

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

Sensitive und genaue Analyse des  
Transkriptoms mit einer schnellen  
und flexiblen Lösung

- Hohe Sensitivität ab 1 ng hochwertiger RNA oder 10 ng RNA aus degradierten FFPE-Proben
- Entfernung von rRNAs unterschiedlicher Spezies (Mensch/Maus/Ratte/Bakterien) sowie von Globin-RNAs mit einer Reaktion in einem einzelnen Röhrchen
- Bibliotheksvorbereitung in 7 Stunden mit einem manuellen Aufwand von nur 3 Stunden



## Einleitung

Die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) mit Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) ist eine leistungsstarke Methode für die Erkennung, das Profiling und die Quantifizierung von RNA-Transkripten. Vorteile der wichtigsten RNA-Seq-Verfahren:

- Die 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.
- Die 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 Transkriptomanalysen 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 Einsetzbarkeit für Gesamt-RNA-Seq-Anwendungen eingeschränkt. Mit der Entwicklung von Illumina Stranded Total RNA Prep hat Illumina Abhilfe geschaffen (Tabelle 1). 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.

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 hochwertige Sequenzen konzentrieren.

\* Zur Durchführung von Metatranskriptomikstudien lässt sich Illumina Stranded Total RNA Prep mit dem Illumina Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit kombinieren, das die zuverlässige Depletion häufiger rRNA in komplexen mikrobiellen Proben ermöglicht.

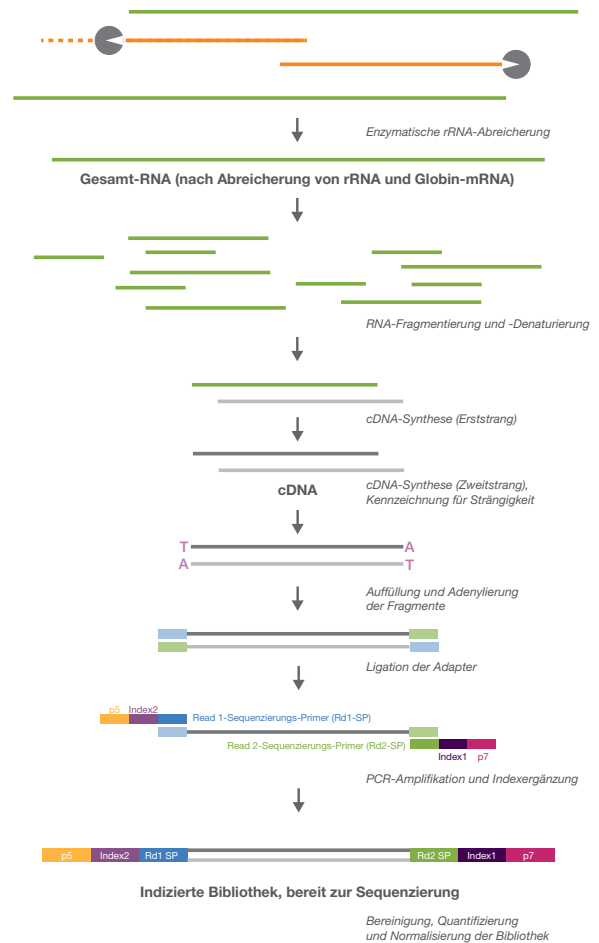


Abbildung 1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus: Nach dem Abreichern von rRNAs und häufigen Globin-mRNAs (orangefarbene Linien) sowie dem Abschluss der cDNA-Synthese werden die Adapter gebunden und die eindeutigen doppelten Indizes durch PCR-Amplifikation hinzugefügt. Dies ergibt hochwertige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

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
UDI (max.)	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-Konfiguration	48 oder 96 Proben	16 oder 96 Proben

- a. 1–1.000 ng hochwertige RNA (RIN > 7), 10–1.000 ng degradierte RNA (RIN 2–7) oder FFPE-RNA (DV200 > 55). Für eine optimale Leistung werden 10 ng Zugabe-RNA empfohlen.
- b. Abkürzungen: UDI = Unique Dual Index, eindeutiger doppelter Index; RIN = RNA Integrity Number, RNA-Integritätszahl

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

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. 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).

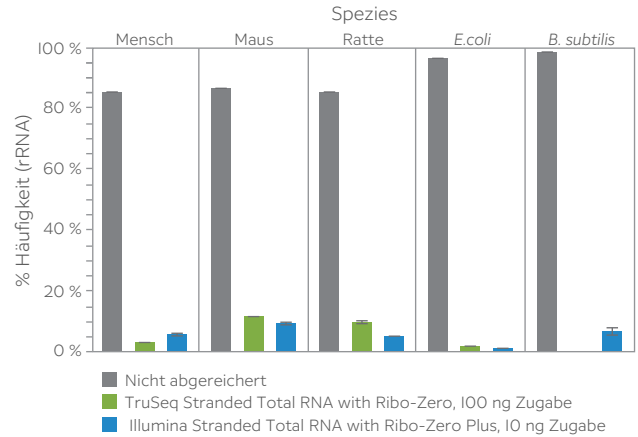


Abbildung 2: Ribodepletion bei mehreren Spezies mit Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus sorgt für eine wirksame rRNA-Abreicherung bei Proben von Menschen, Mäusen, Ratten und Bakterien mit einer Reaktion in einem einzelnen Röhrchen. 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 (Daten zu *B. subtilis* nicht dargestellt).

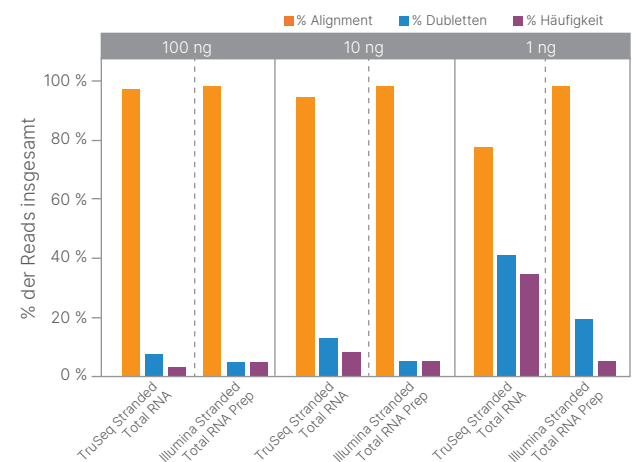


Abbildung 3: Vergleich der Leistung der Bibliotheksvorbereitung: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus wurde mit TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero verglichen. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus war effektiver (mehr alignierte Reads sowie weniger Dubletten und häufige rRNA), 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.

Tabelle 3: Globin-mRNA-Depletion aus Leukozyten, die aus peripherem menschlichen 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	99,97 %	110.406	16	99,99 %
HBB	154.614	78	99,95 %	173.704	86	99,95 %
HBG1	22	0	96,29 %	37	1	99,69 %
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
Mittlerer CV der Coverage	0,44	0,46	0,48	0,47	0,52	0,51
% Dubletten	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 Daten wurden mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 analysiert.

b. Die Dubletten wurden bei Teilproben mit 4 Mio. Paired-End-Reads nach Filterung (PF, Passing Filter) bestimmt.

## Hohe Datenqualität

### Coverage-Einheitlichkeit

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

## Effizienz der Generkennung

Zum Vergleich der Leistung von Illumina Stranded Total RNA Prep und TruSeq Stranded Total RNA bei Generkennungsanwendungen wurden unterschiedliche Mengen UHR-RNA 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 lediglich 1 ng RNA insgesamt (Abbildung 5).

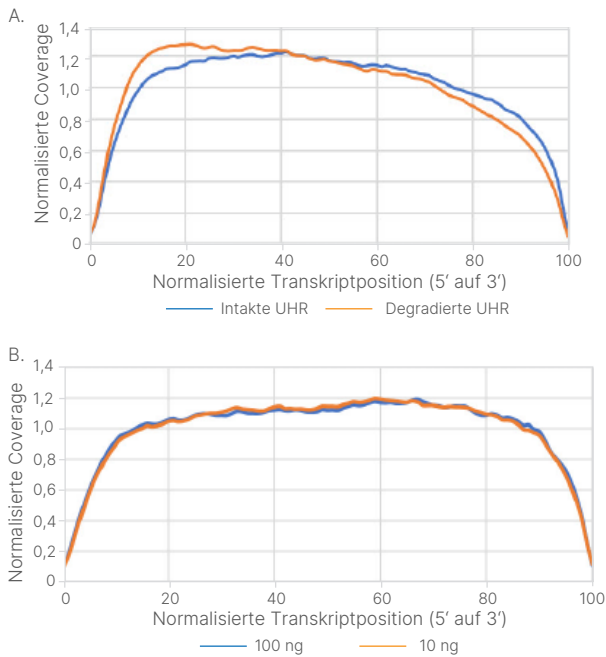


Abbildung 4: Hohe Coverage-Einheitlichkeit: Illumina Stranded Total RNA Prep bietet eine hohe Coverage-Einheitlichkeit für (A) hochwertige und synthetisch degradierte UHR-RNA (RIN=2) sowie (B) FFPE-RNA bei Zugabemengen von 100 ng und 10 ng. Die FFPE-Probe wies einen DV<sub>200</sub>-Qualitäts-Score von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

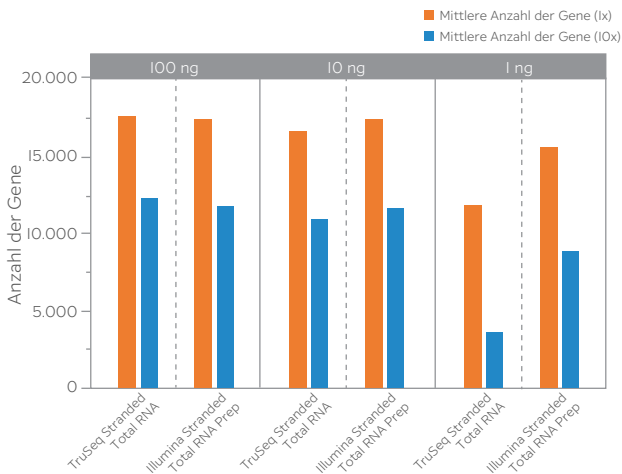


Abbildung 5: Höhere Generkennungsleistung bei geringer Zugabe: Illumina Stranded Total RNA Prep ermöglicht bei geringen RNA-Zugabemengen im Vergleich zu TruSeq Stranded Total RNA eine höhere Generkennungsleistung. Diese wurde anhand der Anzahl erkannter Gene bei Teilproben mit 30 Mio. Paired-End-Reads 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.

## Herausragende Übereinstimmung der Daten

Illumina Stranded Total RNA Prep liefert hochwertige Daten mit hoher Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen UHR-RNA-Zugabemengen (Abbildung 6A) und zwischen technischen Replikaten geringer Zugabemengen von RNA aus FFPE-Proben (Abbildung 6B). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass es sich bei Illumina Stranded Total RNA Prep um eine ideale Lösung für 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 7A) als auch bei verringerter Zugabe (Abbildung 7B).

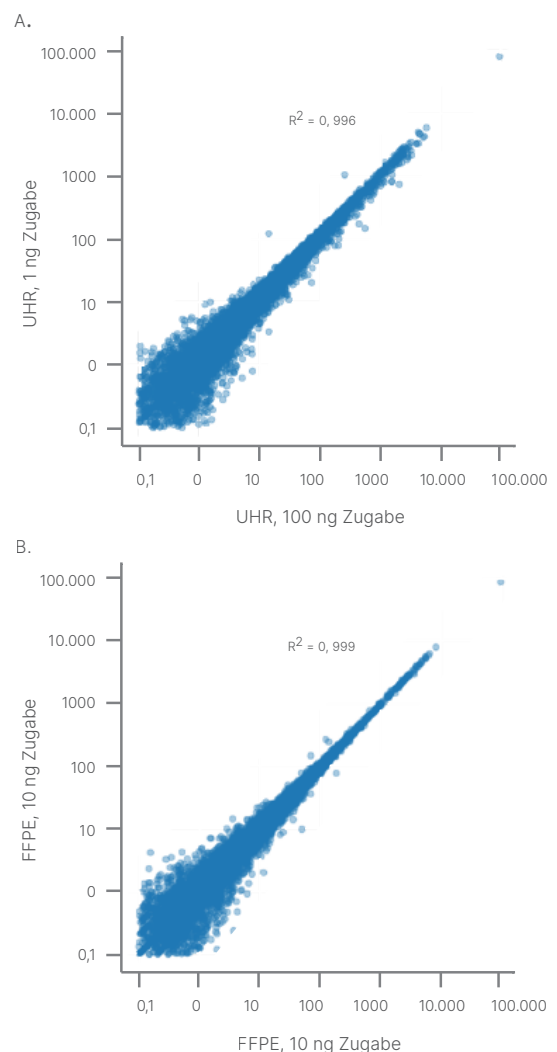


Abbildung 6: Hohe Datenübereinstimmung: Illumina Stranded Total RNA Prep erreicht eine hohe Übereinstimmung zwischen (A) Zugabemengen von 1 ng bis 100 ng UHR-RNA und (B) technischen Replikaten von 10 ng FFPE-RNA. Die Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000 System bei  $2 \times 74$  bp sequenziert. Die Daten wurden mit der BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 analysiert.

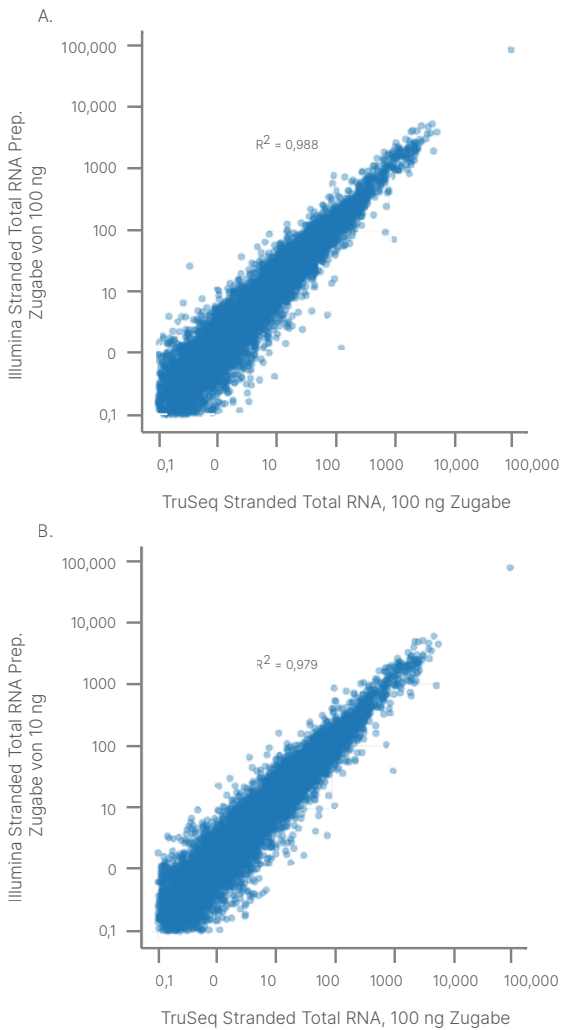


Abbildung 7: Hohe Übereinstimmung mit Legacy-Kit: Illumina Stranded Total RNA Prep liefert bei (A) äquivalenten und (B) geringeren Zugabemengen Daten mit hoher Übereinstimmung zu TruSeq Stranded Total RNA.

## 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 8).

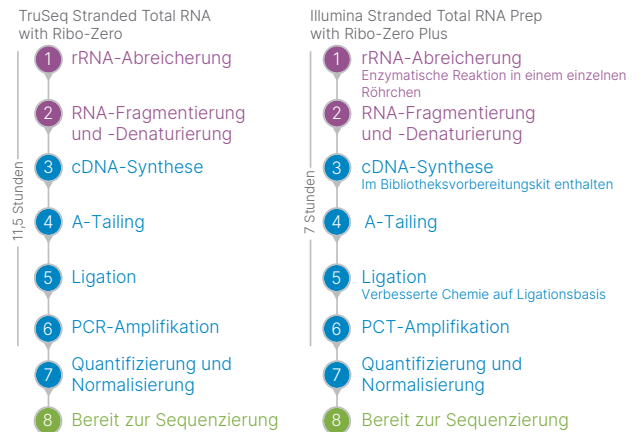


Abbildung 8: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus-Workflow: Illumina Stranded Total RNA Prep bietet einen schnellen Workflow mit geringerem manuellen Aufwand. Die Dauer kann abhängig von den verwendeten Gerätschaften, der Anzahl der verarbeiteten Proben sowie den Automatisierungsverfahren oder der Erfahrung des Benutzers variieren.

## 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 System 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 (UDIs, Unique Dual Indexes). 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 6000 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. Diese Lösung zeichnet sich durch herausragende Flexibilität beim Zugabetyp aus und eignet sich auch für geringe Zugabemengen bereits ab 1 ng. Die Kompatibilität mit dem Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit ermöglicht die hochwirksame Entfernung störender rRNA mehrerer Spezies (Mensch, Maus, Ratte und Bakterien). 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

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

## Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
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



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)  
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 ILLUMINA, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von ILLUMINA, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-02148 DEU v1.0