

# Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero<sup>MC</sup> Plus

Analyse sensible et précise  
du transcriptome grâce à une  
solution flexible et rapide

- Sensibilité élevée avec seulement 1 ng d'ARN de haute qualité ou 10 ng d'ARN provenant d'échantillons FFIP dégradés
- Élimination des ARNr des humains, souris, rats et espèces bactériennes et des ARN de globine en une seule réaction en tube
- Préparation des bibliothèques en 7 heures dont 3 heures seulement sont consacrées à la manipulation

## Introduction

Le séquençage d'ARN (RNA-Seq) avec séquençage nouvelle génération (SNG) est une méthode puissante pour découvrir, réaliser le profilage et quantifier des transcrits d'ARN. Les avantages des principales approches de RNA-Seq comprennent :

- Le RNA-Seq total fournit une approche authentique et sans hypothèse pour une analyse complète du transcriptome. Il mesure de façon précise l'abondance des gènes et des transcrits, et détecte à la fois des caractéristiques connues et nouvelles dans l'ARN codant ainsi que dans différentes formes d'ARN non codant.
- L'ARN messager (mRNA)-Seq quantifie l'expression génique de façon sensible et précise, identifie les isoformes connues et nouvelles dans le transcriptome codant et mesure l'expression spécifique d'allèles.
- Le RNA-Seq ciblé analyse l'expression génique dans un ensemble ciblé de gènes d'intérêt. Le RNA-Seq ciblé avec enrichissement permet d'effectuer une analyse rentable de l'exome de l'ARN grâce à la capture de séquences spécifiques des régions de codage du transcriptome.

TruSeq<sup>MC</sup> Stranded Total RNA est une solution robuste pour les analyses du transcriptome entier sur des échantillons de qualité standard ou faible. Cependant, la nécessité d'utiliser des quantités relativement élevées, l'ampleur de la durée totale du test et de la durée de manipulation ainsi que les limites du champ d'application ont restreint son utilité en matière d'applications RNA-Seq. Pour surmonter ces obstacles, Illumina a mis au point Illumina Stranded Total RNA Prep (tableau 1). Cette solution de pointe offre une préparation de bibliothèques rapide, efficace et basée sur la ligation qui prend en charge les petites quantités d'échantillons et une grande variété d'applications RNA-Seq.

Pour centrer les études sur les séquences à valeur élevée, Illumina Stranded Total RNA Prep comprend la trousse Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit\* qui permet d'éliminer efficacement l'ARN ribosomal (ARNr) d'une multitude d'espèces, dont les humains, les souris, les rats et les bactéries, en une seule réaction (figure 1).

\* Pour les études métatranscriptomiques, Illumina Stranded Total RNA Prep peut être combinée à la trousse Illumina Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, qui fournit une déplétion robuste de l'ARNr abondant dans les échantillons microbiens complexes.

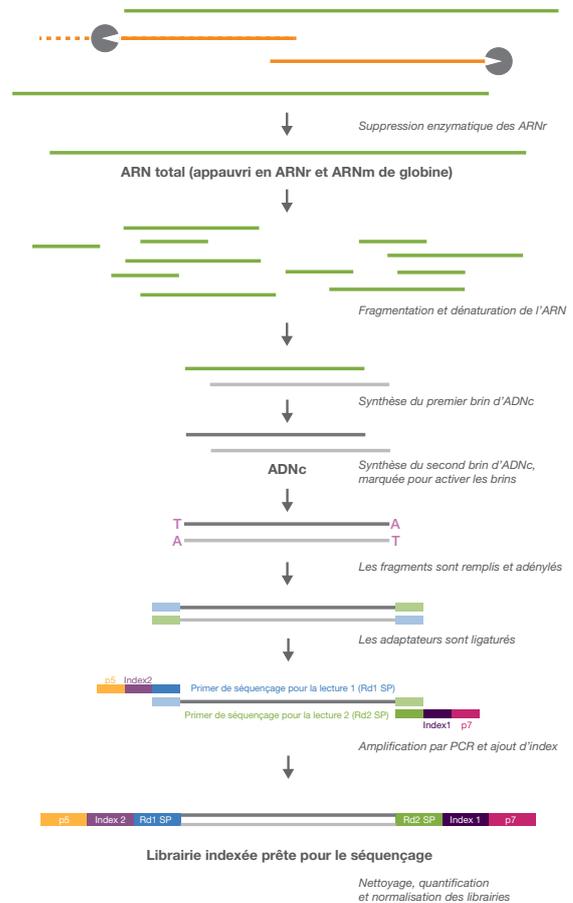


Figure 1 : Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus – Une fois que les ARNr et les ARNm de globine abondants (lignes orange) ont été éliminés et que la synthèse de l'ADNc est terminée, on procède à la ligation des adaptateurs et à l'ajout d'index doubles uniques par amplification PCR pour produire des bibliothèques de haute qualité qui sont quantifiées et normalisées avant le séquençage.

## Élimination multi-espèces efficace des ARNr avec Ribo-Zero Plus

L'élimination des ARN abondants, y compris des ARNr et des ARN de globine, avant le RNA-Seq permet aux chercheurs de se concentrer sur l'analyse de parties informatives à valeur élevée du transcriptome, tout en diminuant les coûts de séquençage. Illumina Stranded Total RNA inclut la trousse Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit, ce qui facilite les analyses riches du transcriptome en éliminant les ARNr et les ARN de globine. La méthode d'élimination enzymatique des ARNr par tube unique est compatible avec les faibles entrées (1 ng) et élimine partiellement les ARNr des espèces procaryotiques et eucaryotiques (tableau 2).

Tableau 1 : Caractéristiques d'Illumina Stranded Total RNA

Caractéristique	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
Appauvrissement de l'ARN abondant	ARNr d'humains, de souris et de rats ou ARNm de globine	ARNr d'humains, de souris, de rats et de bactéries et ARNm de globine
IDU max.	96	384
Quantité d'entrée d'ARN	100 à 1 000 ng	1 à 1 000 ng d'ARN <sup>a</sup>
Durée totale du test	11,5 heures	7 heures
Durée de manipulation	5,5 heures	< 3 heures
Compatible avec les échantillons FFIP	Oui	Oui
Configuration de la trousse	48 ou 96 échantillons	16 ou 96 échantillons

a. 1 à 1 000 ng d'ARN de haute qualité (RIN > 7), 10 à 1 000 ng d'ARN dégradé (RIN 2-7) ou d'ARN FFPE (DV200 > 55). Pour une performance optimale, il est recommandé d'utiliser 10 ng d'ARN d'entrée.  
b. Abréviations : IDU, index doubles uniques; RIN, numéro d'intégrité de l'ARN.

Tableau 2 : Espèces d'ARN ciblées pour la réduction

Échantillon	ARNr ciblés
ARNr cytoplasmiques humains	28S, 18S, 5.8S, 5S
ARNr mitochondriaux humains	12S, 16S
Transcrits de globine bêta humaine	HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2
ARNr de souris et de rats	16S, 28S
ARNr bactérien Gram (-)	<i>E. coli</i> 5S, 16S, 23S
ARNr bactérien Gram (+)	<i>B. subtilis</i> 5S, 16S, 23S

Les ARNr et ARN de globines abondants sont éliminés de l'ARN total par hybridation ciblée sur des sondes d'ADN, puis par clivage par médiation H de la ribonucléase (figure 2, tableau 3). Les échantillons appauvris en ARNr sont ensuite soumis à l'étape de préparation des bibliothèques. Pour évaluer l'appauvrissement en ARNr et la performance de préparation des bibliothèques obtenue avec Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus, une gamme d'entrées d'ARN total a été comparée à TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus a démontré une performance supérieure, particulièrement avec des entrées faibles (figure 3, tableau 4).

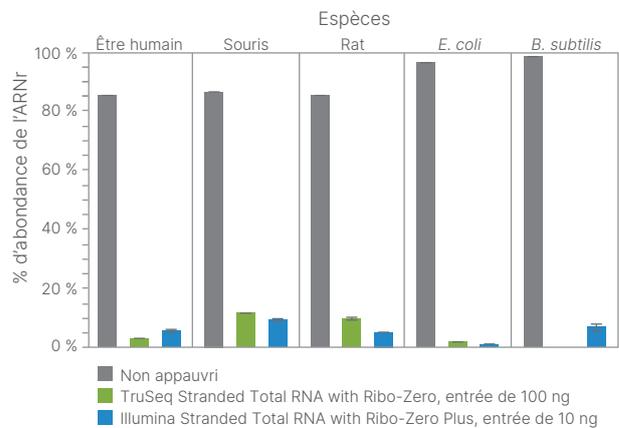


Figure 2 : Appauvrissement multi-espèces des ARNr avec Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus – Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus réduit efficacement les niveaux d'ARNr issus d'humains, de souris, de rats et de bactéries dans une réaction à tube unique. Les résultats sont comparés à TruSeq Stranded Total RNA associé à Ribo-Zero Gold pour des espèces de mammifères et Ribo-Zero Bacteria pour les *E. coli* (données pour *B. subtilis* non représentées).

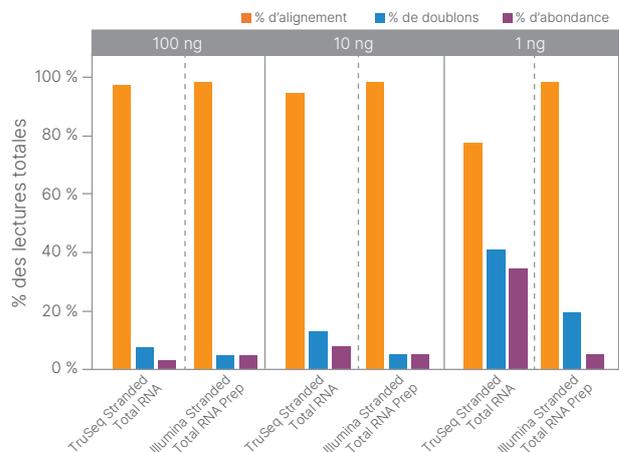


Figure 3 : Comparaison de la performance de la préparation des bibliothèques – Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus a été comparée à TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero. Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus s'est révélée plus efficace, avec plus de lectures alignées et moins de doublons et d'ARN abondants, notamment avec des niveaux d'entrée faibles de 10 ng et de 1 ng d'ARN total de RHU. Les bibliothèques ont été séquencées à l'aide du NextSeq 550 System, sous-échantillonnées à 30 millions de lectures. Les pourcentages de doublons ont été calculés en sous-échantillonnant à 4 millions de lectures et analysés au moyen de l'application BaseSpace<sup>MS</sup> RNA-Seq Alignment App v2.0.

Tableau 3 : Appauvrissement des ARNm de globine provenant de leucocytes périphériques humains à l'aide d'Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus

Gène	Entrée de 100 ng d'ARN total			Entrée de 10 ng d'ARN total		
	Non appauvri	Appauvri	% appauvri	Non appauvri	Appauvri	% appauvri
<i>HBA1</i>	7 489	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 %

Tableau 4 : Indicateurs de performance d'Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus<sup>a</sup>

	Entrée de 100 ng d'ARN total		Entrée de 10 ng d'ARN total		Entrée de 1 ng d'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
% d'ARNr (28S/18S)	2,0	3,8	7,2	4,4	32,8	4,5
% de brins	99	99	99	99	99	99
CV médian de couverture	0,44	0,46	0,48	0,47	0,52	0,51
% de doublons	7,5	4,5	12,8	5,3	40,9	19,2
% d'alignement	96,9	96,9	94,2	97,5	76,6	97,5
% d'abondance	3,0	4,9	8	5,2	35,8	5,0

a. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de l'application BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1.

b. Les pourcentages de doublons correspondent à la situation après sous-échantillonnage à 4 millions de lectures appariées passant le filtre.

## Données de haute qualité

### Uniformité de la couverture

Illumina Stranded Total RNA Prep produit des bibliothèques de séquençage garantissant une couverture hautement uniforme des transcrits à partir d'ARN d'entrée de référence humaine universelle (RHU) de haute qualité et dégradé (figure 4A) et avec de faibles quantités d'entrée d'ARN FFIP (figure 4B).

### Efficacité en matière d'identification de gènes

Pour comparer la performance d'Illumina Stranded Total RNA Prep à TruSeq Stranded Total RNA pour les applications de découverte génique, différentes quantités d'ARN de RHU d'entrée ont été séquencées à 30 millions de lectures appariées et le nombre de gènes a ensuite été évalué avec une couverture de 1× et de 10×. Les résultats ont démontré qu'Illumina Stranded Total RNA Prep permet une meilleure détection des gènes à de faibles niveaux d'entrée d'ARN total de 1 ng seulement (figure 5).

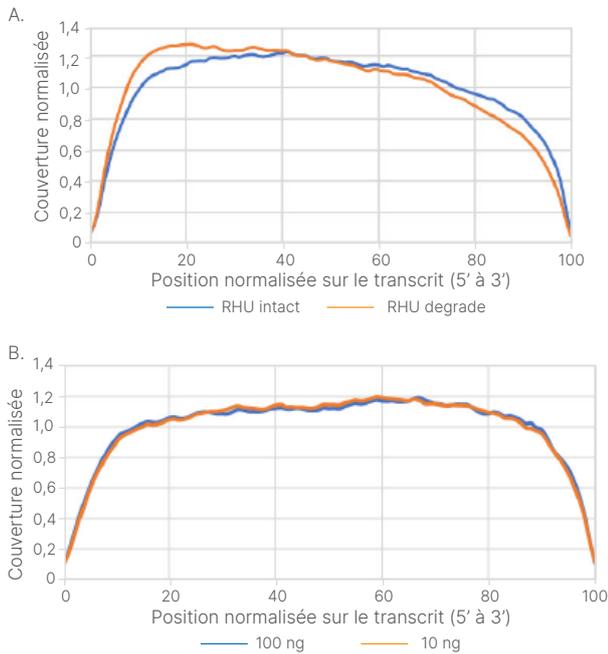


Figure 4 : Uniformité élevée de couverture – Illumina Stranded Total RNA Prep assure une uniformité élevée de couverture pour (A) les ARN de RHU de haute qualité et synthétiquement dégradés (RIN = 2) et (B) les ARN FFIP à des niveaux d'entrée de 100 ng et 10 ng. L'échantillon FFIP présentait un score de qualité DV<sub>200</sub> de 55 %. Toutes les bibliothèques ont été séquencées à l'aide d'un système NovaSeq 6000 à 50 millions de lectures. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de l'application BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1.

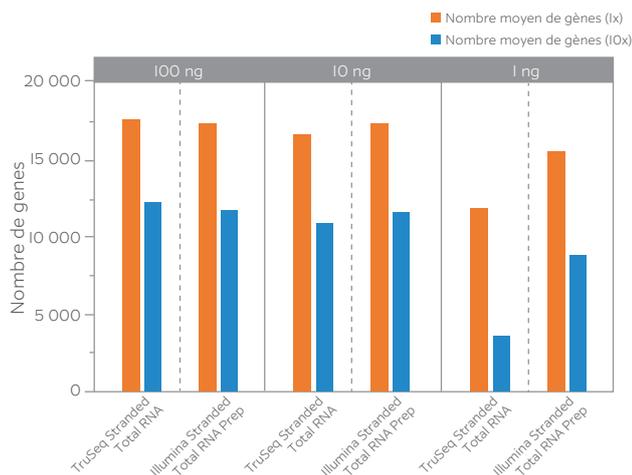


Figure 5 : Meilleure identification des gènes à faible entrée – Illumina Stranded Total RNA Prep permet une meilleure détection des gènes avec de faibles entrées d'ARN, comparativement à TruSeq Stranded Total RNA lorsque l'on mesure le nombre de gènes détectés à 30 millions de lectures appariées sous-échantillonnées passant le filtre. Une détection de plus de gènes à une couverture de 1x avec Illumina Stranded Total RNA Prep indique une plus grande sensibilité.

### Concordance exceptionnelle des données

Illumina Stranded Total RNA Prep génère des données de qualité avec un niveau élevé de concordance entre différentes quantités d'entrée d'ARN de RHU (figure 6A) et entre les répliquats techniques de faibles quantités d'entrée d'ARN d'échantillons FFIP (figure 6B). Ces résultats démontrent qu'Illumina Stranded Total RNA Prep constitue une solution idéale pour les échantillons dégradés dont la quantité de matériel initial est limitée. En outre, Illumina Stranded Total RNA Prep présente un niveau élevé de concordance des données avec TruSeq Stranded Total RNA, tant pour des entrées équivalentes (figure 7A) que réduites (figure 7B).

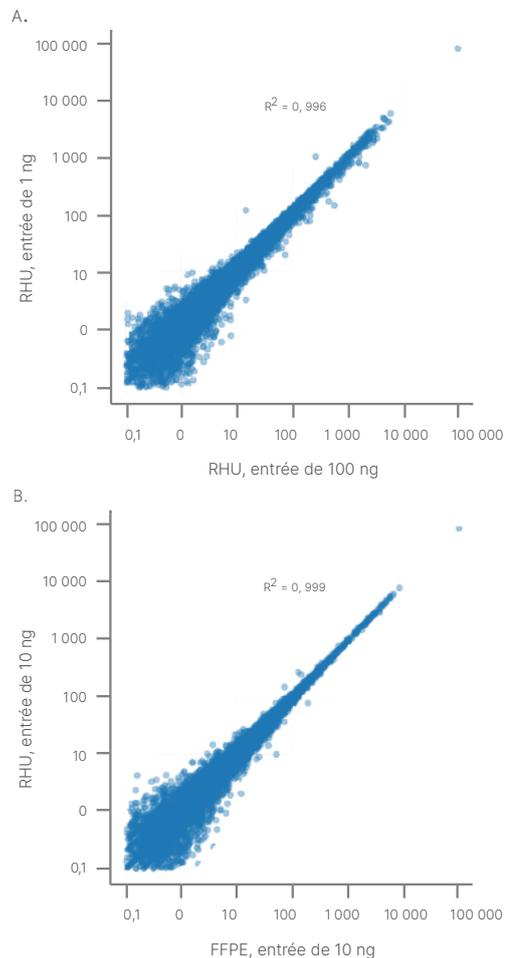


Figure 6 : Concordance élevée des données – Illumina Stranded Total RNA Prep atteint une concordance élevée des données entre (A) des quantités d'entrée de 1 ng et de 100 ng d'ARN de RHU et (B) des répliquats techniques de 10 ng d'ARN FFIP. Les bibliothèques ont été séquencées à l'aide d'un système NovaSeq 6000 à 2 x 74 pb. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de l'application BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1.

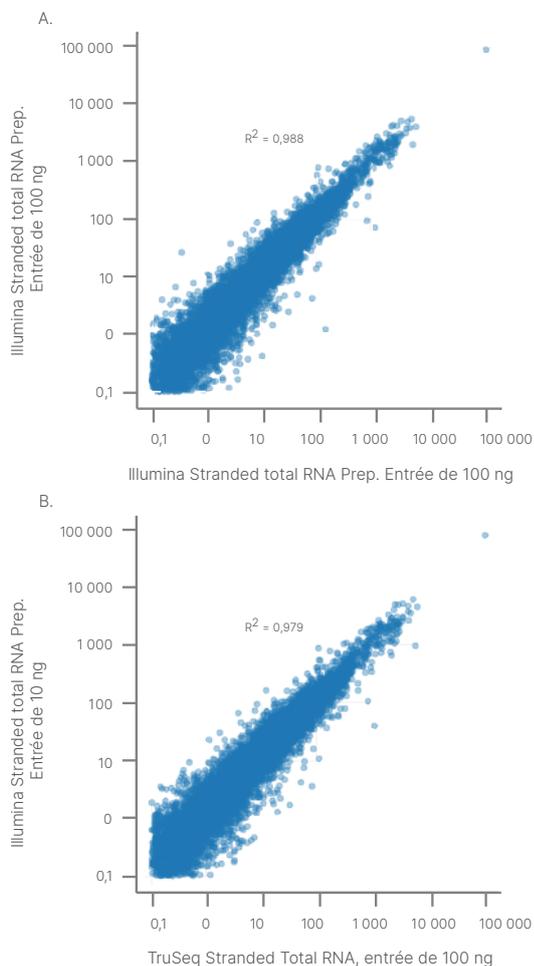


Figure 7 : Concordance élevée avec la trousse existante – Illumina Stranded Total RNA Prep génère des données à concordance élevée avec TruSeq Stranded Total RNA à des entrées (A) équivalentes et (B) inférieures.

## Flux de travail rationalisé pour la préparation des bibliothèques

Illumina Stranded Total RNA Prep utilise un flux de travail rapide et flexible pour la préparation basée sur la ligation des bibliothèques d'ARN (figure 1). Les innovations apportées au flux de travail, notamment des temps d'incubation plus courts et des étapes de nettoyage des échantillons réduites, se traduisent par une durée totale de test plus de 40 % plus courte que TruSeq Stranded Total RNA (figure 8).

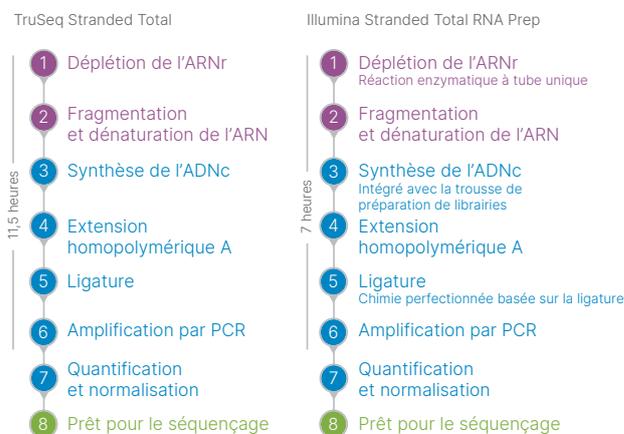


Figure 8 : Flux de travail d'Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus – Illumina Stranded Total RNA Prep assure un flux de travail rapide avec une durée de manipulation réduite. Les durées peuvent varier selon le matériel utilisé, le nombre d'échantillons traité, l'automatisation des procédures et le niveau d'expérience de l'utilisateur.

## Débit plus élevé avec des index doubles uniques

En combinant Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus et des instruments à haut débit comme les systèmes NextSeq<sup>MC</sup> 550 et NovaSeq<sup>MC</sup> 6000, les laboratoires peuvent séquençer beaucoup plus d'échantillons par analyse sans compromettre la qualité des données. Pour augmenter encore davantage le débit d'échantillons, Illumina Stranded Total RNA Prep prend en charge le multiplexage avec 384 index doubles uniques. En plus d'éliminer l'impact d'une mauvaise attribution d'index, ou la commutation d'index, les index doubles uniques contribuent à réduire les coûts de séquençage en permettant le chargement de jusqu'à 384 échantillons sur une seule Flow Cell NovaSeq 6000 S4, ce qui augmente nettement le débit.

## Résumé

ILLUMINA Stranded Total RNA Prep offre une solution rationalisée de RNA-Seq qui permet de réaliser une analyse claire et complète du transcriptome. Elle offre une flexibilité extraordinaire pour le type d'entrées et prend en charge de faibles quantités d'entrées, jusqu'à 1 ng d'ARN de haute qualité. La compatibilité avec la trousse Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit permet d'éliminer avec une haute efficacité l'ARNr interférent d'une multitude d'espèces, dont les humains, les souris, les rats et les bactéries. ILLUMINA Stranded Total RNA Prep garantit une mesure précise de l'orientation du brin, une couverture uniforme et une détection hautement fiable de caractéristiques telles que les autres transcrits, les fusions de gènes et l'expression spécifique d'allèles.

## En savoir plus

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

## Renseignements relatifs à la commande

Produit	N° de référence
ILLUMINA Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 échantillons)	20040525
ILLUMINA Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 échantillons)	20040529
ILLUMINA Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 échantillons)	20072063
ILLUMINA RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091655
ILLUMINA RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091657
ILLUMINA RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091659
ILLUMINA RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 index, 96 échantillons)	20091661



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) | [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2023 ILLUMINA, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'ILLUMINA, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
 M-GL-02148 FRA v1.0