

Illumina RNA Prep with Enrichment

Un flujo de trabajo rápido e integrado para aplicaciones de enriquecimiento de ARN.

Puntos destacados

- Flujo de trabajo de enriquecimiento de ARN rápido y sencillo**
 Prepare bibliotecas en tan solo nueve horas con menos de dos horas de tiempo de participación activa.
- Datos de gran calidad a partir de muestras complicadas**
 Obtenga una gran sensibilidad desde tan solo 10 ng de ARN total a partir de muestras recién preparadas o congeladas o 20 ng de ARN total procedente de muestras FFPE degradadas.
- Secuenciación de ARN selectiva y asequible**
 Aumente al máximo su capacidad de descubrimientos gracias a una captura robusta y eficiente a una profundidad de secuenciación reducida, para realizar detecciones precisas y sin sesgo.
- Productividad flexible y ampliable**
 Multiplexado de hasta 384 muestras en un solo experimento con índices dobles únicos

Introducción

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) de nueva generación (NGS) es un potente método para descubrir, crear perfiles y cuantificar las transcripciones de ARN. Entre las ventajas de la secuenciación de ARN se incluyen:

- Secuenciación de ARN selectiva que analiza la expresión en un conjunto específico de genes. El enriquecimiento permite un análisis rentable del exoma del ARN de las regiones de codificación del transcriptoma mediante la captura, específica de la secuencia. Es ideal para muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE) de baja calidad.
- La secuenciación de ARN total proporciona un enfoque sin sesgo ni hipótesis para un análisis exhaustivo del transcriptoma. Mide con precisión la abundancia de genes y transcripciones y detecta tanto características conocidas como novedosas en la codificación y varias formas de ARN no codificante.
- La secuenciación de ARN mensajero (ARNm) cuantifica de forma sensible y precisa la expresión genética, identifica isoformas conocidas y novedosas en el transcriptoma de la codificación y mide la expresión específica de los alelos.

La tagmentación de Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) ofrece una solución optimizada para la secuenciación selectiva del ARN. Ofrece una gran versatilidad con respecto al tipo y a la cantidad del aporte, para permitir una amplia variedad de aplicaciones de secuenciación de ARN, posibilitando estudios de detección y descubrimiento, como la expresión específica de alelos, la detección de fusión, el cribado de biomarcadores y otras. La combinación de Illumina RNA Prep with Enrichment con el panel de exomas de Illumina ofrece una perspectiva integral del transcriptoma de la codificación, con lo que se obtiene la mayor potencia de descubrimiento con solo una parte de la profundidad de secuenciación.

Flujo de trabajo de enriquecimiento de ARN rápido y sencillo

Illumina RNA Prep with Enrichment utiliza la tagmentación en bolas seguida de un paso de hibridación simplificado de 90 minutos para lograr un flujo de trabajo rápido (figura 1). La tagmentación en bolas

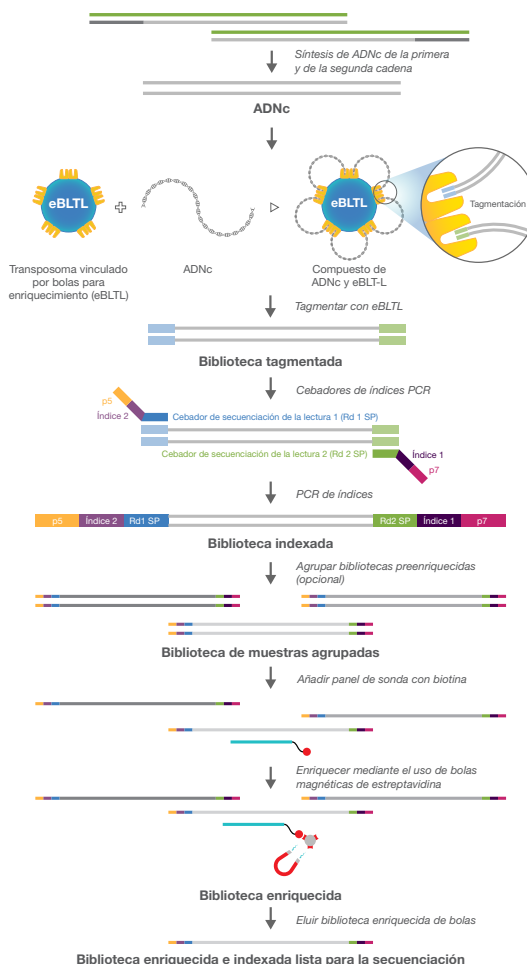


Figura 1: Proceso químico de Illumina RNA Prep with Enrichment: después de la síntesis del ADNc, se realiza una reacción de tagmentación uniforme con los eBTLT como mediadores, seguida de una reacción de hibridación única de 90 minutos que posibilita un flujo de trabajo rápido y versátil.

incluye transposomas vinculados por bolas para el enriquecimiento (eBLT) optimizados para el ARN (eBTLT), que producen una reacción de tagmentación uniforme y evitan pasos de fragmentación separados para ahorrar tiempo. Combinado con las innovaciones en la reacción de hibridación, el flujo de trabajo requiere menos pasos, tiempos de incubación más breves y numerosos puntos de detención de seguridad, así como un tiempo total del ensayo como mínimo un 50 % más rápido que con TruSeq™ RNA Exome (figura 2). Además de la preparación manual, Illumina RNA Prep with Enrichment se ha diseñado para que sea compatible con un flujo de trabajo automatizado con plataformas de manipulación de líquidos, lo que permite una manipulación de muestras altamente reproducible, un menor riesgo de errores humanos y tiempos de participación activa más reducidos.

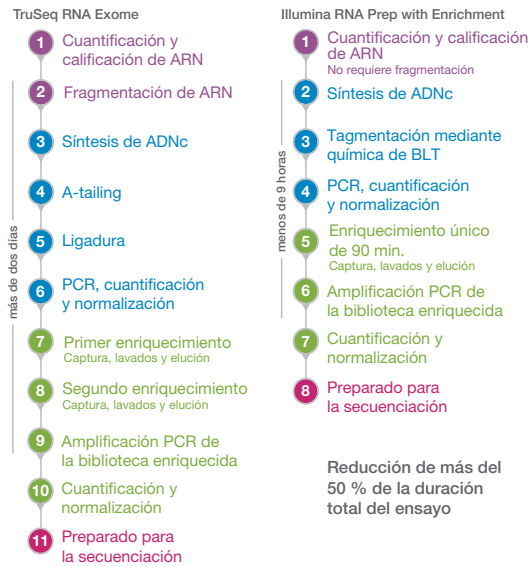


Figura 2: Illumina RNA Prep with Enrichment ofrece un flujo de trabajo rápido. La tagmentación en bolas y un único paso de hibridación de 90 minutos se combinan para lograr flujos de trabajo más rápidos y con menos pasos que TruSeq RNA Exome.

Datos de alta calidad

Datos de alta precisión a partir de muestras con muestras con un bajo aporte y FFPE

La elevada eficacia de captura y la uniformidad de cobertura reducen al mínimo la profundidad de secuenciación necesaria para determinar con precisión y sin sesgos los niveles de expresión. Comenzando con tan solo 10 ng de ARN total, Illumina RNA Prep with Enrichment produce datos de calidad con una elevada concordancia entre cantidades variables de aporte de ARN procedente de muestras recién obtenidas o congeladas (figura 3). Tumores de gran valor: las muestras normales o las muestras de tejido FFPE archivadas proporcionan una abundante información biológica para la creación de perfiles de expresión genética, si bien pueden ser difíciles de estudiar debido a la degradación de los ácidos nucleicos del proceso de fijación y almacenamiento.¹ Illumina RNA Prep with Enrichment produce datos de calidad con un aporte de tan solo 20 ng de ARN procedente de muestras FFPE. Combinados, estos resultados demuestran que Illumina RNA Prep with Enrichment es una solución ideal para muestras de gran valor o degradadas cuando el material de partida es limitado.

Detección de fusión de genes en muestras con un aporte reducido y FFPE

Para demostrar la capacidad de Illumina RNA Prep with Enrichment de reconocer variantes estructurales dentro de los transcritos de ARN, las muestras recién obtenidas/congeladas y FFPE se enriquecieron usando el panel de exomas de Illumina y se secuenciaron con el sistema NovaSeq™ 6000. Los resultados mostraron un índice de llamada del 100 % para las fusiones de genes *BCR-ABL1* (figura 4) y *TPM3-NTRK1* en seis duplicados de la estirpe celular K-562 (número de integridad de ARN, RIN = 7,4, DV₂₀₀ = 90 %) y una estirpe celular de cáncer colorrectal (RIN = 2,5, DV₂₀₀ = 85 %), respectivamente (tabla 1).

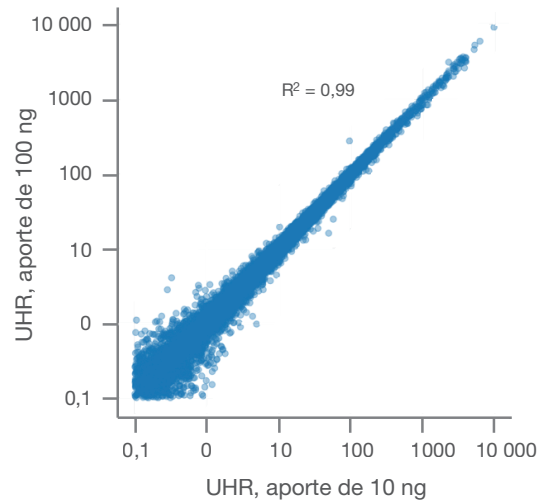


Figura 3: Datos de alta calidad a partir de muestras con un aporte reducido. Illumina RNA Prep with Enrichment logra una alta concordancia de datos entre cantidades de aporte de 10 ng y 100 ng de ARN total de referencia humana universal (UHR). Las bibliotecas de ARN de UHR se secuenciaron en un sistema NovaSeq 6000, con submuestras en grupos de 25 M por biblioteca. Los datos se analizaron mediante la aplicación BaseSpace RNA-Seq Alignment v 1.1.1.

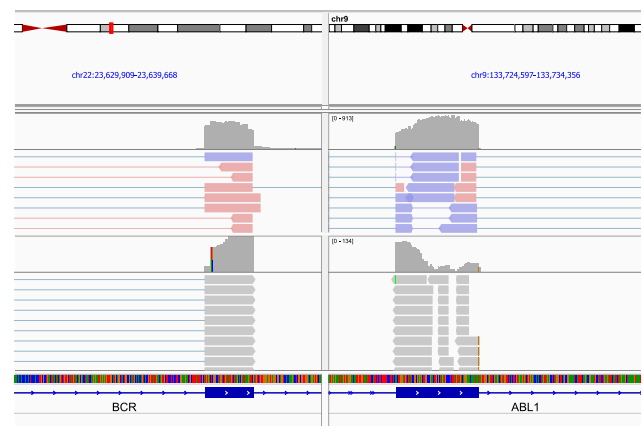


Figura 4: Detección de la fusión de genes *BCR-ABL1*. Las bibliotecas preparadas con 10 ng de ARN de la estirpe celular K-562 mediante Illumina RNA Prep with Enrichment y el panel de exomas de Illumina detectaron correctamente la fusión de genes *BCR-ABL1* utilizando el exhaustivo Integrative Genomics Viewer (IGV). La pista de alineamiento superior muestra todas las lecturas; la pista inferior muestra solo las lecturas que admiten la fusión *BCR-ABL1*.

Tabla 1: Detección de fusión de genes

Fusión (fuente)	RIN	Aporte de ARN	Detección
<i>BCR-ABL1</i> (K-562)	7,4	10 ng	6/6 duplicados (100 %)
<i>TPM3-NTRK1</i> (cáncer colorrectal)	2,5	20 ng	6/6 duplicados (100 %)

Secuenciación de ARN selectiva y asequible

Cobertura exónica excepcional

Ilumina RNA Prep with Enrichment se puede utilizar con el panel de exomas de Illumina, que incluye un conjunto de sondas altamente optimizado para proporcionar una cobertura integral de las secuencias de ARN de la codificación (tabla 2).

Tabla 2: Especificaciones del panel de exomas de Illumina

Especificaciones de cobertura	Panel de exomas de Illumina
N.º de genes objetivo	21 415
N.º de regiones exónicas objetivo	214 126
N.º de sondas	425 437
Porcentaje del exoma RefSeq cubierto	98,3 %

Para evaluar el rendimiento de Illumina RNA Prep with Enrichment para la secuenciación del exoma, las bibliotecas se han preparado a partir de ARN de referencia humana universal (UHR) y ARN FFPE utilizando Illumina RNA Prep with Enrichment. Las bibliotecas resultantes se secuenciaron en un sistema NovaSeq 6000 a 2 x 100 pb (25 millones de lecturas). El análisis de los datos con la aplicación de enriquecimiento en BaseSpace™ Sequence Hub mostró que Illumina RNA Prep with Enrichment produce una cobertura exónica excepcional (figura 5) con más del 85 % de las bases cubiertas alineándose con la secuencia de codificación y con las regiones no traducidas (UTR) del ARN, comparable a TruSeq RNA Exome (figura 6).

Estos resultados demuestran que Illumina RNA Prep with Enrichment proporciona una gran eficacia de captura que centra los esfuerzos de secuenciación en el contenido de gran valor de las regiones codificantes del ARN. Al trabajar con contenido más selectivo, Illumina RNA Prep with Enrichment necesita profundidades de secuenciación más bajas y produce conjuntos de datos más pequeños, lo que ahorra tiempo y costes.

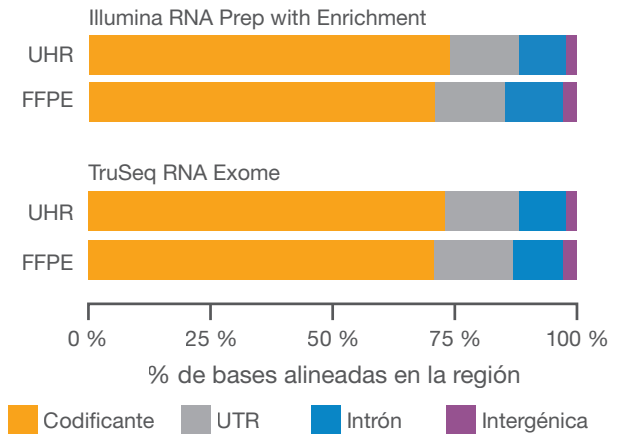


Figura 6: Cobertura de las regiones de codificación con Illumina RNA Prep with Enrichment. Las bibliotecas preparadas a partir de 10 ng de ARN de UHR y 20 ng de ARN FFPE con Illumina RNA Prep with Enrichment y el panel de exomas de Illumina muestran más del 85 % de los datos alineados a la codificación y a las UTR. Los datos de las bibliotecas de TruSeq RNA Exome se muestran a modo de comparación. Las bibliotecas resultantes se secuenciaron en un sistema NovaSeq 6000 a 2 x 100 pb, obteniéndose submuestras de 25 millones de lecturas.

Concordancia con TruSeq RNA Exome

La comparación de los datos generados a partir de las bibliotecas de Illumina RNA Prep with Enrichment con los datos de las bibliotecas de TruSeq RNA Exome, una solución estándar para el enriquecimiento del ARN, mostró una elevada concordancia (figura 7). Hay que destacar que la forma sigmoide de la gráfica de los datos es el resultado del salto de índices desde los adaptadores utilizados con TruSeq RNA Exome. Es importante destacar que Illumina RNA Prep with Enrichment utiliza índices dobles únicos (UDI), diseñados para eliminar la recombinación de índices.

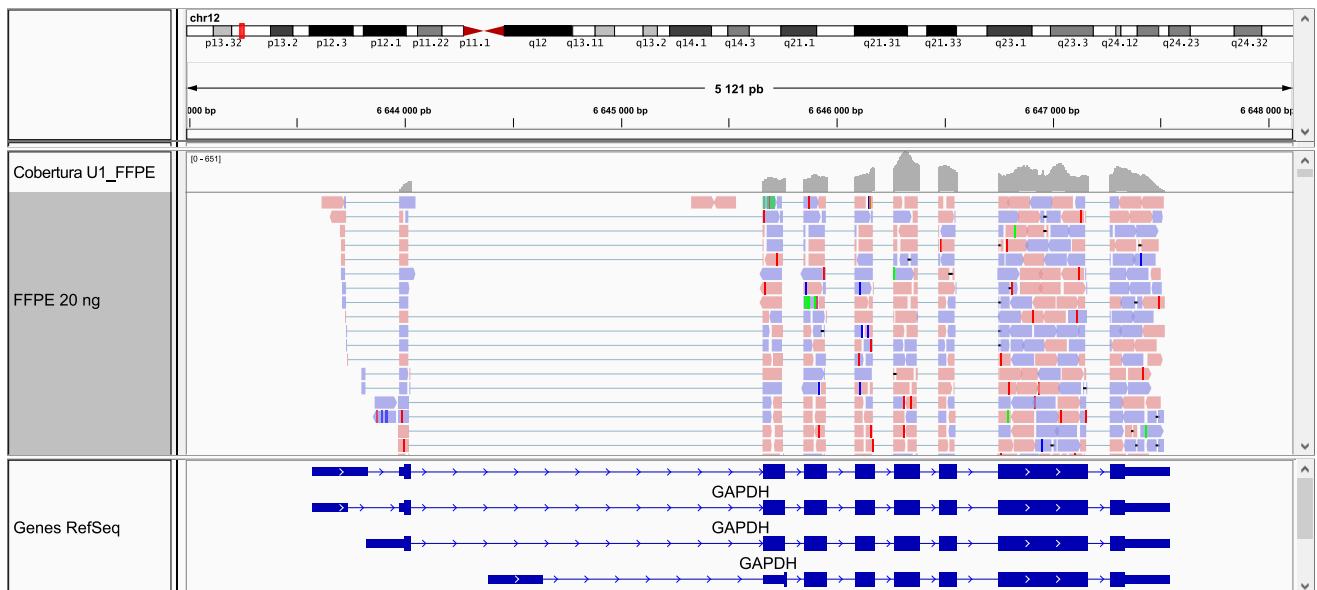


Figura 5: Cobertura de las regiones de codificación de Illumina RNA Prep with Enrichment; una biblioteca preparada a partir de 20 ng de muestra FFPE de baja calidad y enriquecida con Illumina Exome Panel fue secuenciada a 25 millones de lecturas. Se muestra la cobertura del gen de control GAPDH mediante IGV exhaustiva con las lecturas alineadas en los exones de codificación, donde se demuestra una buena captura del objetivo.

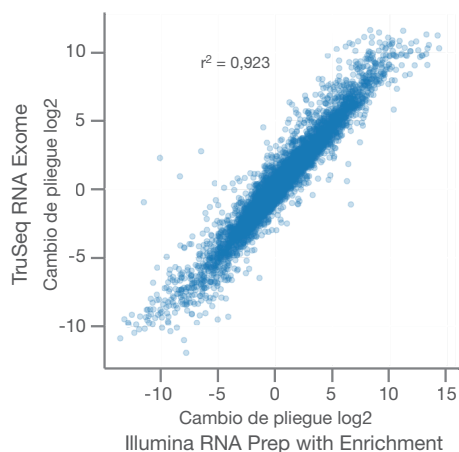


Figura 7: La gráfica de concordancia TruSeq RNA Exome—Illumina RNA Prep with Enrichment muestra una elevada concordancia con TruSeq RNA Exome al medirse con un cambio de pliegue log2 para el ARN de UHR (Agilent, n.º de catálogo 740000) frente a ARN de cerebro humano total (Thermo-Fisher, n.º de catálogo AM7962). Todas las bibliotecas se prepararon con un aporte de 10 ng. Las bibliotecas de TruSeq RNA Exome se enriquecieron como un plexado de 4 unidades, mientras que en las bibliotecas de Illumina RNA Prep with Enrichment el plexado fue de 3 unidades. Todos los datos se redujeron a 25 millones de grupos por biblioteca. Los datos se analizaron con la aplicación Cufflinks Assembly and Differential Expression (Ensamblaje y expresión diferencial de Cufflinks) de BaseSpace v 2.1.0.

Productividad flexible y ampliable

Al combinar Illumina RNA Prep with Enrichment e instrumentos de alto rendimiento, como los sistemas NextSeq™ 550 y 6000, los laboratorios pueden secuenciar muchas más muestras por experimento sin comprometer la calidad de los datos. Para obtener mayores rendimientos de la muestra, Illumina RNA Prep with Enrichment admite el multiplexado con 384 índices dobles únicos (UDI).^{*} Además de evitar la asignación incorrecta de índices, los UDI ayudan a reducir los costes de secuenciación, ya que permiten cargar hasta 384 muestras en una sola celda de flujo NovaSeq S4 para lograr así un rendimiento significativamente superior.

Diseño modular para una gran variedad de aplicaciones de ARN.

Al combinar el rendimiento de la preparación de bibliotecas de ARN y enriquecimiento con la precisión demostrada de la química de secuenciación por síntesis (SBS)² Illumina RNA Prep with Enrichment admite tanto paneles fijos como personalizados de distintos tamaños, para diseños de estudios avanzados en distintas áreas. Los ejemplos incluyen el panel de exomas de Illumina para el análisis de las regiones de codificación del transcriptoma y el más selectivo panel de oligonucleótidos del virus respiratorio, con unas 7800 sondas diseñadas para detectar virus respiratorios, cepas recientes de gripe y SARS-CoV-2, la nueva cepa de coronavirus (CoV) responsable de la pandemia de COVID-19.

^{*} En el momento de lanzamiento del producto se admitirán hasta 192 UDI. A lo largo de 2020 habrá disponibles otras UDI.

Es posible que sean necesarias la validación y los ajustes del protocolo cuando se combine Illumina RNA Prep with Enrichment y un panel personalizado.

Resumen

Illumina RNA Prep with Enrichment ofrece una solución optimizada y un flujo de trabajo sencillo y rápido para la secuenciación selectiva del ARN. Ofrece una gran flexibilidad en cuanto al tipo de aporte, incluidas muestras degradadas y admite aportes reducidos. Su diseño modular admite una gran variedad de aplicaciones de secuenciación de ARN en todas las regiones de interés, por ejemplo, con el panel de exomas de Illumina y el panel de oligonucleótidos del virus respiratorio, lo que permite estudios de detección y descubrimiento, como la expresión específica de alelos, la detección de fusiones, el cribado de biomarcadores y otros.

Información adicional

Para obtener más información acerca de Illumina RNA Prep with Enrichment y ver las opciones actualmente disponibles para el contenido del panel, consulte www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html

Datos para realizar pedidos

Preparación de bibliotecas	N.º de catálogo
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) tagmentación (16 muestras) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) tagmentación (96 muestras) ^a	20040537
Índices	N.º de catálogo
IDT para índices UD ADN/ARN de Illumina, juego A, tagmentación (96 índices, 96 muestras) ^b	20027213
IDT para índices UD ADN/ARN de Illumina, juego B, tagmentación (96 índices, 96 muestras) ^b	20027214
IDT para índices UD ADN/ARN de Illumina, juego C, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	20042666 Disponibile en breve
IDT para índices UD ADR/ARN de Illumina, juego D, tagmentación (96 índices, 96 muestras)	20042667 Disponibile en breve
Panel de enriquecimiento	N.º de catálogo
Panel de exomas de Illumina	20020183
Illumina Respiratory Virus Oligos Panel v2	20044312 Disponibile en breve

- a. El kit de 16 muestras tiene suficientes reactivos para 1 unidad de plexado, 16 reacciones de enriquecimiento; el kit de 96 muestras tiene suficientes reactivos para 3 unidades de plexado, 32 reacciones de enriquecimiento.
b. "IDT para índices UD DNA/RNA de Illumina" son el nuevo nombre de "IDT para índices UD Nextera de Illumina"; el contenido del kit es el mismo.

Referencias

- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, and Schlimpberger M. **Determinants of RNA quality from FFPE samples.** *PLoS ONE.* 2007;2(12): e1261.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. **Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry.** *Nature.* 2008;456:53-59.