

# TruSeq™ Stranded mRNA e Total RNA

Permettono una panoramica chiara ed esaustiva del trascrittoma grazie a una soluzione ottimizzata, efficiente in termini di costi e scalabile per le analisi dell'mRNA o dell'intero trascrittoma.

## Punti principali

- Misurazione precisa dell'orientamento del filamento**  
 Rende possibile il rilevamento della trascrizione antisense, migliora l'annotazione dei trascritti e aumenta l'efficienza di allineamento
- Qualità di copertura eccellente**  
 Fornisce una mappatura accurata ed esaustiva dei trascritti alternativi e delle fusioni geniche
- Compatibile con numerosi tipi di campione**  
 Analizza vari campioni, tra cui campioni di qualità bassa, fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) e di sangue
- Flessibilità eccezionale**  
 Offre una flessibilità eccezionale per la progettazione sperimentale con 96 doppi indici univoci (unique dual index, UDI) che assicurano un multiplex campioni affidabile

## Introduzione

Il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) è un metodo potente per la scoperta, l'identificazione del profilo e la quantificazione dei trascritti dell'RNA. RNA-Seq utilizza la tecnologia di sequenziamento Illumina di nuova generazione (NGS) e non richiede sonde specifiche per specie o trascrittomi specifici, pertanto le ipotesi precedenti sul trascrittoma non comportano una distorsione dei dati. Di conseguenza, RNA-Seq rende possibili progettazioni sperimentali libere da ipotesi di qualsiasi specie, incluse quelle con annotazione genomica scadente o mancante. Oltre alla misurazione dei cambiamenti dell'espressione genica, RNA-Seq può essere utilizzato per applicazioni di scoperta come ad esempio per l'identificazione di eventi di splicing alternativi, di fusioni geniche, di espressione specifica per l'allele e per l'esame di trascritti rari e nuovi.

Di pari passo con una migliore comprensione delle complessità della regolazione genica, è emersa la necessità di acquisire ulteriori dati. Le informazioni del filamento identificano da quale dei due filamenti di DNA è stato derivato un dato trascritto di RNA. Queste informazioni forniscono una maggiore confidenza nell'annotazione del trascritto, in particolare per campioni non umani. L'identificazione dell'origine del filamento incrementa la percentuale di letture allineabili, riducendo i costi di sequenziamento per campione. Il mantenimento dell'orientamento del filamento permette inoltre l'identificazione dell'espressione antisense, un importante mediatore della regolazione genica.<sup>1</sup> La capacità di acquisire l'abbondanza relativa di espressione senso e antisense fornisce visibilità alle interazioni regolatrici che diversamente potrebbero non essere identificate.



**Figura 1: TruSeq Stranded RNA:** TruSeq Stranded mRNA e Total RNA permettono l'interrogazione robusta di campioni standard e di qualità bassa e sono compatibili con un'ampia gamma di progettazioni di studi.

Mentre si continuano a riconoscere gli importanti ruoli biologici dell'RNA non codificante (noncoding RNA, ncRNA), l'analisi dell'intero trascrittoma, o sequenziamento dell'RNA totale, fornisce un'immagine più ampia della dinamica dell'espressione. Sequenziamento dell'RNA totale Il sequenziamento dell'RNA totale reso possibile dalla riduzione dell'RNA ribosomiale (ribosomal RNA, rRNA) è compatibile con i campioni in FFPE, che contengono informazioni biologiche potenzialmente importanti. TruSeq Stranded RNA fornisce una combinazione univoca di qualità eccezionale dei dati per l'analisi dell'mRNA e dell'intero trascrittoma. Inoltre, il flusso di lavoro permette l'interrogazione robusta di campioni standard e di qualità bassa ed è compatibile con un'ampia gamma di progettazioni di studi (Figura 1).

## Efficace riduzione ribosomiale

TruSeq Stranded RNA (Tabella 1) combina, in un protocollo unico e ottimizzato, chimiche comprovate di riduzione ribosomiale e di preparazione delle librerie. Diversamente dai metodi di cattura su base polyA, i kit Ribo-Zero™ rimuovono l'rRNA utilizzando sonde biotilate che legano selettivamente le specie rRNA. Microsfere magnetiche catturano l'ibrido sonda-rRNA e vengono quindi eliminate mediante pull-down, lasciando l'RNA desiderato, purificato dall'rRNA, nella soluzione. Questo processo riduce al minimo la contaminazione ribosomiale e massimizza la percentuale di letture mappate univocamente, coprendo sia l'mRNA che un'ampia gamma di specie di ncRNA d'interesse, inclusi RNA non codificante lungo intergenico lungo (lincRNA), piccolo RNA nucleare (snRNA), piccolo RNA nucleolare (snoRNA) e altre specie di RNA.<sup>2</sup>

**Tabella 1: Specie di RNA mirate per la riduzione**

| Specie di RNA mirate  | Preparazione delle librerie                             |
|---|---|
| • rRNA citoplasmatico   | TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Human/Mouse/Rat |
| • rRNA citoplasmatico<br>• rRNA mitocondriale                       | TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Gold            |
| • rRNA citoplasmatico<br>• rRNA mitocondriale<br>• mRNA con globina | TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Globin          |

### Informazioni di alta qualità sul filamento

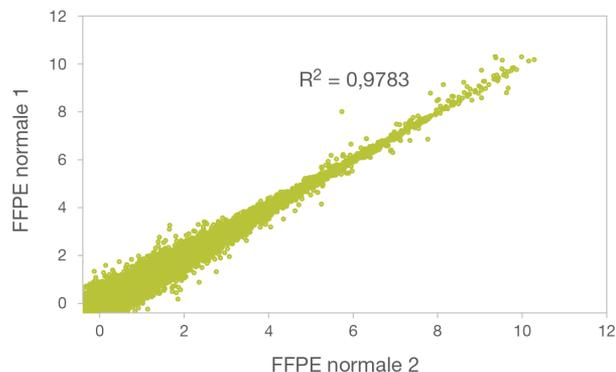
La chimica TruSeq Stranded RNA fornisce dati di qualità eccezionale. La misurazione dei filamenti, ovvero la percentuale di letture mappate univocamente che forniscono informazioni accurate sull'origine del filamento in base all'RNA di riferimento umano universale (Universal Human Reference, UHR) ben caratterizzato, è  $\geq 99\%$  utilizzando TruSeq Stranded mRNA e  $\geq 98\%$  utilizzando TruSeq Stranded Total RNA. Queste informazioni altamente accurate sono utili per aumentare la percentuale di letture univoche allineate nell'assemblaggio di trascrittomi annotati in modo scadente e forniscono sensibilità per rilevare l'espressione antisenso. La misurazione coerente e precisa dell'abbondanza di RNA si riflette nell'elevata riproducibilità tra i replicati tecnici (Figura 2,  $R^2 = 0,9783$ ).

### TruSeq Total RNA per campioni di qualità bassa

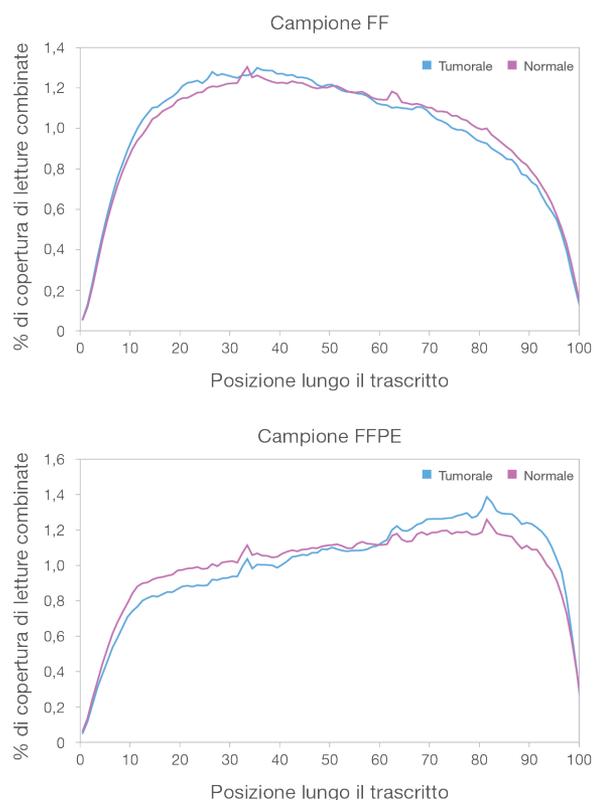
TruSeq Stranded RNA permette l'interrogazione robusta ed efficiente di campioni di RNA FFPE e altri di qualità bassa. La copertura sui trascritti è elevata e uniforme sia sui campioni freschi e congelati (fresh-frozen, FF) sia sui campioni in FFPE preparati con TruSeq Stranded Total RNA (Figura 3). Il flusso di lavoro ottimizzato di rimozione dell'rRNA Ribo-Zero fornisce una soluzione praticabile e altamente scalabile per un'analisi efficiente dell'intero trascrittoma su campioni che storicamente sono difficili da analizzare.

### Analisi di RNA di campioni di sangue

TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Globin permette l'interrogazione robusta ed efficiente di codificanti e ncRNA isolati da campioni di sangue. Un flusso di lavoro ottimizzato e di facile automazione applica la chimica Ribo-Zero per rimuovere, in una singola e rapida fase, l'mRNA per la globina assieme all'rRNA citoplasmatico e mitocondriale contemporaneamente (Tabella 1). Questo flusso di lavoro combina la rimozione dell'mRNA per la globina, la rimozione dell'rRNA e la preparazione delle librerie per ottimizzare l'output del sequenziamento. Consente inoltre di ridurre il tempo totale per il saggio, di eliminare la necessità di ulteriore chimica di rimozione e di ridurre i costi per campione.



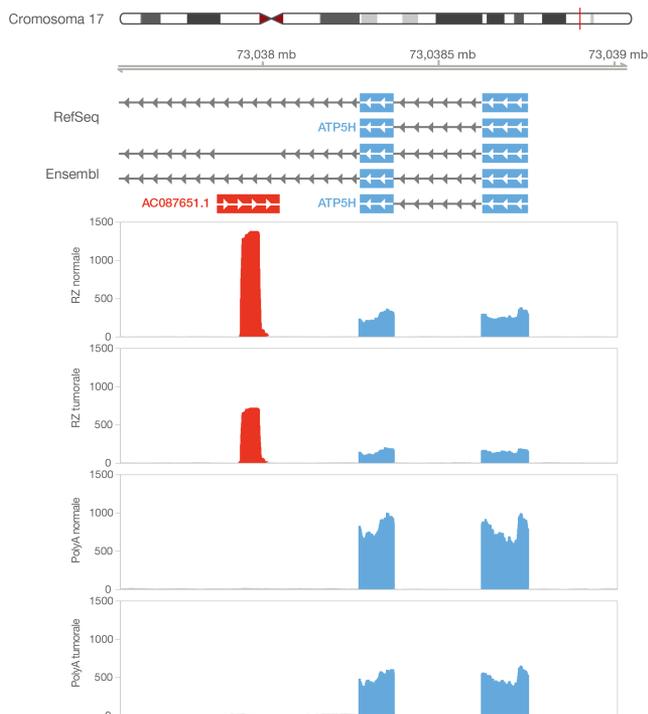
**Figura 2: Concordanza elevata tra replicati tecnici:** i replicati tecnici di tessuto in FFPE mostrano una concordanza elevata, a indicare buone prestazioni di preparazione delle librerie. Gli assi sono rappresentazioni dell'espressione genica espressa in log2 FPKM (Fragments Per Kilobase Million). Viene visualizzato il valore  $R^2$ .



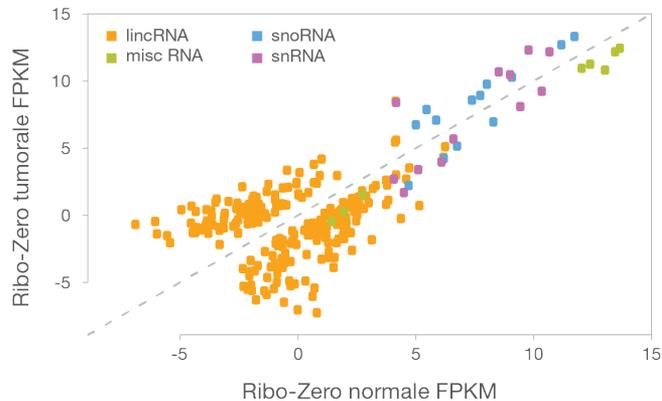
**Figura 3: Copertura uniforme sui trascritti:** TruSeq Stranded Total RNA fornisce un'eccellente copertura sui primi 1.000 trascritti espressi sia in tessuti mammari FF (sopra) che in FFPE (sotto), tumorali e normali corrisposti, con  $> 98\%$  di letture dei filamenti allineate.

## Espressione differenziale di RNA non codificante

La conservazione delle informazioni del filamento dei trascritti dell'RNA è importante per molti motivi, tra cui il rilevamento di trascritti espressi differenzialmente. È stato fatto un confronto tra TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero e un metodo standard su base polyA per la preparazione delle librerie nell'analisi di sequenziamento dell'RNA del tessuto mammario tumorale e normale. Sia le librerie preparate con TruSeq Stranded Total RNA sia quelle preparate su base PolyA hanno rilevato l'espressione differenziale di *ATP5H* tra i campioni tumorali e normali. Tuttavia, utilizzando TruSeq Stranded Total RNA, l'espressione differenziale con orientamento inverso nella posizione del trascritto dello pseudogene AC087651.1 è rilevata anche nell'orientamento del filamento opposto e previsto (Figura 4). TruSeq Stranded Total RNA permette inoltre un rilevamento affidabile dell'espressione differenziale tra più forme di ncRNA, tra cui lincRNA, snRNA, snoRNA e altre specie di RNA (RNA miscelaneo) nei tessuti tumorali e normali (Figura 5).



**Figura 4: Espressione differenziale dei trascritti dell'ncRNA:** l'espressione di *ATP5H* dal cromosoma 17 è espressa differenzialmente nel tessuto mammario tumorale e normale. Utilizzando due metodi differenti di preparazione delle librerie (RZ; Ribo-Zero per RNA totale o PolyA; mRNA su base PolyA) si evidenzia l'espressione differenziale tra tessuto tumorale e normale in entrambe le preparazioni (blu). Tuttavia, solo TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero rileva l'espressione differenziale al locus di uno pseudogene (rosso, AC087651.1), per il quale si rilevano le letture con l'orientamento opposto, come previsto. In una preparazione di mRNA standard queste informazioni del filamento sarebbero state perse.



**Figura 5: Rilevamento dell'espressione di ncRNA:** con TruSeq Stranded Total RNA, è possibile rilevare l'espressione differenziale su una gamma di specie di ncRNA, inclusi RNA non codificante lungo intergenico (long intergenic noncoding RNA, lincRNA), piccolo RNA nucleare (small nuclear RNA, snRNA) e piccolo RNA nucleolare (small nucleolar RNA, snoRNA) e altre specie (RNA miscelaneo) tra tessuti tumorali e normali (quattro replicati per campione, con un valore False Discovery Rate - FDR = 0,05).

## Configurazioni flessibili del flusso di lavoro

TruSeq Stranded mRNA e Total RNA offrono soluzioni ottimizzate per specifiche esigenze sperimentali. Ciascun flusso di lavoro include protocolli di processività bassa ed elevata ideali per progetti con  $\leq 48$  campioni e  $\geq 48$  campioni, rispettivamente. Sono disponibili configurazioni Stranded Total RNA mirate per la rimozione di solo rRNA citoplasmatico, oppure di rRNA citoplasmatico e mitocondriale insieme. In un confronto utilizzando RNA UHR, TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Human/Mouse/Rat e Ribo-Zero Gold hanno entrambi ridotto l'rRNA citoplasmatico a  $< 2\%$  di letture allineate. Con TruSeq Stranded associato a Ribo-Zero Gold si è inoltre ottenuta una riduzione dell'rRNA mitocondriale dal 7% a solo lo 0,02% di letture allineate.

## Multiplex campioni efficiente

Grazie a una procedura semplice, gli indici sono aggiunti ai frammenti dei campioni di cDNA per fornire una soluzione innovativa per il multiplex campioni. Per ottenere la più elevata efficienza operativa, possono essere sottoposti a pooling fino a 96 campioni univocamente indicizzati già posizionati su piastra e possono essere sequenziati assieme su una corsia di una singola cella a flusso su qualsiasi piattaforma di sequenziamento Illumina. Dopo il sequenziamento, gli indici sono utilizzati per il demultiplex dei dati e per assegnare accuratamente le letture ai campioni corretti nel pool.

TruSeq Stranded RNA può utilizzare una strategia di indicizzazione singola o doppia che impieghi una combinazione univoca di due indici per il demultiplex. Gli adattatori con doppi indici univoci (unique dual index, UDI) sono stati sviluppati grazie a una collaborazione tra Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e Illumina (disponibili separatamente) e impiegano coppie univoche di indici per il demultiplex. Gli UDI di nuova introduzione (24 e 96) forniscono un plex aumentato che consente l'assegnazione accurata delle letture e un uso efficace delle celle a flusso. Le combinazioni che utilizzano UDI rappresentano la miglior prassi per essere certi che le letture con indici non corretti non influiscano sull'identificazione delle varianti.

## Informazioni per gli ordini

| Prodotto  | Rimozione ribosomiale   | Configurazione            | N. di catalogo         |
|---|---|---------------------------|------------------------|
| TruSeq Stranded mRNA Library Prep                       | N/A   | 48 campioni               | 20020594               |
|   |   | 96 campioni               | 20020595               |
| TruSeq Stranded Total RNA Library Prep umano/topo/ratto | RNA ribosomiale citoplasmatico                                    | 48 campioni               | 20020596               |
|   |   | 96 campioni               | 20020597               |
| TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold             | RNA ribosomiale citoplasmatico e mitocondriale                    | 48 campioni               | 20020598               |
|   |   | 96 campioni               | 20020599               |
| TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant            | RNA ribosomiale citoplasmatico e cloroplastico                    | 48 campioni               | 20020610               |
|   |   | 96 campioni               | 20020611               |
| TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Globin           | RNA ribosomiale citoplasmatico e mitocondriale e mRNA con globina | 48 campioni               | 20020612               |
|   |   | 96 campioni               | 20020613               |
| Indici  |   | Configurazione            | N. di catalogo         |
| TruSeq RNA Single Indexes Set A                         |   | 12 indici,                | 20020492               |
|   |   | 48 campioni               |                        |
| TruSeq RNA Single Indexes Set B                         |   | 12 indici,                | 20020493               |
|   |   | 48 campioni               |                        |
| TruSeq RNA CD Indexes                                   |   | 96 indici,<br>96 campioni | 20019792               |
| IDT per Illumina-TruSeq RNA UD Indexes                  |   | 24 indici,                | 20020591               |
|   |   | 96 campioni               |                        |
| IDT per Illumina-TruSeq RNA UD Indexes                  |   | 96 indici,                | Disponibile a<br>breve |
|   |   | 96 campioni               |                        |

## Riepilogo

TruSeq Stranded mRNA e Total RNA offrono una panoramica chiara ed esaustiva del trascrittoma, fornendo una misurazione precisa di orientamento del filamento, copertura uniforme e scoperta a elevata confidenza di caratteristiche quali trascritti alternativi, fusioni geniche ed espressione specifica per l'allele. TruSeq Stranded Total RNA combina tutti i benefici della preparazione delle librerie TruSeq RNA con la chimica di riduzione ribosomiale Ribo-Zero, fornendo una soluzione robusta e notevolmente scalabile di preparazione di librerie pronte per il sequenziamento, per l'analisi dell'intero trascrittoma, compatibile con un'ampia gamma di campioni, inclusi quelli non umani e in FFPE.

## Bibliografia

1. Nagai K, Kohno K, Chiba M, et al. Differential expression profiles of sense and antisense transcripts between HCV-associated hepatocellular carcinoma and corresponding noncancerous liver tissue. *Int J Oncol.* 2012(40): 1813-20.
2. Benes V, Blake J, Doyle K. Ribo-Zero Gold Kit: Improved RNA-Seq results after removal of cytoplasmic and mitochondrial ribosomal RNA. *Nat Methods.* 2011(8):10.1038/nmeth.f.352.