

# illumina Stranded Total RNA Prep, Ligazione with Ribo-Zero™ Plus

Analisi sensibile e accurata  
del trascrittoma con una  
soluzione rapida e flessibile

- Elevata sensibilità a partire da soli 1 ng di RNA di alta qualità o 10 ng di RNA da campioni FFPE degradati
- Rimozione dell'rRNA da campioni di origine umana, di topo, di ratto e di specie batteriche e dell'RNA della globina in una reazione a provetta singola
- Preparazione delle librerie in 7 ore, con solo 3 ore di interventi manuali

**illumina**®

## Introduzione

Il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) assieme al sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) è un metodo potente per la scoperta, la profilazione e la quantificazione dei trascritti dell'RNA. I vantaggi dei principali approcci RNA-Seq includono:

- L'RNA-Seq totale fornisce un approccio obiettivo e privo di ipotesi per l'analisi esaustiva del trascrittoma. Consente di misurare l'abbondanza del gene e del trascritto e di rilevare le caratteristiche note e nuove nella codifica e più forme dell'RNA non codificante.
- L'RNA messaggero (mRNA, messenger RNA)-Seq quantifica in modo sensibile e preciso l'espressione genica, identifica le isoforme note e quelle nuove nel trascrittoma di codifica e misura l'espressione allele-specifica.
- Il sequenziamento RNA-Seq mirato analizza l'espressione genica in un insieme specifico di geni di interesse. Il sequenziamento RNA-Seq mirato con arricchimento consente l'analisi dell'esoma dell'RNA a costi contenuti utilizzando l'acquisizione specifica della sequenza delle regioni codificanti 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, l'estesa durata totale del saggio, i lunghi interventi manuali e la ridotta flessibilità dell'applicazione hanno limitato il suo utilizzo nelle applicazioni RNA-Seq totali. Per risolvere questi problemi, Illumina ha sviluppato Illumina Stranded Total RNA Prep (Tabella 1). Questa soluzione avanzata offre la preparazione delle librerie ottimizzata, rapida e basata sulla ligazione, che supporta input di campioni ridotti e un'ampia gamma di applicazioni RNA-Seq.

Per concentrare gli studi sulle sequenze di alto valore, Illumina Stranded Total RNA Prep include l'Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit\*, in grado di rimuovere in modo efficiente l'RNA ribosomiale (rRNA, ribosomal RNA) di più specie, tra cui uomo, topo, ratto e batteri, in una singola reazione (Figura 1).

\* Per gli studi metatranscriptomici, Illumina Stranded Total RNA Prep può essere combinato con l'Illumina Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, che fornisce una forte deplezione di rRNA abbondante in campioni microbici complessi.

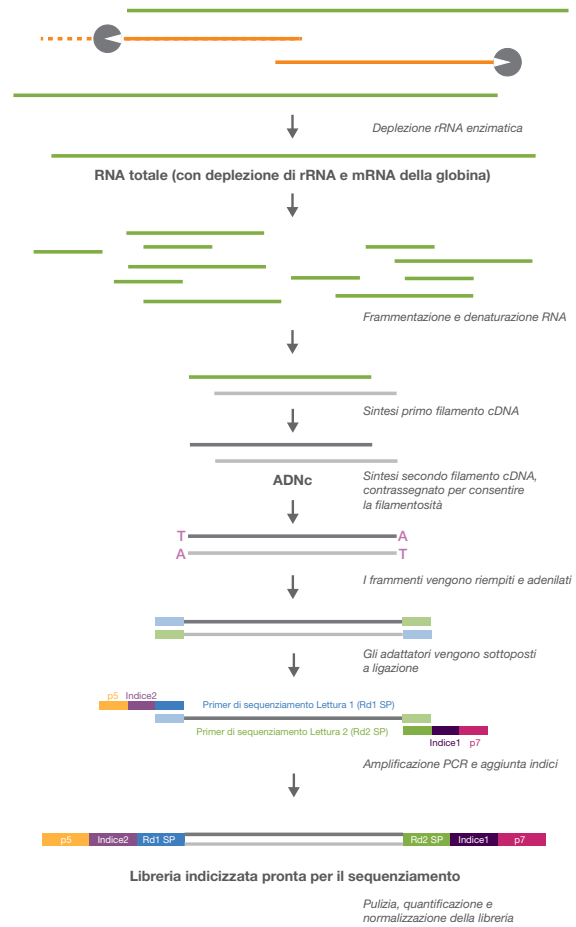


Figura 1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus. Al termine della deplezione degli RNA e degli mRNA con abbondanza di globina (linee arancioni) e al termine della sintesi del DNA complementare (cDNA, complementary DNA), gli adattatori vengono ligati e gli indici doppi univoci vengono aggiunti 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 dell'RNA-Seq, permette ai ricercatori di concentrarsi sull'analisi di porzioni informative ad alto valore del trascrittoma, riducendo i costi di sequenziamento. Illumina Stranded Total RNA include il Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit, che permette di eseguire ricche analisi del trascrittoma rimuovendo gli rRNA e gli RNA della globina. Il metodo della deplezione ribosomiale enzimatica a provetta singola è compatibile con input bassi (1 ng) e riduce l'rRNA da specie procariotiche ed eucariotiche (Tabella 2).

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, di batteri e mRNA della globina
UDI max	96	384
Quantità di input di RNA	100-1.000 ng	1-1.000 ng RNA <sup>a</sup>
Durata totale del saggio	11,5 ore	7 ore
Interventi manuali	5,5 ore	<3 ore
Compatibile con campioni in FFPE	Sì	Sì
Configurazione del kit	48 o 96 campioni	16 o 96 campioni

a. 1-1.000 ng di RNA di alta qualità (RIN >7), 10-1.000 ng di RNA degradato (RIN2-7) o di RNA FFPE (DV200 >55). Per prestazioni migliori, si consiglia un input di 10 ng di RNA.

b. Abbreviazioni: UDI, indici doppi univoci; RIN, numero integrità RNA.

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
Trascritti di globina beta 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

L'rRNA abbondante e l'rRNA della globina vengono rimossi dall'RNA totale mediante ibridazione mirata del DNA con sonde e successiva scissione RNasi H (Figura 2, Tabella 3). I campioni con deplezione ribosomiale vengono quindi sottoposti alla preparazione della libreria. Per valutare la deplezione dell'rRNA e le prestazioni di preparazione della libreria con Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus, è stata testata una serie di input di RNA totale e messa a confronto con TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero. Le prestazioni di Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus sono risultate superiori, in particolare con input bassi (Figura 3, Tabella 4).

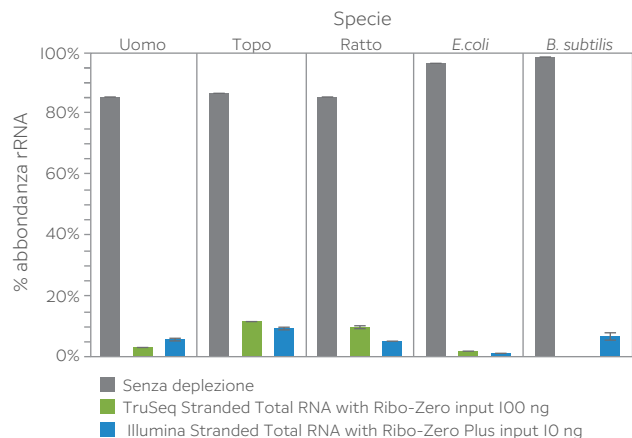


Figura 2: deplezione ribosomiale multispecie con Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus riduce efficacemente i livelli di rRNA per le specie umane, topo, ratto e batteriche in una reazione a provetta singola. I risultati sono confrontati 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).

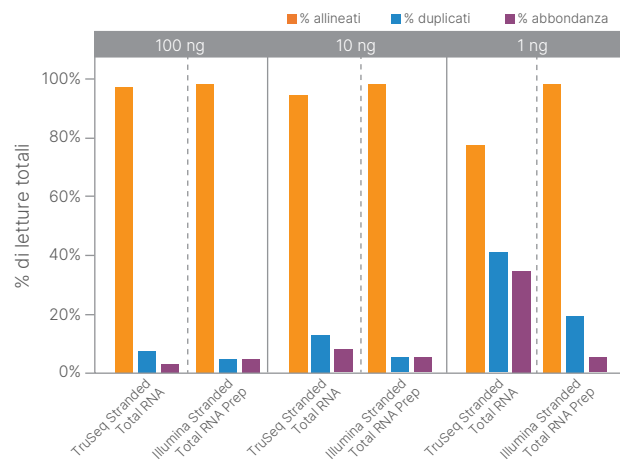


Figura 3: confronto tra le prestazioni della preparazione delle librerie. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus è stato confrontato con TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus è risultato più efficace, con più letture allineate e meno duplicati e abbondanza di rRNA, in particolare con input bassi da 10 ng e 1 ng di RNA UHR totale. Le librerie sono state sequenziate su un NextSeq 550 System, sottocampionate a 30 milioni di letture. I duplicati percentuali sono stati calcolati mediante sottocampionamento a 4 milioni di letture e analizzati utilizzando l'app BaseSpace™ RNA-Seq Alignment v2.0.

Tabella 3: deplezione dell'mRNA della globina da leucociti del sangue periferico umano con Illumina Stranded Total RNA Prep with 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
<i>HBA1</i>	7.489	2	99,97%	13.685	4	99,97%
<i>HBA2</i>	66.045	18	99,97%	110.406	16	99,99%
<i>HBB</i>	154.614	78	99,95%	173.704	86	99,95%
<i>HBG1</i>	22	0	96,29%	37	1	99,69%
<i>HBG2</i>	203	0	100%	143	0	100%

Tabella 4: metriche delle prestazioni per Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus<sup>a</sup>

	Input di RNA totale 100 ng		Input di RNA totale 10 ng		Input di RNA totale 1 ng	
	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero	Illumina Stranded Total RNA Prep with 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	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 v2.0.1.

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

## Dati di elevata qualità

### Uniformità di copertura

Illumina Stranded Total RNA Prep produce librerie di sequenziamento che si traducono in una copertura altamente uniforme dei trascritti utilizzando un input di RNA di riferimento umano universale (UHR, universal human reference) di alta qualità e degradato (Figura 4A) e quantità di input basso di RNA FFPE (Figura 4B).

### 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 sequenziate diverse quantità di RNA UHR di input a 30 milioni di letture paired-end ed è stato valutato il numero di geni con copertura  $1\times$  e  $10\times$ . I risultati mostrano che Illumina Stranded Total RNA Prep permette una maggiore rilevazione di geni con quantità di input bassi pari a 1 ng di RNA totale (Figura 5).

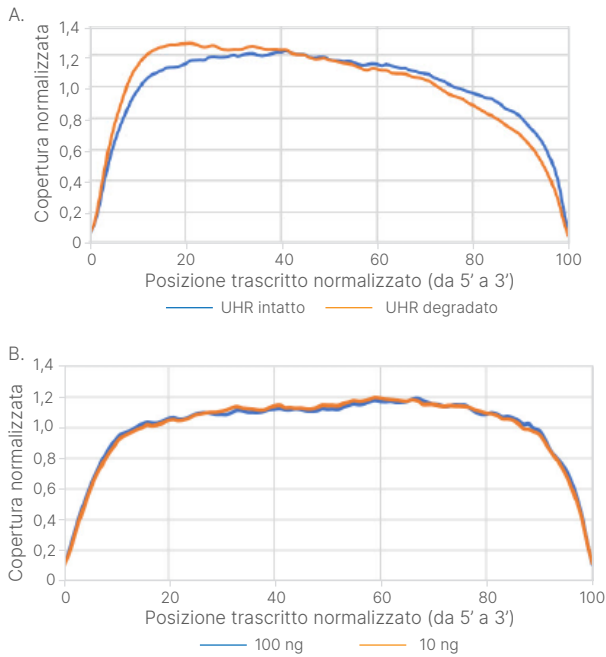


Figura 4: elevata uniformità di copertura. Illumina Stranded Total RNA Prep fornisce un'elevata uniformità di copertura per (A) RNA UHR di alta qualità e sinteticamente degradato (RIN=2) e (B) RNA FFPE a livelli di input pari a 100 ng e 10 ng. Il campione FFPE ha ottenuto un punteggio qualitativo DV<sub>200</sub> del 55%. Tutte le librerie sono state sequenziate su un NovaSeq 6000 System a 50 milioni di letture. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando l'app BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

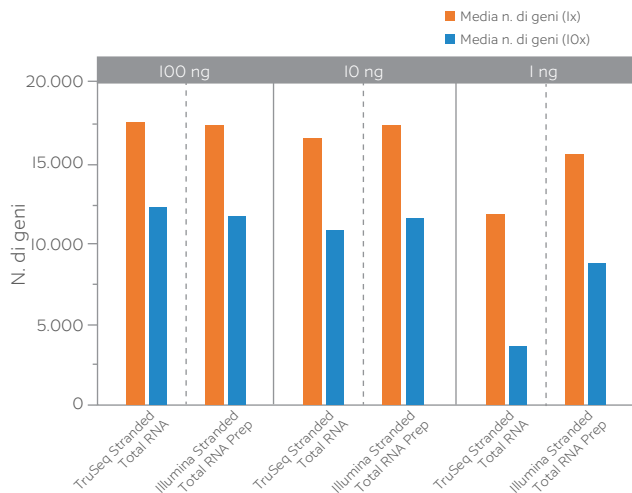


Figura 5: maggiore rilevazione di geni con input basso. Illumina Stranded Total RNA Prep permette una maggiore rilevazione di geni con input basso di RNA, rispetto al TruSeq Stranded Total RNA, se si misura il numero di geni rilevati dopo 30 milioni di letture paired-end PF sottocampionate. La quantità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

### 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 6A) e tra replicati tecnici di quantità di input bassi di RNA da campioni FFPE (Figura 6B). Questi risultati dimostrano che Illumina Stranded Total RNA Prep è la soluzione ideale per campioni 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 7A), sia con input ridotti (Figura 7B).

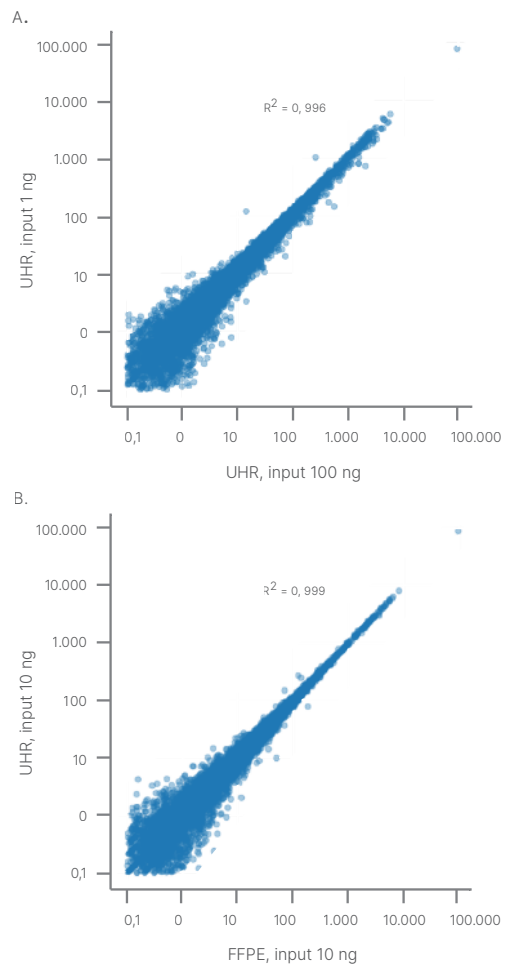


Figura 6: concordanza dei dati elevata. Illumina Stranded Total RNA Prep raggiunge un'elevata concordanza dei dati tra (A) quantità di input pari a 1 ng e 100 ng di RNA UHR e (B) replicati tecnici di 10 ng di RNA FFPE. Le librerie sono state sequenziate su un NovaSeq 6000 System a 2 x 74 bp. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando l'app BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

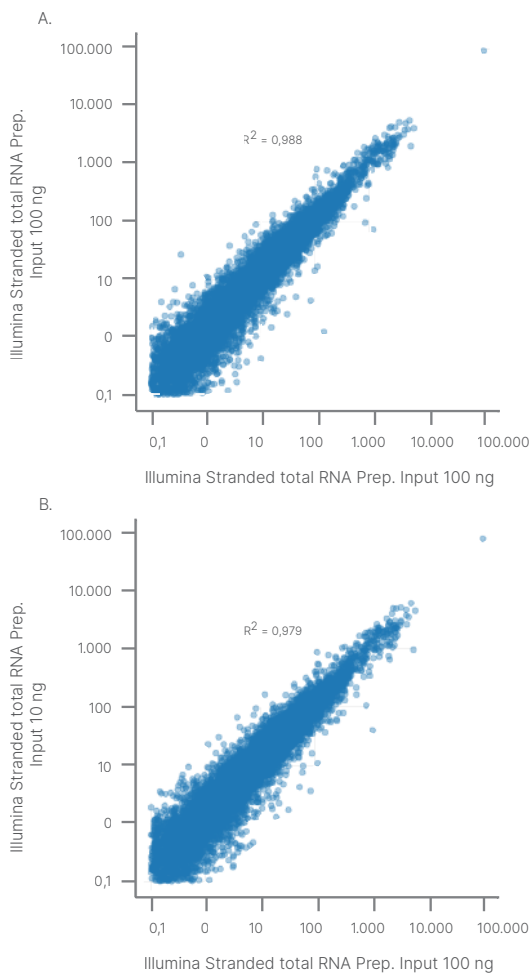


Figura 7: elevata concordanza con i kit precedenti. Illumina Stranded Total RNA Prep produce dati altamente concordanti con TruSeq Stranded Total RNA tra (A) livelli di input equivalenti e (B) input ridotti.

## Flusso di lavoro ottimizzato per la preparazione delle librerie

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 relative al flusso di lavoro, ad esempio la riduzione dei tempi di incubazione e delle fasi di pulizia del campione, si traducono in una durata totale del saggio di circa il 40% inferiore rispetto alle tempistiche di TruSeq Stranded Total RNA (Figura 8).

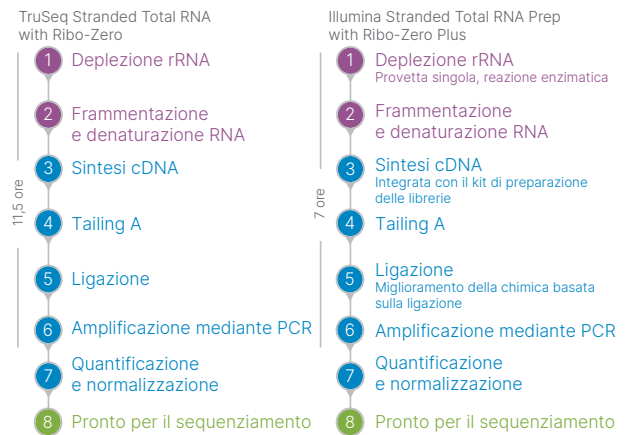


Figura 8: flusso di lavoro Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep prevede un flusso di lavoro rapido con interventi manuali ridotti. Le tempistiche possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni analizzati, alle procedure automatizzate e all'esperienza dell'utente.

## Aumento della processività con indici doppi univoci

Associando Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus a strumenti ad alta processività come il NextSeq™ 550 System e il NovaSeq™ 6000 System, 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 gli effetti dell'errata assegnazione dell'indice, ovvero l'hopping 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 6000 S4, aumentando quindi la processività.

## Riepilogo

ILLUMINA Stranded Total RNA Prep offre una soluzione RNA-Seq semplificata per l'analisi chiara e completa del trascrittoma. Questa soluzione offre una straordinaria flessibilità per il tipo di input e supporta basse quantità di input: fino a 1 ng di RNA di alta qualità. La compatibilità con Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit 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 permette di misurare con precisione l'orientamento del filamento, offre una copertura uniforme e favorisce la scoperta di caratteristiche quali trascritti alternativi, fusioni geniche ed espressione specifica per l'allele con un livello elevato di affidabilità.

## Maggiori informazioni

[ILLUMINA Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus](#)  
o [Ribo-Zero Plus Microbiome](#)

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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 Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 samples)	20072063
ILLUMINA RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091655
ILLUMINA RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091657
ILLUMINA RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091659
ILLUMINA RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20091661



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 ILLUMINA, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di ILLUMINA, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02148 ITA v1.0