

illumina miRNA Prep

Generazione rapida e affidabile di librerie di sequenziamento di miRNA ed RNA di piccole dimensioni



Consente di risparmiare tempo e riduce la perdita di campioni eliminando la necessità di purificazione con gel



Migliora il rilevamento in campioni di RNA a basso input impedendo la formazione di dimeri adattatori



Ottimizza l'accuratezza della quantificazione riducendo le distorsioni e le interferenze di fondo

Introduzione

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificanti che regolano l'espressione genica inibendo la traduzione dell'mRNA o mirando alla sua degradazione.¹ Svolgono un ruolo fondamentale nei processi cellulari e nello sviluppo, il che li rende uno dei cardini fondamentali della ricerca per comprendere i meccanismi della malattia e sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) consente una profilazione precisa e a elevata processività dell'espressione dei miRNA, permettendo ai ricercatori di identificare nuovi miRNA, quantificarne i livelli di espressione e scoprire i loro ruoli nella regolazione genica.^{2,3} La breve lunghezza dei miRNA li rende suscettibili a distorsioni introdotte durante l'isolamento e la preparazione delle librerie che possono influire sull'accuratezza della quantificazione. La disponibilità limitata di RNA di input può anche aumentare il rischio di artefatti di sequenziamento e ridurre la sensibilità per i miRNA a bassa abbondanza.^{4,5}

Illumina miRNA Prep fornisce una soluzione semplice ed economica per generare librerie di sequenziamento di miRNA ed RNA di piccole dimensioni direttamente da RNA totale o miRNA isolato praticamente per qualsiasi specie. Illumina miRNA Prep utilizza una chimica ottimizzata che impedisce i dimeri degli adattatori, riduce al minimo le distorsioni e migliora la quantificazione di campioni di miRNA anche limitati.

Informazioni su Illumina miRNA Prep

Il flusso di lavoro ottimizzato di Illumina miRNA Prep inizia con RNA totale purificato o miRNA isolato da cui vengono preparate le librerie di miRNA, seguito da sequenziamento e analisi dei dati (Figura 1).

Le fasi ottimizzate di ligazione, amplificazione e pulizia degli adattatori consentono ai ricercatori di passare dall'RNA totale purificato o miRNA isolato alle librerie di miRNA pronte per il sequenziamento in meno di un giorno (Tabella 1). I vantaggi principali di Illumina miRNA Prep includono:

- **Ligazione ottimizzata degli adattatori.** Garantisce la cattura selettiva di miRNA maturi durante la preparazione delle librerie utilizzando adattatori da 3' e 5' appositamente progettati.
- **Purificazione semplificata basata su microsfere.** Riduce gli interventi manuali e la complessità del flusso di lavoro eliminando la noiosa selezione delle dimensioni a base di gel.
- **Prevenzione mirata dei dimeri degli adattatori.** Preserva le letture di sequenziamento per le molecole di vero miRNA utilizzando oligonucleotidi modificati che riducono la formazione di dimeri degli adattatori.



- **Incorporazione precisa di identificatori molecolari univoci (UMI, Unique Molecular Identifier) durante la trascrizione inversa.** Consente la quantificazione accurata mediante la marcatura di ogni molecola di miRNA originale per distinguere le molecole univoche dai duplicati della PCR.
- **Migliore riduzione della distorsione nell'amplificazione della PCR.** Migliora la sensibilità di rilevamento e garantisce una quantificazione affidabile dei miRNA a bassa abbondanza con input di RNA minimo grazie a una chimica ottimizzata che promuove l'amplificazione uniforme della PCR.

Isolamento ottimizzato dei miRNA

A differenza della maggior parte degli RNA cellulari, i miRNA maturi hanno sia un gruppo idrossilico da 3' che un gruppo fosfato da 5'. Queste caratteristiche facilitano la ligazione di adattatori univoci che consentono l'amplificazione di miRNA maturi riducendo al minimo l'amplificazione di altri tipi di RNA (Figura 2).

Tabella 1: specifiche di Illumina miRNA Prep

Parametro	Illumina miRNA Prep	TruSeq Small RNA
Tipo di input	RNA totale da cellule, tessuto FFPE, siero/plasma o tessuto fresco congelato da praticamente qualsiasi specie	Ottimizzato utilizzando RNA totale UHR di alta qualità ^a
Input richiesto	1-500 ng ^b	1.000 ng
N. di indici disponibili	384 UDI	48 indici singoli
Sistemi di sequenziamento supportati	Illumina NextSeq, NovaSeq e MiSeq System ^{c,d}	Illumina MiSeq, NextSeq 500/550 System ^e
Durata del flusso di lavoro ^f	3 ore di interventi manuali, 7 ore totali	Circa 4-5 ore di interventi manuali, circa 11 ore in totale o circa 1 giorno in totale con eluizione notturna

- L'utilizzo di RNA di altre specie, altri tessuti o altre qualità potrebbe richiedere un'ulteriore ottimizzazione.
- Per ottenere i migliori risultati, si raccomandano quantità più elevate di RNA totale, specialmente per i campioni di miRNA a bassa abbondanza.
- Include NextSeq 500, NextSeq 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000, NovaSeq 6000, NovaSeq X, NovaSeq X Plus, MiSeq e MiSeq i100 System.
- Utilizzando 384 indici doppi univoci.
- Limitato dal numero di set di indici disponibili.
- A partire dall'RNA totale isolato fino alla pulizia delle librerie.

FFPE (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded), fissato in formalina e incluso in paraffina; UHR (Universal Human Reference), riferimento umano universale; UDI (Unique Dual Index), indici doppi univoci.

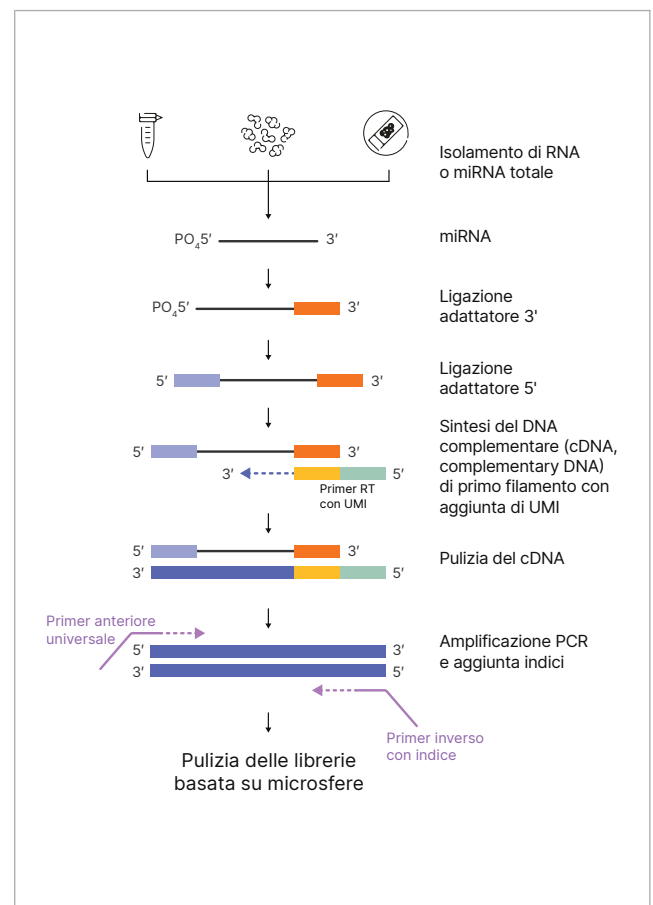


Figura 2: chimica Illumina miRNA Prep

Gli adattatori sono legati alle estremità 5' e 3' di ciascun miRNA per garantire l'amplificazione preferenziale. Gli identificatori molecolari univoci (UMI) sono integrati durante la fase di trascrizione inversa (RT, Reverse Transcription), consentendo la quantificazione digitale e la correzione della distorsione dell'amplificazione. Una rapida pulizia basata su microsfere sostituisce la purificazione del gel, riducendo il flusso di lavoro a sole sette ore.

Pulizia a base di microsfere senza gel

La purificazione a base di gel delle librerie amplificate richiede molto lavoro ed elettroforesi, escissione di bande ed eluizione pur non riuscendo spesso a rimuovere tutti i dimeri di adattatori e l'RNA contaminante. Illumina miRNA Prep elimina questi passaggi con un flusso di lavoro privo di gel e basato su microsfere (Figura 3) che migliora l'isolamento specifico dei miRNA riducendo al minimo i dimeri degli adattatori e i tipi di RNA indesiderati.

Quantificazione imparziale

Illumina miRNA Prep migliora la quantificazione dei miRNA utilizzando gli UMI per contare le singole molecole (Figura 2). I metodi tradizionali di preparazione delle librerie spesso introducono distorsioni durante l'amplificazione, con conseguente sovrarappresentazione di alcuni miRNA e distorsione dei livelli di espressione. Poiché gli UMI sono incorporati in una fase iniziale, ogni molecola di miRNA viene conteggiata una sola volta, distinguendo i segnali biologici reali da artefatti come i dimeri di adattatori (Figura 4).

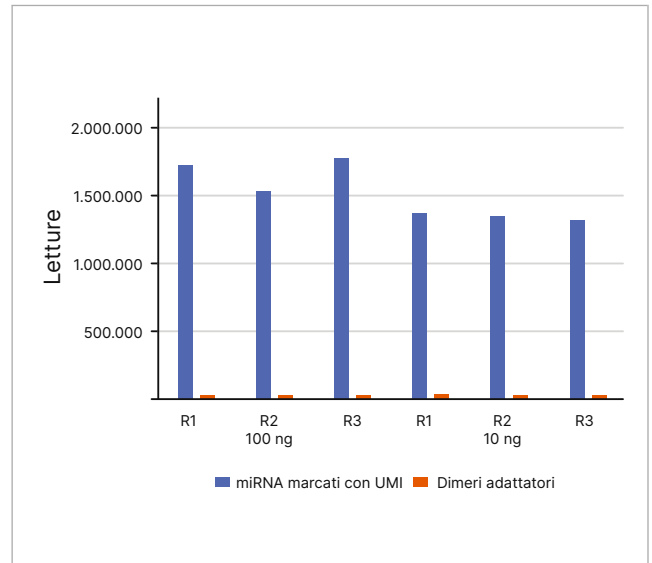


Figura 4: quantificazione imparziale dei miRNA utilizzando UMI

Incorporando identificatori molecolari univoci (UMI) nelle prime fasi del flusso di lavoro, la maggior parte delle letture di sequenziamento viene mappata su miRNA univoci, riducendo al minimo le distorsioni dovute ai dimeri degli adattatori.



Figura 3: confronto tra i flussi di lavoro di miRNA Prep e di TruSeq Small RNA di Illumina

Eliminando l'elettroforesi su gel e la purificazione, Illumina miRNA Prep offre un flusso di lavoro più rapido con tempi di intervento manuale ridotti rispetto a TruSeq Small RNA. Le tempistiche possono variare in base all'apparecchiatura utilizzata, al numero di campioni analizzati, alle procedure di automazione e all'esperienza dell'utente.

Sensibilità massimizzata

I miRNA sono emersi come biomarcatori per malattie come il cancro e i disturbi neurodegenerativi.⁶⁻⁸ Gli esosomi, piccole vescicole extracellulari secrete dalle cellule, trasportano anche i miRNA e li proteggono dalla degradazione, aumentando la stabilità.⁹ Inoltre, i miRNA sono ben conservati in tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) a causa delle loro piccole dimensioni, consentendo studi retrospettivi su campioni archiviati.¹⁰

Poiché i miRNA nei biofluidi e nei campioni FFPE sono spesso presenti in abbondanza bassa, per un rilevamento accurato sono necessari metodi altamente sensibili di preparazione delle librerie. Illumina miRNA Prep risolve tale complessità consentendo la profilazione dei miRNA da appena 1 ng di RNA totale. Questa funzionalità è vantaggiosa per gli studi che utilizzano biofluidi come il siero (Figura 5).

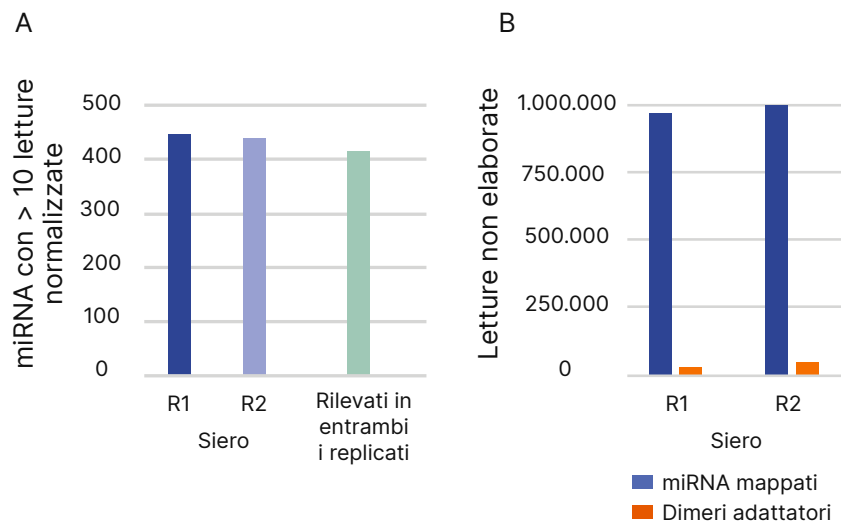


Figura 5: robusto rilevamento dei miRNA nei campioni di siero

Illumina miRNA Prep fornisce un rilevamento dei miRNA solido e riproducibile in biofluidi come il siero. (A) Rilevamento di miRNA da campioni di siero replicati (R1 e R2). (B) Letture di miRNA mappati rispetto ai dimeri degli adattatori da campioni di siero replicati.

Analisi dei miRNA semplificata

Illumina offre potenti soluzioni software per l'analisi dei dati di sequenziamento dei miRNA, semplificando l'identificazione e la quantificazione dei miRNA. BaseSpace Sequence Hub e Illumina Connected Analytics (ICA) forniscono l'analisi secondaria dei dati di Illumina miRNA Prep, inclusi allineamento, mappatura e quantificazione delle letture. I file di output risultanti possono quindi essere utilizzati per analisi terziarie come l'espressione differenziale. Questi strumenti aiutano i ricercatori a elaborare in modo efficiente i dati dei miRNA, supportando la scoperta dei biomarcatori e gli studi sull'espressione con un'analisi affidabile e di facile utilizzo.

Riepilogo

Illumina miRNA Prep fornisce un flusso di lavoro rapido e senza gel per la preparazione delle librerie di sequenziamento dei miRNA, integrando la ligazione degli adattatori e la marcatura UMI per massimizzare l'accuratezza. Il flusso di lavoro di facile utilizzo supporta diversi tipi di campioni, dai biofluidi al tessuto FFPE, e consente la profilazione dei miRNA a elevata processività con interventi manuali minimi. La chimica ottimizzata assicura l'amplificazione preferenziale dei miRNA eliminando i dimeri degli adattatori e l'RNA contaminante, con conseguente pulizia delle librerie e quantificazione più accurata. Ottimizzando l'efficienza del flusso di lavoro e riducendo al minimo gli artefatti per una maggiore affidabilità, Illumina miRNA Prep migliora l'accuratezza e l'impatto della ricerca sui miRNA.

Maggiori informazioni →

[Illumina miRNA Prep](#)

[BaseSpace Sequence Hub](#)

[Introduzione al sequenziamento dell'RNA](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina miRNA Prep (96 samples)	20145030
Illumina miRNA UD Indexes Set A (96 indexes, 96 samples)	20145031
Illumina miRNA UD Indexes Set B (96 indexes, 96 samples)	20145032
Illumina miRNA UD Indexes Set C (96 indexes, 96 samples)	20145033

Bibliografia

- Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. [microRNAs in action: biogenesis, function and regulation](#). *Nat Rev Genet*. 2023;24(12):816-833. doi:10.1038/s41576-023-00611-y
- Tam S, Borja R de, Tsao MS, McPherson JD. [Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies](#). *Lab Invest*. 2014;94(3):350-358. doi:10.1038/labinvest.2013.157
- Dantas AG, Nunes BC, Nunes N, et al. [Next-generation sequencing profiling of miRNAs in individuals with 22q11.2 deletion syndrome revealed altered expression of miR-185-5p](#). *Hum Genomics*. 2024;18(1):64. doi:10.1186/s40246-024-00625-5
- Benesova S, Kubista M, Valihrach L. [Small RNA-sequencing: approaches and considerations for miRNA analysis](#). *Diagnostics*. 2021;11(6):964. doi:10.3390/diagnostics11060964
- Coenen-Stass AML, Magen I, Brooks T, et al. [Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing](#). *RNA Biol*. 2018;15(8):1133-1145. doi:10.1080/15476286.2018.1514236
- Sundarbose K, Kartha RV, Subramanian S. [MicroRNAs as biomarkers in cancer](#). *Diagnostics*. 2013;3(1):84-104. doi:10.3390/diagnostics3010084
- Azam HMH, Rößling RI, Geithe C, et al. [MicroRNA biomarkers as next-generation diagnostic tools for neurodegenerative diseases: a comprehensive review](#). *Front Mol Neurosci*. 2024;17. doi:10.3389/fnmol.2024.1386735
- Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sülthmann H. [Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer](#). *Mol Cancer*. 2010;9(1):306. doi:10.1186/1476-4598-9-306
- Li C, Zhou T, Chen J, et al. [The role of exosomal miRNAs in cancer](#). *J Transl Med*. 2022;20(1):6. doi:10.1186/s12967-021-03215-4
- Kakimoto Y, Kamiguchi H, Ochiai E, Satoh F, Osawa M. [MicroRNA stability in postmortem FFPE tissues: quantitative analysis using autoptic samples from acute myocardial infarction patients](#). *PLoS One*. 2015;10(6):e0129338. doi:10.1371/journal.pone.0129338



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-03399 ITA v1.0