

# Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero™ Plus

Klare und umfassende Auswertung des Transkriptoms mit herausragender Flexibilität für Studien.

## Vorteile

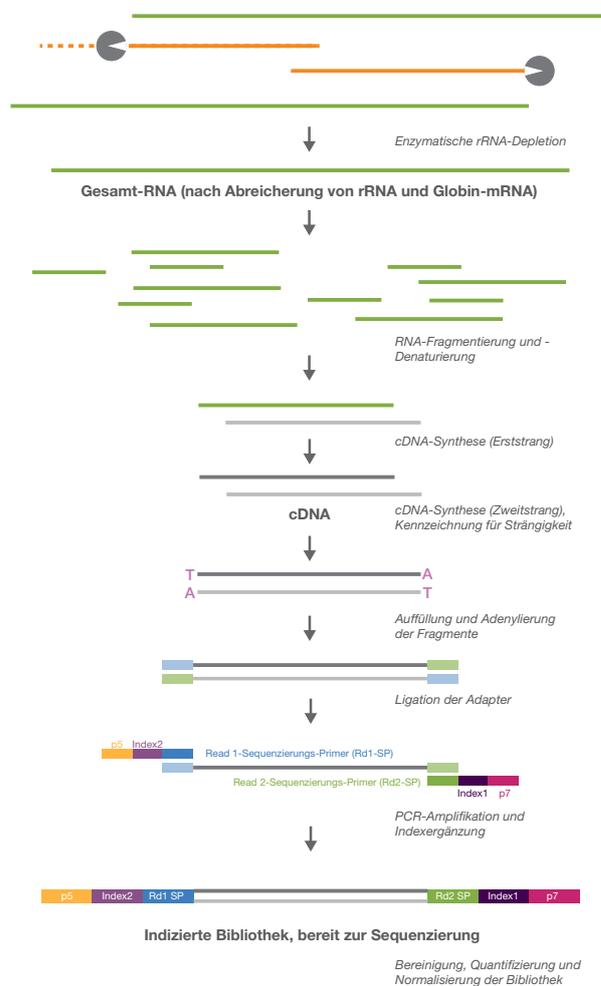
- Effektive Ribodepletion mit Ribo-Zero™ Plus**  
 Entfernung von rRNAs unterschiedlicher Spezies (Mensch/ Maus/Ratte/Bakterien) sowie von Globin-RNAs mit einer Reaktion in einem einzelnen Röhrchen
- Daten mit hoher Qualität aus schwierigen Proben mit geringer Zugabemenge**  
 Hohe Sensitivität ab 1 ng hochwertiger RNA oder 10 ng RNA aus degradierten FFPE-Proben
- Schneller Bibliotheksvorbereitungs-Workflow für die RNA-Seq**  
 Bibliotheken in sieben Stunden mit drei Stunden manuellem Aufwand vorbereiten, > 40 % schneller als TruSeq Stranded Total RNA
- Hochdurchsatzsequenzierung mit niedrigen Gesamtkosten**  
 Ermöglicht mit eindeutigen doppelten Indizes das Multiplexing hunderter Proben in einem einzigen Lauf

## Einleitung

RNA-Seq (RNA-Sequenzierung) auf Basis von NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ist eine leistungsstarke Methode für die Erkennung, das Profiling und die Quantifizierung von RNA-Transkripten. RNA-Seq bietet folgende Vorteile:

- Gesamt-RNA-Seq bietet einen unverzerrten, hypothesenfreien Ansatz für die umfassende Transkriptomanalyse. Gen- und Transkripthäufigkeit werden mit dem Verfahren genau bestimmt. Außerdem lassen sich sowohl bekannte als auch neue Merkmale in codierender sowie in zahlreichen Formen nicht codierender RNA ermitteln.
- Messenger-RNA(mRNA)-Seq quantifiziert mit hoher Sensitivität und Genauigkeit die Genexpression, ermittelt bekannte und neue Isoformen im codierenden Transkriptom und misst die allelspezifische Expression.
- Bei der zielgerichteten RNA-Seq wird die Expression einer spezifischen Gruppe von Genen analysiert. Die zielgerichtete RNA-Seq mit Anreicherung ermöglicht eine kosteneffektive RNA-Exomanalyse anhand der sequenzspezifischen Erfassung von codierenden Regionen des Transkriptoms.

TruSeq™ Stranded Total RNA bietet eine zuverlässige Lösung für Gesamttranskriptomanalysen für Standardproben und Proben mit niedriger Qualität. Die relativ hohe erforderliche Zugabemenge, die lange Assay-Gesamtzeit und der hohe manuelle Aufwand sowie die mangelnde Anwendungsflexibilität haben bislang jedoch die Nützlichkeit für Gesamt-RNA-Seq-Anwendungen eingeschränkt. Mit der Entwicklung von Illumina Stranded Total RNA Prep hat Illumina Abhilfe geschaffen. Diese fortschrittliche Lösung bietet eine optimierte und schnelle Bibliotheksvorbereitung auf Ligationsbasis, die sich für geringe Probenzugabemengen und ein breites Spektrum an RNA-Seq-Anwendungen eignet (Tabelle 1). Illumina Stranded Total RNA Prep enthält das Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit, das die effiziente Entfernung von ribosomaler RNA (rRNA) bei unterschiedlichen Spezies wie Mensch, Maus, Ratte und Bakterien in einer einzigen Reaktion ermöglicht (Abbildung 1). Dadurch lassen sich Studien auf hochwertigen Sequenzen konzentrieren.



**Abbildung 1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus:** Nach dem Abreichern von rRNAs und häufigen Globin-mRNAs (orangefarbene Linien) sowie dem Abschluss der cDNA-Synthese werden die Adapter gebunden und die eindeutigen doppelten Indizes durch PCR-Amplifikation hinzugefügt. Dies ergibt hochwertige Bibliotheken, die vor der Sequenzierung quantifiziert und normalisiert werden.

## Effektive Ribodepletion bei mehreren Spezies mit Ribo-Zero Plus

Durch die Entfernung häufiger RNAs, einschließlich rRNAs und Globin-RNAs, vor der RNA-Seq können sich Forscher auf die Analyse hochwertiger informativer Transkriptomabschnitte konzentrieren und profitieren zugleich von geringeren Sequenzierungskosten. Illumina Stranded Total RNA enthält das Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit, das durch die Entfernung von rRNAs und Globin-RNAs eine umfassende Transkriptomanalyse ermöglicht. Die enzymatische Ribodepletion in einem einzelnen Röhrchen eignet sich für geringe Zugabemengen (1 ng) und reduziert bei prokaryotischen und eukaryotischen Spezies den rRNA-Anteil (Tabelle 2). Häufige rRNA und Globin-RNA werden mithilfe gezielter Hybridisierung an DNA-Sonden sowie mithilfe der nachfolgenden RNase-H-vermittelten Aufspaltung aus der Gesamt-RNA entfernt (Abbildung 2, Tabelle 3). Nach der Ribodepletion der Proben erfolgt die Bibliotheksvorbereitung.

**Tabelle 1: Illumina Stranded Total RNA Prep – Spezifikationen**

| Merkmal                   | TruSeq Stranded Total RNA                   | Illumina Stranded Total RNA Prep                     |
|---------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Depletion häufiger RNA    | rRNAs (Mensch/Maus/Ratte) oder Globin-mRNAs | rRNAs (Mensch/Maus/Ratte/Bakterien) und Globin-mRNAs |
| Max. UDI                  | 96                                          | 384                                                  |
| RNA-Zugabemenge           | 100–1.000 ng                                | 1–1.000 ng RNA <sup>a</sup>                          |
| Assay-Zeit insgesamt      | 11,5 Stunden                                | 7 Stunden                                            |
| Manueller Aufwand         | 5,5 Stunden                                 | < 3 Stunden                                          |
| Für FFPE-Proben geeignet? | Ja                                          | Ja                                                   |
| Kit-Konfigurationen       | 48 oder 96 Proben                           | 16 oder 96 Proben                                    |

a. 1–1.000 ng hochwertige RNA<sup>a</sup> (RIN > 7), 10–1.000 ng degradierte RNA (RIN 2–7) oder FFPE-RNA (DV<sub>200</sub> > 55). Für eine optimale Leistung werden 10 ng Zugabe-RNA empfohlen.  
 Abkürzungen UDI = Unique Dual Index, eindeutiger doppelter Index; RIN = RNA Integrity Number, RNA-Integritätszahl

Zur Überprüfung der Leistung bei rRNA-Depletion und Bibliotheksvorbereitung mit Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus wurde eine Reihe von Gesamt-RNA-Zugaben in Tests mit TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero verglichen. Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus zeigte eine überlegene Leistung, insbesondere bei geringen Zugabemengen (Abbildung 3, Tabelle 4).

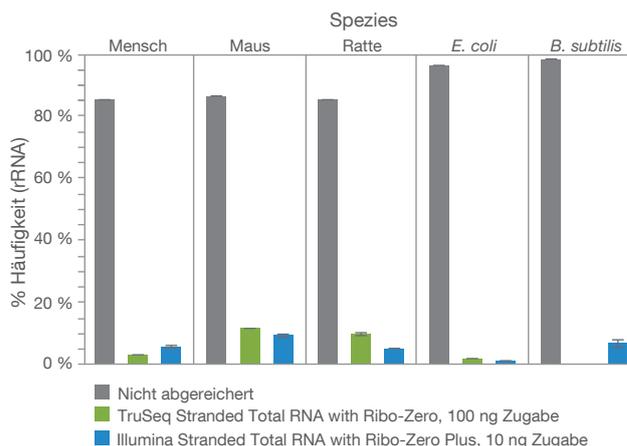
## Qualitativ hochwertige Daten

### Coverage-Einheitlichkeit

Illumina Stranded Total RNA Prep liefert Sequenzierungsbibliotheken, mit denen sich bei hochwertiger und degradierter Zugabe-RNA aus der UHR (Universal Human Reference, universelle humane Referenz) (Abbildung 4A) und geringen Zugabemengen FFPE-RNA (Abbildung 4B) eine hochgradig einheitliche Transkript-Coverage erzielen lässt.

**Tabelle 2: Anvisierte RNA-Spezies für die Reduzierung**

| Probe                           | Anvisierte rRNAs                |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Zytoplasmatische rRNAs (Mensch) | 28S, 18S, 5.8S, 5S              |
| Mitochondriale rRNAs (Mensch)   | 12S, 16S                        |
| β-Globin-Transkripte (Mensch)   | HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2     |
| rRNA (Maus und Ratte)           | 16S, 28S                        |
| Gram-negative Bakterien-rRNAs   | <i>E. coli</i> 5S, 16S, 23S     |
| Gram-positive Bakterien-rRNAs   | <i>B. subtilis</i> 5S, 16S, 23S |



**Abbildung 2: Ribodepletion bei mehreren Spezies mit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus:** Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus sorgt für eine wirksame rRNA-Abreicherung bei Proben von Menschen, Mäusen, Ratten und Bakterien mit einer Reaktion in einem einzelnen Röhrchen. Die Ergebnisse werden mit TruSeq Stranded Total RNA verglichen, bei Säugetierarten gepaart mit Ribo-Zero Gold und bei *E. coli* gepaart mit Ribo-Zero Bacteria (*B. subtilis* nicht dargestellt).

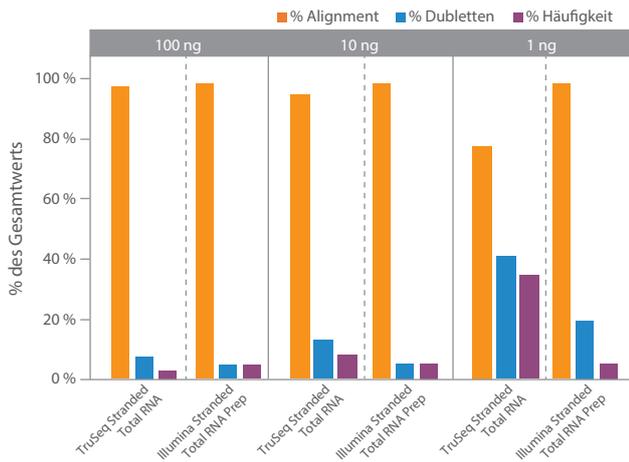
**Tabelle 3: Globin-mRNA-Depletion aus Leukozyten, die aus peripherem Blut extrahiert wurden, mit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus**

| Gen  | 100 ng RNA-Zugabe insgesamt |              |                | 10 ng RNA-Zugabe insgesamt |              |                |
|------|-----------------------------|--------------|----------------|----------------------------|--------------|----------------|
|      | Nicht abgereichert          | Abgereichert | % abgereichert | Nicht abgereichert         | Abgereichert | % abgereichert |
| HBA1 | 7.489                       | 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 %          |

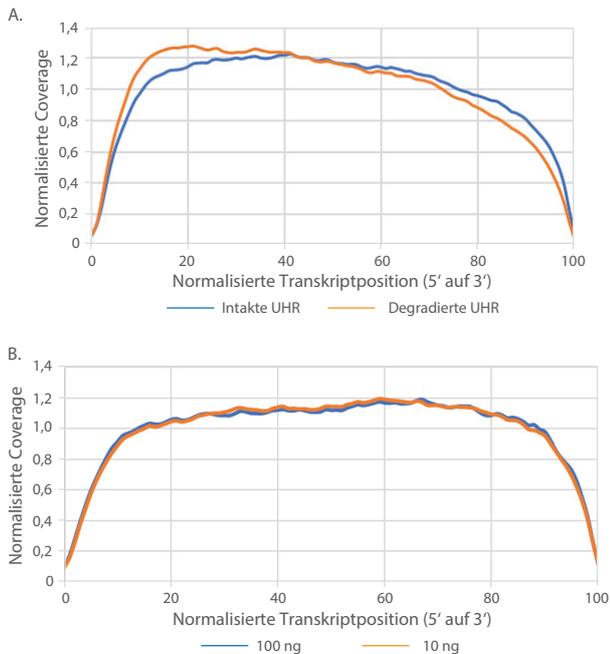
**Tabelle 4: Leistungsmetriken für Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus<sup>a</sup>**

|                            | 100 ng RNA-Zugabe insgesamt              |                                                      | 10 ng RNA-Zugabe insgesamt               |                                                      | 1 ng RNA-Zugabe insgesamt                |                                                      |
|----------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                            | 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                                                  |
| % Strängigkeit             | 99                                       | 99                                                   | 99                                       | 99                                                   | 99                                       | 99                                                   |
| Median des CV der Coverage | 0,44                                     | 0,46                                                 | 0,48                                     | 0,47                                                 | 0,52                                     | 0,51                                                 |
| % Dubletten <sup>b</sup>   | 7,5                                      | 4,5                                                  | 12,8                                     | 5,3                                                  | 40,9                                     | 19,2                                                 |
| % Alignment                | 96,9                                     | 96,9                                                 | 94,2                                     | 97,5                                                 | 76,6                                     | 97,5                                                 |
| % Häufigkeit               | 3,0                                      | 4,9                                                  | 8                                        | 5,2                                                  | 35,8                                     | 5,0                                                  |

a. Die Datenanalyse wurde mit der BaseSpace™ RNA-Seq Alignment App v2.0.1 durchgeführt.  
 b. Die Dubletten wurden bei Teilproben mit 4 Mio. Paired-End-Reads nach Filterung (Passing Filter, PF) bestimmt.



**Abbildung 3: Vergleich der Leistungsmetriken:** Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus wurde mit TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero verglichen. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus war effektiver, insbesondere bei geringen Zugabemengen von 10 ng und 1 ng UHR-RNA insgesamt. Die Bibliotheken wurden als Teilproben mit 30 Mio. Reads auf einem NextSeq 550-System sequenziert. Der prozentuale Anteil an Dubletten wurde anhand von Teilproben mit 4 Mio. Reads berechnet und mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0 analysiert.



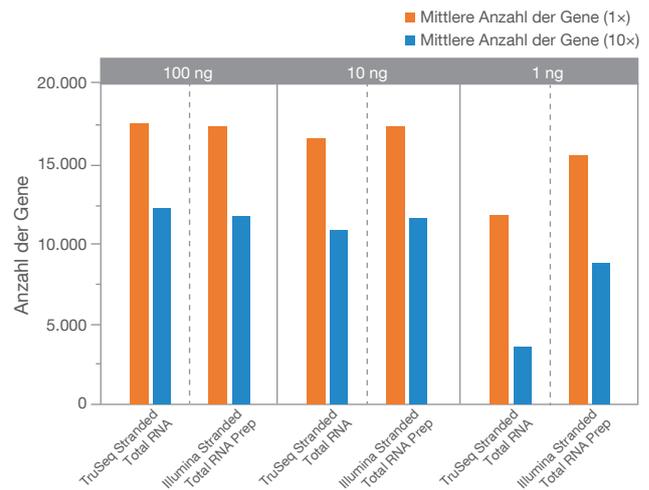
**Abbildung 4: Hohe Coverage-Einheitlichkeit:** Illumina Stranded Total RNA Prep bietet eine hohe Coverage-Einheitlichkeit für (A) hochwertige und synthetisch degradierte UHR-RNA (RIN=2) sowie (B) FFPE-RNA bei Zugabemengen von 100 ng und 10 ng. Die FFPE-Probe wies einen DV<sub>200</sub>-Qualitäts-Score von 55 % auf. Alle Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000-System bei 50 Mio. Reads sequenziert. Die Datenanalyse wurde mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 durchgeführt.

**Effizienz der Genererkennung**

Zum Vergleich der Leistung von Illumina Stranded Total RNA Prep und TruSeq Stranded Total RNA bei Generkennungsanwendungen wurden unterschiedliche Mengen UHR-RNA (Universal Human Reference, universelle humane Referenz) bei 30 Mio. Paired-End-Reads sequenziert und die Anzahl der Gene mit 1-facher und 10-facher Coverage ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die höhere Generkennungsleistung von Illumina Stranded Total RNA Prep bei geringen Zugabemengen von 1 ng (Abbildung 5).

**Herausragende Übereinstimmung der Daten**

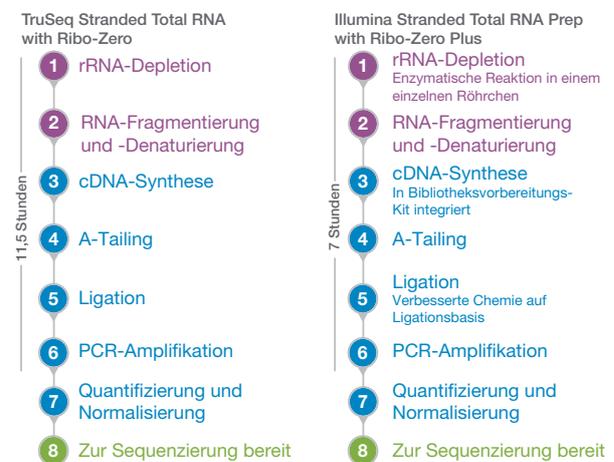
Illumina Stranded Total RNA Prep liefert hochwertige Daten mit hoher Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen UHR-RNA-Zugabemengen (Abbildung 7A) und zwischen technischen Replikaten geringer Zugabemengen von RNA aus FFPE-Proben (Abbildung 7B). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass es sich bei Illumina Stranded Total RNA Prep um eine ideale Lösung für wertvolle oder degradierte Proben mit begrenztem Ausgangsmaterial handelt. Zusätzlich zeigt Illumina Stranded Total RNA Prep eine hohe Übereinstimmung mit TruSeq Stranded Total RNA sowohl bei äquivalenter Zugabe (Abbildung 8A) als auch bei verringerter Zugabe (Abbildung 8B).



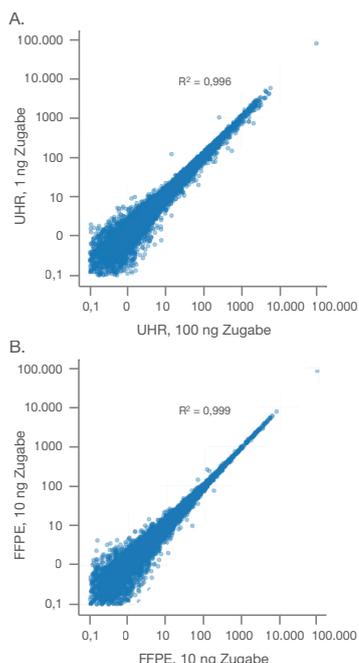
**Abbildung 5: Höhere Generkennungsleistung bei geringer Zugabe:** Illumina Stranded Total RNA Prep ermöglicht bei geringen RNA-Zugabemengen im Vergleich zu TruSeq Stranded mRNA eine höhere Generkennungsleistung. Diese wurde anhand der Anzahl erkannter Gene bei Teilproben mit 30 Mio. Paired-End-Reads nach Filterung gemessen. Die Erkennung von mehr Genen bei 1-facher Coverage als bei Illumina Stranded Total RNA Prep weist auf eine höhere Sensitivität hin.

**Optimierter Bibliotheksvorbereitungs-Workflow**

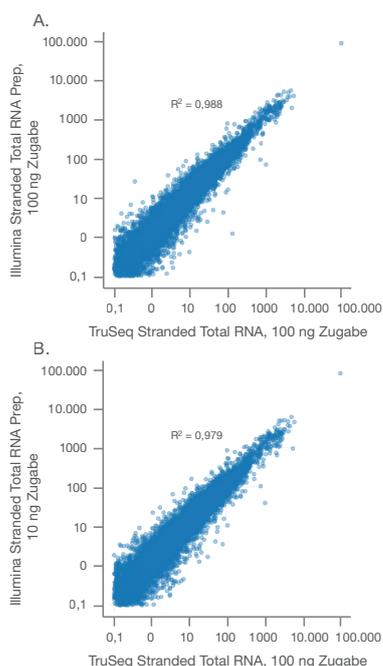
Illumina Stranded Total RNA Prep verwendet einen schnellen und flexiblen Workflow zur Vorbereitung von RNA-Bibliotheken auf Ligationsbasis (Abbildung 1). Neuerungen beim Workflow, einschließlich kürzerer Inkubationszeiten und der Verringerung der Probenbereinigungsschritte, sorgen für eine Assay-Gesamtzeit, die mehr als 40 % unter der von TruSeq Stranded Total RNA liegt (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus-Workflow:** Illumina Stranded Total RNA Prep bietet einen schnellen Workflow mit geringerem manuellem Aufwand. Die Dauer kann abhängig von den verwendeten Gerätschaften, der Anzahl der verarbeiteten Proben sowie den Automatisierungsverfahren oder der Erfahrung des Benutzers variieren.



**Abbildung 7: Hohe Datenübereinstimmung:** Illumina Stranded Total RNA Prep erreicht eine hohe Übereinstimmung zwischen (A) Zugabemengen von 1 ng bis 100 ng UHR-RNA und (B) technischen Replikaten von 10 ng FFPE-RNA. Die Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000-System bei 2 × 74 bp sequenziert. Die Datenanalyse wurde mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 durchgeführt.



**Abbildung 8: Hohe Übereinstimmung mit Legacy-Kit:** Illumina Stranded Total RNA Prep liefert bei (A) äquivalenten und (B) geringeren Zugabemengen Daten mit hoher Übereinstimmung zu TruSeq Stranded Total RNA.

## Höherer Durchsatz mit eindeutigen doppelten Indizes

Durch die Kombination von Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus mit Hochdurchsatzgeräten wie dem NextSeq™ 550- und dem NovaSeq™ 6000-System können Labore deutlich mehr Proben pro Lauf sequenzieren, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung der Datenqualität führt. Für eine zusätzliche Steigerung des Probendurchsatzes unterstützt Illumina Stranded Total RNA Prep das Multiplexing mit 384 eindeutigen doppelten Indizes (Unique Dual Indexes, UDIs). UDIs unterbinden nicht nur Index-Fehlzuweisungen, d. h. Index-Hopping, sondern senken auch die Sequenzierungskosten, da sich bis zu 384 Proben auf eine einzige NovaSeq S4-Fließzelle laden lassen, was einen deutlich höheren Durchsatz ermöglicht.

## Zusammenfassung

Illumina Stranded Total RNA Prep bietet eine optimierte RNA-Seq-Lösung für die klare und umfassende Analyse des Transkriptoms. Das Produkt zeichnet sich durch herausragende Flexibilität beim Zugabetyp aus und eignet sich auch für geringe Zugabemengen bis zu nur 1 ng hochwertiger RNA. Es ist kompatibel mit dem Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit, das eine hochgradig effiziente Entfernung von störungsverursachender rRNA zahlreicher Spezies wie Mensch, Maus, Ratte und Bakterien ermöglicht. Illumina Stranded Total RNA Prep ermöglicht eine genaue Messung der Strangausrichtung, eine einheitliche Coverage und eine äußerst zuverlässige Erkennung von Merkmalen wie alternativen Transkripten, Genfusionen und der allelspezifischen Expression.

## Weitere Informationen

Weitere Informationen zu Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus finden Sie unter [www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html](http://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html).

## Bestellinformationen

| Bibliotheksvorbereitung                                                    | Katalog-Nr.                      |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 Proben) | 20040525                         |
| Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 Proben) | 20040529                         |
| Indizes                                                                    | Katalog-Nr.                      |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)    | 20040553                         |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)    | 20040554                         |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)    | 20040555<br>Demnächst erhältlich |
| IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indizes, 96 Proben)    | 20040556<br>Demnächst erhältlich |

\* Bei der Produkteinführung werden bis zu 192 UDIs unterstützt. Zusätzliche UDIs sind im weiteren Verlauf des Jahres 2020 erhältlich.