

让困难样本RNA-Seq 不再困难!

SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 –
Pico Input Mammalian

SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v3 –
Pico Input Mammalian

that's
GOOD
science!™

FFPE/cfRNA/EV/病原微生物/RNA甲基化等RNA-Seq建库策略

· 制品列表 ·

制品名称	Code No.	包装量
SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 – Pico Input Mammalian	634411	12 Rxns
	634412	48 Rxns
	634413	96 Rxns
	634414	192 Rxns
SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v3 – Pico Input Mammalian	634485	24 Rxns
	634486	48 Rxns
	634487	96 Rxns
	634488	192 Rxns

Clontech **TakaRa** cellartis

· 基本介绍 ·

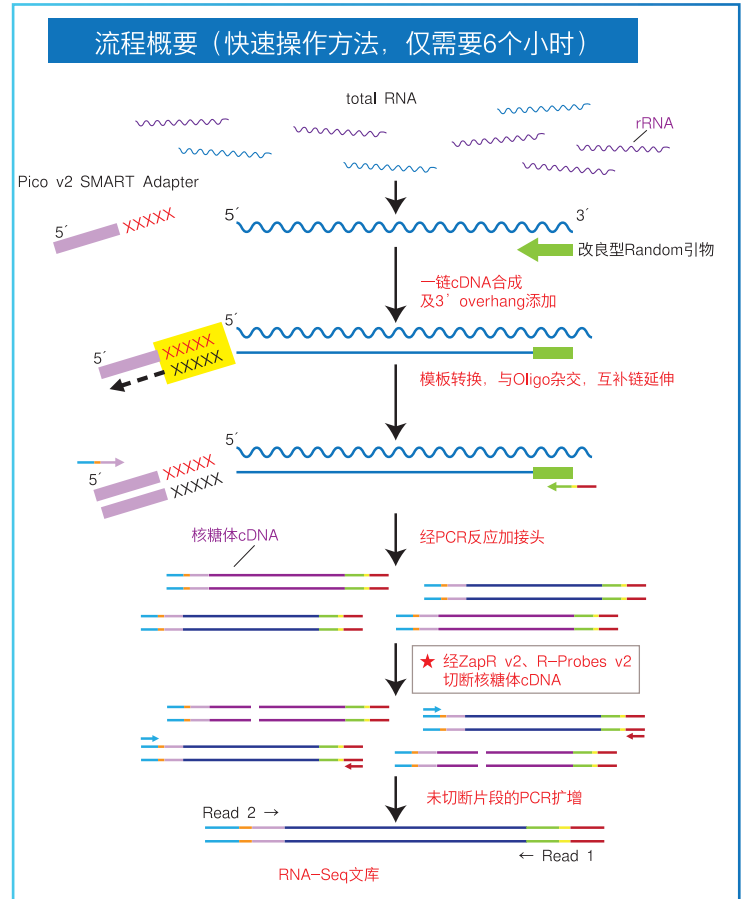
SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 – Pico Input Mammalian (Pico v2)

■ 产品特点

- ✓ **微量RNA起始** 250 pg–10 ng人、大/小鼠total RNA起始
- ✓ **无需担心RNA降解** 兼容不同品质的RNA (RIN2–10或DV₂₀₀>25%) LCM、FFPE来源的样本以及cfRNA等
- ✓ **操作简便时间短** 不需要前处理rRNA, 6小时内完成Illumina文库构建
- ✓ **非编码与编码同时分析** 随机引物起始, 捕获全转录组信息
- ✓ **信息可靠** 保留链特异性信息, 制备的文库具有方向性

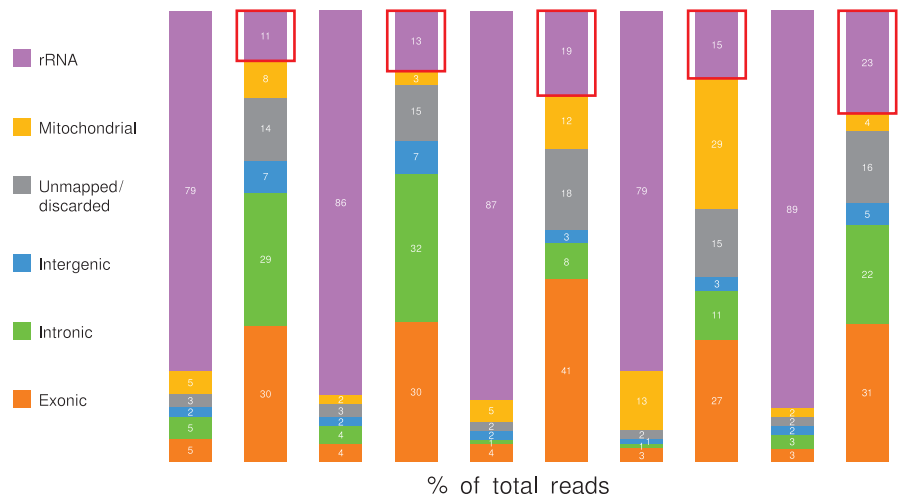
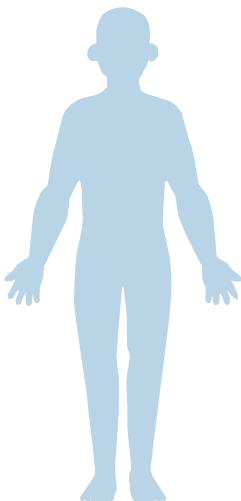
Tip: DV₂₀₀是一种评价RNA质量的指标, 即长度超过200 nt的RNA片段在所有RNA序列中的比例。

RNA的品质	DV ₂₀₀
高	>70%
中	50–70%
低	30–50%
高度降解	<30%



■ 人各组织Reads分布

本案例以250 pg总RNA起始, 分别在ZapR v2、R-Probes v2 +/-情况下文库reads数分布。结果显示, 经ZapR v2、R-Probes v2处理后核糖体RNA来源的reads大幅减少, 但依组织不同残存率有所区别。



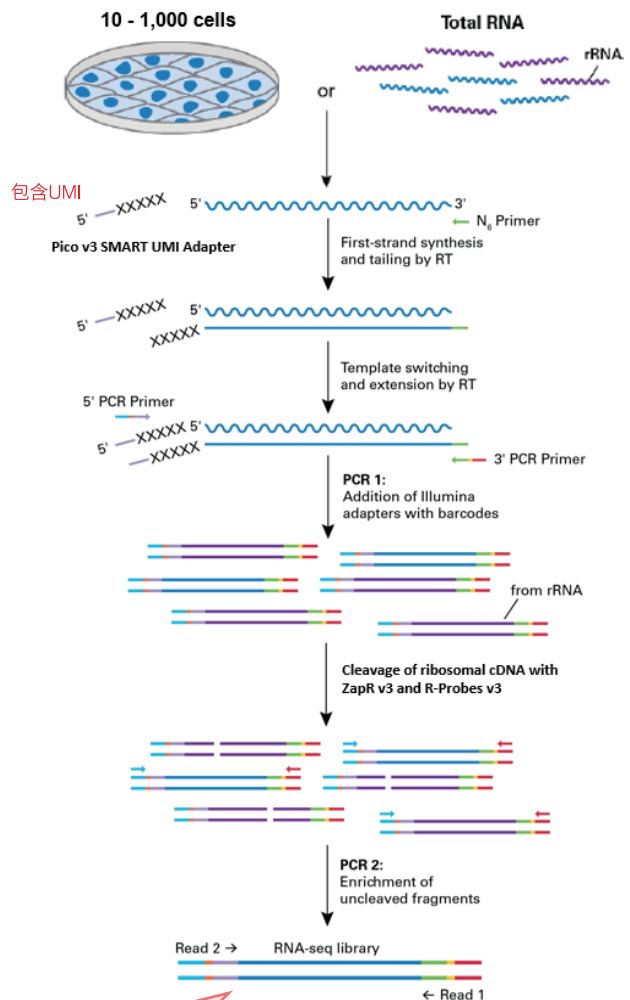
Tissue type	Brain		Placenta		Skeletal Muscle		Heart		Spleen	
Ribosomal cDNA depletion	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Library yield (ng/μl)	18.1	5.2	10.2	3.7	11.5	2.4	9.9	3.8	10.6	3.2
Number of transcripts FPKM>1	12,581	15,693	9,079	13,095	6,619	11,879	7,667	14,448	9,900	15,798
Correct strand per biological annotation (%)	97.6	97.6	97.8	97.8	98.5	98.5	98.4	98.4	98.3	98.1

· 基本介绍 ·

SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v3 – Pico Input Mammalian (Pico v3)

■ 产品特点

- ✓ 可以人、大鼠或小鼠来源的250 pg–10 ng的总RNA或10–1000个细胞起始
- ✓ 引入UMI校正PCR错误、重复序列以及测序错误
- ✓ 能分析质量较差的FFPE、LCM以及cfRNA来源的样本
- ✓ 流线型文库构建体验，无需rRNA前处理，仅需要7.5小时即可完成文库构建
- ✓ 支持编码区及非编码区的同时分析
- ✓ 可直接制备多达192种index的Illumina®-ready文库



采用[ZapR v3 & R-Probes v3]在建库过程中去除rRNA干扰!

■ 文库结构



接头序列包含：通过PCR 1反应添加的可以与Illumina流动池结合生成簇的P7、P5序列（P7以淡蓝色表示，P5以红色表示），用于区分单个lane上多个样本的Index序列（Index 1 [i7] 序列连接在P7端，Index 2 [i5]连接在P5端）。并且还包括识别测序引物区域的Read 2（紫色）和 Read 1（绿色）。通过Read 1起始得到的原始RNA的反义链序列，Read 2起始获得的是原始RNA的正义链序列。其中，通过Read 2起始时，前8个碱基是UMI（深紫色），UMI之后的3个碱基（XXX）是Pico v3 Adapter衍生的序列。

· 支持FFPE来源的RNA构建文库，DV₂₀₀低至25%也能do! ·

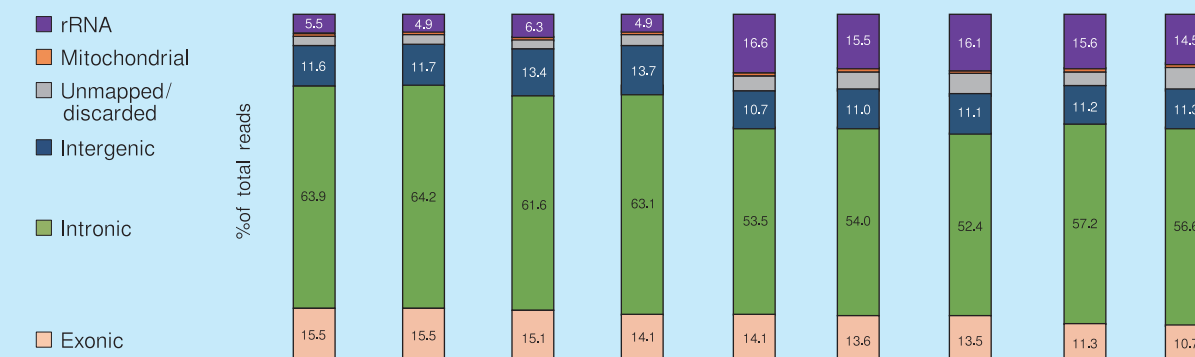
福尔马林固定石蜡包埋 (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE) 技术是一种先用福尔马林固定，再用石蜡包埋临床组织样本的处理方法。由其可长期常温保存的特点被全球的医院或组织样本库大量采用，供组织学诊断及研究使用。

当FFPE样品与NGS技术相结合，为Biomarker筛查、回顾性研究、疾病机制探讨提供了可能。

然而，福尔马林固定样本时，组织中的RNA容易发生不同程度的降解与分子间交联，石蜡的高温渗入又进一步加速降解，保存时间及环境对RNA也有不小影响，即**FFPE样本中不易留存高品质RNA**。同时，提取RNA前不当的前处理方案，不合适的扩增方法与条件也**不易获得足够量的核酸用于NGS分析**。**Pico v2和Pico v3优化用于低品质、微量的FFPE RNA-Seq文库构建!**

■ Takara实验案例 (Pico v2)

取4个不同降解程度的FFPE-RNA样本 (DV₂₀₀在28%–68%之间)，使用Pico v2试剂盒制备文库，然后进行NGS分析。同一样品，不同起始量检测到的转录本数量基本相同，具有很高的表达重复相关性，而且**比对到rRNA的比率 ≤ 20%**。



FFPE tissue	Breast (Normal)				Lung (Cancer)					
	A (66%)		B (68%)		C (30%)		D (28%)			
Sample (DV ₂₀₀)	10 ng	40 ng	10 ng	72 ng	10 ng	50 ng	90 ng	10 ng	50 ng	
Input amount	10 ng	40 ng	10 ng	72 ng	10 ng	50 ng	90 ng	10 ng	50 ng	
% duplicates	36	28	46	27	56	41	28	59	36	
Transcripts ≥1 FPKM	10,023	9,916	9,348	8,716	10,592	10,346	10,495	9,305	9,251	
Transcripts ≥0.1 FPKM	21,831	21,855	20,662	20,491	22,119	22,370	22,546	21,416	21,961	
Pearson/Spearman	0.99/0.9		0.98/0.88		0.99/0.88		0.99/0.88		0.99/0.95	

(以上图片与数据来源于Takara Bio USA, Inc.)

■ 文献案例 (Pico v3)

Marc Hilmi, *et al.* Whole-Transcriptome Profiling on Small FFPE Samples: Which Sequencing Kit Should Be Used? *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, 44(5), 2186–2193

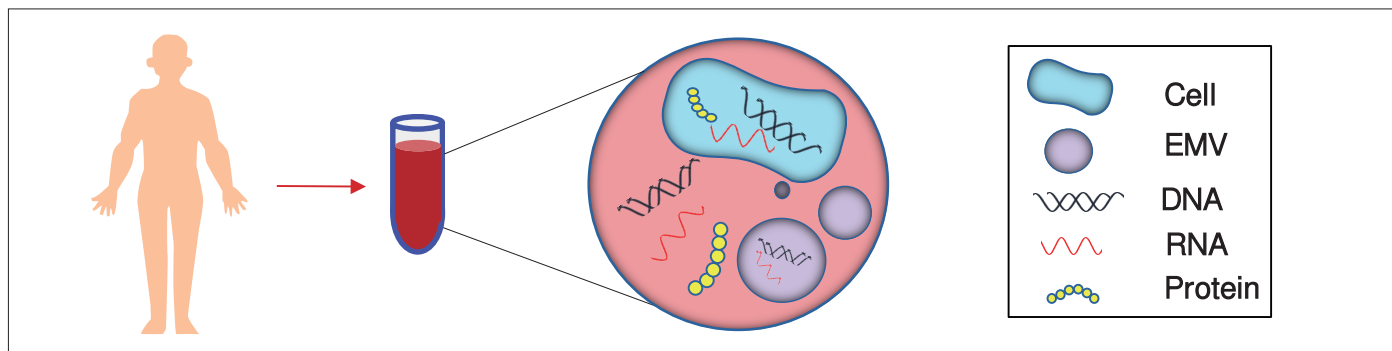
在本研究中，来自巴黎大学研究人员比较了5种不同的RNA建库试剂盒，以寻找更加可靠、性价比更高的RNA-Seq方法。研究人员使用8 ng至400 ng的乳腺癌FFPE RNA样本 (DV₂₀₀为13%–69%，平均42%)，使用五种兼容FFPE建库试剂盒 (基于3'捕获、外显子组捕获和核糖体去除方法) 进行文库构建，并将从同一肿瘤的冻存样本中提取的RNA使用Illumina的TruSeq试剂盒制备文库作为参考组。

结果表明，在这5个试剂盒中，**Pico v3试剂盒**用于8 ng RNA样本进行文库构建，可获得与高起始量的参考组类似的结果 ($p < 0.001$)，因此**是更加适合研究少量 FFPE 样本的的RNA-Seq 技术，并且具有高度可重复性**。

· 轻松handle液态活检研究相关样本RNA-Seq! ·

肿瘤细胞（病变细胞）所释放出的特征物质能进入体液，我们可以从中分析到疾病发生发展过程中的关键信息。由此，液态活检技术应运而生。由于灵敏度高，液态活检适用于早期诊断以及指导用药、疗效与复发监控，特征物质包括游离核酸（cfDNA/cfRNA）、细胞外囊泡（EV）等。在开发液态活检项目时，研发人员常面临多种挑战，需要更好用的解决方案。

Takara真香推荐Pico v2和Pico v3，助您研发液态活检RNA-Seq项目！



✓ 游离RNA-Seq (cell free RNA, cfRNA)

随着研究的不断深入，科研人员发现单纯用ctDNA不能全面反映疾病在RNA水平的生物活性，无法明确突变对细胞进程的影响。而RNA水平的检测能明确癌症在特定时间发生的变化，可定期监控疾病的发展及对治疗的反应，并预测身患同一癌症的不同个体将对不同疗法有何反应，因此受到广泛关注。但cfRNA在外周血中含量低、结构不稳定，文库制备比较困难。别怕，Pico v2和Pico v3能轻松应对！

■ 文献案例1 (Pico v2)

Rasmussen M, Reddy M, Nolan R, *et al.* RNA profiles reveal signatures of future health and disease in pregnancy [J]. *Nature*, 2022, 601(7893).

先兆子痫是孕产妇发病以及死亡的主要原因之一。不过，对其潜在问题的发现和发病风险仍然存在难度。

2022年1月，Mirvie公司联合布莱根妇女医院在 *Nature* 发表了题为：RNA profiles reveal signatures of future health and disease in pregnancy 的研究论文。研究团队对来自8个独立队列的1840名孕妇的**2539例血浆样本进行了cfRNA分析**，就能在临床确诊几个月前预测孕期出现先兆子痫的风险。研究发现通过检测母体血浆中cfRNA转录组，不仅可以预测胎儿的胎龄，还可以反映妊娠进展的生理状态。对1908例cfRNA图谱进行机器学习和建模，并对474例样本进行测试，其准确性与妊娠中期的超声检查相似且优于妊娠晚期超声检查。

在案例中，使用Pico v2对cfRNA样本进行文库构建，并进行了靶向富集测序。

■ 文献案例2 (Pico v3)

Porritt RA, Binek A, Paschold L, *et al.* The autoimmune signature of hyperinflammatory multisystem inflammatory syndrome in children. *J Clin Invest.* 2021;131(20):e151520.

儿童多系统炎症综合征(multisystem inflammatory syndrome in children, MIS-C)是一种由SARS-CoV-2感染后引发的严重的、不受控制的炎症反应，涉及多器官。

在本研究中，洛杉矶 Cedars-Sinai 医疗中心的研究人员利用蛋白质组学、RNA测序、自身抗体阵列和B细胞受体 (BCR) 库分析来表征MIS-C免疫发病机制，并进一步确定导致重症症状以及重症监护病房入院的因素。样本包括轻度MIS-C (n=7)、重度MIS-C (n=20)、KD (n=7, COVID 19发生之前收集到的川崎病患者样本)、健康对照(n=20)、发热对照组(n=15)。其中，**92%的MIS-C血清样本和100%的KD血浆样本在IVIG给药前采集。**

在案例中，使用Pico v3构建10 ng total RNA起始的测序文库，并使用Illumina Novaseq 6000 (PE 50) 进行测序分析。

✓ 细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EV) RNA-Seq

细胞外囊泡是细胞在静息或应激状态下释放的各种具有脂质双层膜结构的囊泡总称，主要由外泌体、微囊泡和凋亡小体组成，存在于细胞培养上清以及血液、尿液等体液中。

EV中包含母细胞相关的蛋白质、脂类、核苷酸（包括DNA、mRNA、miRNA、lncRNA等）和糖等多种生物活性物质，广泛参与细胞之间的信息传递，对维持各种生理过程至关重要，被认为是潜在的Biomarker。

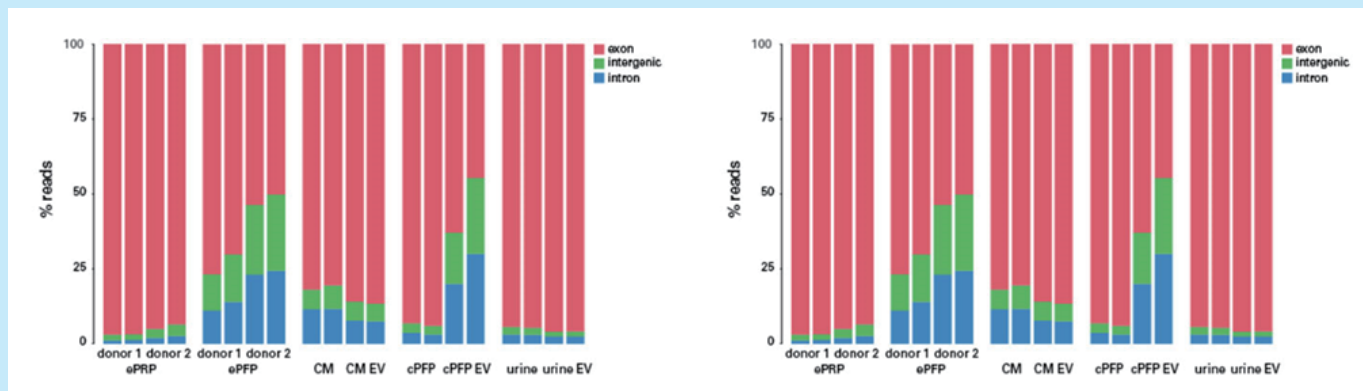
因此，科研人员非常重视EV中这些物质的分析，其中mRNA与lncRNA的分析由于存在一定难点，科研人员需要更好的技术去解决问题！

Pico v2和Pico v3均采用随机引物起始，能够对一个样本同时完成mRNA与lncRNA文库的构建，是EV RNA-Seq的理想选择！

■ 文献案例1 (Pico v2)

Everaert C., *et al.* Performance assessment of total RNA sequencing of human biofluids and extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2019 Nov 26;9(1):17574.

来自根特大学的科研人员与Biogazelle公司合作开展一项研究，探讨不同来源的cfRNA分子特性的差异。科研人员选取含血小板血浆（ePRP）、不含血小板血浆（ePFP）、细胞培养上清（CM）、尿液（urine）、及上述几种体液分离的细胞外囊泡，提取RNA并采用Pico v2构建文库、测序↓



结果显示，不同样本来源的cfRNA，测序reads分布有明显差异。其中，含血小板血浆cfRNA超过75% reads比对到线粒体来源RNA，而不含血小板血浆cfRNA绝大多数reads比对到细胞核DNA。并且，不同类型cfRNA的内含子、外显子、基因间隔区的reads占比也有较大不同。

■ 文献案例2 (Pico v2)

Almeida A, Gabriel M, Firlej V, *et al.* Urinary extracellular vesicles contain mature transcriptome enriched in circular and long noncoding RNAs with functional significance in prostate cancer. *J Extracell Vesicles.* 2022;11(5):e12210.

研究人员对6个前列腺癌FFPE样本，以及其对应的尿液来源的EV进行总RNA测序，以进行对来自同一患者的全转录组比较。本次研究发现，尿液来源的细胞外囊泡含有成熟的转录组，富含环状RNA和lncRNA，在前列腺癌的研究具有功能意义。其中Pico v2用于total RNA样本(10 ng)的文库构建。

· 助力break through病原宏转录组项目研发瓶颈! ·

人类与感染性疾病的战斗持续了几千年。但自17世纪列文虎克第一次用显微镜观察到微生物后，人类才逐渐认知到了感染性疾病是由病原微生物导致，逐步开启了病原微生物的研究。

主要的研究方法包括经典的培养鉴定法、实时荧光定量PCR法、NGS分析、质谱分析等多种方法。其中NGS由于可直接从宿主中快速而正确地检测鉴别病原体的全基因组序列，以及通量高、数据库全等特点，逐渐成为微生物研究领域的重要方法。

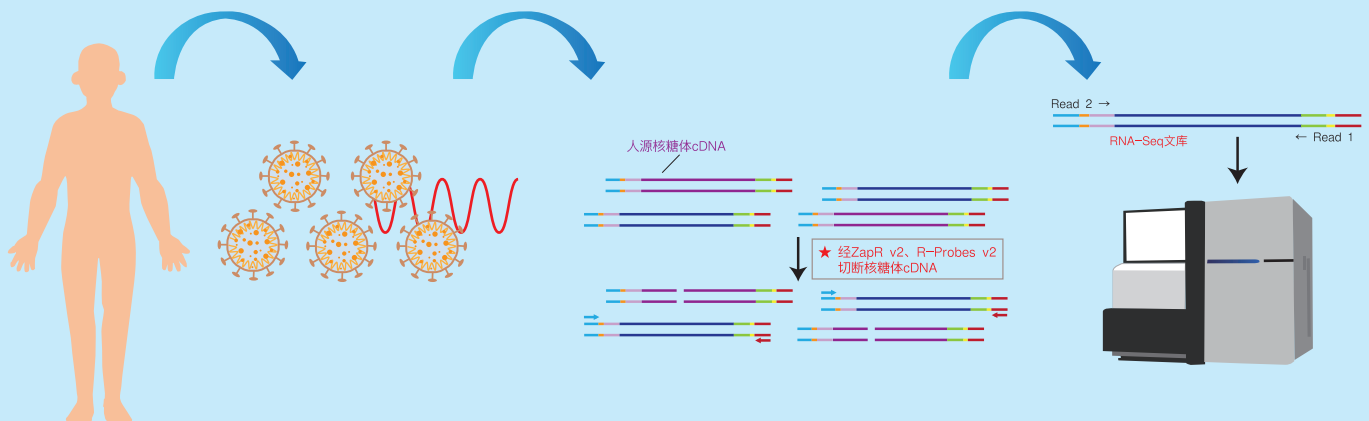
宏转录组技术是近几年兴起的采用NGS分析环境、临床样本中所有RNA病毒的技术，用于RNA病毒基因组序列的解析、溯源与变异追踪，为后续实现对感染性疾病精准诊断、治疗及预防提供技术保障。

然而，在使用鼻拭子、咽拭子、肺泡灌洗液等临床样本进行病原微生物NGS分析时，往往会遇到病原核酸含量少、样本背景复杂、宿主核酸干扰大、建库过程PCR扩增不均一等问题，给正确分析病毒基因组信息造成困难。

Pico v2和Pico v3能够应对这一挑战，可用于RNA病原微生物的检测分析!

■ 文献案例1 (Pico v2)

复旦大学张永振教授团队通过测序分析了**新冠病毒基因组序列**，该病毒样本来自一名41岁的男性患者，相关成果发表在Nature杂志题为*A new coronavirus associated with human respiratory disease in China*的文章中。本研究对200 μ L肺泡灌洗液 (BALF) 样本提取总RNA，使用Illumina MiniSeq (PE 150) 进行深度宏转录组测序，确定了该病毒的基因组。同时进行系统进化分析，发现与一组来自于中国蝙蝠SARS样冠状病毒基因组相似度达到89.1%。作者使用了**SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian**制备宏转录组文库，通过核心的ZapR v2、Rprobes v2技术在建库过程中去除了人源rRNA!



■ 文献案例2 (Pico v2)

来自瑞典乌普萨拉大学的Dr. John Pettersson采用宏转录组技术研究中枢神经系统综合征患者脑脊液中的HBV病毒，结合系统发育学发现部分HBV病毒基因组属于Genotype B和C，并与其它一些亚洲病毒基因组类似。相关成果发表在Diagnostic microbiology and infectious disease杂志 *Meta-transcriptomic identification of hepatitis B virus in cerebrospinal fluid in patients with central nervous system disease* 一文中。

在此案例中，Dr. John团队采用**SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian**完成宏转录组文库构建。所用的样本为150 μ l脑脊液，**total RNA浓度为50-200 pg/ μ l**。

· 助力RNA甲基化研究项目研发瓶颈! ·

近年来的研究发现, m6A (N6-甲基腺嘌呤, N6-methyladenosine) 是真核生物mRNA上非常普遍的化学修饰。m6A在调控mRNA的稳定性、剪切、翻译等方面扮演重要角色。m6A RNA甲基化测序一般采用的方法通过m6A特异性抗体对具有m6A修饰的RNA片段进行免疫共沉淀, 将富集下来的RNA片段进行文库构建, 然后再上机测序。Pico v2和Pico v3可以用于RNA甲基化测序研究的文库构建!

■ 文献案例 (Pico v2)

Zhuo W, Sun M, Wang K, *et al.* m6Am methyltransferase PCIF1 is essential for aggressiveness of gastric cancer cells by inhibiting TM9SF1 mRNA translation. *Cell Discov.* 2022 May 21;8(1):48.

浙江大学周天华/卓巍教授课题组与北京大学伊成器教授课题组合作, 发现胃癌组织中PCIF1表达水平以及m6Am修饰均显著升高, 并且PCIF1的高表达与胃癌发展以及不良预后均显著相关。在探索下游机制过程中, 通过m6Am-Seq和m6A-RIP qPCR技术等, 筛选并鉴定了TM9SF1 mRNA可能是PCIF1调控胃癌进展的重要下游靶基因。

其中, SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2- Pico Input Mammalian用于构建m6Am-Seq测序文库。

· 部分参考文献 ·

■ FFPE RNA-Seq参考文献

1. Lin X, Qiu L, Song X, *et al.* A comparative analysis of RNA sequencing methods with ribosome RNA depletion for degraded and low-input total RNA from formalin-fixed and paraffin-embedded samples[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 1-13.

■ 液态活检参考文献

1. Everaert C, Helmsmoortel H, Decock A, *et al.* Performance assessment of total RNA sequencing of human biofluids and extracellular vesicles[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1).
2. Lennon K M, Wakefield D L, Maddox A L, *et al.* Single molecule characterization of individual extracellular vesicles from pancreatic cancer[J]. *Journal of extracellular vesicles*, 2019, 8(1).
3. Pan W, Ngo T T, Camunassoler J, *et al.* Simultaneously monitoring immune response and microbial infections during pregnancy through plasma cfRNA sequencing[J]. *Clinical Chemistry*, 2017, 63(11): 1695-1704.

■ 病原宏转录组参考文献

1. Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
2. Pettersson J H, Piorkowski G, Mayxay M, *et al.* Meta-transcriptomic identification of hepatitis B virus in cerebrospinal fluid in patients with central nervous system disease[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2019, 95(4).
3. Temmam S, Vongphayloth K, Hertz J C, *et al.* Six nearly complete genome segments of a novel reovirus identified in laotian batflies[J]. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(46)e00733-19.

销售商:

宝日医生物技术 (北京) 有限公司
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

地址: 北京市昌平区科学园路22号 (中关村生命科学园内)
电话: 010-80720985, 80720986

制造商:

宝生物工程 (大连) 有限公司
Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

地址: 辽宁省大连市经济技术开发区东北二街19号
电话: 0411-87621671

- 本宣传页上登载的制品, 都是以科研为目的。请不要用于其它方面, 如: 不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可, 严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认: <https://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注, 使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用, 其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2022年7月1日的信息, 最新信息请参考公司官网。

Ver.1 2022年7月印刷 5K