

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

使用快速、灵活的解决方案对  
转录组进行灵敏而准确的分析

- 仅需 1 ng 高质量 RNA 或 10 ng 来自降解 FFPE 样本的 RNA 即可实现高灵敏度分析
- 在单管反应中去除人类、小鼠、大鼠和细菌中的 rRNA 和 珠蛋白 RNA
- 可在 7 小时内完成文库制备，而手动操作时间仅需 3 小时

**illumina**®

## 简介

利用新一代测序 (NGS) 开展 RNA 测序 (RNA-Seq) 是发现、分析和定量 RNA 转录本的一种强大方法。主要 RNA-Seq 方法的优势包括：

- 总 RNA-Seq 为全面分析转录组提供了一种无偏向性、无假设的方法。它能准确检测基因和转录本丰度，并能检测编码 RNA 和多种形式的非编码 RNA 中已知的和新的特征
- 信使 RNA (mRNA) -Seq 能灵敏而准确地定量基因表达，识别编码转录组中已知的和新的亚型，并测量等位基因特异性表达
- 靶向 RNA-Seq 可分析一组目标基因中的基因表达。靶向 RNA-Seq 利用转录组编码区域的序列特异性捕获进行富集，实现经济有效的 RNA 外显子分析

TruSeq™ Stranded Total RNA 为标准 and 低质量样本的全转录组分析提供了一种强大的解决方案。然而，相对较高的起始量要求、较长的总实验时间和手动操作时间，以及较低的应用灵活性限制了其在总 RNA-Seq 应用中的使用。为了克服这些挑战，因美纳开发了 Illumina Stranded Total RNA Prep (表 1)。这种先进的解决方案提供了基于连接的一体化快速文库制备方法，支持低样本起始量和多种 RNA-Seq 应用。

为了将研究重点放在高价值序列上，Illumina Stranded Total RNA Prep 包含了 Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit\*，其可在一次反应中有效去除多个物种的核糖体 RNA (rRNA)，包括人类、小鼠、大鼠和细菌 (图 1)。

\* 在宏转录组学研究中，Illumina Stranded Total RNA Prep 可与 Illumina Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit 结合使用，该试剂盒能够很好地去除复杂的微生物样本中丰富的 rRNA。

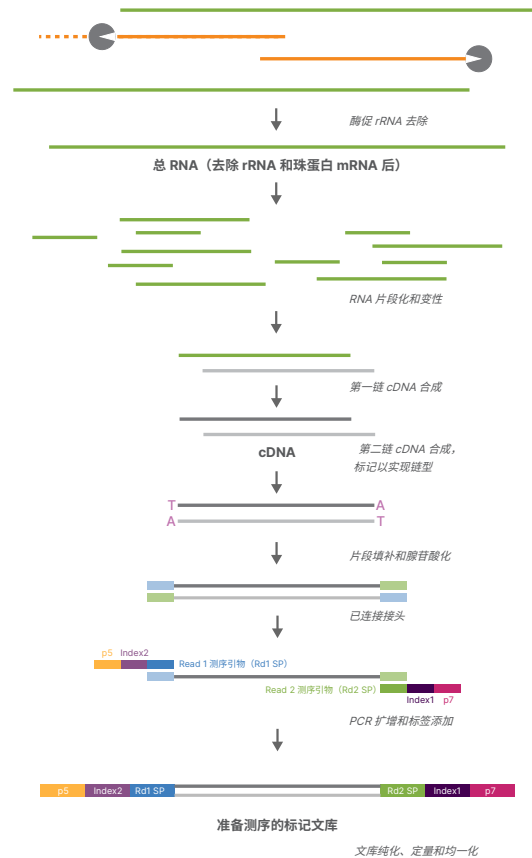


图 1: Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus——去除 rRNA 和大量珠蛋白 mRNA (橙色线) 并完成 cDNA 合成后，连接接头并添加唯一双标签序列，利用 PCR 扩增生成高质量文库，在测序前对文库进行定量和均一化。

## 使用 Ribo-Zero Plus 有效去除多个物种的核糖核酸

在进行 RNA-Seq 之前去除大量的 RNA (包括 rRNA 和珠蛋白 RNA)，使研究人员能够专注于分析转录组中高价值、信息丰富的部分，同时降低测序成本。Illumina Stranded Total RNA 包括 Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit，其可以去除 rRNA 和珠蛋白 RNA，有助于实现信息丰富的转录组分析。该单管酶促核糖核酸去除方法与低起始量 (1 ng) 兼容，可减少来自原核和真核生物的 rRNA (表 2)。

表 1: Illumina Stranded Total RNA 规格

特点	TruSeq Stranded Total RNA	Illumina Stranded Total RNA Prep
去除大量 RNA	人类、小鼠、大鼠的 rRNA 或珠蛋白 mRNA	人类、小鼠、大鼠、细菌的 rRNA 和珠蛋白 mRNA
UDI 最大数量	96	384
RNA 起始量	100-1000 ng	1-1000 ng RNA <sup>a</sup>
总实验时间	11.5 小时	7 小时
手动操作时间	5.5 小时	< 3 小时
与 FFPE 兼容	是	是
试剂盒组成	48 或 96 个样本	16 或 96 个样本

a. 1-1000 ng 高质量 RNA (RIN > 7), 10-1000 ng 降解的 RNA (RIN 2-7) 或 FFPE RNA (DV200 > 55)。为获得理想性能, 建议使用 10 ng 起始 RNA。

b. 缩写: UDI, 唯一双标签序列 (Unique Dual Indexes); RIN, RNA 完整性指数 (RNA Integrity Number)。

表 2: 可去除的目标 RNA 种类

样本	目标 rRNA
人细胞质 rRNA	28S、18S、5.8S、5S
人线粒体 rRNA	12S、16S
人 β 珠蛋白转录本	HBA1、HBA2、HBB、HBG1、HBG2
小鼠和大鼠 rRNA	16S、28S
革兰氏阴性细菌 rRNA	大肠埃希菌 5S、16S、23S
革兰氏阳性细菌 rRNA	枯草芽孢杆菌 5S、16S、23S

借助与 DNA 探针的靶向杂交和随后 RNase H 介导的裂解, 可从总 RNA 中去除大量 rRNA 和珠蛋白 RNA (图 2, 表 3)。随后将已经去除核糖核酸的样本用于文库制备。为了评估 Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus 的 rRNA 去除和文库制备性能, 在不同的 RNA 起始量下进行了测试。Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus 具有出色性能, 尤其是在低起始量下 (图 3, 表 4)。

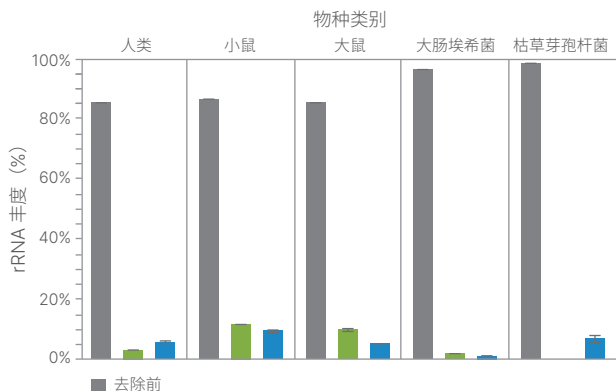


图 2: 使用 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 去除多个物种的核糖核酸——Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 可在单管反应中有效降低人类、小鼠、大鼠和细菌的 rRNA 浓度。将结果与 TruSeq Stranded Total RNA 配合 Ribo-Zero Gold (哺乳动物种属) 和 RiboZero Bacteria (大肠埃希菌) 的结果进行比较 (枯草芽孢杆菌数据未显示)。

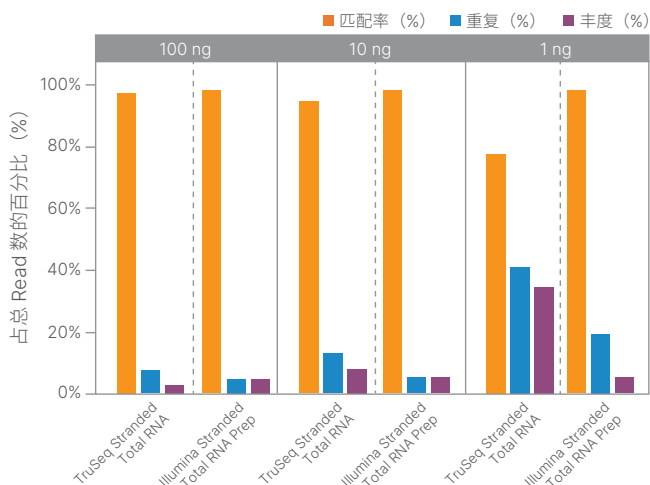


图 3: 文库制备性能比较——将 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 与 TruSeq Stranded Total RNA with RiboZero 进行比较。Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 更高效, 比对 read 增加, 重复和 rRNA 丰度降低, 尤其是在使用 10 ng 和 1 ng 低起始量总 UHR RNA 的情况下。在 NextSeq 550 基因测序仪上对文库进行测序, 将样本数据量调整到 30M reads。通过取 4M reads 来计算重复比例, 并使用 BaseSpace™ RNA-Seq Alignment App v2.0 进行分析。

表 3: 使用 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 去除人外周血白细胞中的珠蛋白 mRNA

基因	100 ng 总 RNA 起始量			10 ng 总 RNA 起始量		
	去除前	去除后	去除率 (%)	去除前	去除后	去除率 (%)
<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%

表 4: Illumina Stranded Total RNA Prep with RiboZero Plus 的性能参数<sup>a</sup>

	100 ng 总 RNA 起始量		10 ng 总 RNA 起始量		1 ng 总 RNA 起始量	
	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
链型 (%)	99	99	99	99	99	99
覆盖度变异系数 (CV) 中位数	0.44	0.46	0.48	0.47	0.52	0.51
重复 (%)	7.5	4.5	12.8	5.3	40.9	19.2
匹配率 (%)	96.9	96.9	94.2	97.5	76.6	97.5
丰度 (%)	3.0	4.9	8	5.2	35.8	5.0

a. 使用 BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 进行数据分析。

b. 在将样本数据量调整到 4M 双端 reads (通过过滤, passing filter, PF) 之后, 报告重复率。

## 高质量数据

### 覆盖均一性

Illumina Stranded Total RNA Prep 使用高质量和降解的通用人类参考 (Universal Human Reference, UHR) RNA (图 4A) 作为起始材料以及使用低起始量 FFPE RNA (图 4B) 生成的测序文库, 可实现高度均一的转录本覆盖度。

### 基因检测效率

为了比较 Illumina Stranded Total RNA Prep 与 TruSeq Stranded Total RNA 在基因检测应用中的性能, 在 30M 双端 read 下对不同起始量的 UHR RNA 进行测序, 并评估了覆盖度为 1x 和 10x 的基因数量。结果表明, Illumina Stranded Total RNA Prep 在仅 1 ng 总 RNA 的低起始量下能够检测到更多基因 (图 5)。

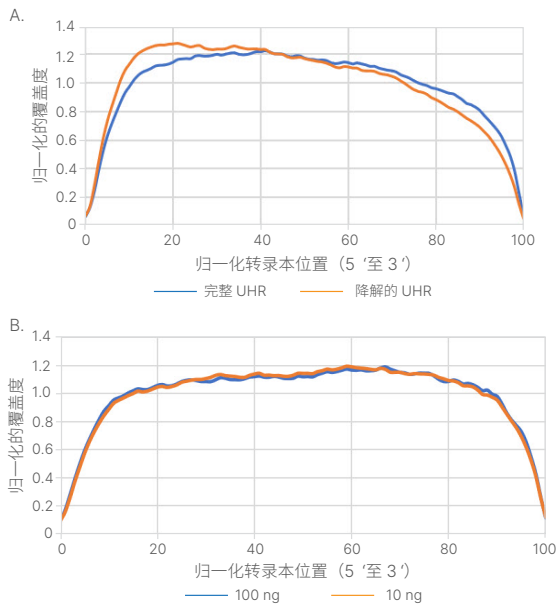


图 4：高覆盖度均匀性——Illumina Stranded Total RNA Prep 为 (A) 高质量和合成降解的 UHR RNA (RIN = 2) 以及 (B) 起始量为 100 ng 和 10 ng 的 FFPE RNA 提供了高覆盖度均匀性。FFPE 样本的 DV200 质量分值为 55%。所有文库都在 NovaSeq 6000 基因测序仪上以 50 M reads 进行测序。使用 BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 进行数据分析。

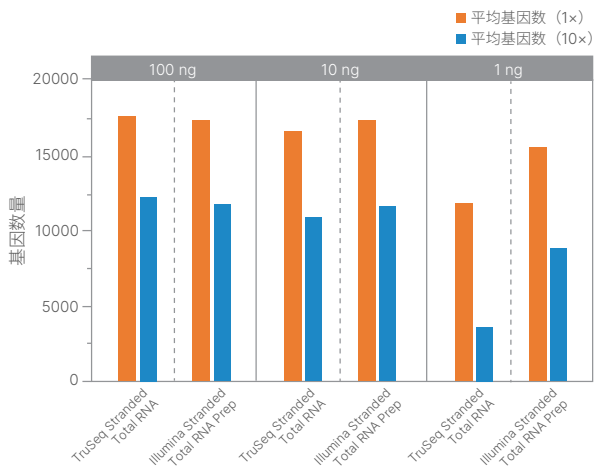


图 5：低起始量下可检测到更多基因——将样本数据量调整到 30M PF 双端 reads 时检测到的基因数显示，与 TruSeq Stranded Total RNA 相比，Illumina Stranded Total RNA Prep 可在低 RNA 起始量下检测到更多基因。使用 Illumina Stranded Total RNA Prep 在 1x 覆盖度下检测到更多基因，这是其具有更高灵敏度的一个指标。

## 出色的数据一致性

Illumina Stranded Total RNA Prep 可生成高质量数据，在不同的 UHR RNA 起始量之间 (图 6A) 以及来自 FFPE 样本的 RNA 的低起始量技术平行分析之间具有很高的 consistency (图 6B)。这些结果表明，Illumina Stranded Total RNA Prep 是起始材料有限的降解样本的理想解决方案。此外，无论在相同的起始量下 (图 7A)，还是在更低的起始量下 (图 7B)，Illumina Stranded Total RNA Prep 都表现出与 TruSeq Stranded Total RNA 的高数据一致性。

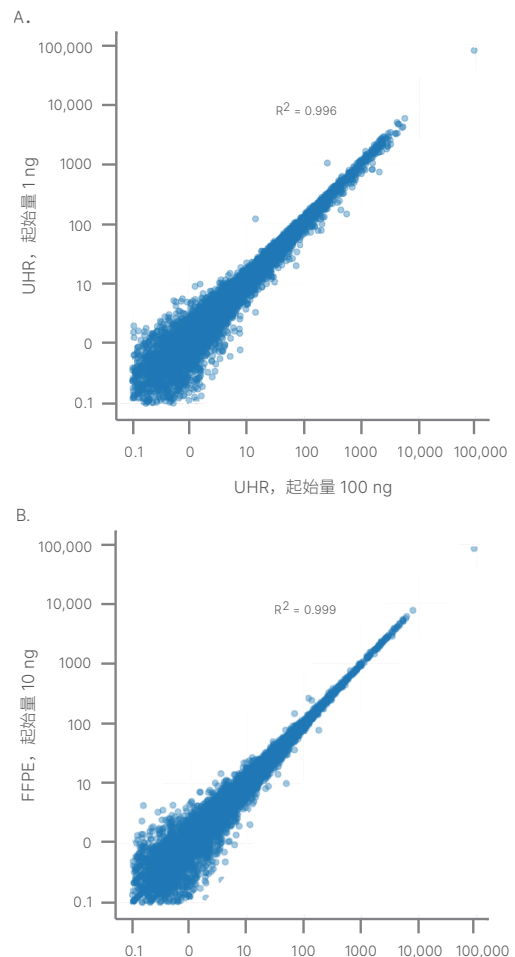


图 6：高数据一致性——Illumina Stranded Total RNA Prep 在 (A) 1 ng 和 100 ng UHR RNA 的起始量和 (B) 10 ng FFPE RNA 的技术平行分析之间实现了高数据一致性。文库在 NovaSeq 6000 基因测序仪上以  $2 \times 74$  bp 读长进行测序。使用 BaseSpace RNA-Seq Alignment App v2.0.1 进行数据分析。

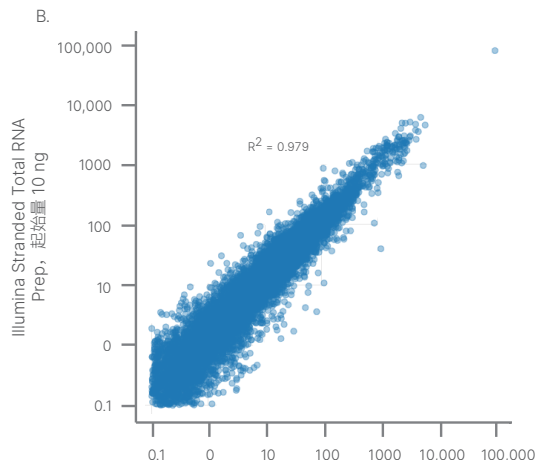
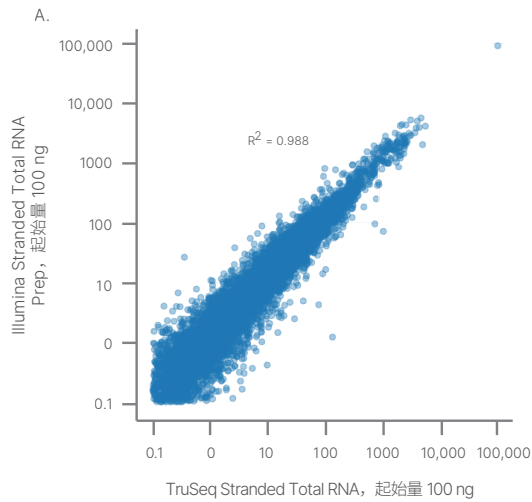


图 7：与传统试剂盒的表现高度一致——（A）在相同起始量和（B）更低起始量下，Illumina Stranded Total RNA Prep 产生的数据与 TruSeq Stranded Total RNA 高度一致。

## 简化的文库制备工作流程

Illumina Stranded Total RNA Prep 使用快速灵活的工作流程，进行基于连接的 RNA 文库制备（图 1）。工作流程的创新包括更短的孵育时间和更少的样本纯化步骤，总实验时间比 TruSeq Stranded Total RNA 缩短 40% 以上（图 8）。

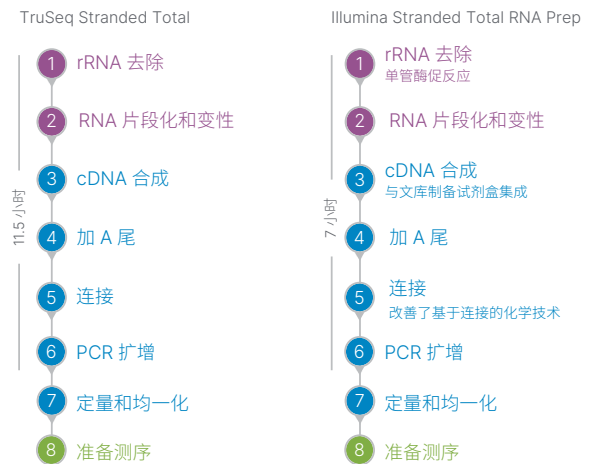


图 8：Illumina Stranded Total RNA Prep with RiboZero Plus 工作流程——Illumina Stranded Total RNA Prep 提供了快速的工作流程，且手动操作时间短。时间长短因使用的设备、处理的样本数量、自动化程序或用户体验而异。

## 利用唯一双标签序列提高通量

通过将 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 和高通量仪器（例如 NextSeq™ 550 和 NovaSeq™ 6000 基因测序仪）结合使用，实验室在每次运行中可以对更多样本进行测序，且不会牺牲数据质量。为了进一步提高样本通量，Illumina Stranded Total RNA Prep 支持使用 384 个唯一双标签序列（UDI）进行多重分析。除了消除标签错配的影响（或标签跳跃）之外，UDI 还支持在单个 NovaSeq 6000 S4 流动槽中上样多达 384 个样本，从而大幅提高通量，降低测序成本。

## 总结

Illumina Stranded Total RNA Prep 提供了简化的 RNA-Seq 解决方案，可获得全转录组的清晰、全面分析。此解决方案还可灵活地支持多种起始类型和起始量（最低只需 1 ng 高质量 RNA）。此产品与 Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit 兼容，后者能够高效去除多种物种（包括人、小鼠、大鼠和细菌）的干扰 rRNA。Illumina Stranded Total RNA Prep 能够准确测量链方向，实现均匀覆盖，并发现高度可信的可变剪接体、基因融合和等位基因特异性表达等特征。

## 了解更多

[Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus](#) 或 [Ribo-Zero Plus Microbiome](#)

## 订购信息

产品	货号
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 个样本)	20040525
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 个样本)	20040529
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 个样本)	20072063
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 个标签, 96 个样本)	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 个标签, 96 个样本)	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 个标签, 96 个样本)	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 个标签, 96 个样本)	20091661

## Illumina 中国

上海办公室 • 电话 (021) 6032-1066 • 传真 (021) 6090-6279  
 北京办公室 • 电话 (010) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855  
 技术支持热线 400-066-5835 • [chinasupport@illumina.com](mailto:chinasupport@illumina.com)  
 市场销售热线 400-066-5875 • [china\\_info@illumina.com](mailto:china_info@illumina.com) • [www.illumina.com.cn](http://www.illumina.com.cn)

© 2023 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。  
 关于具体的商标信息，请访问 [www.illumina.com.cn/company/legal.html](http://www.illumina.com.cn/company/legal.html)。  
 M-GL-02148 v1.0



因美纳 因美纳讲堂

**illumina**<sup>®</sup>