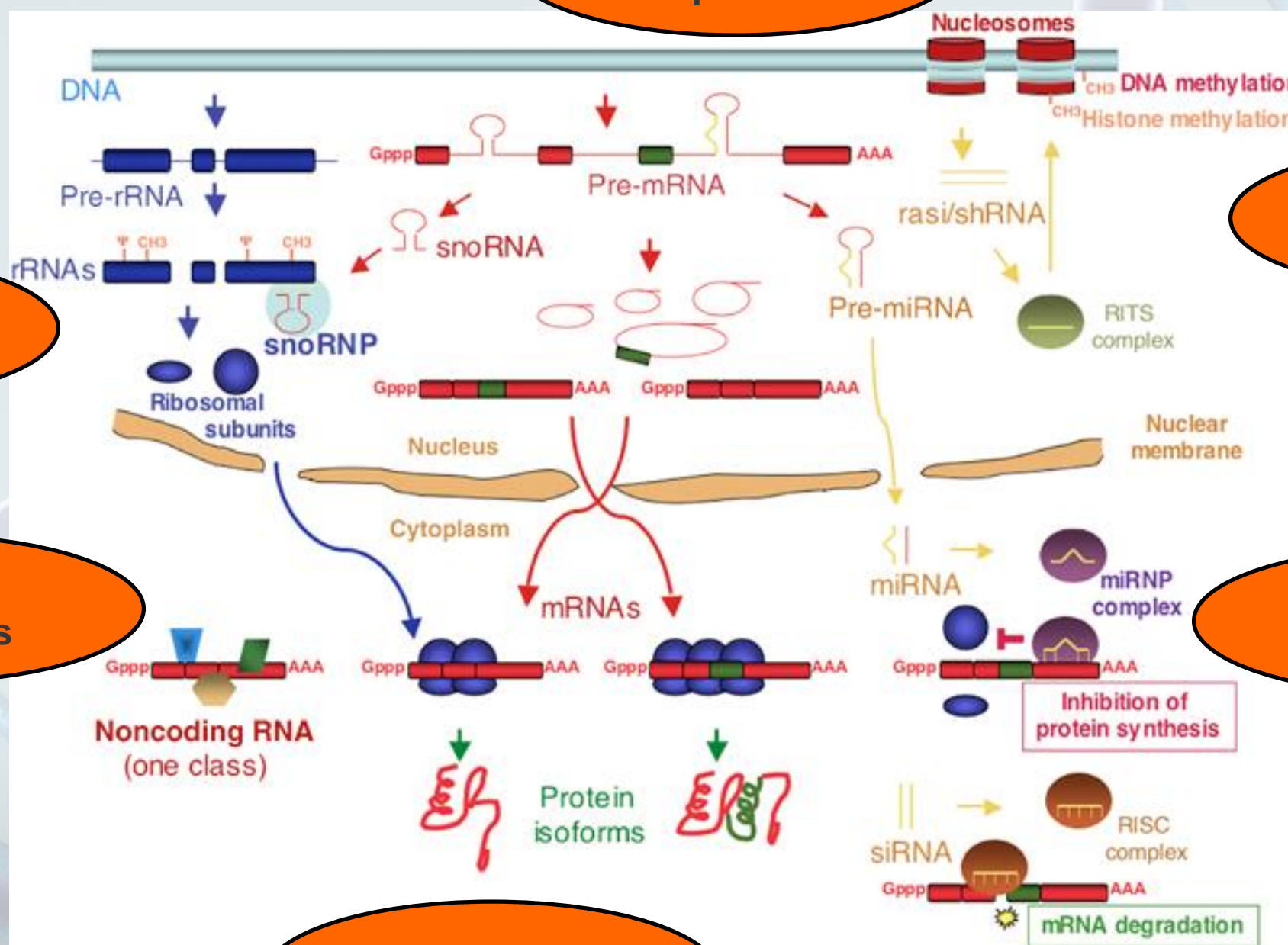
Variantes

Biomarcadores

Nuevos
transcritos

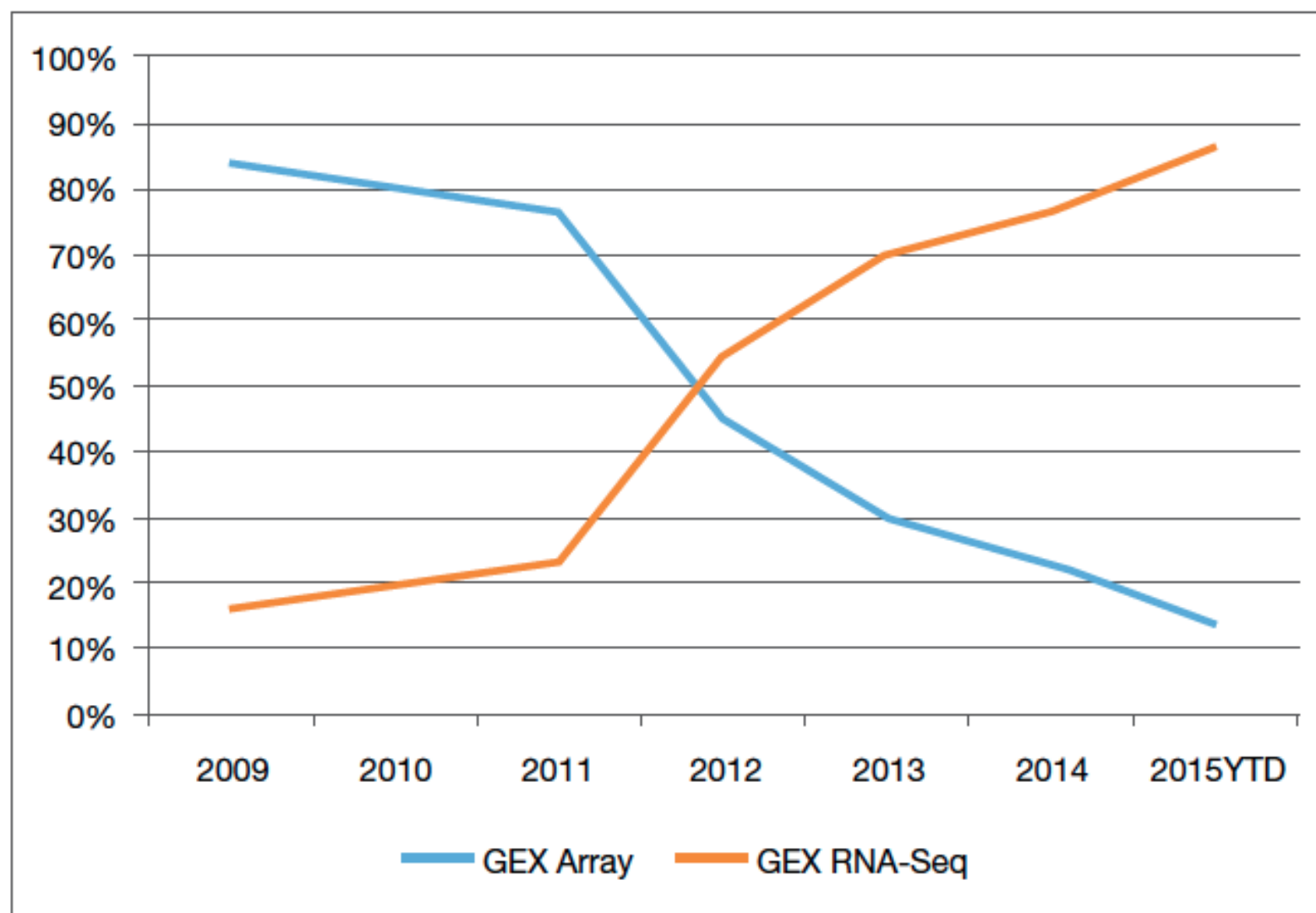
smallRNAs

Isoformas



RNASeq vs. Arrays

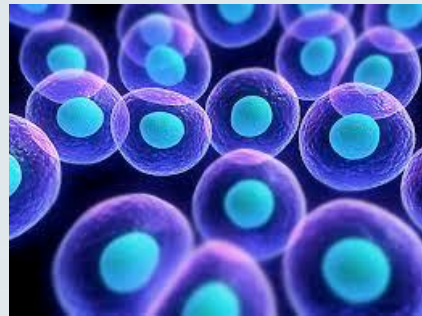
NIH Funding for Gene Expression Studies - New Grants



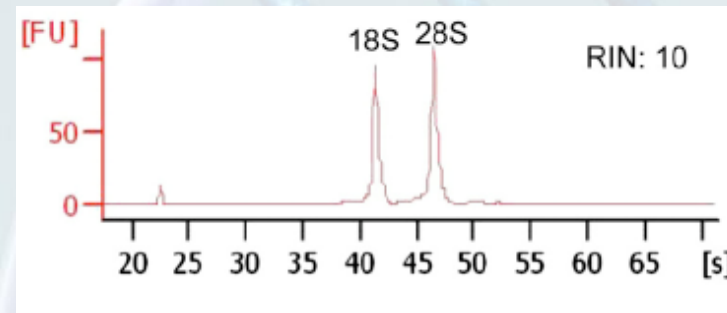
Comparison of grant awards using gene expression arrays versus RNA sequencing from 2009-2015 in the NIH Research Portfolio. Data derived from an NIH Project Reporter database search (<http://projectreporter.nih.gov>) in October 2015.

RNASeq, las bases

Aislamiento de RNA



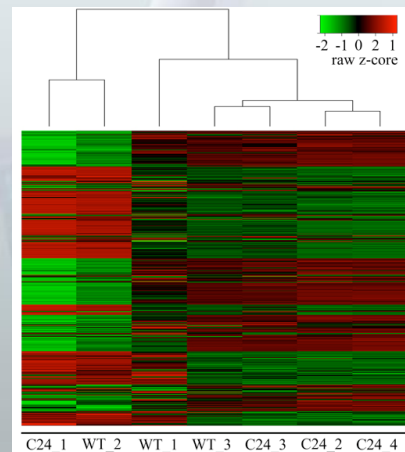
Control de Calidad del RNA



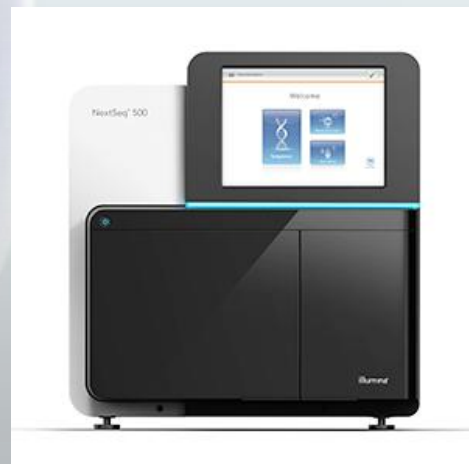
RNASeq Sample prep



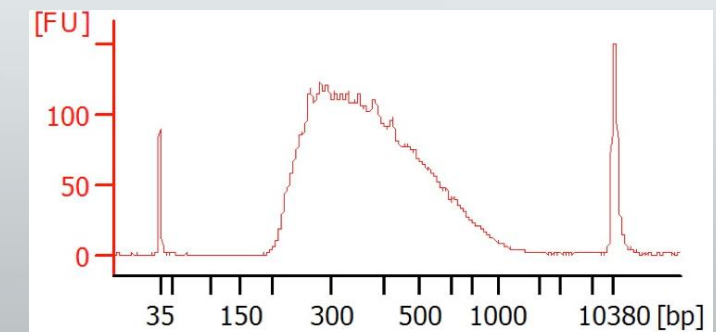
Análisis



Secuenciación



Control de Calidad Biblioteca

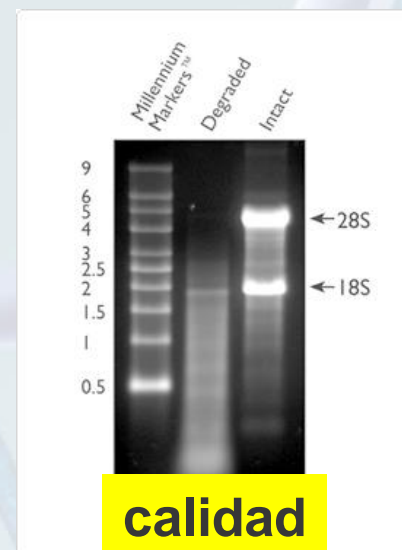


Que tenemos que checar antes de iniciar

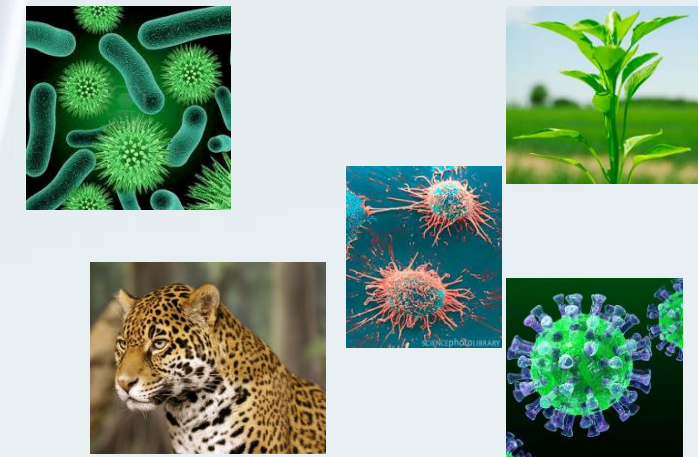
Proyecto



Sample Prep



¿ ug, ng ó pg ?



Secuenciación



Tamaño de lectura

Que tenemos que checar antes de iniciar

Que queremos	Nuestro modelo	Parametros muy importantes
Perfiles de expresión Cuantificación del transcriptoma codificante	Impacto de la investigación y definición de las imágenes para la publicación	Tamaño del estudio y réplicas biológicas Determinar el número de muestras y las réplicas para cada condición o población específica
Secuenciación del transcriptoma completo Análisis del transcriptoma codificante y no codificante	Tipo de muestra Humana, no humana, de planta o bacteria Definir el tipo de biblioteca para el tipo de muestra	Definir la plataforma de secuenciación ideal para el estudio.
Escaneo de alta resolución del transcriptoma completo Identificar nuevos transcritos Fusiones génicas Uniones por splicing Isoformas	Calidad de la muestra Definir el tipo de biblioteca para el tipo de muestra.	Profundidad de secuencia Cuantas secuencias por muestra son requeridas de acuerdo a lo que buscamos inicialmente.
Secuenciación de RNAs pequeños	Cantidad de muestra Cultivo celular, células individuales etc.	

Algunas guías

Profundidad óptima para análisis de expresión

Eucariontes= 20-30 M reads/sample

Procarionte= 10 M reads/sample

Configuración de corrida= 1X76

Profundidad para detección de isoformas y variantes

Eucariontes= >30M reads/sample

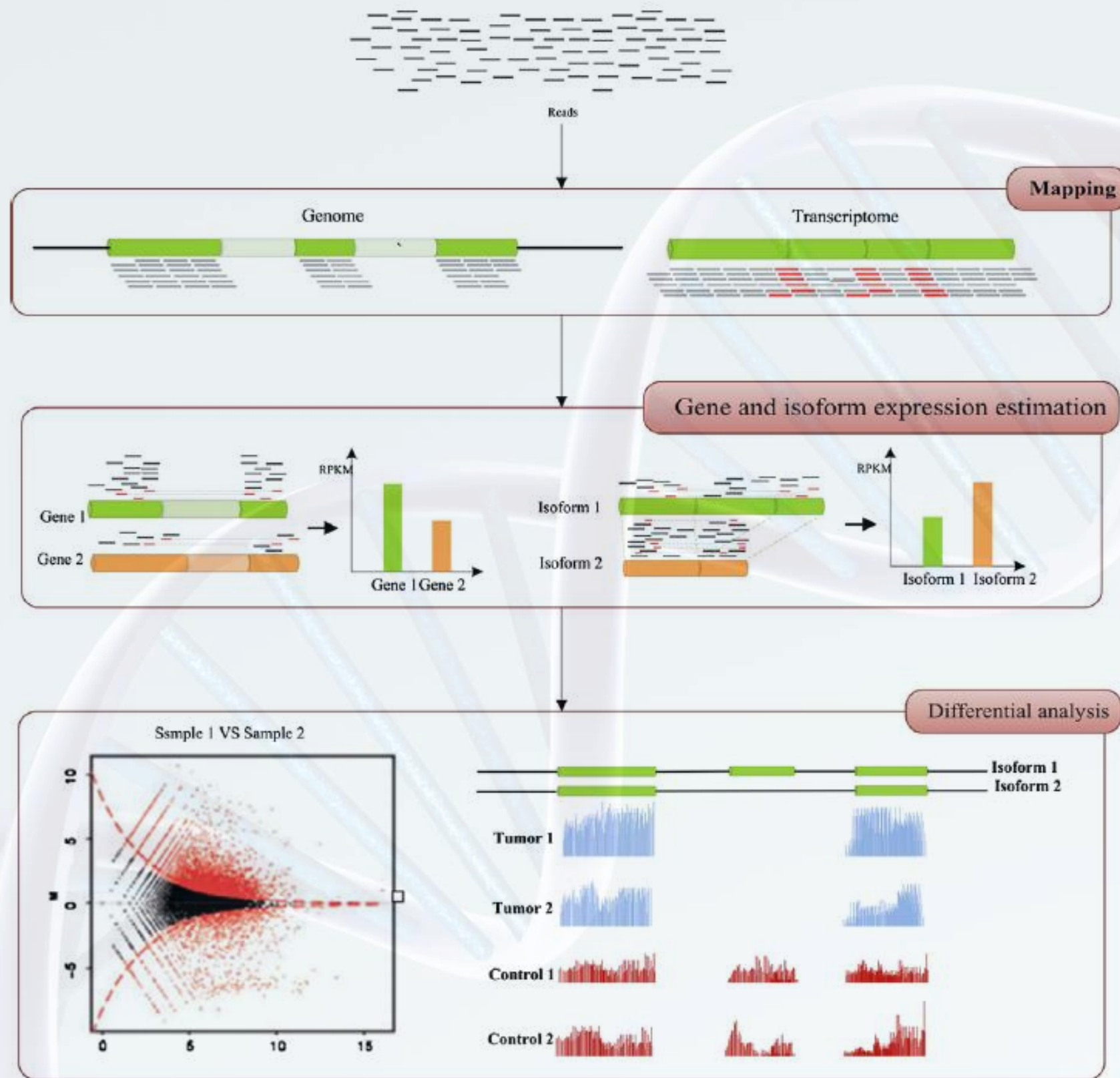
Configuración de corrida= 2X76

**Incrementando de
10 a 30 M podemos
obtener 25% más
genes
diferencialmente
expresados**

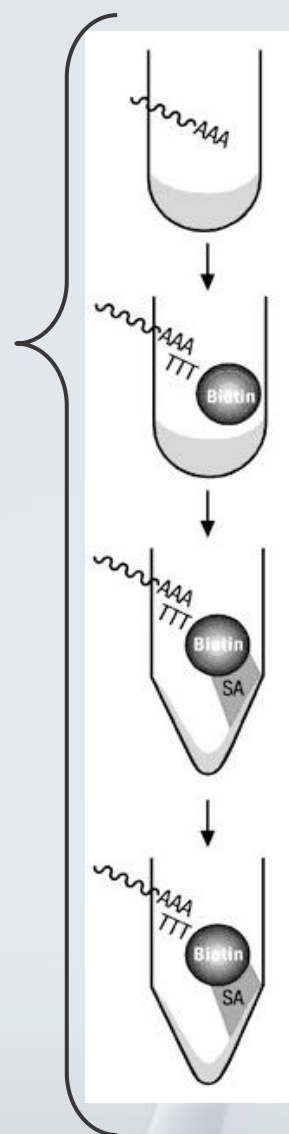
Caso 1	Caso 2	Caso 3
Perfil de Expresión	Perfil de Expresión Variantes Isoformas	Perfil de Expresión Variantes Isoformas RNAs no codificantes
Kit: directional mRNA library prep	Kit: directional mRNA library prep	<u>Kit: directional total RNA library prep</u>
Configuración de corrida: 1X50	Configuración de corrida: 2X76	Configuración de corrida: 2X76
Profundidad: >20 Millones de reads por muestra	Profundidad: >30 Millones de reads por muestra	Profundidad: > 40 Millones de reads por muestra
Plataforma: NextSeq 500 MO, 10 Muestras	Plataforma: NextSeq 500 HO, 16 Muestras	Plataforma: NextSeq 500 HO, 9-12 Muestras

Análisis de Transcriptoma

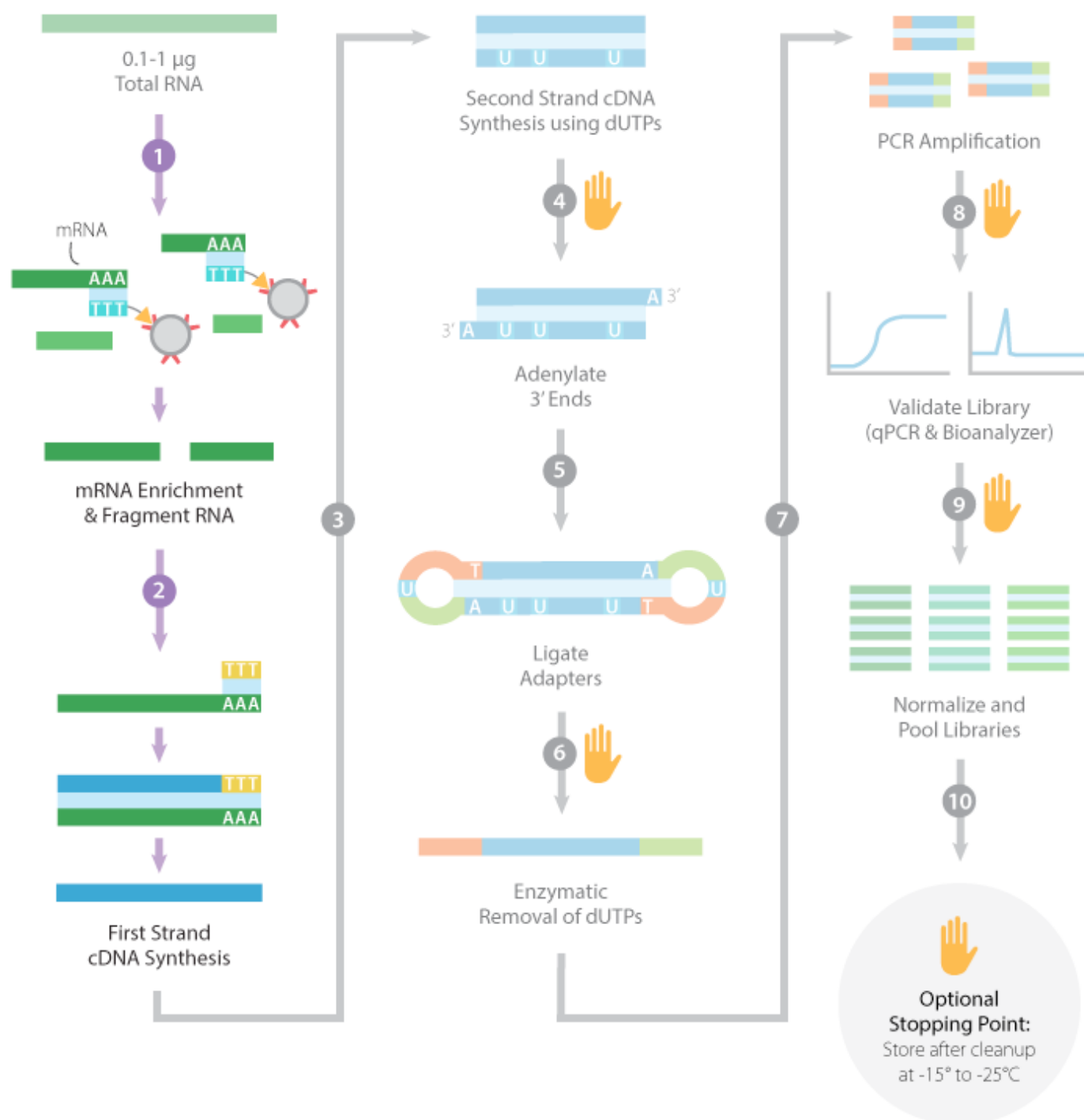
RNA-Seq



Análisis de Transcriptoma mRNA-Seq



TruSeq Stranded mRNA Kit



Características

- 100ng - 1ug de RNA
- RIN >7.0
- Sólo transcritos polyA
- Cadena específica

Análisis de Transcriptoma

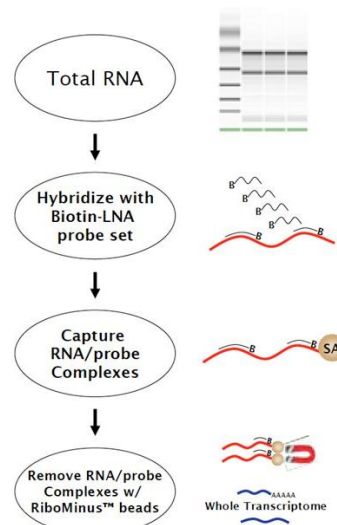
Transcripción antisentido



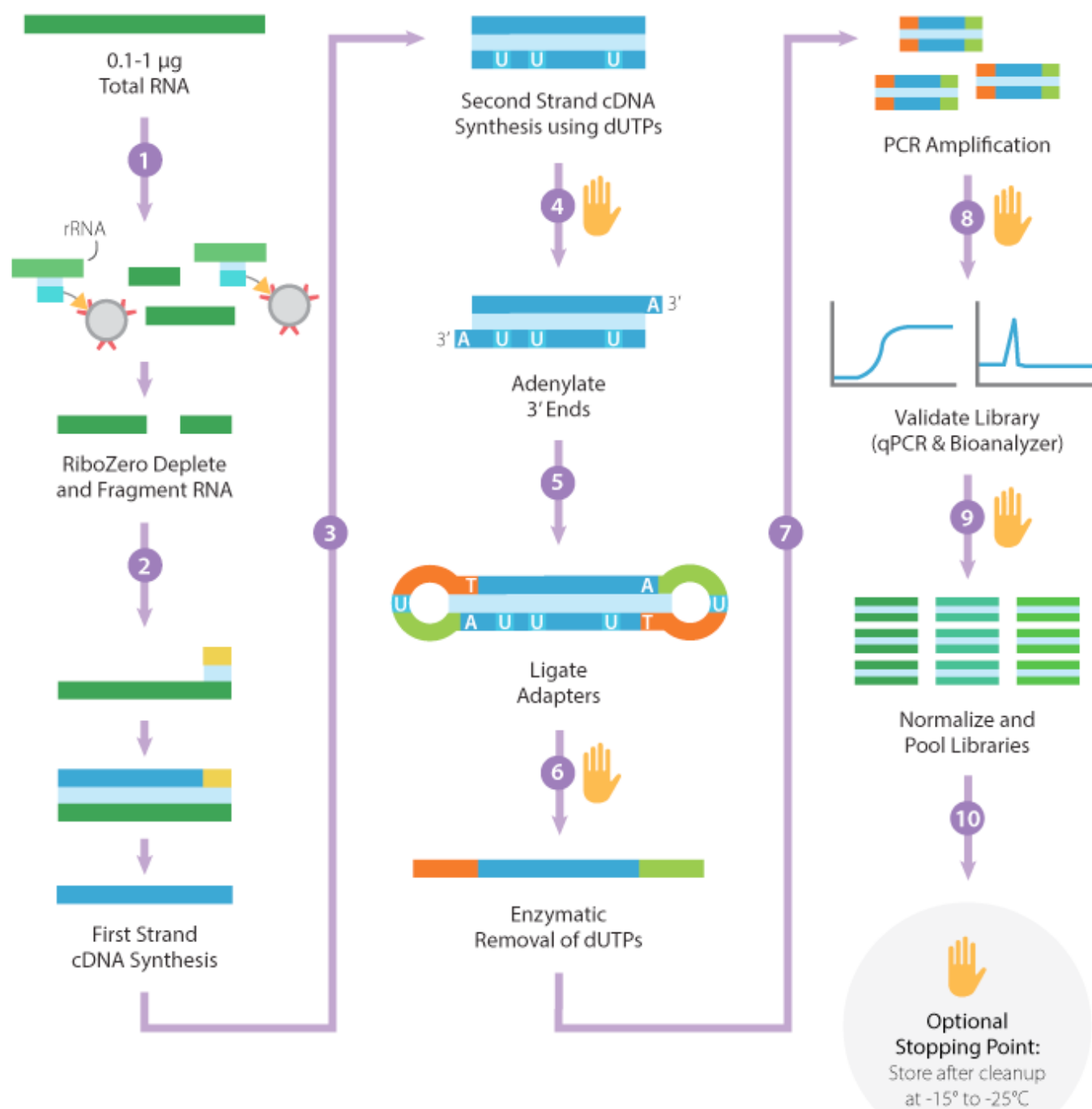
Análisis de Transcriptoma

TotalRNA-Seq

Ribosomal RNA subtraction

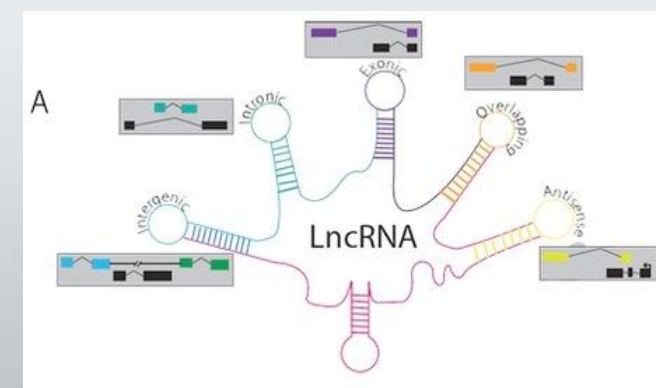


TruSeq Stranded Total RNA Kit



Características

- 100ng - 5ug de RNA
- Para muestras provenientes de parafina
- Sólo hay compatibilidad con algunas especies
- Transcritos polyA y no polyA
- Cadena específica
- Se requiere mayor profundidad



Low input RNA

Ribo-SPIA® Whole Transcriptome Amplification Process

Total RNA

NNNNNN-NNNNNN-TTTTT cDNA Primer (DNA/RNA)
random and polyT

Step 1 First Strand cDNA Synthesis

RT Reverse Transcriptase

First-Strand cDNA

RT NNNNNN TTTTT

Step 2 Second Strand cDNA Synthesis

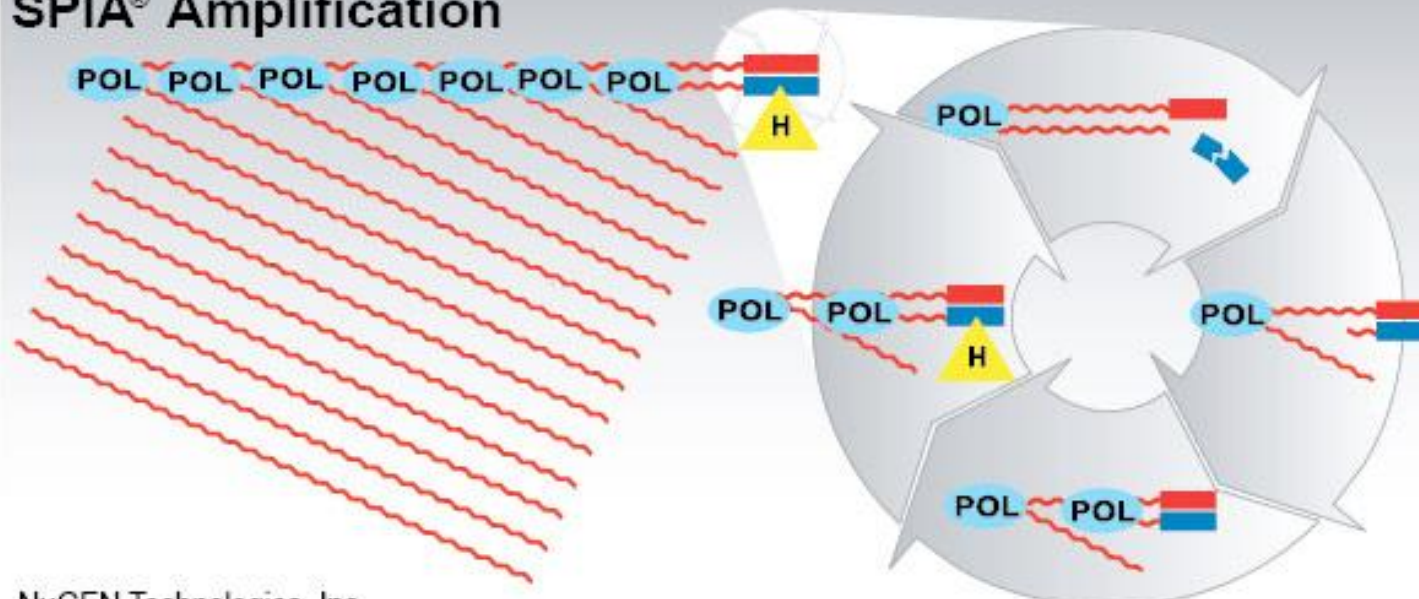
POL DNA Polymerase

Double-Stranded cDNA

Step 3 Amplification Cycle

H RNase H
POL DNA Polymerase
SPIA® Primer (DNA/RNA)

SPIA® Amplification



NuGEN Technologies, Inc.

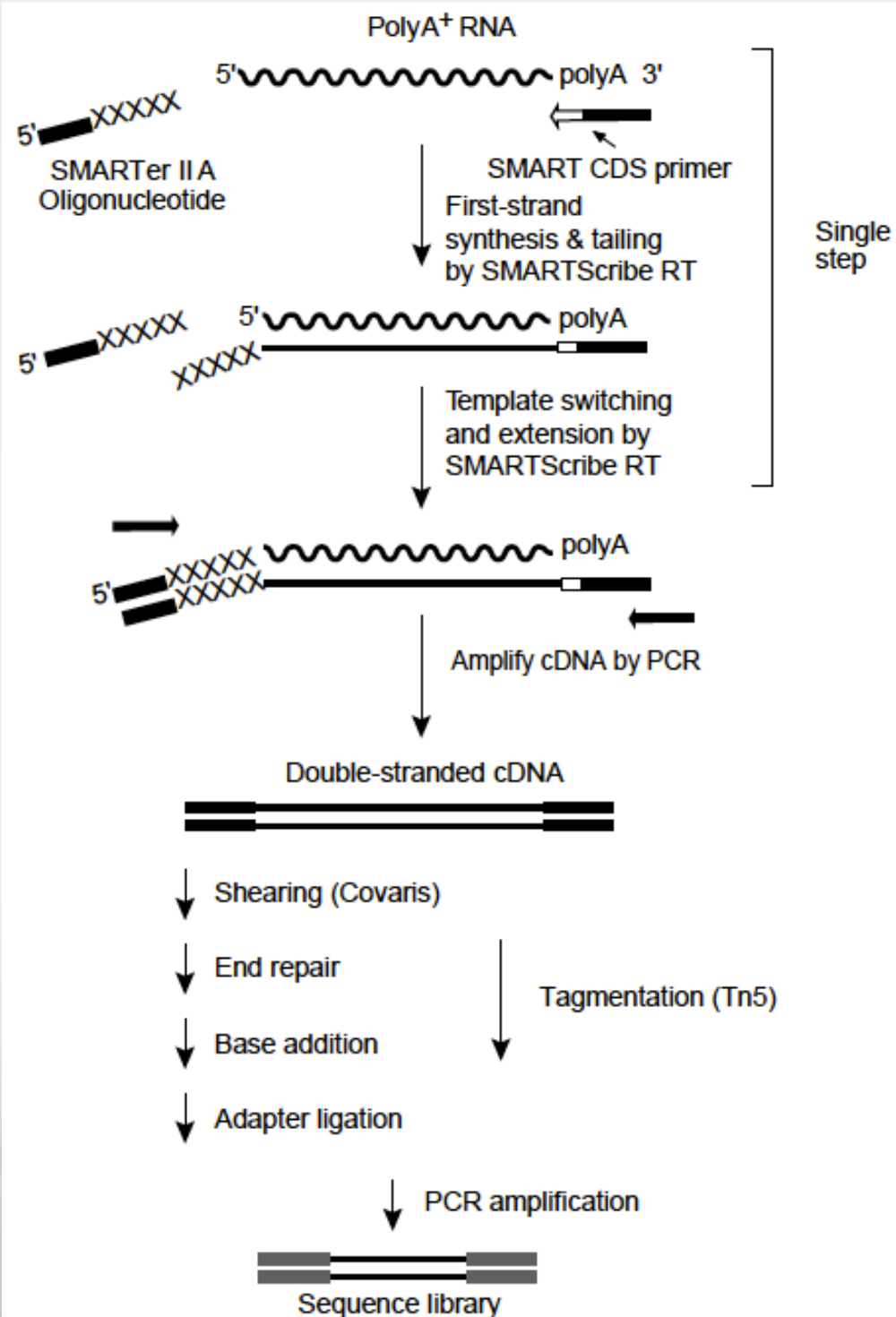
Características

- >1- 500pg de RNA
- Sólo hay compatibilidad con algunas especies
- Transcritos polyA y no polyA
- Cadena específica
- No hay versiones para procariontes
- Se pierden los RNAs < 200pb

Análisis de Transcriptoma

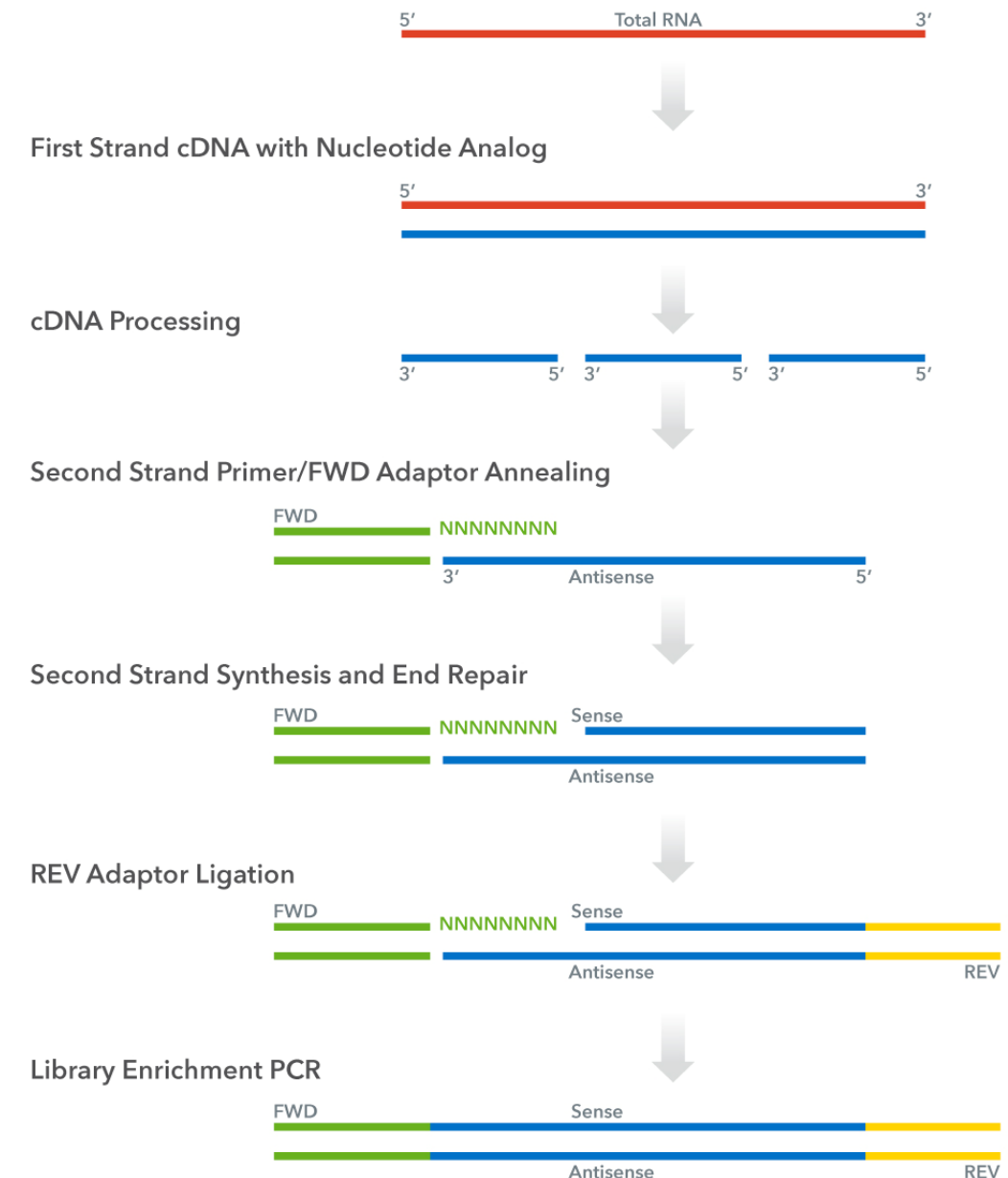
RNA-Seq de una célula

Smart-seq



NuGEN

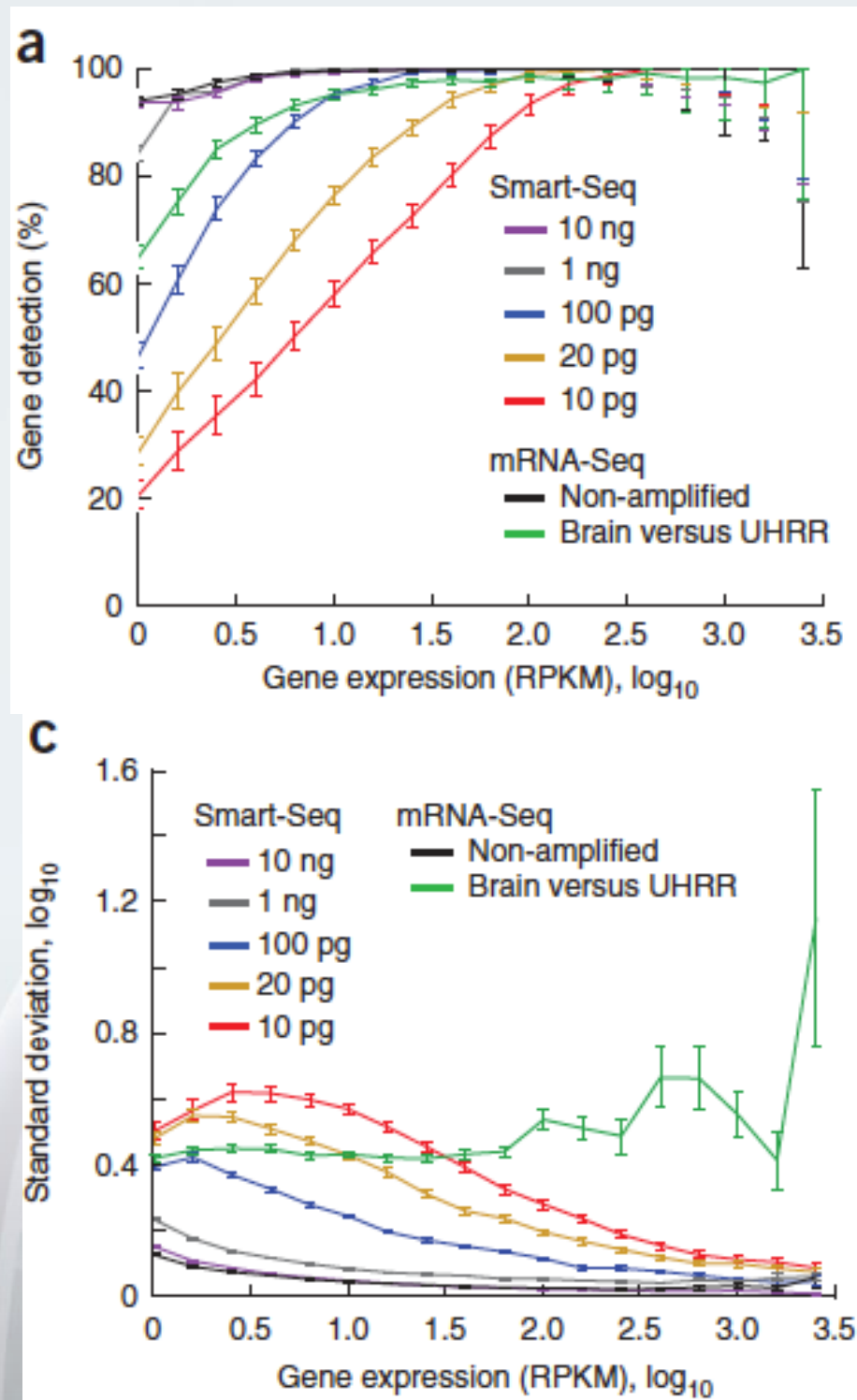
Single Cell RNA-Seq Workflow



Análisis de Transcriptoma

RNA-Seq de una célula

Smart-seq

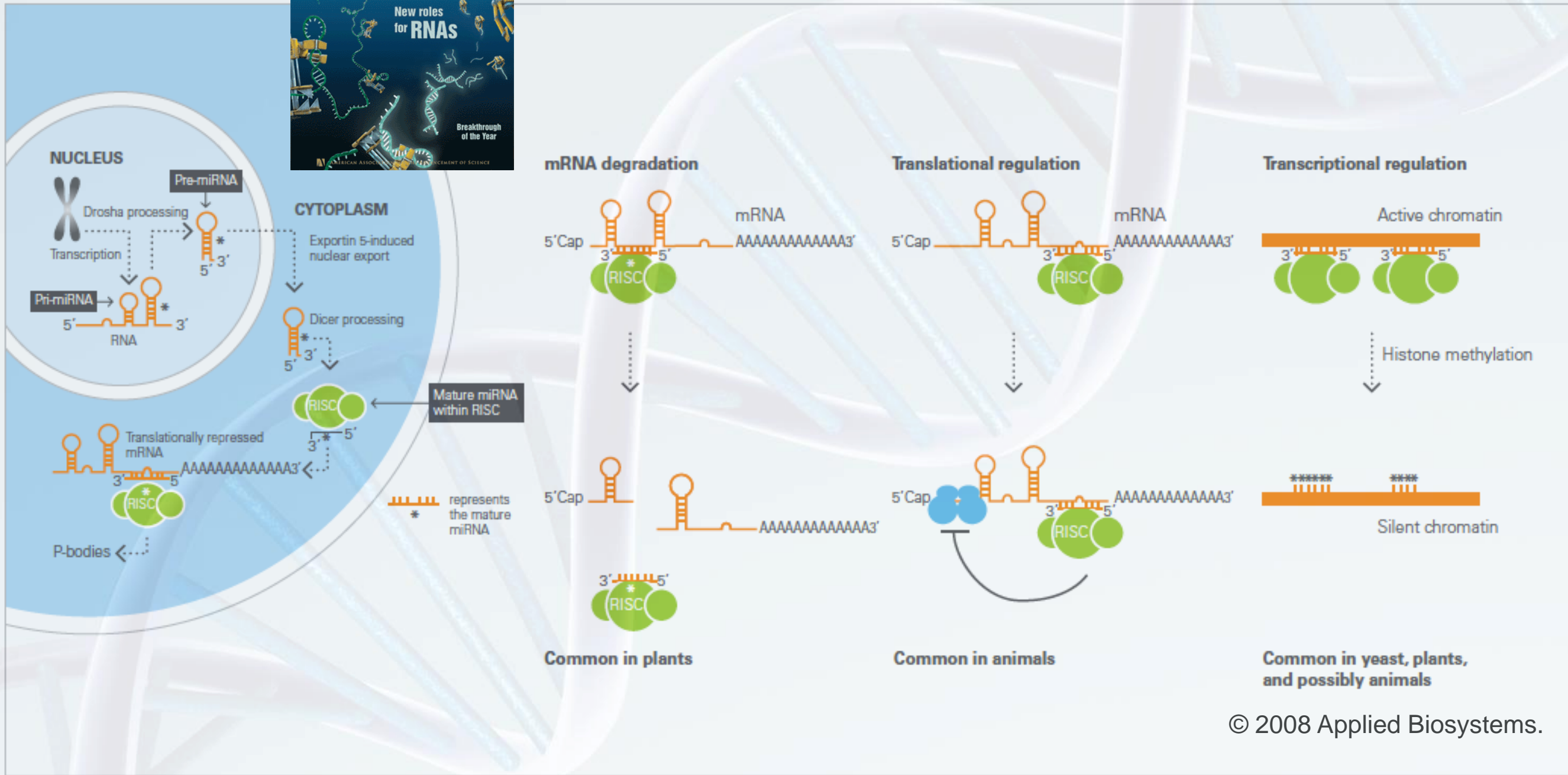


NuGEN

	Source of Total RNA					
	Human Brain (MAQC B)			Human UHR (MAQC A)		
Input of Total RNA	10 pg	100 pg	10 ng	10 pg	100 pg	10 ng
% of Total Reads						
Not Aligned	13	5	3.1	21	7	3.4
Aligned	87	95	96.9	79	93	96.6
% of Mapped Reads by Category						
All Non-rRNA	74.9	70.8	81.6	80.9	75.4	79.5
All rRNA	25.1	29.2	18.4	19.1	24.6	20.5
Distribution of RefSeq Reads						
Exons	34.3	36.6	38.5	38.3	41.6	37.3
Introns	46.7	47.4	46.1	41.9	42.6	45.2
Intergenic	19.0	15.9	15.4	19.8	15.9	17.5
RefSeq Strand Retention						
Exons	97.5	96.2	98.8	99.3	99.2	98.4
5' UTR	94.3	93.3	96.5	98.1	98.2	97.9
3' UTR	96.5	96.2	97.9	96.8	97.3	96.7

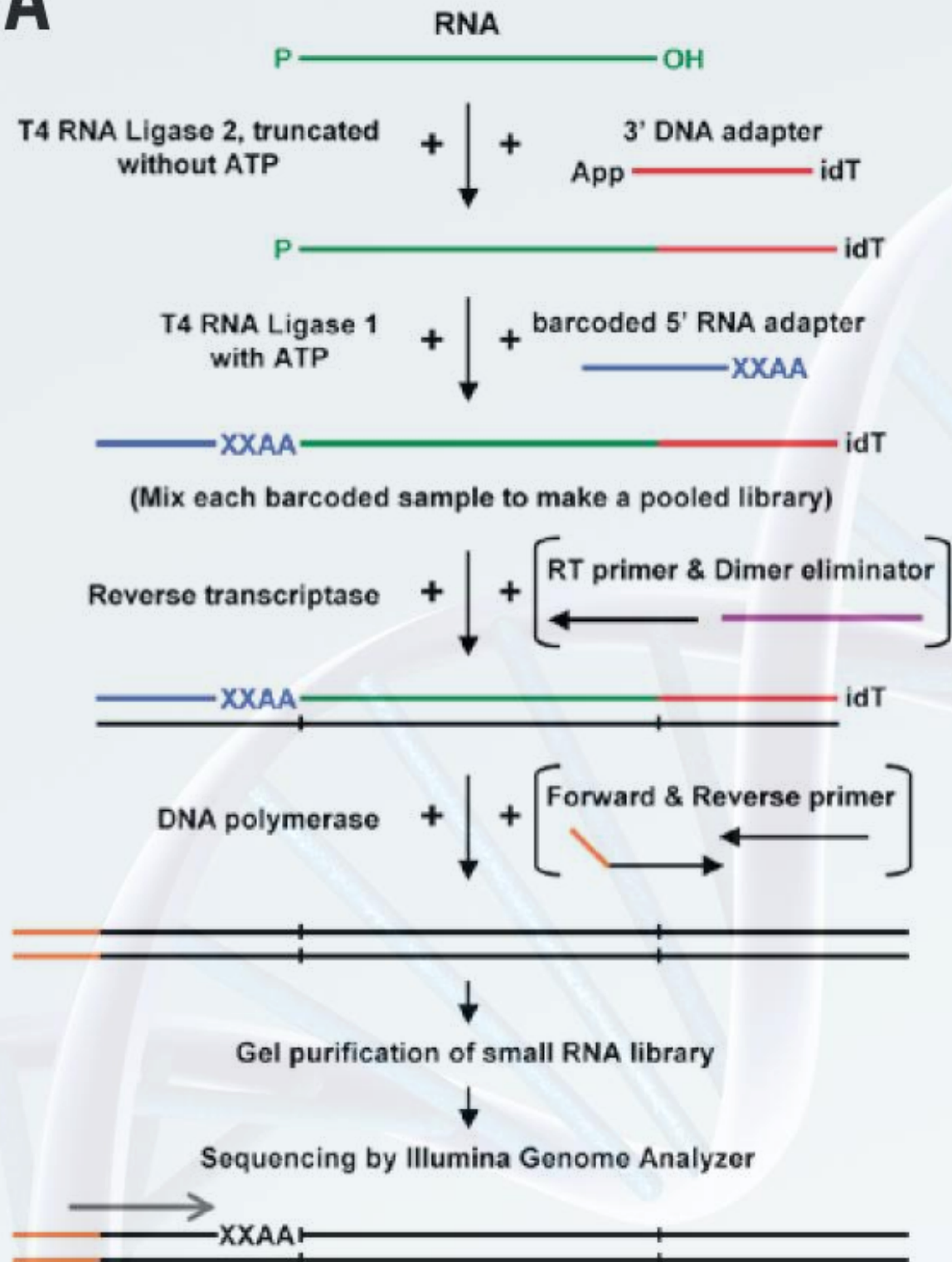
Análisis de Transcriptoma

Small RNAs

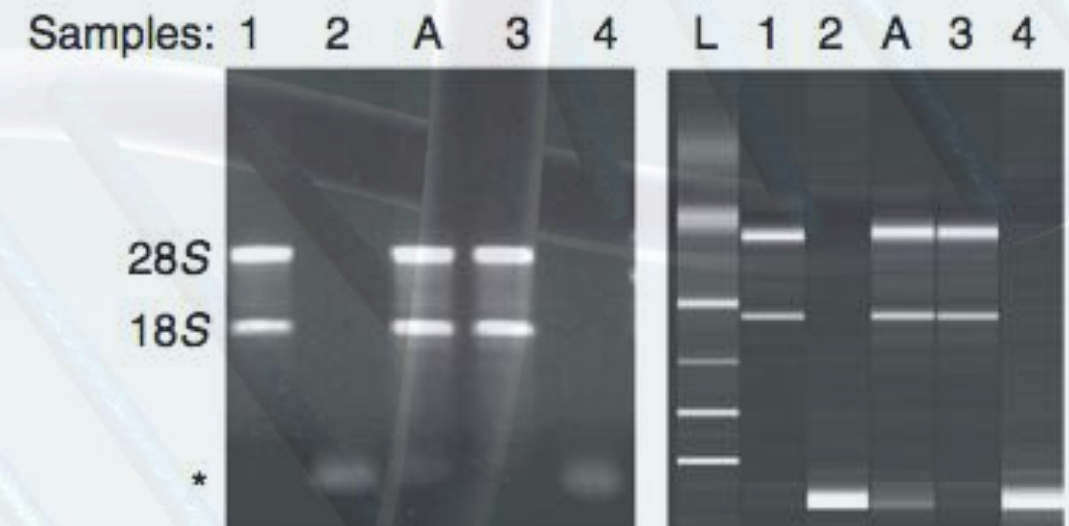


Análisis de Transcriptoma Small RNAs

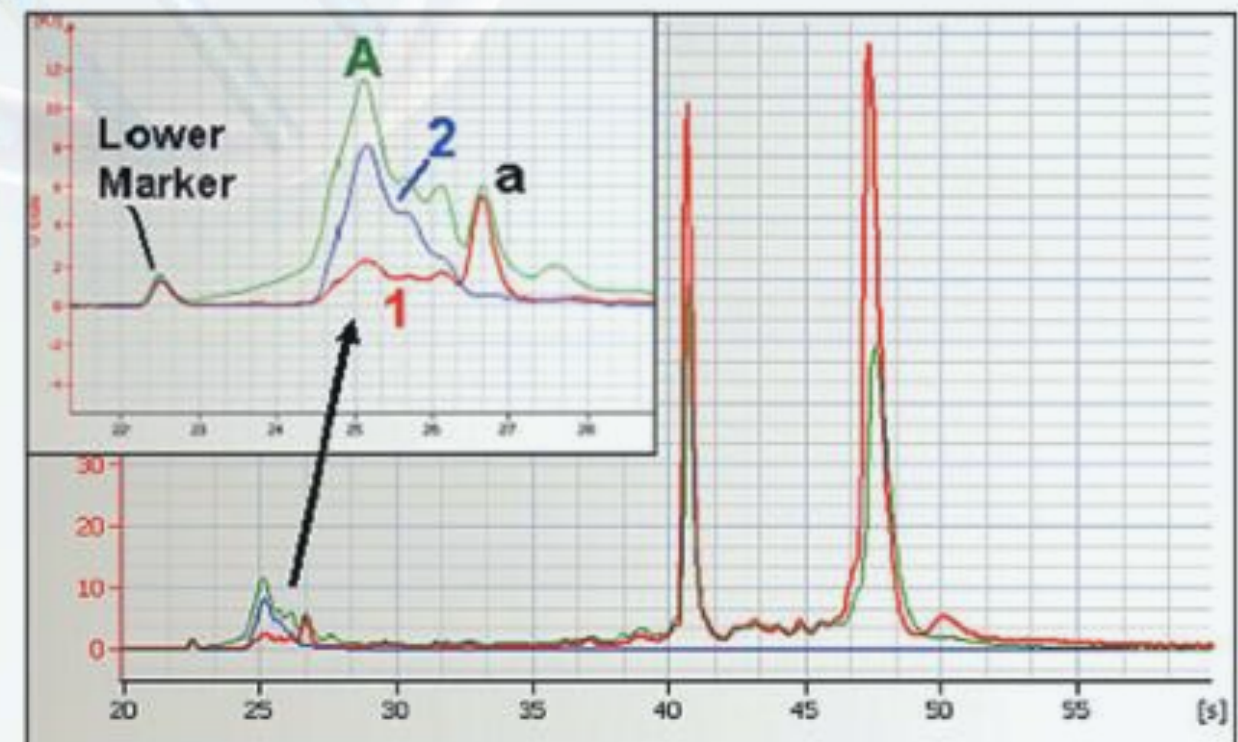
A



a



b



Análisis de Transcriptoma

Método de captura

SureSelect RNA Capture

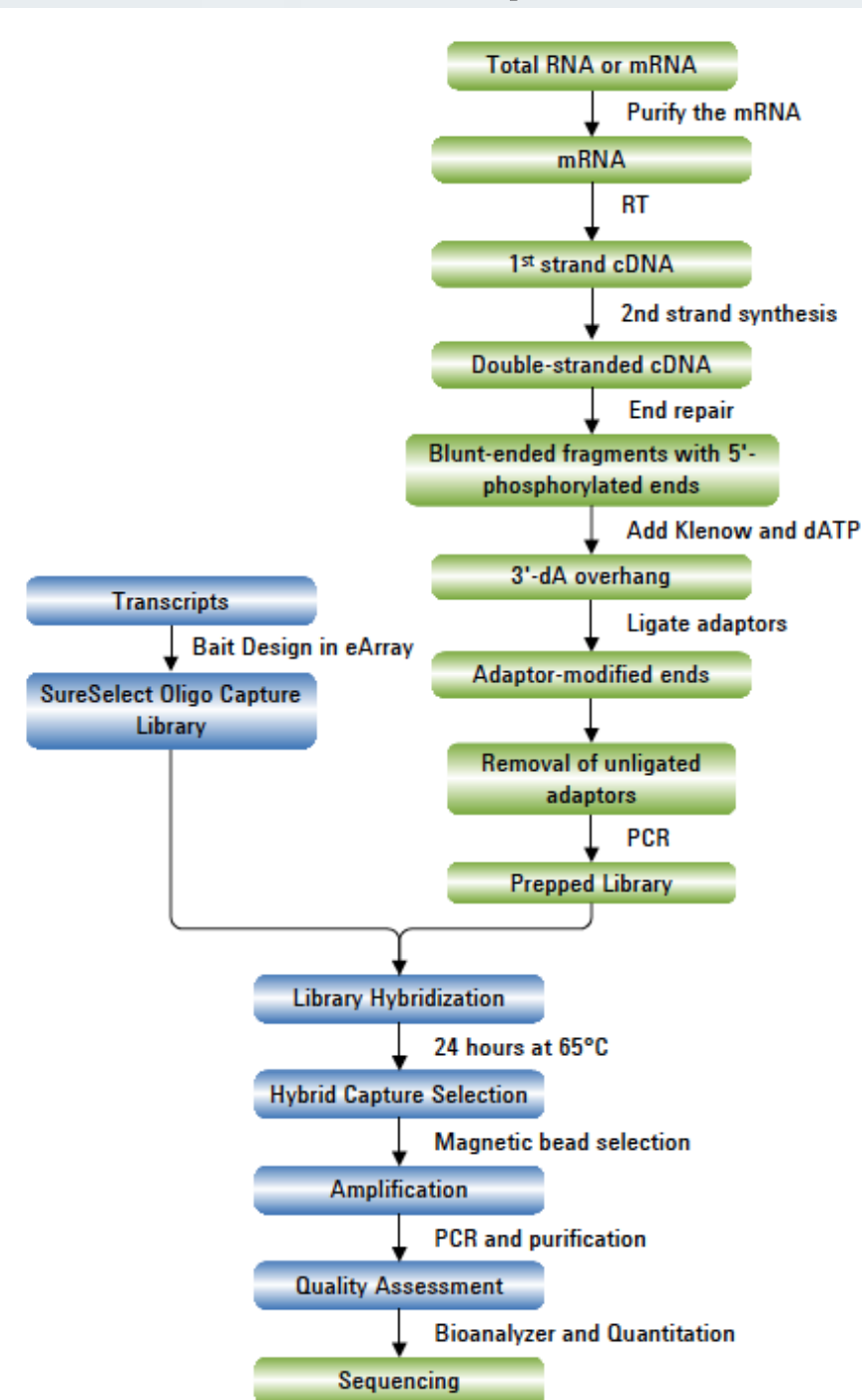
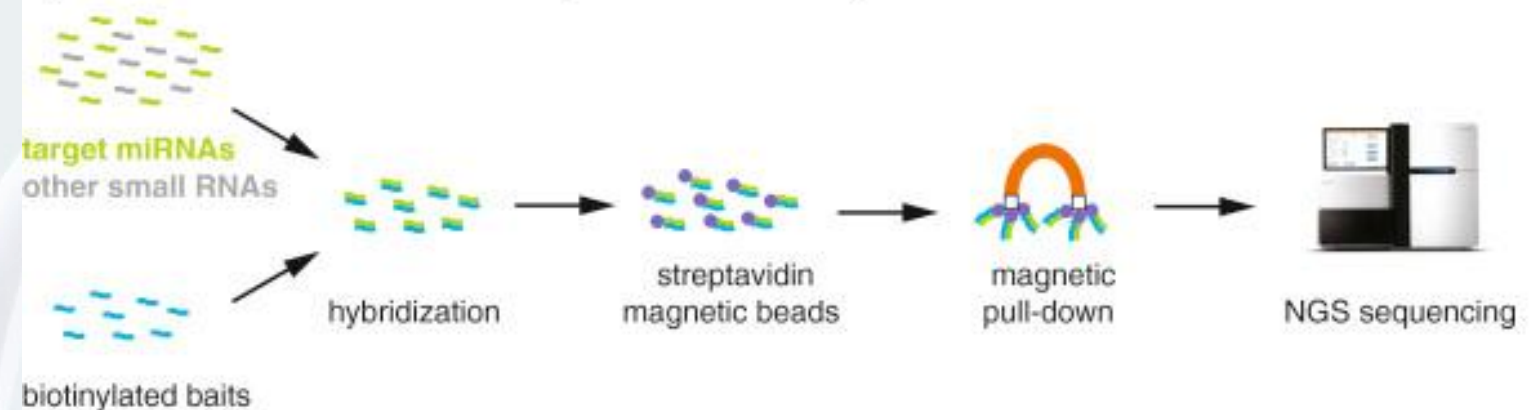
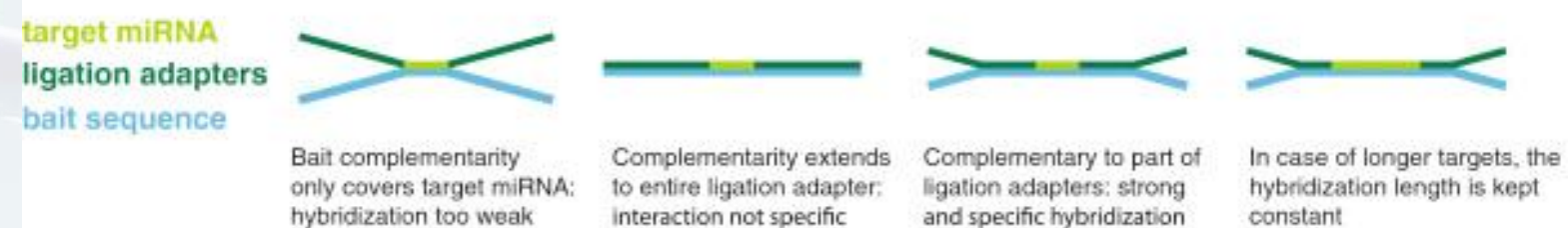


Figure 1 Overall sequencing sample preparation workflow.

a) Work-flow of custom sRNA capture SureSelect system



b) Design of bait sequences



R Friedländer *et al* Genome Biol 2014

Características

- Captura de RNAs específicos
- RNA total y mRNA
- Diseños < 10 Mb
- El diseño es sin costo

Centros de Secuenciación

SERVICIOS GENÓMICOS
LANGEBIO
CINVESTAV-Campus Guanajuato



Unidad de Biología Molecular



**Usec
INMEGEN**

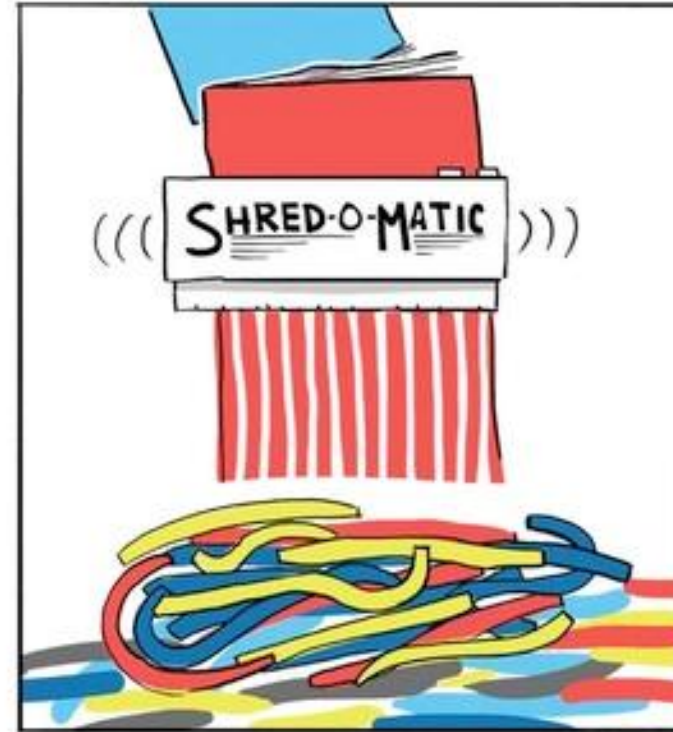
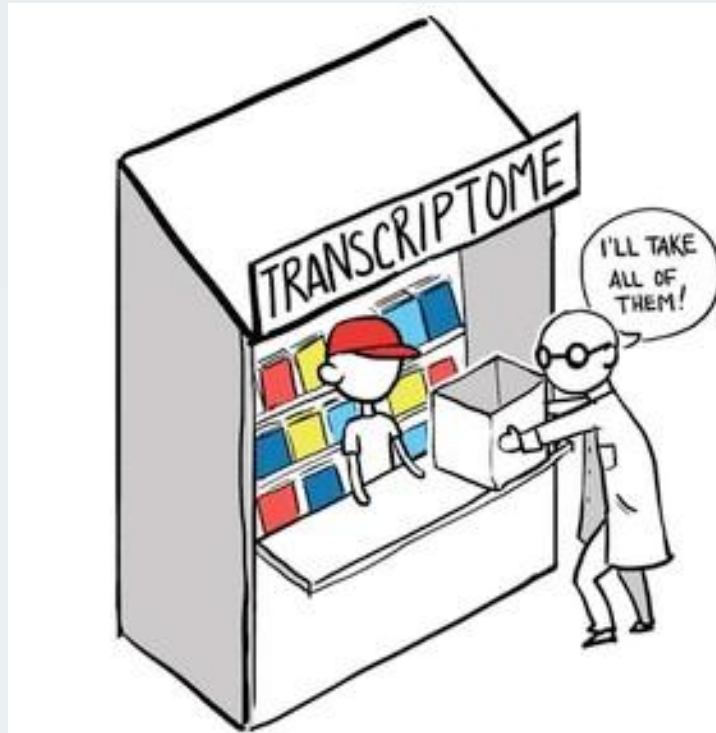


**LABORATORIO DE SECUENCIACIÓN
GENÓMICA DE LA BIODIVERSIDAD Y DE
LA SALUD**



Laboratorio Nacional en Salud

Centros de Secuenciación





www.inmegen.gob.mx

Síguenos en



Facebook

<http://on.fb.me/qaNj1Z>



Broadcast Yourself

<http://bit.ly/pcl2Zo>



Twitter

[#!/INMEGEN](https://twitter.com/#!/INMEGEN)



<http://bit.ly/rbUsIB>