

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

Análisis sensible y preciso del  
transcriptoma con una solución  
rápida y flexible

- 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
- Elimine los ARNr humanos, de ratón, de rata y de bacterias y los ARN de la globina en una reacción en un tubo único
- Prepare librerías en 7 horas, incluidas solo 3 horas de tiempo de participación activa

**illumina**®

## Introducción

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) con secuenciación de nueva generación (NGS, Next-Generation Sequencing) es un potente método para localizar, definir y cuantificar los transcritos de ARN. Las ventajas de las principales estrategias de RNA-Seq son, por ejemplo:

- La RNA-Seq total proporciona un método sin sesgos y sin hipótesis para un análisis exhaustivo del transcriptoma. Asimismo, mide de forma precisa la abundancia genética y de transcritos, y detecta las características nuevas y conocidas del ARN codificante y las diversas formas del 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 RNA-Seq selectiva analiza la expresión genética en un conjunto específico de genes de interés. La RNA-Seq selectiva con enriquecimiento permite un análisis del exoma de ARN rentable utilizando captura específica de 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, la relativamente elevada entrada necesaria y la prolongación del ensayo total, así como la limitada versatilidad en cuanto a las aplicaciones, han limitado su utilidad en las aplicaciones RNA-Seq total. Para superar estos desafíos, Illumina ha desarrollado Illumina Stranded Total RNA Prep (tabla 1). Esta solución avanzada permite una preparación de librerías optimizada y rápida basada en la ligadura que admite muestras de entrada reducida y una amplia gama de aplicaciones de RNA-Seq.

Para centrar los estudios en secuencias de alto valor, Illumina Stranded Total RNA Prep incluye Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit\*, que elimina de forma eficaz el ARN ribosómico (ARNr) de diversas especies, como humanos, ratones, ratas y bacterias, en una única reacción (figura 1).

\* Para los estudios de metatranscriptómica, Illumina Stranded Total RNA Prep se puede combinar con Illumina Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, que proporciona una eliminación sólida del abundante ARNr en muestras microbianas complejas.

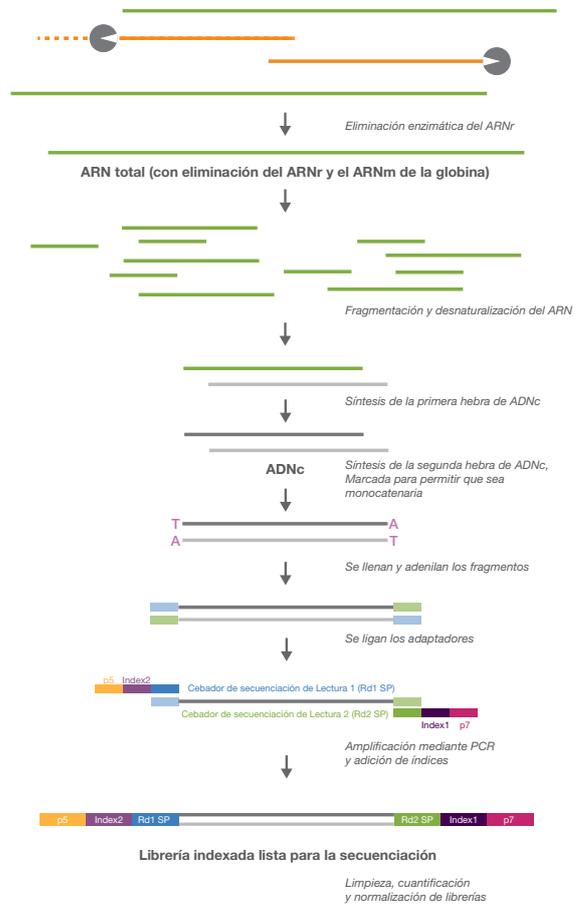


Figura 1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus. Cuando los ARNr y los abundantes ARNm de la globina (líneas naranjas) se eliminan y la síntesis de ADNc finaliza, se ligan los adaptadores y se añaden índices dobles únicos mediante amplificación PCR para producir librerías de alta calidad 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 RNA-Seq 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 Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit, lo que facilita unos análisis de transcriptomas enriquecidos mediante la eliminación de los ARNr y los ARN de la globina. El método de eliminación enzimática de ARN ribosómico en un único tubo es compatible con entradas reducidas (1 ng) y reduce el ARNr de las especies procariontas y eucariotas (tabla 2).

Tabla 1: Especificaciones de Illumina Stranded Total RNA

Característica	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
Eliminación de ARN abundante	ARNr de humanos, ratones y 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 <sup>a</sup>
Duración total del ensayo	11,5 horas	7 horas
Tiempo de participación activa	5,5 horas	<3 horas
Compatible con FFPE	Sí	Sí
Configuración del kit	48 o 96 muestras	16 o 96 muestras

a. 1-1000 ng de ARN 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.  
b. Abreviaturas: UDI, índices dobles únicos; RIN, número de integridad del ARN.

Tabla 2: Especies de ARN selectivo para la reducción

Muestra	ARNr selectivos
ARNr citoplasmáticos humanos	28S, 18S, 5.8S, 5S
ARNr mitocondriales humanos	12S, 16S
Transcritos 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

Los abundantes ARNr y ARN de la globina se eliminan del ARN total mediante hibridación selectiva con sondas de ADN y escisión posterior mediada por ARNasa H, (figura 2, tabla 3). A continuación, las muestras con el ARN ribosomal eliminado se someten a la preparación de librerías. Para evaluar la eliminación de ARNr y el rendimiento de la preparación de librerías con Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus, se probó un rango de entradas de ARN total frente a TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus mostró un mayor rendimiento, especialmente con entradas reducidas (figura 3, tabla 4).

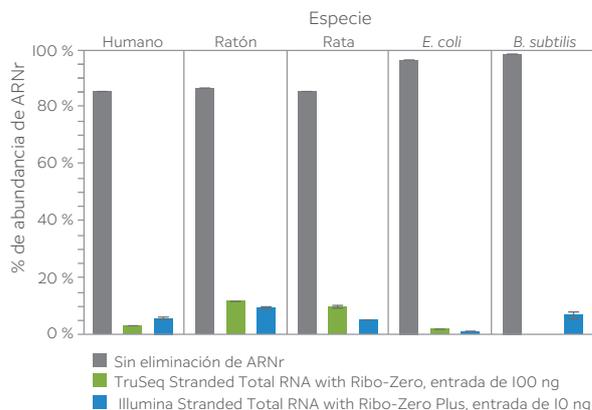


Figura 2: Eliminación de ribosomas de diferentes especies con Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus reduce de manera eficaz las concentraciones de ARNr de humanos, ratones, ratas y bacterias en una reacción en un único tubo. Los resultados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

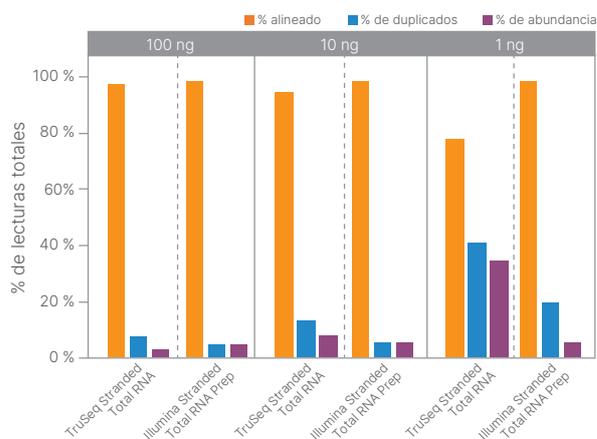


Figura 3: Comparación del rendimiento de preparación de librerías. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus se comparó con TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus fue más eficaz, con un mayor número de lecturas alineadas y menos duplicados y abundancia de ARNr, particularmente con entradas reducidas de 10 ng y 1 ng de ARN de UHR total. Las librerías se secuenciaron en NextSeq 550 System, obteniéndose 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 BaseSpace™ RNA-Seq Alignment v2.0.

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

Gen	100 ng de entrada de ARN total			10 ng de entrada de ARN total		
	Sin eliminación	Con eliminación	% de eliminación	Sin eliminación	Con eliminación	% de eliminación
<i>HBA1</i>	7489	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 %

Tabla 4: Criterios de medición del rendimiento de Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus<sup>a</sup>

	100 ng de entrada de ARN total		10 ng de entrada de ARN total		1 ng de entrada de ARN total	
	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
% 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	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 BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

b. El porcentaje de duplicados se notifican después de las submuestras de 4 millones de lecturas "paired-end" que pasan el filtro (PF, Passing Filter).

## Datos de alta calidad

### Uniformidad de cobertura

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

### 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 diversas cantidades de entrada de ARN de UHR en 30 millones de lecturas "paired-end" y se evaluó el número de genes con cobertura de 1 y 10×. Los resultados muestran que Illumina Stranded Total RNA Prep permite una mayor detección de genes con cantidades de entrada reducidas de 1 ng (figura 5).

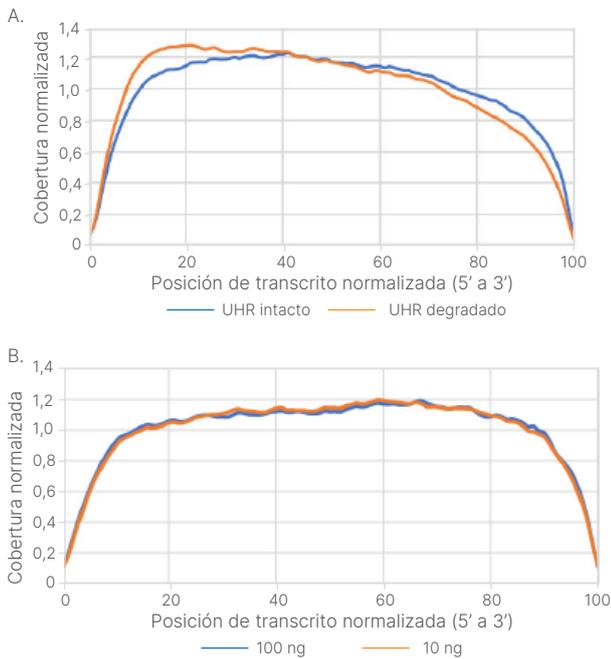


Figura 4: Uniformidad de cobertura elevada. Illumina Stranded Total RNA Prep proporciona una uniformidad de cobertura elevada para (A) ARN de UHR de alta calidad y degradado sintéticamente (RIN = 2) y (B) ARN FFPE a niveles de entrada de 100 ng y 10 ng. La muestra FFPE obtuvo una puntuación de calidad de DV<sub>200</sub> del 55 %. Todas las librerías se secuenciaron en NovaSeq 6000 System con 50 millones de lecturas. El análisis de datos se realizó utilizando la aplicación BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

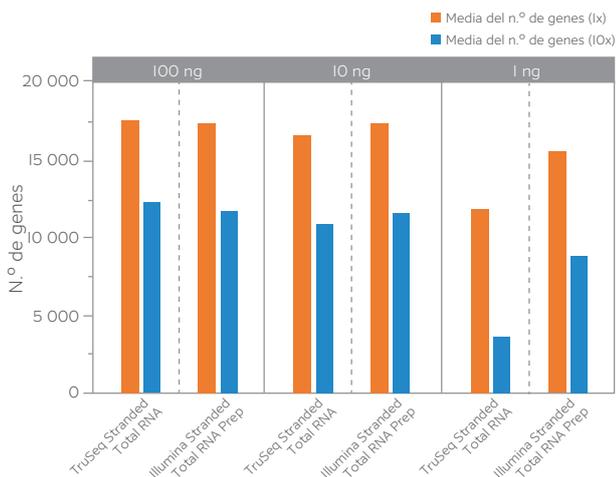


Figura 5: Mayor descubrimiento de genes con entrada reducida. Illumina Stranded Total RNA Prep permite una mayor detección de genes con entradas de ARN reducidas, en comparación con TruSeq Stranded Total RNA, medido por el número de genes detectados en 30 millones de lecturas "paired-end" submuestreadas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

### Concordancia de datos excepcional

Illumina Stranded Total RNA Prep produce datos de calidad con una alta concordancia entre diversas cantidades de entrada de ARN de UHR (figura 6A) y entre réplicas técnicas con cantidades reducidas de entrada de ARN de muestras FFPE (figura 6B). Estos resultados demuestran que Illumina Stranded Total RNA Prep es una solución ideal para muestras degradadas con material de partida limitado. Además, Illumina Stranded Total RNA Prep muestra una gran concordancia de datos con TruSeq Stranded Total RNA, tanto con entradas equivalentes (figura 7A) como con entradas reducidas (figura 7B).

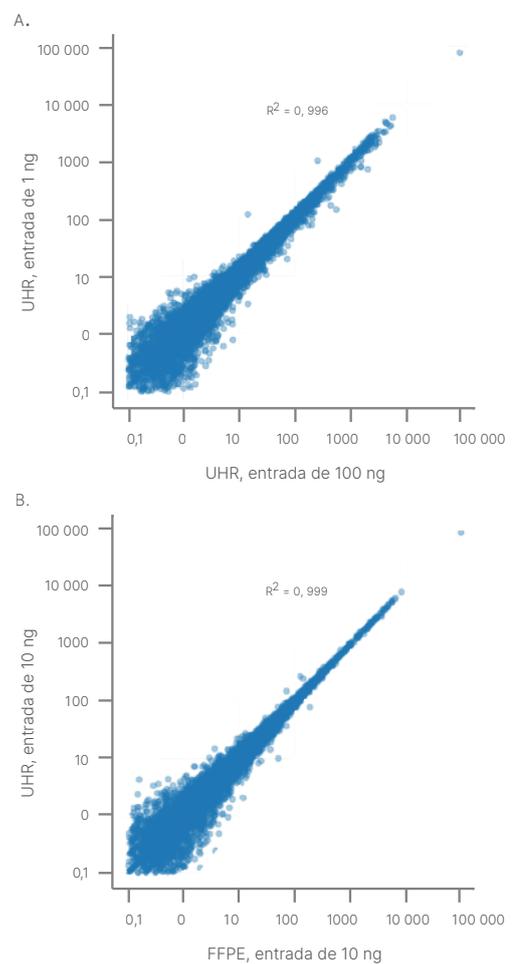


Figura 6: Alta concordancia de datos. Illumina Stranded Total RNA Prep logra una elevada concordancia de datos entre (A) cantidades de entrada de ARN de UHR de 1 ng y 100 ng y (B) réplicas técnicas de 10 ng de ARN FFPE. Las librerías se secuenciaron en NovaSeq 6000 System a 2 x 74 pb. El análisis de datos se realizó utilizando la aplicación BaseSpace RNA-Seq Alignment v2.0.1.

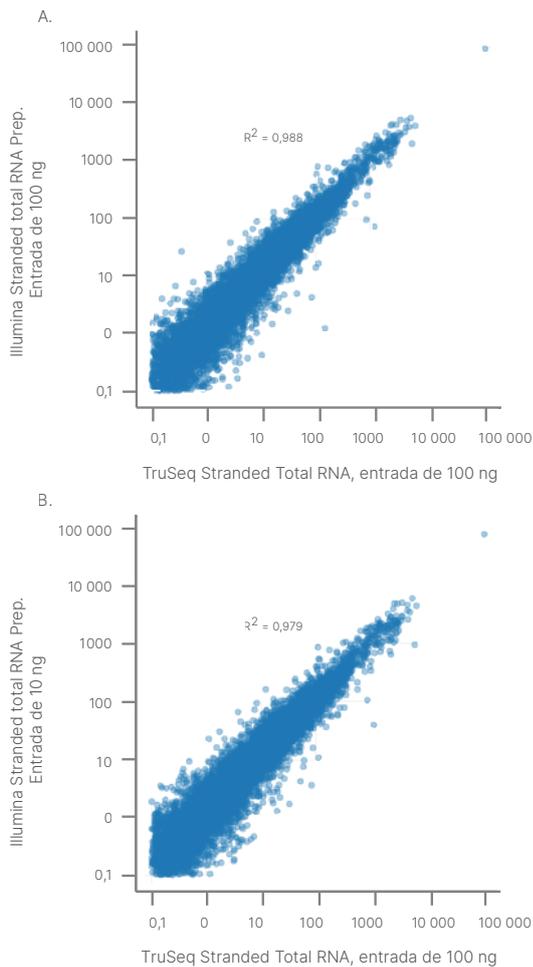


Figura 7: Alto grado de concordancia con el kit heredado. Illumina Stranded Total RNA Prep produce datos con un alto nivel de concordancia con TruSeq Stranded Total RNA con (A) entradas equivalentes y (B) más reducidas.

## Flujo de trabajo de preparación de librerías optimizado

Illumina Stranded Total RNA Prep utiliza un flujo de trabajo rápido y flexible para la preparación con un método de ligadura de librerías 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 8).



Figura 8: Flujo de trabajo de Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus. Illumina Stranded Total RNA Prep ofrece un flujo de trabajo rápido con un menor tiempo de participación activa. El tiempo puede variar dependiendo del equipo empleado, el número de muestras procesadas, los procedimientos de automatización o la experiencia del usuario.

## Mayor productividad con índices dobles únicos

Al combinar Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus y los instrumentos de alta productividad, como NextSeq™ 550 System y NovaSeq™ 6000 System, los laboratorios pueden secuenciar muchas más muestras por experimento, sin comprometer la calidad de los datos. Para obtener un aumento adicional en la productividad de muestras, Illumina Stranded Total RNA Prep posibilita el multiplexado con 384 índices dobles únicos (UDI, Unique Dual Indexes). Además de eliminar el impacto de la asignación incorrecta de índices, es decir, el intercambio de índices, los UDI ayudan a disminuir los costes de la secuenciación, ya que permiten cargar hasta 384 muestras en una sola celda de flujo S4 de NovaSeq 6000 para lograr así una productividad significativamente superior.

## Resumen

ILLUMINA Stranded Total RNA Prep ofrece una solución de RNA-Seq optimizada para un análisis claro y completo en todo el transcriptoma. Además, proporciona una extraordinaria flexibilidad en cuanto al tipo de entrada y permite entradas reducidas de hasta 1 ng de ARN de alta calidad. La compatibilidad con Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit permite una eliminación muy eficaz del ARNr interferente de diferentes especies, incluidos humanos, ratones, ratas y bacterias. ILLUMINA Stranded Total RNA Prep permite medir de forma precisa la orientación de la cadena, una cobertura uniforme y un alto grado de fiabilidad en el descubrimiento de características, como, por ejemplo, transcritos alternativos, fusiones génicas y expresión específica de alelos.

## Información adicional

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

## Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
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



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566  
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 ILLUMINA, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a ILLUMINA, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
 M-GL-02148 ESP v1.0