

ILLUMINA Stranded Total RNA Prep, ligadura con Ribo-Zero™ Plus

Obtenga una visión clara y completa del transcriptoma gracias a una flexibilidad de estudio excepcional.

Puntos destacados

- Eliminación eficaz de ribosomas con Ribo-Zero™ Plus**
 Elimine los ARNr en humanos, ratones, ratas, bacterias y los ARN de la globina en una reacción en un tubo único.
- Datos de alta calidad a partir de muestras problemáticas de aporte reducido**
 Logre un alto grado de sensibilidad con tan solo 1 ng de ARN de alta calidad o 10 ng de ARN de muestras degradadas y FFPE.
- Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas rápido para la secuenciación de ARN**
 Prepare bibliotecas en siete horas con un tiempo de participación activa de tres horas, un 40 % más rápido que TruSeq Stranded Total RNA.
- Secuenciación con un alto grado de productividad y un coste total bajo**
 Admite el multiplexado de cientos de muestras en un solo experimento con índices dobles únicos.

Introducción

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) con la secuenciación de nueva generación (NGS) es un potente método para localizar, definir y cuantificar las transcripciones de ARN. Las ventajas de la secuenciación de ARN incluyen:

- La secuenciación de ARN total proporciona un método imparcial y sin hipótesis para un análisis exhaustivo del transcriptoma. Mide con precisión la abundancia de genes y transcripciones, y detecta tanto las características conocidas como las nuevas en la codificación y las diversas formas de ARN no codificante.
- La secuenciación de ARN mensajero (ARNm) cuantifica de manera precisa y sensible la expresión genética, identifica isoformas conocidas y nuevas en el transcriptoma codificante y mide la expresión específica del alelo.
- La secuenciación de ARN selectivo analiza la expresión genética en un conjunto específico de genes de interés. La secuenciación de ARN selectivo con enriquecimiento permite realizar un análisis rentable de los exomas de ARN utilizando la captura específica de la secuencia de las regiones de codificación del transcriptoma.

TruSeq Stranded Total RNA™ proporciona una solución robusta en el análisis de transcriptomas completos para muestras normales y de baja calidad. Sin embargo, un requisito de aporte relativamente alto, una duración del ensayo total y un tiempo de participación activa prolongados, así como una limitada versatilidad en cuanto a aplicaciones, han limitado su utilidad en las aplicaciones de secuenciación de ARN total. Para superar estos desafíos, Illumina ha desarrollado Illumina Stranded Total RNA Prep. Esta solución avanzada permite una preparación de bibliotecas optimizada y rápida basada en la ligadura que admite muestras de aporte reducido y una amplia gama de aplicaciones de secuenciación de ARN (Tabla 1). Para centrar los estudios en secuencias de alto valor, Illumina Stranded Total RNA Prep incluye el kit de eliminación de ARNr Ribo-Zero Plus de Illumina, que elimina de forma eficaz el ARN ribosómico (ARNr) de diversas especies, como humanos, ratones, ratas y bacterias, en una única reacción (Figura 1).

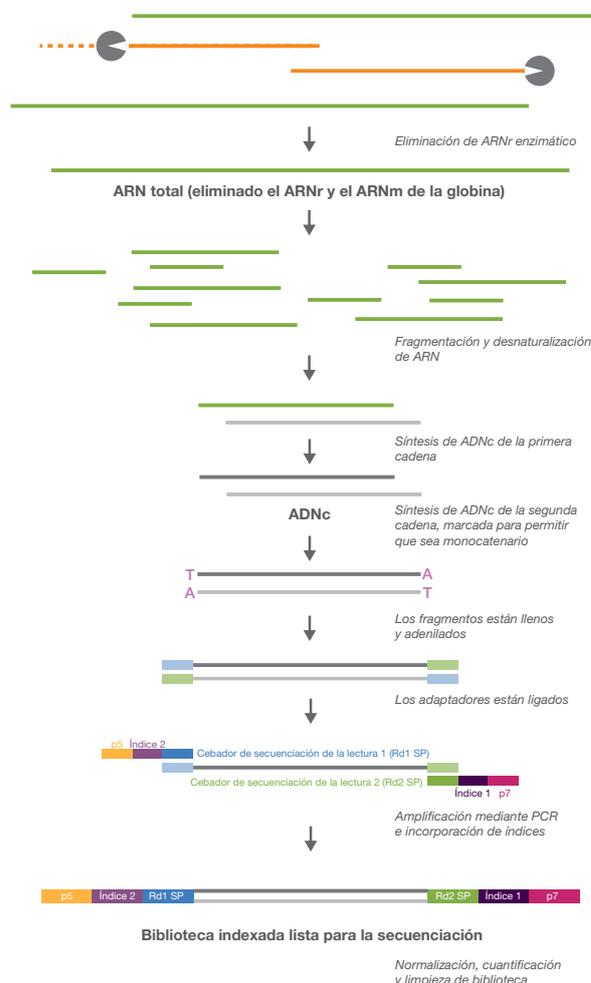


Figura 1: Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus. Cuando los ARNr y los ARNm de la globina abundantes (líneas naranjas) se agotan y la síntesis de ADNc finaliza, se ligan los adaptadores y se añaden índices dobles únicos mediante amplificación PCR para producir bibliotecas de alta calidad que se cuantifican y normalizan antes de la secuenciación.

Eliminación eficaz de ribosomas de varias especies con Ribo-Zero Plus

La eliminación de los ARN abundantes, incluidos los ARNr y los ARN de la globina, antes de la secuenciación de ARN permite a los investigadores centrarse en analizar las partes informativas de alto valor del transcriptoma, al tiempo que se reducen los costes de secuenciación. Illumina Stranded Total RNA incluye el kit de eliminación de ARNr Ribo-Zero Plus, lo que facilita unos análisis de transcriptomas enriquecidos mediante la eliminación de los ARNr y los ARN de la globina. El método de eliminación de ribosomas enzimáticos en un tubo único es compatible con aportes reducidos (1 ng) y reduce el ARNr de las especies procariontas y eucariotas (Tabla 2). El ARNr y el ARN de la globina abundantes se eliminan del ARN total mediante la hibridación selectiva de sondas de ADN y el posterior clivaje de ARNasa H (figura 2, tabla 3). Muestras de ribosoma eliminado tras someterse a la preparación de bibliotecas.

Tabla 1: Especificaciones de Illumina Stranded Total RNA Prep

Característica	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
Eliminación de ARN abundante	ARNr de humanos, ratones, ratas o ARNm de la globina	ARNr de humanos, ratas y bacterias y ARNm de la globina
UDI máx.	96	384
Cantidad de entrada de ARN	100-1000 ng	1-1000 ng de ARN ^a
Duración total del ensayo	11,5 horas	7 horas
Tiempo de participación activa	5,5 horas	<3 horas
¿Compatible con FFPE?	Sí	Sí
Configuraciones del kit	48 o 96 muestras	16 o 96 muestras

a. 1-1000 ng de ARN^a de alta calidad (RIN > 7), 10-1000 ng de ARN degradado (RIN 2-7) o ARN de FFPE (DV₂₀₀ > 55). Para obtener un mejor rendimiento se recomiendan 10 ng de entrada de ARN.
Abreviaturas: UDI, índices dobles únicos; RIN, número de integridad del ARN

Para evaluar la eliminación de ARNr y el rendimiento de la preparación de bibliotecas con el Illumina Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus, se probó un rango de aportes de ARN total frente a TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus mostró un mayor rendimiento, especialmente con aportes reducidos (figura 3, tabla 4).

Datos de alta calidad

Uniformidad de cobertura

Illumina Stranded Total RNA Prep produce bibliotecas de secuenciación que dan como resultado una cobertura de transcripción altamente uniforme utilizando el ARN de entrada de referencia humana universal (UHR) degradado y de alta calidad (figura 4A) y con aportes reducidos de ARN de FFPE (figura 4B).

Tabla 2: Tipo de ARN selectivo de la reducción

Muestra	ARNr selectivos
ARNr citoplasmáticos humanos	28S, 18S, 5.8S, 5S
ARNr mitocondriales humanos	12S, 16S
Transcripciones de globina beta humana	HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2
ARNr de ratón y rata	16S, 28S
ARNr de bacterias gramnegativas	<i>E. coli</i> 5S, 16S, 23S
ARNr de bacterias grampositivas	<i>B. subtilis</i> 5S, 16S, 23S

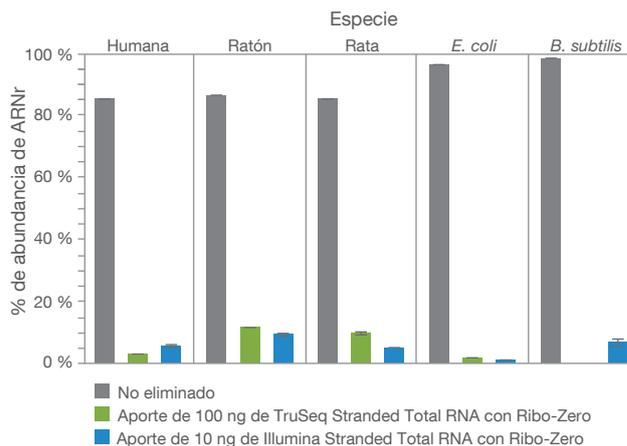


Figura 2: Eliminación ribosomas de diferentes especies con Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus reduce de manera eficaz los niveles de ARNr en humanos, ratones, ratas y bacterias en una reacción en tubo único. Los resultados están comparados con TruSeq Stranded Total RNA emparejado con Ribo-Zero Gold para mamíferos y Ribo-Zero Bacteria para *E. coli* (los datos de *B. subtilis* no se muestran).

Tabla 3: Eliminación del ARNm de la globina de los leucocitos de la sangre periférica humana con Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus

Gen	100 ng de aporte de ARN total			10 ng de aporte de ARN total		
	No eliminado	Eliminado	% eliminado	No eliminado	Eliminado	% eliminado
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 %

Tabla 4: Valores de rendimiento de Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus^a

	100 ng de aporte de ARN total		10 ng de aporte de ARN total		1 ng de aporte de ARN total	
	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
% de ARNr (28S/18S)	2,0	3,8	7,2	4,4	32,8	4,5
% monocatenario	99	99	99	99	99	99
CV de la mediana de cobertura	0,44	0,46	0,48	0,47	0,52	0,51
% de duplicados ^b	7,5	4,5	12,8	5,3	40,9	19,2
% alineado	96,9	96,9	94,2	97,5	76,6	97,5
% de abundancia	3,0	4,9	8	5,2	35,8	5,0

a. El análisis de datos se realizó utilizando la aplicación de alineación BaseSpace™ RNA-Seq v2.0.1.

b. El porcentaje de duplicados se registran después de las submuestras de 4 millones de lecturas "paired-end" que superan el filtro (PF).

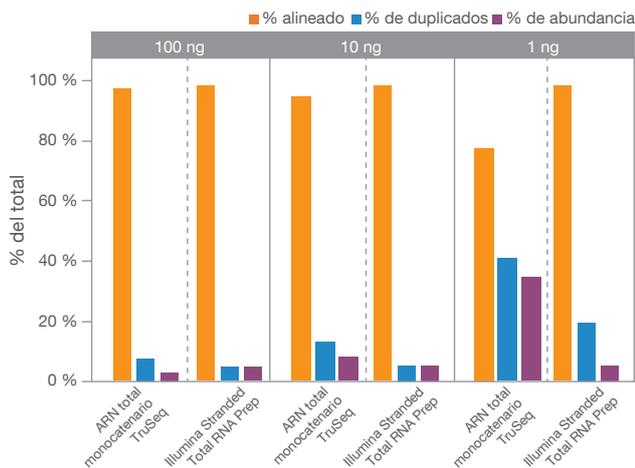


Figura 3: Comparación de los valores de rendimiento. Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus se ha comparado con TruSeq Stranded Total RNA emparejado con Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus fue más eficaz, particularmente con aportes reducidos de 10 ng y 1 ng de ARN UHR total. Las bibliotecas se secuenciaron en un sistema NextSeq 550, con submuestras de 30 millones de lecturas. El porcentaje de duplicados se calculó mediante el submuestreo de 4 millones de lecturas y se analizó utilizando la aplicación de alineación BaseSpace RNA-Seq v2.0.

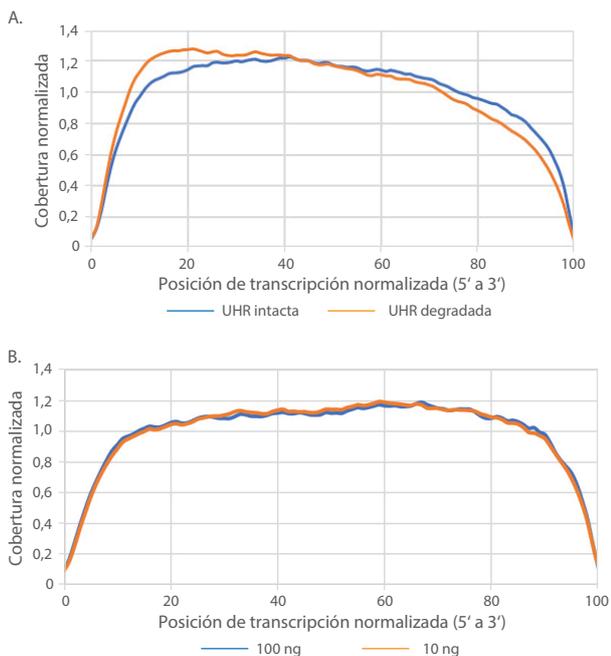


Figura 4: Uniformidad de cobertura elevada. Illumina Stranded Total RNA Prep proporciona una uniformidad de cobertura elevada para (A) ARN UHR de alta calidad y degradado sintéticamente (RIN = 2) y (B) ARN de FFPE a niveles de aporte de 100 ng y 10 ng. La muestra FFPE obtuvo una puntuación de calidad de DV₂₀₀ del 55 %. Todas las bibliotecas se secuenciaron en un sistema NovaSeq 6000 con 50 millones de lecturas. El análisis de datos se realizó utilizando la aplicación de alineación BaseSpace RNA-Seq v2.0.1.

Eficacia en el descubrimiento de genes

Para comparar el rendimiento de Illumina Stranded Total RNA Prep con TruSeq Stranded Total RNA en aplicaciones de descubrimiento de genes, se secuenciaron cantidades variables de aporte de ARN UHR en 30 millones de lecturas "paired-end" y se evaluó el número de genes con cobertura 1x y 10x. Los resultados muestran que Illumina Stranded Total RNA Prep permite una mayor detección de genes con cantidades de aporte reducidos de 1 ng (figura 5).

Concordancia de datos excepcional

Illumina Stranded Total RNA Prep produce datos de calidad con un alto grado de concordancia entre cantidades variables de aporte de ARN UHR (figura 7A) y entre duplicados técnicos de cantidades reducidas de aporte de ARN de muestras FFP (figura 7B). Estos resultados demuestran que Illumina Stranded Total RNA Prep es una solución ideal para muestras valiosas o degradadas con material de partida limitado. Además, Illumina Stranded Total RNA Prep muestra un alto grado de concordancia de datos con TruSeq Stranded Total RNA, ambos con aportes equivalentes (figura 8A) y aportes reducidos (figura 8B).

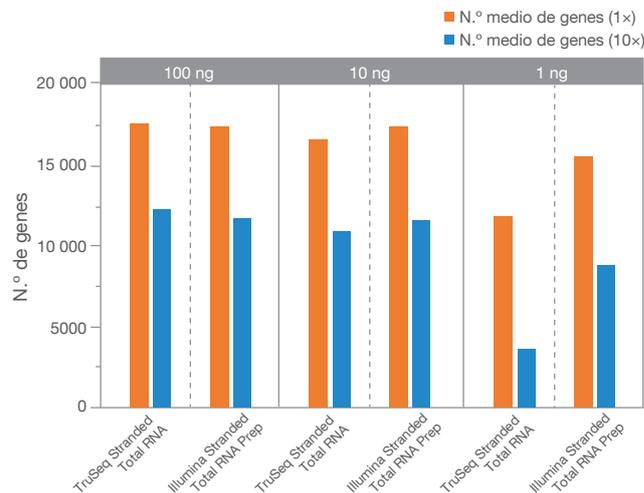


Figura 5: Mayor descubrimiento de genes con aporte reducido. Illumina Stranded Total RNA Prep permite una mayor detección de genes con aportes de ARN reducidos, en comparación con TruSeq Stranded Total RNA, medido por el número de genes detectados en 30 millones de lecturas submuestreadas "paired-end" que superan el filtro. El hecho de que se detecten más genes a 1x con Illumina Stranded Total RNA Prep es un indicador de mayor sensibilidad.

Flujo de trabajo de preparación de bibliotecas optimizado

Illumina Stranded Total RNA Prep utiliza un flujo de trabajo rápido y flexible para la preparación con un método de ligadura de bibliotecas de ARN (Figura 1). Las innovaciones en el flujo de trabajo, que incluyen tiempos de incubación más cortos y pasos reducidos de eliminación de muestras, dan como resultado un tiempo de ensayo total que es más de un 40 % más rápido que TruSeq Stranded Total RNA (figura 6).

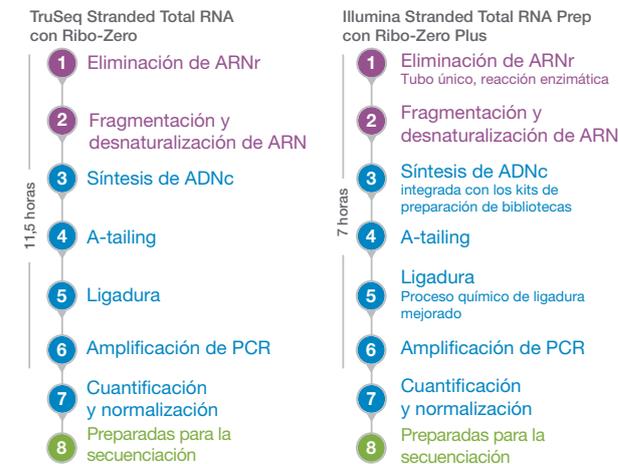


Figura 6: Illumina Stranded Total RNA Prep con el flujo de trabajo Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep ofrece un flujo de trabajo rápido con un tiempo de participación activa reducido. El tiempo puede variar dependiendo del equipo empleado, el número de muestras procesadas, los procesos de automatización o la experiencia del usuario.

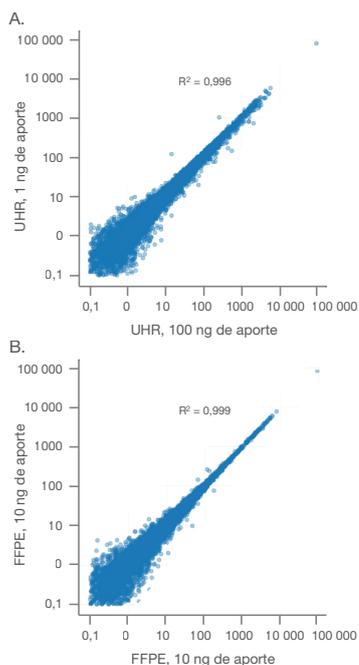


Figura 7: Alto grado de concordancia de datos. Illumina Stranded Total RNA Prep logra un alto grado de concordancia de datos entre (A) cantidades de aporte de 1 ng y 100 ng de ARN UHR y (B) duplicados técnicos de 10 ng de ARN de FFPE. Las bibliotecas se secuenciaron en un sistema NovaSeq 6000 a 2 × 74 pb. El análisis de datos se realizó utilizando la aplicación de alineación BaseSpace RNA-Seq v2.0.1.

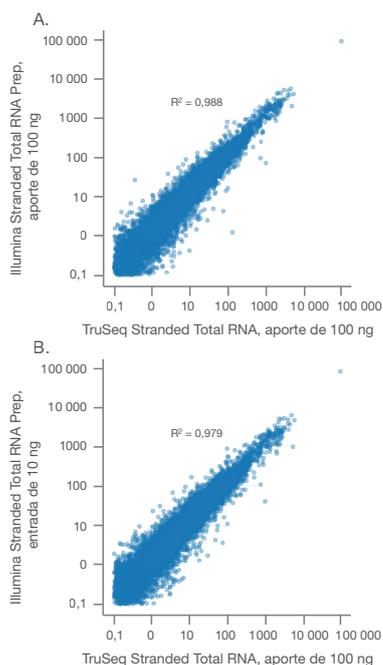


Figura 8: Alto grado de concordancia con el kit heredado. Illumina Stranded Total RNA Prep produce datos con un alto nivel de concordancia con TruSeq Stranded Total RNA a (A) aportes equivalentes y (B) más reducidos.

Mayor productividad con índices dobles únicos

Al combinar TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Plus e instrumentos con un alto grado de productividad como los sistemas NextSeq™ 550 y NovaSeq™ 6000, los laboratorios pueden secuenciar de manera significativa más muestras por experimento sin comprometer la calidad de los datos. Para obtener un aumento adicional en la productividad de las muestras, Illumina Stranded Total RNA Prep posibilita el multiplexado con 384 índices dobles únicos (UDI)*. Además de eliminar el impacto de la mala asignación de índices, es decir, el salto de índices, los UDI ayudan a disminuir los costes de la secuenciación al permitir que se carguen hasta 384 muestras en una sola celda de flujo de NovaSeq S4 para obtener una productividad significativamente mayor.

Resumen

Illumina Stranded Total RNA Prep ofrece una solución de secuenciación de ARN optimizada para un análisis claro y completo en todo el transcriptoma. Ofrece una flexibilidad extraordinaria para el tipo de aporte y admite cantidades de aporte reducidas, hasta 1 ng de ARN de alta calidad. Es compatible con el kit de eliminación de ARNr de Ribo-Zero Plus, que permite una eliminación de ARNr interferente de diferentes especies muy eficaz, incluidos humanos, ratones, ratas y bacterias. Illumina Stranded Total RNA Prep permite medir de forma precisa la orientación de la cadena, la cobertura uniforme y el alto grado de fiabilidad en la localización de características, como, por ejemplo, distintas transcripciones, fusiones de genes y expresión específica de alelos.

Información adicional

Para obtener más información sobre Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus, consulte www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html

Datos para realizar pedidos

Preparación de bibliotecas	N.º de catálogo
Illumina Stranded Total RNA Prep, ligadura con Ribo-Zero Plus (16 muestras)	20040525
Illumina Stranded Total RNA Prep, ligadura con Ribo-Zero Plus (96 muestras)	20040529
Índices	N.º de catálogo
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set A, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040553
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set B, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040554
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set C, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040555 Disponible próximamente
IDT for Illumina RNA UD Indexes Set D, ligadura (96 índices, 96 muestras)	20040556 Disponible próximamente

* Se admitirán hasta 192 UDI en el lanzamiento del producto. Los UDI adicionales estarán disponibles más adelante en este 2020.