

Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligazione con Ribo-Zero™ Plus

Una visione chiara e completa del trascrittoma con una flessibilità di studio eccezionale.

Punti principali

- Deplezione ribosomiale efficace con Ribo-Zero™ Plus**
 Consente di rimuovere l'rRNA da campioni di origine umana, di topo, di ratto e di specie batteriche e l'RNA della globina in una reazione a provetta singola.
- Dati di elevata qualità da campioni difficili e con basso input**
 Consente di ottenere un'elevata sensibilità a partire da soli 1 ng di RNA di alta qualità o 10 ng di RNA da campioni FFPE degradati.
- Flusso di lavoro di preparazione delle librerie per sequenziamento dell'RNA rapido**
 Permette di preparare le librerie in sette ore con una durata degli interventi manuali di tre ore: oltre il 40% più rapido di TruSeq Stranded Total RNA.
- Sequenziamento ad alta processività con costo totale ridotto**
 Supporta il multiplex di centinaia di campioni in una singola corsa con indici doppi univoci.

Introduzione

Il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) con un sistema di sequenziamento di nuova generazione (NGS) è un metodo potente per la scoperta, l'identificazione del profilo e la quantificazione dei trascritti dell'RNA. Ecco alcuni vantaggi del sequenziamento dell'RNA:

- Il sequenziamento dell'RNA totale fornisce un approccio imparziale e privo di ipotesi per un'analisi completa del trascrittoma. Misura accuratamente l'abbondanza di geni e trascrizioni e rileva sia le caratteristiche note che quelle nuove nella codifica e nelle forme multiple di RNA non codificanti.
- Il sequenziamento dell'RNA messaggero (mRNA) quantifica in modo sensibile e preciso l'espressione genica, identifica le isoforme note e quelle nuove nel trascrittoma di codifica e misura l'espressione specifica per l'allele.
- Il sequenziamento dell'RNA mirato analizza l'espressione genica in un insieme mirato di geni di interesse. Il sequenziamento dell'RNA mirato attraverso l'arricchimento consente un'analisi dell'esoma dell'RNA a costi contenuti utilizzando l'acquisizione specifica della sequenza delle regioni di codifica del trascrittoma.

TruSeq™ Stranded Total RNA è una soluzione robusta per l'analisi dell'intero trascrittoma per campioni di qualità standard e bassa. Tuttavia, i requisiti di input relativamente elevati, la lunga durata totale del saggio e i lunghi tempi per gli interventi manuali hanno limitato la sua utilità nelle applicazioni di sequenziamento dell'RNA. Per risolvere questi problemi, Illumina ha sviluppato Illumina Stranded Total RNA Prep. Questa soluzione avanzata offre una preparazione delle librerie rapida e basata sulla ligazione, che supporta input di campioni ridotti e un'ampia gamma di applicazioni di sequenziamento dell'RNA (Tabella 1). Per concentrare gli studi sulle sequenze di alto valore, Illumina Stranded Total RNA Prep include il kit di deplezione dell'RNA Illumina Ribo-Zero Plus, in grado di rimuovere in modo efficiente l'RNA ribosomiale (rRNA) di più specie, tra cui uomo, topo, ratto e batteri, in una singola reazione (Figura 1).

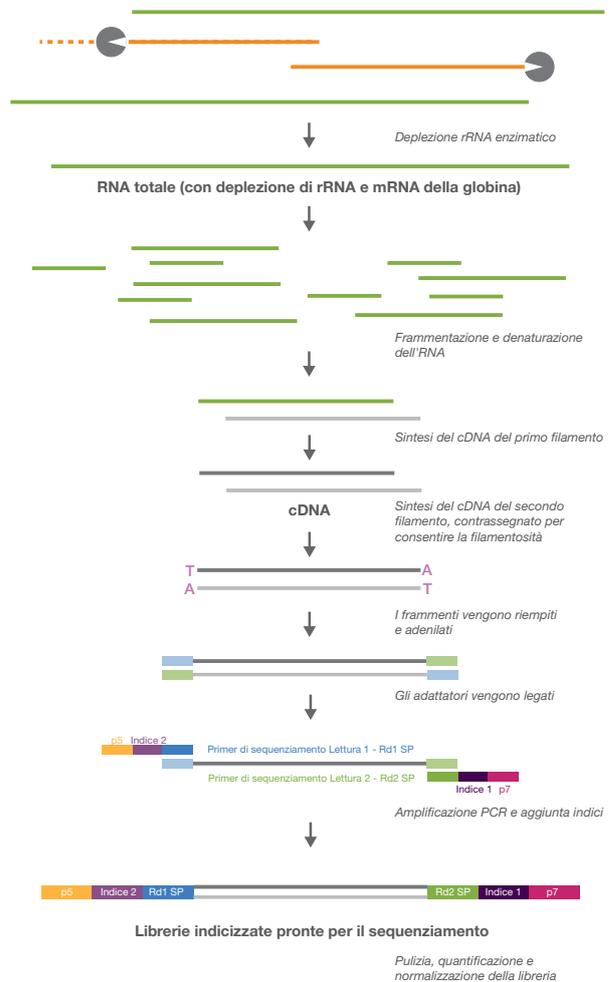


Figura 1: Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus.

Al termine della deplezione dell'rRNA e degli mRNA con abbondanza di globina (linee arancioni) e al termine della sintesi del cDNA, gli adattatori vengono legati e gli indici doppi univoci vengono aggiunti dall'amplificazione PCR al fine di produrre librerie di alta qualità che verranno quantificate e normalizzate prima del sequenziamento.

Deplezione ribosomiale efficace e multispecie con Ribo-Zero Plus

La rimozione di RNA abbondanti, compresi gli rRNA e gli RNA della globina, prima del sequenziamento dell'RNA, permette ai ricercatori di concentrarsi sull'analisi di porzioni ad alto valore informativo del trascrittoma, riducendo i costi di sequenziamento. Illumina Stranded Total RNA include il kit di deplezione dell'rRNA Ribo-Zero Plus, che permette di eseguire ricche analisi del trascrittoma rimuovendo gli rRNA e gli RNA della globina. Il metodo della deplezione ribosomiale a provetta singola è compatibile con input bassi (1 ng) e riduce l'rRNA da specie procariotiche ed eucariotiche (Tabella 2). L'rRNA abbondante e l'RNA della globina vengono rimossi dall'RNA totale mediante ibridazione mirata del DNA con sonde e successiva scissione RNasi H (Figura 2, Tabella 3). Campioni con deplezione ribosomiale in fase di preparazione della libreria.

Tabella 1: Specifiche di Illumina Stranded Total RNA Prep

Caratteristica	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
Deplezione di RNA abbondante	rRNA umano, di topo, di ratto oppure mRNA della globina	rRNA umano, di topo, di ratto e mRNA della globina
UDI max	96	384
Quantità di input di RNA	100-1000 ng	1-1000 ng RNA ^a
Durata totale del saggio	11,5 ore	7 ore
Durata interventi manuali	5,5 ore	< 3 ore
Compatibile con FFPE?	Sì	Sì
Configurazione del kit	48 o 96 campioni	16 o 96 campioni
a. 1-1000 ng di RNA di alta qualità ^a (RIN > 7), 10-1000 ng di RNA degradato (RIN 2-7) o di RNA FFPE (DV ₂₀₀ > 55). Per prestazioni migliori, si consiglia un input di 10 ng di RNA. Abbreviazioni: UDI, indici doppi univoci; RIN, numero integrità RNA		

Per valutare la deplezione dell'rRNA e le prestazioni di preparazione della libreria con Illumina Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus, è stata testata una serie di input di RNA totale e messa a confronto con TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero. Le prestazioni di Illumina Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus sono risultate essere superiori, specie con input bassi (Figura 3, Tabella 4).

Elevata qualità dei dati

Uniformità di copertura

Illumina Stranded Total RNA Prep produce librerie di sequenziamento che si traducono in una copertura altamente uniforme delle trascrizioni utilizzando un input di RNA di riferimento umano universale (UHR) di alta qualità e degradato (Figura 4A) e basse quantità di input di RNA FFPE (Figura 4B).

Tabella 3. Deplezione dell'mRNA della globina da leucociti del sangue periferico umano con Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus

Gene	Input di RNA totale 100 ng			Input di RNA totale 10 ng		
	Senza deplezione	Con deplezione	% deplezione	Senza deplezione	Con deplezione	% deplezione
HBA1	7489	2	99,97%	13.685	4	99,97%
HBA2	66.045	18	99,99%	110.406	16	99,97%
HBB	154.614	78	99,95%	173.704	86	99,95%
HBG1	22	0	96,69%	37	1	99,29%
HBG2	203	0	100%	143	0	100%

Tabella 4. Metriche delle prestazioni per Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus^a

	Input di RNA totale 100 ng		Input di RNA totale 10 ng		Input di RNA totale 1 ng	
	TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus
% rRNA (28S/18S)	2,0	3,8	7,2	4,4	32,8	4,5
% Filamentosità	99	99	99	99	99	99
Mediana CV di copertura	0,44	0,46	0,48	0,47	0,52	0,51
% Duplicati ^b	7,5	4,5	12,8	5,3	40,9	19,2
% Allineati	96,9	96,9	94,2	97,5	76,6	97,5
% Abbondanza	3,0	4,9	8	5,2	35,8	5,0

a. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando l'app BaseSpace™ RNA-Seq Alignment versione 2.0.1.

b. La percentuale di duplicati è riportata dopo 4 M di letture paired-end attraverso il filtro (PF) sottocampionate.

Tabella 2: Specie di RNA mirate per la riduzione

Campione	rRNA mirati
rRNA citoplasmici umani	28S, 18S, 5,8S, 5S
rRNA mitocondriali umani	12S, 16S
Trascrizioni di Beta Globina umana	HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2
rRNA di topo e ratto	16S, 28S
rRNA batterici Gram (-)	<i>E. coli</i> 5S, 16S, 23S
rRNA batterici Gram (+)	<i>B. subtilis</i> 5S, 16S, 23S

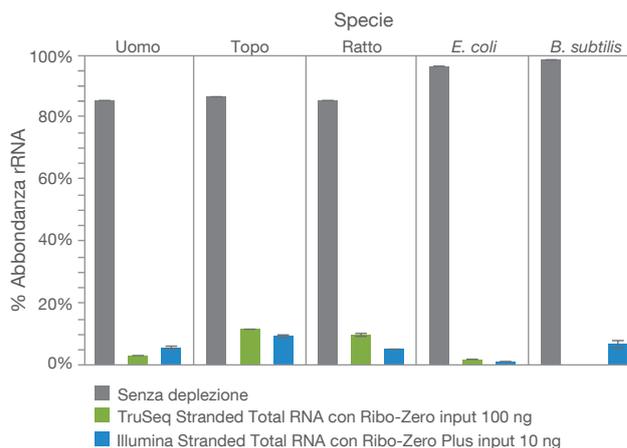


Figura 2. Deplezione ribosomiale multispecie con Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus riduce efficacemente i livelli di rRNA per le specie umane, topo, ratto e batteriche in una reazione a provetta singola. I risultati sono confrontati con quelli ottenuti con TruSeq Stranded Total RNA abbinato a Ribo-Zero Gold per i mammiferi e a Ribo-Zero Bacteria per l'*E. coli* (i dati di *B. subtilis* non sono riportati).

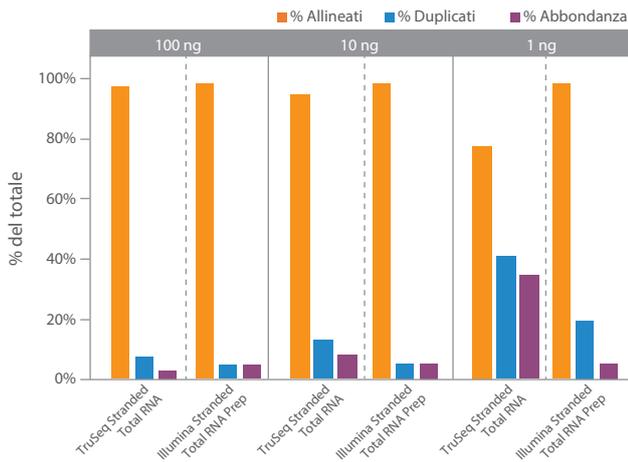


Figura 3. Confronto tra metriche delle prestazioni. Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus è stato confrontato con TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus è risultato essere più efficace, in particolare con input basso da 10 ng e 1 ng di RNA UHR totale. Le librerie sono state sequenziate su un sistema NextSeq 550, sottocampionate a 30 M di letture. I duplicati percentuali sono stati calcolati mediante sottocampionamento a 4 M di letture e analizzati utilizzando l'app BaseSpace RNA-Seq Alignment versione 2.0.

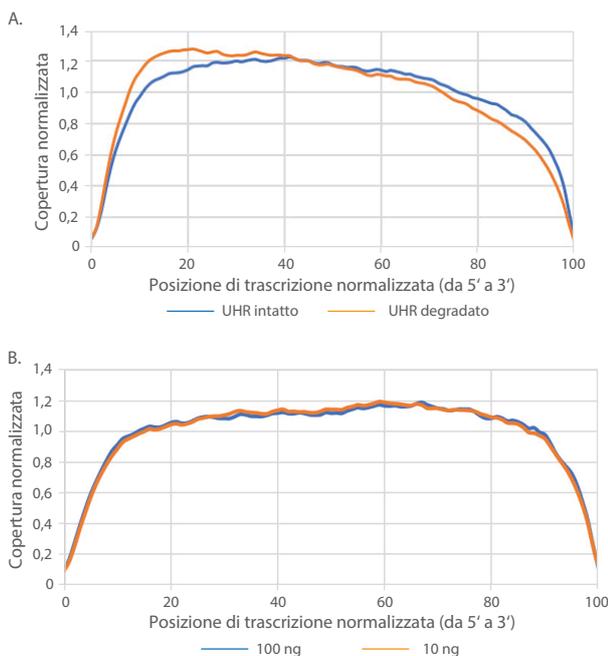


Figura 4. Elevata uniformità di copertura. Illumina Stranded Total RNA Prep fornisce un'elevata uniformità di copertura per (A) RNA UHR di alta qualità e sinteticamente degradato (RIN=2) e (B) RNA FFPE a livelli di input pari a 100 ng e 10 ng. Il campione FFPE ha ottenuto un punteggio qualitativo DV₂₀₀ del 55%. Tutte le librerie sono state sequenziate su un sistema NovaSeq 6000, a 50 M di letture. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la app BaseSpace RNA-Seq Alignment versione 2.0.1.

Efficienza nella scoperta dei geni

Per confrontare le prestazioni di Illumina Stranded Total RNA Prep con TruSeq Stranded Total RNA per applicazioni di ricerca genica, sono state messe in sequenza diverse quantità di RNA UHR in ingresso a 30 M di letture paired-end ed è stato valutato il numero di geni con copertura 1x e 10x. I risultati mostrano che Illumina Stranded Total RNA Prep permette una maggiore rilevazione di geni con basse quantità di input pari a 1 ng (Figura 5).

Eccezionale concordanza dei dati

Illumina Stranded Total RNA Prep produce dati di qualità con un'elevata concordanza tra le diverse quantità di input di RNA UHR (Figura 7A) e tra repliche tecniche di basse quantità di input di RNA da campioni FFPE (Figura 7B). Questi risultati dimostrano che Illumina Stranded Total RNA Prep è una soluzione ideale per campioni preziosi o degradati con materiale di partenza limitato. Inoltre, Illumina Stranded Total RNA Prep presenta un'elevata concordanza di dati con TruSeq Stranded Total RNA, sia con input equivalenti (Figura 8A), sia con input ridotti (Figura 8B).

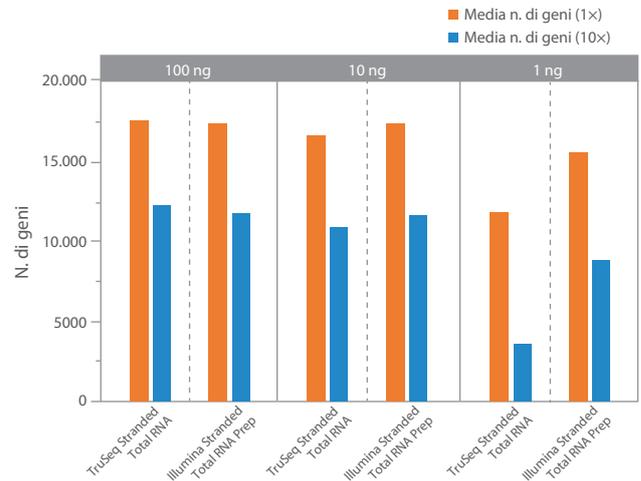


Figura 5. Maggiore scoperta di geni con input basso. Illumina Stranded Total RNA Prep permette una maggiore scoperta di geni con input basso di RNA, rispetto al TruSeq Stranded Total RNA, se si misura il numero di geni rilevati dopo 30 M di letture paired-end PF sottocampionate. La quantità maggiore di geni rilevati con copertura 1x, come nel caso di Illumina Stranded Total RNA Prep, è indice di maggiore sensibilità.

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie ottimizzato

Illumina Stranded Total RNA Prep utilizza un flusso di lavoro veloce e flessibile per la preparazione basata sulla ligazione delle librerie di RNA (Figura 1). Le innovazioni al flusso di lavoro, compresi i tempi di incubazione più brevi e le fasi di pulizia del campione ridotte, si traducono in un tempo totale del saggio che è circa del 40% inferiore rispetto al tempo impiegato da TruSeq Stranded Total RNA (Figura 6).



Figura 6. Flusso di lavoro Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep prevede un flusso di lavoro rapido con una durata inferiore degli interventi manuali. Le durate possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni analizzati, alle procedure automatizzate e all'esperienza dell'utente.

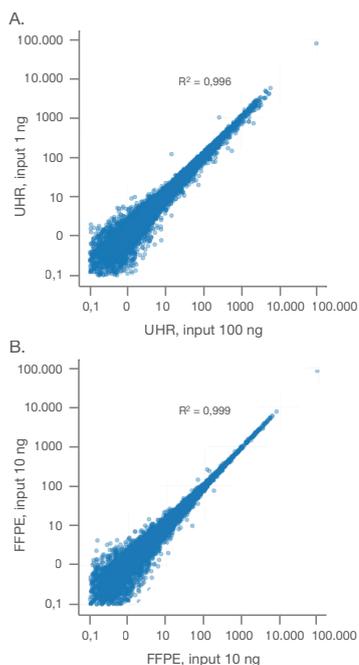


Figura 7. Concordanza dei dati elevata. Illumina Stranded Total RNA Prep raggiunge un'elevata concordanza dei dati tra (A) quantità input pari a 1 ng e 100 ng di RNA UHR e (B) repliche tecniche di 10 ng di RNA FFPE. Le librerie sono state sequenziate su un sistema NovaSeq 6000 a 2 × 74 bp. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la app BaseSpace RNA-Seq Alignment versione 2.0.1.

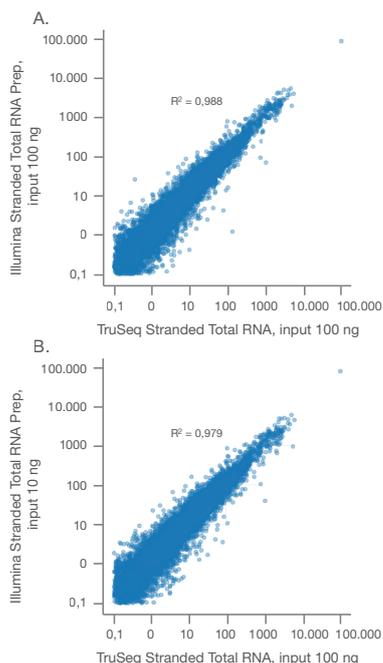


Figura 8. Elevata concordanza con i kit precedenti. Illumina Stranded Total RNA Prep produce dati altamente concordanti con TruSeq Stranded Total RNA tra (A) livelli di input equivalenti e (B) di livelli di input ridotti.

Aumento della processività con indici doppi univoci

Unendo Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus e strumenti ad alta processività come i sistemi NextSeq™ 550 e NovaSeq™ 6000, i laboratori possono sequenziare un numero significativamente maggiore di campioni per ogni corsa senza compromettere la qualità dei dati. Per aumentare ulteriormente la processività dei campioni, Illumina Stranded Total RNA Prep supporta il multiplexing con 384 indici doppi univoci (UDI).^{*} Oltre a eliminare l'impatto dell'errata assegnazione dell'indice, ovvero il salto dell'indice, gli UDI consentono di ridurre i costi di sequenziamento grazie alla possibilità di caricare fino a 384 campioni su una singola cella a flusso NovaSeq S4, aumentando quindi la processività.

Riepilogo

Illumina Stranded Total RNA Prep offre una soluzione di sequenziamento RNA semplificata per un'analisi chiara e completa del trascrittoma. Offre una straordinaria flessibilità per il tipo di input e supporta basse quantità di input, fino a 1 ng di RNA di alta qualità. È compatibile con il kit di deplezione dell'rRNA Ribo-Zero Plus, che consente la rimozione altamente efficace dell'rRNA interferente da più specie, tra cui l'uomo, il topo, il ratto e i batteri. Illumina Stranded Total RNA Prep fornisce una misurazione precisa dell'orientamento del filamento, una copertura uniforme e un livello di scoperta a elevata affidabilità tramite funzioni quali le trascrizioni alternative, le fusioni geniche e l'espressione specifica per l'allele.

Maggiori informazioni

Per ulteriori informazioni su Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus, visitare il sito www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html

Informazioni per gli ordini

Preparazione delle librerie	N. di catalogo
Illumina Stranded Total RNA Prep, ligazione con Ribo-Zero Plus (16 campioni)	20040525
Illumina Stranded Total RNA Prep, ligazione con Ribo-Zero Plus (96 campioni)	20040529
Indici	N. di catalogo
IDT per Illumina RNA UD Indici Set A, Ligazione (96 indici, 96 campioni)	20040553
IDT per Illumina RNA UD Indici Set B, Ligazione (96 indici, 96 campioni)	20040554
IDT per Illumina RNA UD Indici Set C, Ligazione (96 indici, 96 campioni)	20040555 Presto disponibile
IDT per Illumina RNA UD Indici Set D, Ligazione (96 indici, 96 campioni)	20040556 Presto disponibile

^{*} Al momento del lancio del prodotto saranno supportati fino a 192 UDI. Ulteriori UDI saranno disponibili più avanti nel corso del 2020.