

Flujo de trabajo fácil y rápido para identificar eventos de fusión de ARN en la investigación oncológica

Uso de los paneles Illumina
RNA Prep with Enrichment
for TruSight™ RNA Fusion
y TruSight RNA Pan-Cancer



Introducción

Los transcritos de ARN que se expresan dinámicamente son muy informativos sobre la actividad y el estado de los tejidos a nivel celular. La secuenciación selectiva de ARN (RNA-Seq) de muestras tumorales es un método potente para cuantificar transcritos de ARN expresado e identificar fusiones génicas relevantes en la investigación oncológica. Las células cancerosas acumulan numerosos cambios genéticos, aunque normalmente solo unos pocos de estos cambios fomentan la progresión tumoral.¹⁻³ La medición de los patrones de expresión genética mediante RNA-Seq puede ayudar a diferenciar estas mutaciones causantes de cáncer de las mutaciones secundarias.¹⁻³ La detección de fusiones génicas es importante para la investigación oncológica, ya que el 20 % de todos los tumores humanos son portadores de translocaciones y fusiones génicas.⁴⁻⁶ La mayoría de las fusiones génicas tienen un impacto significativo en la carcinogénesis y una fuerte asociación con el fenotipo morfológico, lo que las hace útiles como posibles biomarcadores.⁴⁻⁶

Centrarse en un subconjunto de genes relevantes permite llevar a cabo procesos de RNA-Seq en un sistema de secuenciación de sobremesa empleando un análisis eficiente con una alta sensibilidad. El enriquecimiento, o secuenciación de captura híbrida, ofrece una estrategia sólida y exhaustiva para los investigadores que requieren una visión más profunda de los datos genómicos complejos. Este método destaca en la detección de regiones objetivo más amplias y por su alta sensibilidad, lo que permite la identificación de una amplia gama de alteraciones genéticas, incluidas fusiones conocidas y desconocidas, variantes alternativas de corte y empalme y otros biomarcadores críticos. Además, el enriquecimiento mantiene la eficacia incluso con tipos de muestras difíciles, como las fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, formalin fixed, paraffin-embedded) y otras fuentes de ADN comprometidas.

TruSight RNA Fusion Panel y TruSight RNA Pan-Cancer Panel se utilizan en procesos de RNA-Seq con enriquecimiento para ayudar a los investigadores clínicos a medir la expresión genética y detectar fusiones génicas relevantes para el cáncer.^{7,8} TruSight RNA Fusion Panel cubre 507 genes asociados a fusiones y TruSight RNA Pan-Cancer Panel es selectivo de 1385 genes y permite evaluar de manera exhaustiva los transcritos de ARN relacionados con el cáncer (tabla 1). Ambos paneles admiten un aporte de ARN total de tan solo 10 ng, si se trata de ARN de alta calidad, o 20 ng en el caso de ARN de muestras FFPE.

Flujo de trabajo fácil y rápido

El uso de Illumina RNA Prep with Enrichment con los paneles de oligonucleótidos TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer ofrece un flujo de trabajo rápido para obtener resultados centrados en la expresión genética y la detección de fusiones relacionadas con el cáncer (figura 1). El protocolo de preparación de librerías optimizado incluye menos pasos, tiempos de incubación más breves y numerosos puntos de detención seguros con un tiempo total de ensayo de solo nueve horas.⁹ Illumina RNA Prep with Enrichment utiliza tecnología de tagmentación en bolas para mediar una reacción de tagmentación uniforme, con lo que se elimina la necesidad de pasos de fragmentación separados y se ahorra tiempo.⁹ A esto le sigue la hibridación simplificada de un solo ciclo para el enriquecimiento basado en el panel de sondas. El enriquecimiento se puede realizar en forma de una o de tres unidades de plexado. Un programa de PCR de ciclo limitado amplifica exponencialmente los fragmentos enriquecidos para aumentar el volumen de la librería. La secuenciación se lleva a cabo en un sistema de secuenciación de sobremesa de Illumina y los datos se analizan con BaseSpace™ Sequence Hub.



Figura 1: Flujo de trabajo de los paneles de TruSight RNA con Illumina RNA Prep with Enrichment: RNA-Seq selectivo para investigación oncológica con los paneles TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer e Illumina RNA Prep with Enrichment sigue un flujo de trabajo completo optimizado que incluye la preparación de librerías, la secuenciación y el análisis de datos.

Tabla 1: Contenido del panel de ARN TruSight

Nombre del panel	N.º de sondas	N.º de genes objetivo	N.º de regiones exónicas objetivo
TruSight RNA Fusion Panel	21 283	507	7690
TruSight RNA Pan-Cancer Panel	57 010	1385	21 043

Esta nota de aplicación proporciona a los usuarios orientación y datos de rendimiento para el uso de Illumina RNA Prep with Enrichment con los paneles TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer para identificar la expresión genética del ARN y los casos de fusión relacionados con el cáncer.

Métodos

Preparación de librerías

El rendimiento de TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, n.º de catálogo 20046101) y TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina, n.º de catálogo 20046104) con Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, n.º de catálogo 20040536) se analizó utilizando muestras de ARN de alta calidad (tabla 2) y de ARN FFPE (tabla 3), con enriquecimiento tanto de una unidad de plexado como de tres unidades de plexado.

Las muestras de ARN de alta calidad utilizadas para el estudio de enriquecimiento con una unidad de plexado fueron ARN de referencia humano universal (UHR, universal human reference) (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo QS0639), ARN total de la línea celular de leucemia humana K562 (ATCC, n.º de catálogo CCL-243) y ARN de referencia humano cerebral (HBRR, Human Brain Reference) (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo QS0611) con aportes de 10 y 100 ng. Las muestras FFPE utilizadas para el estudio de enriquecimiento con una unidad de plexado fueron la muestra de cáncer de colon «FFPE-A», la muestra de cáncer de pulmón «FFPE-B», la muestra primaria de cáncer desconocido «FFPE-C» y la muestra de linfoma «FFPE-D», con aportes de 20 ng. Se generaron al menos tres réplicas de librerías a partir de cada tipo de muestra y se utilizaron para formar reacciones de enriquecimiento de una unidad de plexado. Ambos paneles de oligonucleótidos TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer se analizaron para cada tipo de muestra con una unidad de plexado.

Las muestras de ARN utilizadas para el estudio de enriquecimiento con tres unidades de plexado fueron ARN de referencia humano universal de alta calidad y ARN total de K562 con aportes de 10 ng, y la muestra de cáncer de colon «FFPE-E» con un aporte de 20 ng. Se generaron tres réplicas de librerías a partir de cada tipo de muestra y se utilizaron para formar reacciones de enriquecimiento de tres unidades de plexado. Ambos paneles de oligonucleótidos TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer se analizaron para cada tipo de muestra con tres unidades de plexado.

Tabla 2: Muestras de ARN de alta calidad

Descripción	Nota	Cantidad aportada
ARN de referencia humano universal	Derivado de una mezcla exclusiva de 10 líneas celulares humanas	10 ng, 100 ng
ARN total de K562	Derivado de una línea celular de leucemia mielógena crónica	10 ng, 100 ng
ARN de referencia humano cerebral	Derivado de una mezcla de tejidos cerebrales humanos de múltiples donantes	10 ng, 100 ng

Tabla 3: Muestras de ARN FFPE

Muestra	Tejido	Diagnóstico	DV ₂₀₀ ^a	Cantidad aportada
FFPE-A	Pellet celular	Cáncer de colon	81,9	20 ng
FFPE-B	Pulmón	Cáncer de pulmón	45,5	20 ng
FFPE-C	Desconocido	Cáncer primario desconocido o no especificado	36,5	20 ng
FFPE-D	Desconocido	Linfoma	56,1	20 ng
FFPE-E	Desconocido	Cáncer de colon	59,7	20 ng

a. DV₂₀₀ es el porcentaje de fragmentos de ARN >200 nucleótidos. Valores de DV₂₀₀ obtenidos del depósito de muestras.

Se prepararon librerías siguiendo la guía de referencia de tagmentación de Illumina RNA Prep with Enrichment (L) (Illumina, n.º de documento 100000124435 v03) utilizando los paneles TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer para los pasos de enriquecimiento.

Secuenciación

Las librerías preparadas se diluyeron hasta una concentración de carga final de 1,8 pM, de acuerdo con la Guía de desnaturalización y dilución de librerías para NextSeq 550 System (Illumina, n.º de documento 15048776 v18) y se secuenciaron en NextSeq 550 System a una longitud de lectura de 2 × 74 pb con NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20024907) a una profundidad de como mínimo 3 millones de lecturas por muestra. Tenga en cuenta que 3 millones de lecturas por muestra fue la profundidad de secuenciación mínima elegida para este estudio para examinar los criterios de medición en el borde inferior del rendimiento. Muchas aplicaciones de clientes se benefician de una mayor profundidad de secuenciación, hasta 30 millones de lecturas por muestra.

Análisis de datos

Los resultados de alineación y cobertura de transcritos se generaron con la aplicación Illumina RNA-Seq Alignment v2.0.2 en BaseSpace Sequence Hub. Los resultados del análisis de expresión se generaron con la aplicación DRAGEN™ RNA v4.2.4. Los resultados de enriquecimiento de lectura completada (PRE, padded

read enrichment) y enriquecimiento de lectura única completada (PURE, padded unique read enrichment) se generaron con la aplicación DRAGEN Enrichment v4.2.4. La detección de fusiones se comprobó con las aplicaciones RNA-Seq Alignment v2.0.2 y DRAGEN RNA v4.2.4. Los datos se redujeron a 1 millón de lecturas por muestra (para el enriquecimiento con una unidad de plexado) o a 4 millones de lecturas por muestra (para el enriquecimiento con tres unidades de plexado) para normalizar las diferencias de carga.

Resultados

Eliminación de transcritos abundantes

Los resultados de la aplicación RNA-Seq Alignment incluyen una estimación de la proporción de ARN de especies de transcritos muy abundantes, como el ARN ribosómico (ARNr), que normalmente tienen un valor informativo bajo. Durante la fase de enriquecimiento del flujo de trabajo de Illumina RNA Prep with Enrichment se eliminan estas especies abundantes de transcritos. Con las preparaciones de una y de tres unidades de plexado, las especies de transcritos abundantes se reducen a menos del 20 % de las lecturas y, con frecuencia, a menos del 10 % (figura 2).

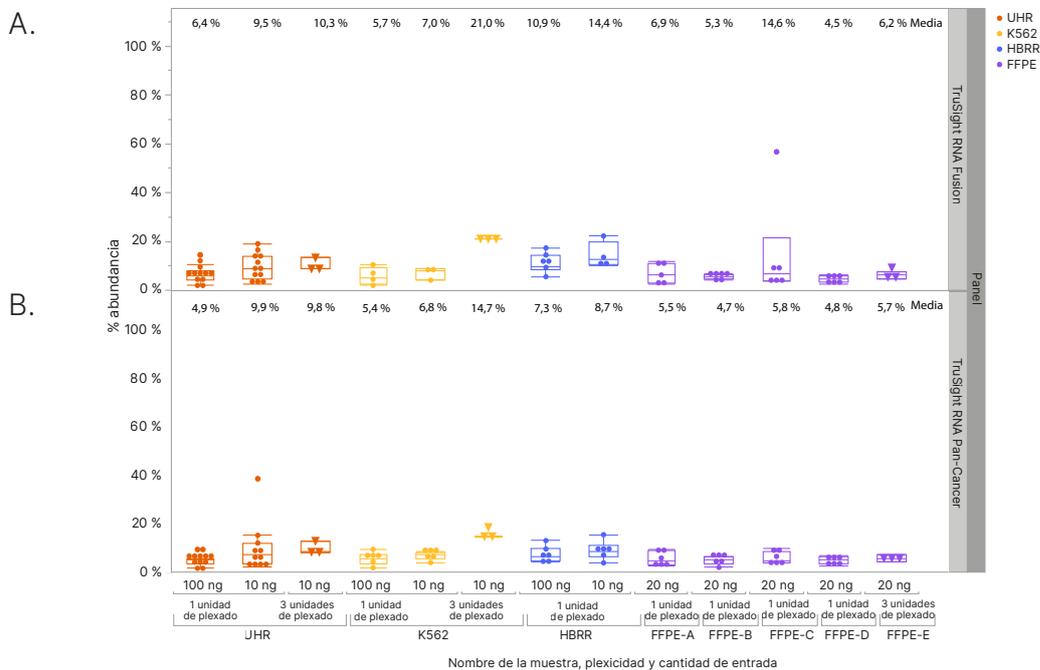


Figura 2: Eliminación eficaz de especies de ARN abundantes con Illumina RNA Prep with Enrichment: con los paneles de oligonucleótidos (A) TruSight RNA Fusion y (B) TruSight RNA Pan-Cancer para el enriquecimiento, menos del 20 % de los transcritos de ARN secuenciados fueron ARNr u otros transcritos muy abundantes. UHR: ARN de referencia humano universal; HBRR: ARN de referencia humano cerebral

Porcentaje de duplicados

El porcentaje de lecturas duplicadas representa el porcentaje del total de lecturas que corresponden a duplicados de fragmentos únicos de la muestra (frecuentemente duplicados de la PCR). Por lo general, es preferible que los valores de porcentaje de duplicados sean bajos y muestren un uso eficiente del ancho de banda de la secuenciación. En este estudio, las lecturas se normalizaron a 3 millones por muestra, momento en el que los valores de porcentaje de duplicados más bajos indican un mayor contenido de lectura única. En ese momento, las tasas de duplicación muestran correlación con la calidad de la muestra de ARN aportada y con el tamaño del panel de oligonucleótidos (figura 3). El panel TruSight RNA Fusion más pequeño produce más duplicados por muestra que el panel de TruSight RNA Pan-Cancer porque, este último, tiene más objetivos únicos que se pueden capturar. En el caso de las librerías enriquecidas con una unidad de plexado, las muestras de ARN de alta calidad muestran un porcentaje de duplicados menor que la mayoría de las muestras FFPE, y esto se debe a la calidad de la muestra aportada. En el caso de las librerías enriquecidas con tres unidades de plexado, las muestras de UHR muestran una tasa media de duplicación $\leq 32\%$, mientras que la línea celular K562 y las muestras FFPE-E muestran tasas de duplicación más altas, lo que indica un menor contenido de lecturas únicas en la librería final.

Enriquecimiento de lecturas

Los altos valores de enriquecimiento de lectura demuestran que las sondas del panel capturan de forma eficiente las librerías objetivo durante el enriquecimiento, lo que da como resultado una secuenciación reducida de regiones no objetivo no deseadas. Dos mediciones de enriquecimiento son PRE y PURE. PRE se refiere al porcentaje de lecturas que se asignan a regiones objetivo del panel o a su proximidad inmediata (regiones completadas), incluidas las lecturas duplicadas. El criterio de medición PURE excluye las lecturas duplicadas y puede parecer más bajo cuando la proporción de lecturas duplicadas es alta (figura 4). PRE se considera un criterio de medición más útil para algunas aplicaciones de RNA-Seq.

En el caso del estudio de enriquecimiento con una unidad de plexado, el enriquecimiento en las muestras de ARN de alta calidad fue generalmente superior al 70 % mediante ambos criterios de medición, lo que indica un enriquecimiento satisfactorio. Esto fue así tanto para las muestras con mucha como con poca cantidad de entrada. La eficacia de enriquecimiento de muestras FFPE fue alta para todas las muestras para el criterio de medición PRE, y fue muy variable para el criterio de medición PURE, aunque con un valor medio por encima del 50 %. Esta variabilidad se correlaciona con el número de lecturas duplicadas por muestra, tal y como indica el gradiente de color en el gráfico (figura 4).

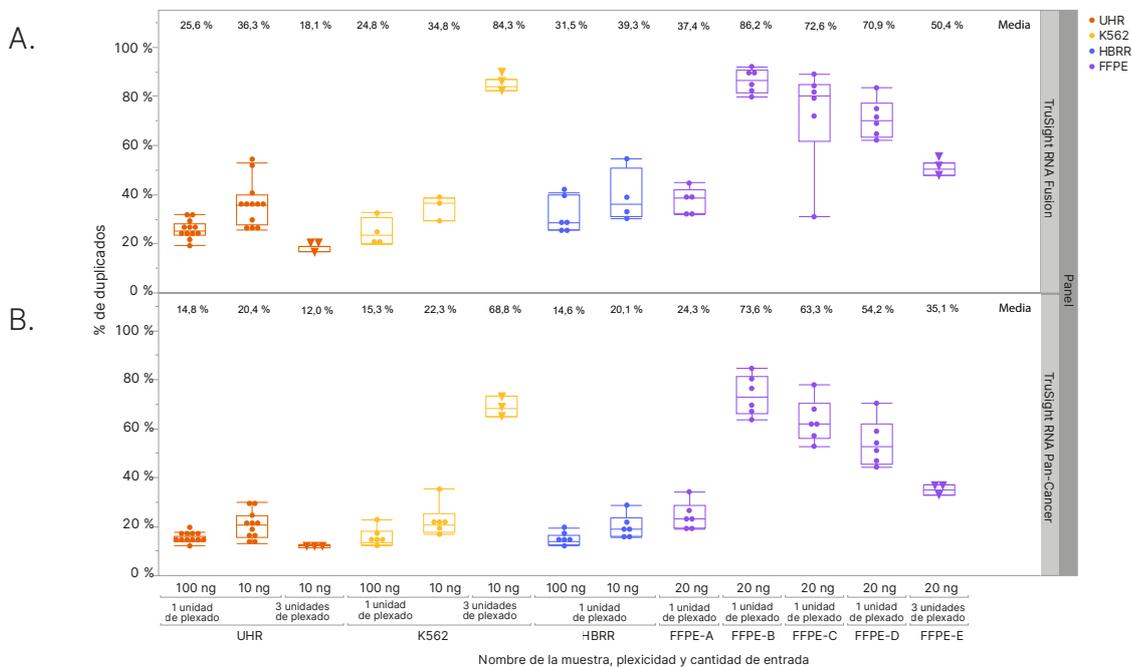


Figura 3: Porcentaje de duplicados con los paneles de TruSight RNA e Illumina RNA Prep with Enrichment: con los paneles de oligonucleótidos (A) TruSight RNA Fusion y (B) TruSight RNA Pan-Cancer para el enriquecimiento, las tasas de duplicación muestran correlación con la calidad de la muestra de ARN aportada y con el tamaño del panel de oligonucleótidos.

Para el estudio de enriquecimiento con tres unidades de plexado, el PRE para ARN de alta calidad es superior al 70 % y para FFPE es superior al 90 %, lo que apunta a un enriquecimiento suficiente con los paneles TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer (figura 4).

Detección de fusión génica

Los paneles TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer permitieron una detección fiable de la fusión génica (tabla 4). La muestra de ARN de la línea celular K562 que contenía la fusión *BCR-ABL1* se utilizó como el tipo de muestra aplicable para probar la detección con el uso de Illumina RNA Prep with Enrichment. Los resultados mostraron una tasa de llamada del 100 % para la fusión génica *BCR-ABL1* en la línea celular K562 en seis réplicas (10 y 100 ng, enriquecimiento de una unidad de plexado) y tres réplicas (10 ng, enriquecimiento de tres unidades de plexado) cuando se analizaron tanto a través de la aplicación DRAGEN RNA v4.2.4 como de la aplicación RNA-Seq Alignment v2.0.2 en BaseSpace Sequence Hub.

Cobertura de exones

El análisis de datos con la aplicación DRAGEN Enrichment reveló que Illumina RNA Prep with Enrichment daba como resultado una cobertura de más del 85 % de las bases, en línea con la secuencia de codificación y las regiones no traducidas (UTR, untranslated regions) de ARN. Estos resultados demuestran una alta eficiencia de captura que centra los esfuerzos de secuenciación en el contenido de alto valor de las regiones codificantes del ARN (figura 5).

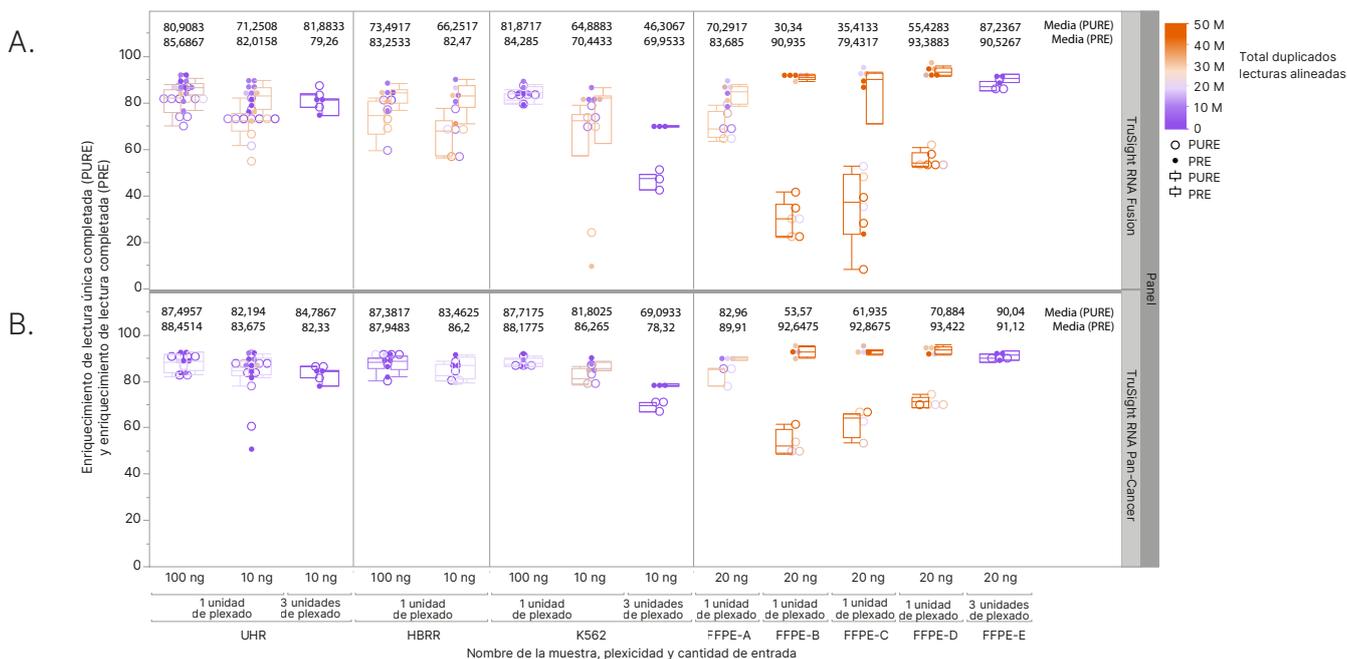


Figura 4: Alta eficiencia de enriquecimiento con los paneles TruSight RNA e Illumina RNA Prep with Enrichment: el enriquecimiento con los paneles de oligonucleótidos (A) TruSight RNA Fusion y (B) TruSight RNA Pan-Cancer mostró una alta eficiencia en todos los tipos de muestras con PRE, un criterio de medición que incluye los duplicados. En cambio, PURE (un indicador que excluye los duplicados) no es tan útil para aplicaciones de RNA-Seq. Las muestras con altas tasas de duplicados muestran una alta variabilidad en PURE. Aquí, el recuento de lecturas duplicadas está codificado por colores de 0 (morado) a 50 M (naranja). El análisis de DRAGEN Enrichment se ejecuta sin eliminar lecturas duplicadas (es decir, la casilla de opción predeterminada «Mark Duplicates» (marcar duplicados) debe estar desmarcada en la aplicación). Para producir análisis de enriquecimiento para los paneles TruSight RNA Fusion y TruSight RNA Pan-Cancer con la aplicación DRAGEN Enrichment, se debe cargar el archivo *.bed manualmente para cada panel en BaseSpace Sequence Hub.

Tabla 4: Detección de fusión génica con los paneles de ARN TruSight e Illumina RNA Prep with Enrichment

Fusión (fuente)	Panel	Enriquecimiento	Entrada de ARN	Detección con RNA-Seq Align v2.0.2	Detección con DRAGEN RNA v4.2.4
BCR-ABL1 (K562)	TruSight RNA Fusion	1 unidad de plexado	10 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
			100 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
		3 unidades de plexado	10 ng	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
	TruSight RNA Pan Cancer	1 unidad de plexado	10 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
			100 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
		3 unidades de plexado	10 ng	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)

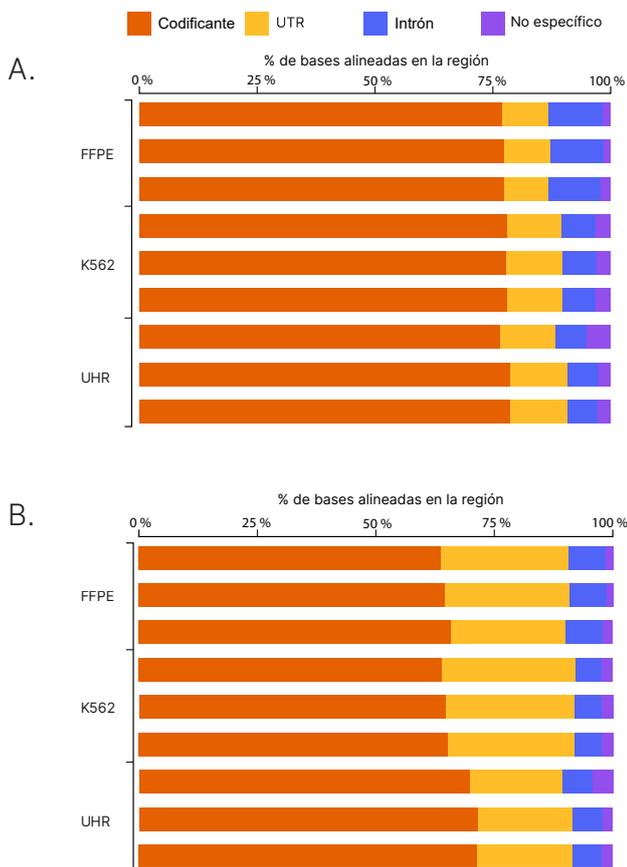


Figura 5: Cobertura de regiones de codificación con los paneles de ARN TruSight e Illumina RNA Prep with Enrichment: el uso de los paneles de oligonucleótidos (A) TruSight RNA Fusion y (B) TruSight RNA Pan-Cancer para el enriquecimiento da como resultado una alta eficiencia de captura que se alinea con la secuencia de codificación y las regiones no traducidas (UTR).

Resumen

Al centrarse en genes de interés esenciales, la secuenciación selectiva del ARN permite a los investigadores estudiar contenido de gran valor enriquecido con transcritos asociados al cáncer. Illumina RNA Prep with Enrichment y TruSight RNA Fusion Panel o TruSight RNA Pan-Cancer Panel demuestran resultados altamente reproducibles con la sensibilidad analítica necesaria para detectar transcritos y fusiones poco frecuentes. Este flujo de trabajo proporcionó un rendimiento sólido para ambos paneles, incluso con niveles de entrada de ARN más bajos o ARN de menor calidad. Los investigadores oncológicos pueden beneficiarse de un flujo de trabajo rápido y sencillo para el análisis selectivo de ARN.

Más información

[TruSight RNA Fusion Panel](#)

[TruSight RNA Pan-Cancer Panel](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
TruSight RNA Fusion Oligo Panel	20046101
TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel	20046104
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples)	20040537
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660

Bibliografía

1. Pon JR, Marra MA. **Driver and passenger mutations in cancer.** *Annu Rev Pathol.* 2015;10:25-50. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040312
2. Green MR, Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, et al. **Transient expression of BCL6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma.** *Nat Commun.* 2014;5:3904 doi:10.1038/ncomms4904.
3. Piskol R, Ramaswami G, Li JB. **Reliable identification of genomic variants from RNA-seq data.** *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):641-651.
4. Mertens F, Tayebwa J. **Evolving techniques for gene fusion detection in soft tissue tumours.** *Histopathology.* 2014;64(1):151-162. doi:10.1111/his.12272
5. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. mitelmandatabase.isb-cgc.org/. Fecha de actualización: 15 de octubre de 2024. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2024.
6. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. **The emerging complexity of gene fusions in cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):371-381.
7. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-rna-prep-enrichment-data-sheet-m-gl-02145/illumina-rna-prep-enrich-data-sheet-m-gl-02145.pdf. Año de publicación: 2020. Año de actualización: 2023. Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2024.
8. Illumina. TruSight RNA Fusion Panel. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf. Año de publicación: 2017. Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2024.
9. Illumina. TruSight RNA Pan-Cancer Panel. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-pan-cancer-data-sheet-1170-2015-004.pdf. Año de publicación: 2015. Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2024.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-03103 ESP v1.0