

Soluzione di sequenziamento dell'RNA NextSeq™ 1000 e NextSeq 2000

Flusso di lavoro integrato ed
efficace in termini di costi per
l'analisi dell'espressione genica
e del trascrittoma

- Innovativo portafoglio per la preparazione delle librerie per le analisi sull'intero trascrittoma con flessibilità di campionamento e input
- Processività di sequenziamento scalabile per supportare un'ampia gamma di applicazioni RNA-Seq
- Analisi secondaria DRAGEN integrata per un'efficienza ottimale del flusso di lavoro

illumina®

Introduzione

La soluzione di sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) NextSeq 1000 e NextSeq 2000 offre una visualizzazione chiara e completa del trascrittoma, rendendolo più accessibile che mai. La soluzione utilizza la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) di Illumina, la chimica XLEAP-SBS™ ottimizzata per il sequenziamento mediante sintesi (SBS, sequencing by synthesis), un ampio portafoglio di soluzioni per la preparazione delle librerie e strumenti di analisi dei dati per fornire flussi di lavoro ottimizzati ed efficienti (Figura 1). La flessibilità e la scalabilità del NextSeq 1000 Sequencing System e del NextSeq 2000 Sequencing System (Figura 2) consentono agli utenti di elaborare vari volumi di campioni in modo efficiente, garantendo l'equilibrio ottimale tra il budget di letture e la processività del campione. La soluzione RNA-Seq NextSeq 1000 e NextSeq 2000 supporta una gamma di applicazioni di RNA, dal profilo dell'espressione genica di base alle analisi complesse dell'intero trascrittoma.

Vantaggi dell'RNA-Seq

È emerso rapidamente che l'RNA-Seq è l'approccio fondamentale alla mappatura del trascrittoma ad alta processività.^{1,2} L'RNA-Seq fornisce un'istantanea dettagliata del trascrittoma in un determinato momento e offre numerosi vantaggi rispetto alla PCR quantitativa, tra cui:

- Progettazione sperimentale priva di ipotesi, che non richiede alcuna conoscenza precedente del trascrittoma
- Possibilità di scoperta per individuare trascritti noti e nuovi
- Elevata processività per quantificare da centinaia a migliaia di regioni in ogni saggio
- Ampia gamma dinamica per avere una misurazione più accurata dell'espressione genica
- Maggiore quantità di dati per saggio, con informazioni complete sulla sequenza e sulle varianti



Figura 2: NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sfruttano la chimica XLEAP-SBS e integrano l'analisi secondaria per semplificare i flussi di lavoro di sequenziamento.



Figura 1: flusso di lavoro per l'RNA-Seq con NextSeq 1000 e NextSeq 2000. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System fanno parte di un flusso di lavoro NGS semplice e integrato che fornisce dati di sequenziamento dell'RNA altamente accurati. Le durate variano in base all'esperimento e al tipo di saggio.

Flusso di lavoro NGS integrato

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System supportano un ampio portafoglio di soluzioni per la preparazione delle librerie, soddisfacendo un'ampia gamma di esigenze dello studio del trascrittoma. I ricercatori possono scegliere tra diversi kit di preparazione delle librerie; ciò consente di trovare quello che meglio si adatta alle loro esigenze sperimentali e aiuta a superare le comuni difficoltà come l'RNA iniziale di scarsa qualità o la disponibilità limitata dei campioni.

Preparazione avanzata delle librerie di RNA Illumina

Grazie a un'esperienza consolidata nell'RNA-Seq, Illumina offre soluzioni affidabili e comprovate per la preparazione delle librerie di RNA. I progressi del portafoglio Illumina relativo ai kit di preparazione delle librerie di RNA forniscono i dati di alta qualità richiesti dai ricercatori con un flusso di lavoro ottimizzato che può essere completato in un unico turno di lavoro standard. Illumina offre tre kit di preparazione delle librerie di RNA (Tabella 1):

- **Illumina Stranded Total RNA Prep** consente l'analisi dell'intero trascrittoma utilizzando Ribo-Zero™ Plus, acquisendo RNA codificante e più forme di RNA non codificante per ottenere un quadro completo della biologia. Illumina Stranded Total RNA Prep offre anche solide prestazioni quando si lavora con campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) di bassa qualità.
- **Illumina Stranded mRNA Prep** fornisce un'opzione economica per l'analisi dedicata all'RNA codificante. Illumina Stranded mRNA Prep funziona con qualsiasi RNA eucariotico da campioni di alta qualità.*
- **Illumina RNA Prep with Enrichment** porta la tecnologia del trasposone legato a microsfere (BLT, bead-linked transposome) nell'RNA-Seq e fornisce un flusso di lavoro di arricchimento rapido dell'RNA in un solo giorno con interventi manuali minimi (meno di 2 ore). Quando sequenziati sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System, i dati dell'RNA "nonstranded" risultanti forniscono informazioni preziose su un ampio numero di posizioni del genoma.

* Numero di integrità dell'RNA (RIN, RNA integrity number) maggiore di otto. Per campioni di qualità inferiore o FFPE, utilizzare Illumina RNA Prep with Enrichment o Illumina Stranded Total RNA Prep.

Tabella 1: kit per la preparazione delle librerie di RNA Illumina

	Illumina Stranded Total RNA Prep	Illumina Stranded mRNA Prep	Illumina RNA Prep with Enrichment
Metodo	Ligazione con Ribo-Zero Plus ^a	Ligazione	(L) Tagmentazione
Rilevamento	Trascrittoma codificante e non codificante	Trascrittoma codificante con tailing poli-A	Regioni codificanti target ^b
Compatibilità FFPE	Sì	No	Sì
Input	1-1.000 ng ^c	25-1.000 ng	10 ng non FFPE 20 ng FFPE
Durata totale del saggio ^d	7 ore	<7 ore	<9 ore
Interventi manuali ^d	<3 ore	<3 ore	<2 ore
Facile automazione	Sì	Sì	Sì

a. Ribo-Zero Plus incluso rimuove l'RNA abbondante di più specie, inclusi campioni umani, di topo, di ratto, batteri ed epidemiologia.

b. Solo per campioni umani. Testate con Illumina Exome Panel e Respiratory Oligos Panel v2. Illumina RNA Prep with Enrichment non fornisce informazioni sui filamenti.

c. Input minimo per RNA di alta qualità mostrato. Si raccomanda un minimo di 10 ng per una qualità ottimale e FFPE per Illumina Stranded Total RNA Prep.

d. Durata degli interventi manuali e totale basata sull'elaborazione manuale di un massimo di 24 campioni per i flussi di lavoro Illumina Stranded Total RNA e mRNA e 1 campione per il flusso di lavoro di arricchimento.

Per gli utenti di BaseSpace™ Clarity LIMS, i protocolli preimpostati per Illumina Stranded mRNA Prep, Illumina Stranded Total RNA Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment sono disponibili per l'uso con il NextSeq 1000 System e il NextSeq 2000 System.

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offrono flessibilità e scalabilità per soddisfare una gamma completa di esigenze di analisi del trascrittoma. Quattro tipi di celle a flusso disponibili consentono ai ricercatori di selezionare l'equilibrio ottimale tra il numero di campioni e le letture per campione (Tabella 2). Ad esempio, il profilo dell'espressione genica (la misurazione dell'abbondanza a livello di gene tra caratteristiche note) può essere eseguito in modo efficiente a una capacità di processività elevata con un massimo di 170 campioni* in una singola corsa. L'analisi dell'intero trascrittoma consente di scoprire nuove caratteristiche interrogando l'RNA codificante e non codificante fino a un massimo di 34 campioni per corsa; i ricercatori possono anche analizzare l'RNA codificante fino a un massimo di 68 campioni per corsa (Tabella 2, Tabella 3). Illumina raccomanda di consultare la letteratura principale per il campo e l'organismo di applicazione al fine di consultare le linee guida più aggiornate sulla progettazione dell'esperimento e sulla profondità di sequenziamento.

† La mappatura dell'espressione presuppone 10 milioni di letture per campione.

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offrono flessibilità di utilizzo di applicazioni diverse, consentendo ai ricercatori di passare facilmente da un progetto di sequenziamento all'altro. I sistemi sono compatibili con un'ampia gamma di kit di preparazione delle librerie di Illumina e di terze parti, consentendo un facile passaggio tra RNA-Seq in massa, RNA-Seq a singola cellula, sequenziamento dell'intero trascrittoma, sequenziamento dell'esoma e altre applicazioni. Ad esempio, i ricercatori possono associare l'RNA-Seq al sequenziamento dell'esoma su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System per valutare se le varianti codificanti influiscono sull'espressione del trascritto o possono eseguire l'ATAC-Seq‡ per analizzare l'accessibilità della cromatina e caratterizzare meglio la regolazione funzionale.

Maggiori informazioni grazie alla chimica XLEAP-SBS

Con NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System, i ricercatori possono arricchire i loro studi con una maggiore profondità di lettura, ottenendo stime di variazione più accurate e un'elevata sensibilità nel rilevamento di geni, trascritti ed espressione differenziale. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sono basati sulla chimica XLEAP-SBS che è, ad oggi, la chimica SBS di Illumina più veloce e più efficace in grado di fornire la massima qualità.

‡ ATAC-Seq, saggio per la cromatina accessibile alla trasposasi con sequenziamento.

Tabella 2: soluzioni Illumina RNA-Seq e processività dei campioni per cella a flusso

Metodo	Misura	Coppie di letture tipiche per campione ^a	Preparazione delle librerie	N. di campioni per cella a flusso per corsa						
				NextSeq 1000 e NextSeq 2000				NovaSeq X Series ^d		
				P1	P2	P3 ^c	P4 ^c	1.5B	10B	25B
Quantificazione dell'espressione genica	Abbondanza a livello genico tra le caratteristiche note	10 milioni	Illumina Stranded mRNA Prep ^b	10	40	120	170	150	Circa 1.000 ^e	Circa 2.500 ^e
Sequenziamento dell'mRNA	Abbondanza e scoperta di RNA codificante	25 milioni	Illumina RNA Prep with Enrichment	4	16	48	68	Circa 60	Circa 400 ^e	Circa 1.000 ^e
RNA-Seq totale	Abbondanza e scoperta dell'RNA codificante e non codificante	50 milioni	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus	2	8	24	34	Circa 30	Circa 200	Circa 520 ^e

a. Le lunghezze di lettura raccomandate sono 2 × 75 bp per Illumina Stranded Total RNA Prep e Illumina Stranded mRNA Prep e 2 × 100 bp per Illumina RNA Prep with Enrichment.
 b. Illumina Stranded mRNA Prep non è compatibile con i campioni FFPE. Per campioni di bassa qualità o FFPE, si consiglia Illumina RNA Prep with Enrichment o Illumina Stranded Total RNA Prep.
 c. I reagenti P3 e P4 sono disponibili solo per il NextSeq 2000 System.
 d. Il NovaSeq X Plus System può gestire corse a singola cella a flusso o a doppia cella a flusso. Il NovaSeq X System può gestire corse a singola cella a flusso.
 e. È disponibile un massimo di 384 doppi indici unici. Per la NovaSeq X Series, il caricamento indipendente delle corsie consente il multiplex di più campioni.

Tabella 3: parametri delle prestazioni di NextSeq 1000 e NextSeq 2000 per RNA-Seq

Cella a flusso	Lecture single-end ^a	Lunghezza lettura	Output ^a	Durata della corsa ^b	Qualità dei dati ^c	Input richiesto
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagents ^d	100 milioni	2 × 150 bp	30 Gb	17 ore		
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagents ^d	400 milioni	2 × 100 bp	80 Gb	19 ore	≥85% di basi al di sopra di Q30	10 ng-1 µg con Illumina RNA Prep
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagents ^{d,e}	1,2 miliardi	2 × 100 bp	240 Gb	31 ore		
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagents ^e	1,7 miliardi	2 × 100 bp	330 Gb	34 ore		

- a. Le specifiche per gli output si basano su una singola cella a flusso utilizzando la libreria del campione di controllo PhiX Illumina a densità cluster supportate.
- b. La durata della corsa include la generazione di cluster, il sequenziamento e l'identificazione delle basi sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System.
- c. I punteggi qualitativi si basano su una libreria di campioni di controllo PhiX Illumina. Le prestazioni possono variare in base al tipo e alla qualità della libreria, alla dimensione dell'inserzione, alla concentrazione di caricamento e ad altri fattori sperimentali. La percentuale di basi con punteggio qualitativo superiore a Q30 rappresenta la media su un'intera corsa.
- d. I reagenti XLEAP-SBS per le celle a flusso P1, P2 e P3 sono disponibili nel 2° trimestre del 2024.
- e. I reagenti P3 e P4 sono disponibili solo per il NextSeq 2000 System.

I reagenti XLEAP-SBS consentono di ottenere il massimo output di lecture e il minimo prezzo per milione di lecture di qualsiasi sistema di sequenziamento da banco Illumina. La riduzione del costo per milione di lecture abbinata a una capacità di sequenziamento aggiuntiva fornisce:

- Più lecture per campione per acquisire informazioni sui trascritti con abbondanza inferiore
- Più campioni per potenziare i progetti sperimentali più solidi entro un determinato budget di ricerca
- Metodi più completi per acquisire sfaccettature più complesse del panorama dell'RNA per favorire una maggiore scoperta

Le diverse configurazioni delle celle a flusso del NextSeq 1000 System e del NextSeq 2000 System (Tabella 3) consentono ai ricercatori di ottimizzare le progettazioni dello studio in base al numero di campioni e ai requisiti di output. Ad esempio, la capacità di sequenziamento aggiuntiva offerta dalla cella a flusso NextSeq 2000 P4 consente di progettare in modo più facile ed economico studi con potenza appropriata e rendere l'RNA-Seq una routine del repertorio di strumenti molecolari di qualsiasi laboratorio. Se è necessaria una maggiore processività del campione, gli studi possono essere scalati fino a centinaia di campioni per corsa utilizzando la NovaSeq™ X Series (Tabella 2).

Valore del sequenziamento paired-end

Con il NextSeq 1000 System e il NextSeq 2000 System, i ricercatori possono eseguire il sequenziamento a lettura singola o paired-end. Il sequenziamento a lettura singola è un'opzione economica per il profilo dell'espressione genica. Tuttavia, l'RNA-Seq paired-end è necessario per le informazioni con filamento e offre vantaggi chiave.

Le informazioni sulla profondità di lettura generate da entrambe le estremità di un'inserzione consentono di differenziare efficacemente gli isomeri del trascritto, fornendo un rilevamento e una quantificazione più accurati dell'abbondanza a livello di trascritto. Le informazioni paired-end migliorano sostanzialmente la sensibilità per rilevare le fusioni geniche e le varianti di inserzione/delezione (indel).

Soluzioni di analisi semplificate di Illumina

Analisi secondaria DRAGEN™

L'analisi dei dati RNA-Seq può essere eseguita utilizzando gli strumenti Illumina come l'analisi secondaria DRAGEN, una suite di pipeline di analisi dei dati accurate, complete ed efficienti.[§] La pipeline Illumina DRAGEN RNA esegue un allineamento accurato dell'RNA con un genoma di riferimento, l'identificazione di varianti e la quantificazione di geni, nonché la caratterizzazione delle giunzioni di splicing e delle fusioni geniche candidate (Figura 3). La pipeline DRAGEN RNA può essere configurata come parte della configurazione della corsa per il lancio sul cloud con Illumina Connected Analytics o BaseSpace Sequence Hub o come flusso di lavoro integrato sullo strumento utilizzando l'hardware DRAGEN integrato di NextSeq 1000 e NextSeq 2000.

§ L'hardware DRAGEN è incluso nel NextSeq 1000 System e nel NextSeq 2000 System. Una licenza DRAGEN è inclusa nello strumento e non deve essere acquistata separatamente.

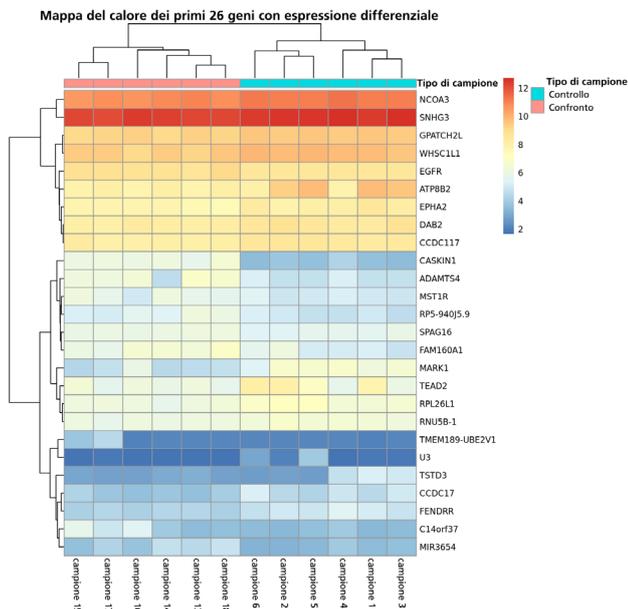


Figura 3: pipeline DRAGEN RNA. Esempio di screenshot della mappa di calore dell'espressione differenziale con pipeline DRAGEN RNA, disponibile sul NextSeq 1000 System e sul NextSeq 2000 System o sul cloud con BaseSpace Sequence Hub o Illumina Connected Analytics.

La pipeline DRAGEN RNA fornisce dati di alta qualità forniti in un'interfaccia utente intuitiva. Semplici suggerimenti guidano l'utente durante l'intero processo, partendo dalla selezione dei file generati dal sequenziatore fino alla visualizzazione dei dati analizzati e dei risultati. L'output della pipeline DRAGEN RNA può essere inserito direttamente in un'ampia gamma di strumenti di analisi a valle disponibili. Oltre alla piattaforma DRAGEN, Illumina Connected Analytics e BaseSpace Sequence Hub forniscono strumenti per la visualizzazione, l'analisi e la condivisione.

Assistenza tecnica completa di Illumina

Illumina mette a disposizione il suo team di assistenza di massimo livello composto da ricercatori esperti nella preparazione delle librerie, nel sequenziamento e nell'analisi. Questo team dedicato include tecnici dell'assistenza in loco (FSE, field service engineer) altamente qualificati, scienziati delle applicazioni tecniche (TAS, technical applications scientist), tecnici delle applicazioni in loco (FAS, field applications scientist), ingegneri per il supporto dei sistemi, bioinformatici ed esperti di reti IT, tutti formati in modo approfondito sulla tecnologia NGS e sulle applicazioni che i clienti di Illumina utilizzano in tutto il mondo. [L'assistenza tecnica](#) è disponibile telefonicamente cinque giorni la settimana oppure online 24/7 in tutto il mondo e in diverse lingue.

Grazie a questo eccezionale servizio di assistenza, Illumina aiuta gli utenti a massimizzare l'efficacia dei loro NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System, formare i nuovi dipendenti e apprendere le tecniche più recenti e le migliori pratiche.

Riepilogo

La soluzione RNA-Seq NextSeq 1000 e NextSeq 2000 offre un flusso di lavoro ottimizzato dall'RNA ai risultati che combina la potenza, la velocità e la flessibilità del NextSeq 1000 Sequencing System e del NextSeq 2000 Sequencing System con un portafoglio avanzato per la preparazione delle librerie di RNA e applicazioni software RNA-Seq di facile utilizzo. Quattro tipi di celle a flusso garantiscono efficacia in termini di costi tra i tipi di progetto RNA-Seq, dal profilo dell'espressione genica alla scoperta dell'intero trascrittoma.

Maggiori informazioni

[Sequenziamento dell'RNA](#)

[Preparazione delle librerie di RNA Illumina](#)

[NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System](#)

[Analisi secondaria DRAGEN](#)

[Dati demo su BaseSpace Sequence Hub](#)

Bibliografia

- Geraci F, Saha I, Bianchini M. [Editorial: RNA-Seq Analysis: Methods, Applications and Challenges](#). *Front Genet.* 2020;11:220. doi:10.3389/fgene.2020.00220.
- Corchete LA, Rojas EA, Alonso-López D, De Las Rivas J, Gutiérrez NC, Burguillo FJ. [Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis](#). *Sci Rep.* 2020;10(1):19737. doi:10.1038/s41598-020-76881-x.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
NextSeq 2000 Sequencing System	20038897
NextSeq 1000 Sequencing System	20038898
NextSeq 1000 to NextSeq 2000 upgrade	20047256
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b}	20100983
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b}	20100982
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a,b}	20100981
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b}	20100987
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a,b}	20100986
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b}	20100985
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a,b}	20100984
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a,b}	20100990
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a,b}	20100989
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a,b}	20100988
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (50 cycles) ^a	20100995
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^a	20100994
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^a	20100993
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^a	20100992
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read and Index Primers ^a	20112856
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Index Primer Kit ^a	20112858

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read Primer Kit ^a	20112859
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 mRNA Prep, Ligation (16 samples)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 samples)	20040534
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples)	20040537
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091661
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) ^c	20091660

a. I kit di reagenti XLEAP-SBS per gli strumenti NextSeq 1000 e NextSeq 2000 vengono spediti e conservati alla stessa temperatura dei kit di reagenti SBS standard.

b. I reagenti XLEAP-SBS per le celle a flusso P1, P2 e P3 sono disponibili nel 2° trimestre del 2024.

c. Gli indici di ligazione sono compatibili con i kit per la preparazione totale e di mRNA. Gli indici di tagmentazione sono compatibili con i kit per la preparazione per l'arricchimento di DNA e RNA.



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

© 2024 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-00480 ITA v3.0