

Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation

Soluzione rapida e flessibile
per l'analisi altamente accurata
del trascrittoma codificante

- Consente di ottenere dati di alta qualità e una migliore scoperta genica da appena 25 ng di RNA
- Consente di preparare librerie in 7 ore con interventi manuali inferiori alle 3 ore
- Consente il multiplex fino a un massimo di 384 campioni in una singola corsa con indici doppi univoci

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 principali approcci RNA-Seq includono:

- 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.
- 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.
- Il sequenziamento RNA-Seq mirato analizza l'espressione genica in un insieme specifico di geni di interesse. Il sequenziamento RNA-Seq mirato attraverso l'arricchimento consente l'analisi dell'esoma dell'RNA a costi contenuti utilizzando l'acquisizione specifica della sequenza delle regioni di codifica del trascrittoma. È ideale per campioni di bassa qualità fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded).

TruSeq™ Stranded mRNA è una soluzione robusta per l'analisi dell'espressione genica e le applicazioni di scoperta nel trascrittoma di codifica. Tuttavia, i requisiti di input relativamente elevati, l'estesa durata totale del saggio e i lunghi interventi manuali hanno limitato la sua utilità nelle applicazioni RNA-Seq. Per risolvere questi problemi, Illumina ha sviluppato Illumina Stranded mRNA Prep. Questa soluzione avanzata offre una preparazione delle librerie ottimizzata, rapida e basata sulla ligazione (Figura 1), che supporta input di campioni ridotti (Tabella 1) e un'ampia gamma di applicazioni mRNA-Seq.

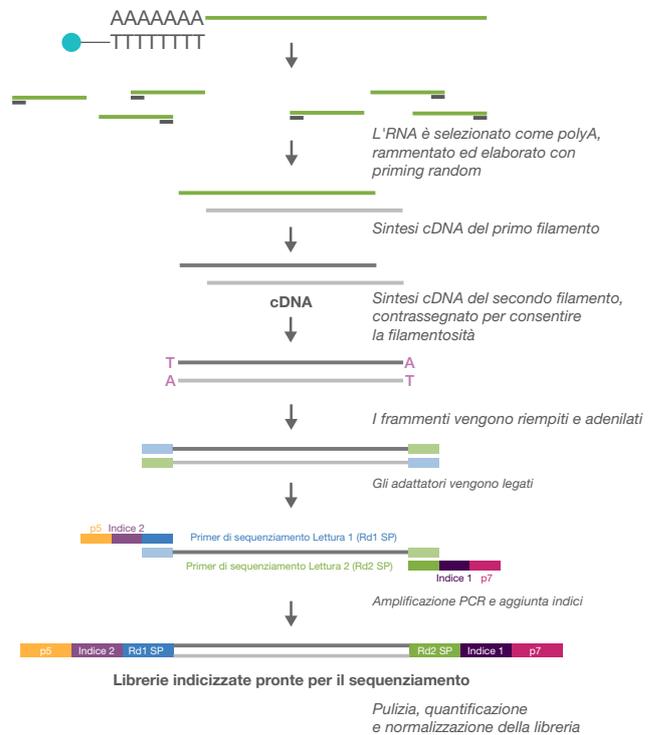


Figura 1: Illumina Stranded mRNA Prep. Quando la selezione polyA e la sintesi del cDNA sono complete, la ligazione degli adattatori degli indici doppi univoci e l'amplificazione PCR producono librerie di alta qualità che vengono quantificate e normalizzate prima del sequenziamento.

Tabella 1: specifiche di Illumina Stranded mRNA Prep

Caratteristica	TruSeq Stranded mRNA Prep	Illumina Stranded mRNA Prep
UDI max	96	384
Quantità di input di RNA	100-1.000 ng	25-1.000 ng
Durata totale del saggio	10,5 ore	6,5 ore
Interventi manuali	<7 ore	<3 ore
Configurazione del kit	48 o 96 campioni	16 o 96 campioni
UDI, indici doppi univoci		

Dati di elevata qualità

Espressione genica

Illumina Stranded mRNA Prep produce librerie di sequenziamento a partire da quantità di input ridotti, che si traducono in metriche di alta qualità per l'analisi dell'espressione genica (Tabella 2, Figura 2). Insieme, questi risultati dimostrano le eccezionali prestazioni di Illumina Stranded mRNA Prep per applicazioni di espressione genica. Il sequenziamento mRNA-Seq offre numerosi vantaggi rispetto ai metodi non-NGS, tra cui:

- Progettazione sperimentale priva di ipotesi, che non richiede alcuna conoscenza precedente del trascrittoma
- Maggiori possibilità di scoperta per individuare trascritti noti e nuovi
- Maggiore processività per quantificare da centinaia a migliaia di regioni in ogni saggio
- Gamma dinamica più ampia, per avere una misurazione più accurata dell'espressione genica
- Maggiore quantità di dati per saggio, con informazioni complete sulla sequenza e sulle varianti

Tabella 2: metriche sulle prestazioni per Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation

Metrica	100 ng di RNA di input		25 ng di RNA di input	
	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep	TruSeq Stranded mRNA	Illumina Stranded mRNA Prep
% rRNA (28S/18S)	5,1	1,8	5,3	1,5
Filamentosità	99,6	99,4	99,6	99,4
Mediana CV di copertura	0,49	0,46	0,50	0,47
% duplicati	5,4	3,7	8,5	3,3
% allineati	97,1	97,8	96,8	97,8

I risultati sono tratti dall'applicazione RNA Seq Alignment v2.0.1 dopo 30 milioni di letture. I duplicati sono riportati dopo 4 milioni di letture paired-end sottocampionate attraverso il filtro.

Efficienza nella scoperta dei geni

Per mettere a confronto le prestazioni di Illumina Stranded mRNA Prep e quelle di TruSeq Stranded mRNA per applicazioni di scoperta di geni, sono state sequenziate quantità variabili di RNA umano universale di riferimento (UHR, universal human reference) dopo 30 milioni di letture ed è stato valutato il numero di geni con copertura 1× e 10×. I risultati mostrano che Illumina Stranded mRNA Prep permette una maggiore rilevazione dei geni, specialmente con quantità di input ridotte (Figura 3).

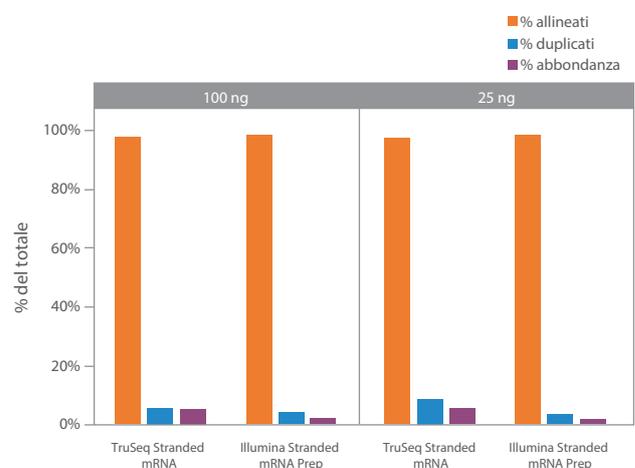


Figura 2: confronto tra metriche prestazionali. Illumina Stranded mRNA Prep è stato confrontato con TruSeq Stranded mRNA. Illumina Stranded mRNA Prep ha mostrato prestazioni migliori, in particolare con un input di 25 ng di RNA UHR. Le librerie sono state sottocampionate a 30 milioni di letture e analizzate usando l'applicazione BaseSpace™ RNA-Seq Alignment v2.0.1. I duplicati sono riportati dopo 4 milioni di letture paired-end sottocampionate attraverso il filtro.

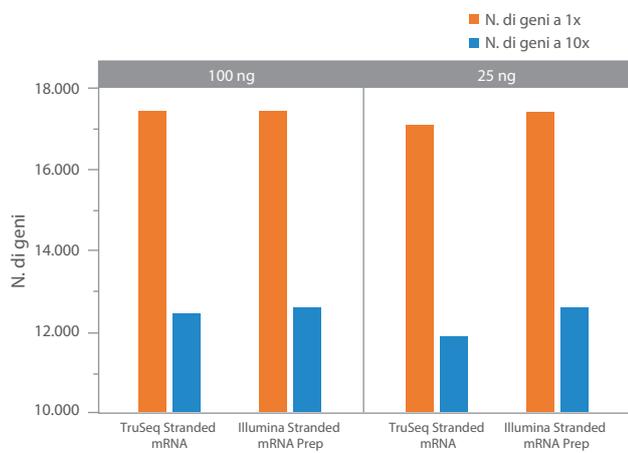


Figura 3: maggiore rilevazione dei geni con input ridotto. Illumina Stranded mRNA Prep permette una maggiore rilevazione di geni in caso di input di RNA ridotto, rispetto a TruSeq Stranded mRNA. Il numero di geni rilevati è riportato dopo 30 milioni di letture paired-end PF sottocampionate. La quantità maggiore di geni rilevati con copertura 1x, come nel caso di Illumina Stranded mRNA Prep, è indice di maggiore sensibilità.

Eccezionale concordanza dei dati

Illumina Stranded mRNA Prep produce dati di qualità con un'elevata concordanza tra replicati tecnici (Figura 4A) e quantità variabili di input di RNA UHR (Figura 4B). Questi risultati dimostrano che Illumina Stranded mRNA Prep è la soluzione ideale per campioni in cui la quantità di materiale di partenza è limitata. Inoltre, Illumina Stranded mRNA Prep mostra un'elevata concordanza di dati con TruSeq Stranded mRNA, sia con input equivalenti (Figura 5A) sia con input ridotto (Figura 5B).

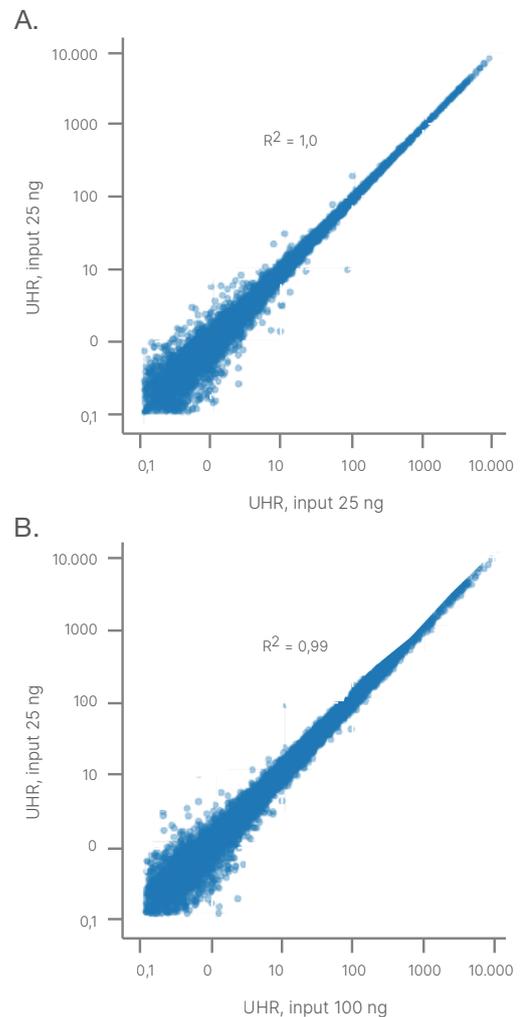


Figura 4: concordanza dei dati elevata. Illumina Stranded mRNA Prep raggiunge un'elevata concordanza dei dati tra (A) replicati tecnici di 25 ng di RNA UHR e (B) tra quantità di input di 25 ng e input di 100 ng di RNA UHR. Le librerie sono state sequenziate a 2×74 bp e sottocampionate dopo 30 milioni di letture. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando l'app BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

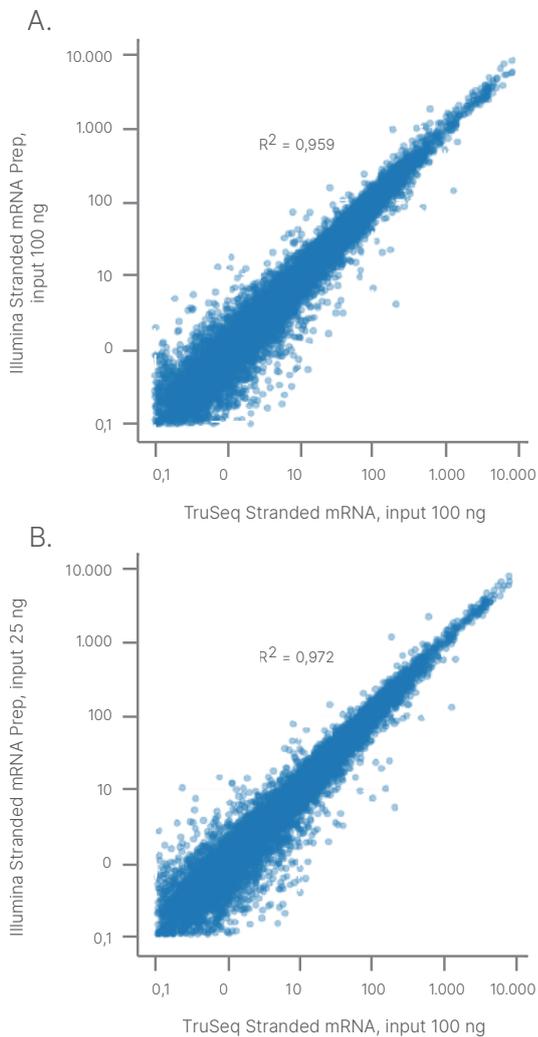


Figura 5: elevata concordanza con i kit precedenti. Illumina Stranded mRNA Prep produce dati altamente concordanti con TruSeq Stranded mRNA (A) in caso di livelli di input equivalenti, pari a 100 ng UHR RNA e (B) in caso di livelli di input ridotti, pari a 25 ng e confrontati con input pari a 100 ng UHR RNA.

Flusso di lavoro ottimizzato per la preparazione delle librerie

Illumina Stranded mRNA 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 mRNA (Figura 6).



Figura 6: flusso di lavoro Illumina Stranded mRNA Prep. Illumina Stranded mRNA 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 mRNA Prep a piattaforme ad alta processività come NextSeq™ 550 System e 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 mRNA Prep offre una soluzione semplificata per l'analisi chiara ed esaustiva del trascrittoma di codifica. Questa soluzione offre una straordinaria flessibilità per il tipo di input e supporta basse quantità di input: fino a 25 ng di RNA di alta qualità. Illumina Stranded mRNA Prep permette di misurare con precisione l'orientamento del filamento, offre una copertura uniforme e favorisce la scoperta di caratteristiche quali nuove isoforme, fusioni geniche ed espressione allele-specifica con un livello elevato di affidabilità.

Maggiori informazioni

[Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 samples)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 samples)	20040534
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.
M-GL-02143 ITA v1.0