

Illumina RNA Prep with Enrichment

Un flujo de trabajo rápido
e integrado para una detección
precisa y sin sesgos de transcritos

- Consiga una alta sensibilidad con solo 10-20 ng de ARN total de muestras recién obtenidas, congeladas o FFPE
- Prepare librerías en nueve horas con menos de dos horas de tiempo de participación activa
- Multiplexado de hasta 384 muestras en un experimento único con índices dobles únicos



Introducción

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) con secuenciación de nueva generación (NGS, Next-Generation Sequencing) es un potente método para localizar, definir y cuantificar los transcritos de ARN. Las ventajas de los métodos clave de RNA-Seq son, por ejemplo:

- RNA-Seq selectiva que analiza la expresión en un conjunto específico de genes. El enriquecimiento permite el análisis rentable del exoma de ARN mediante captura específica de secuencia de las regiones de codificación del transcriptoma. Es ideal para muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) de baja calidad
- La RNA-Seq total proporciona un método sin sesgos y sin hipótesis para un análisis exhaustivo del transcriptoma. Asimismo, mide de forma precisa la abundancia genética y de transcritos, y detecta las características nuevas y conocidas del ARN codificante y las diversas formas del no codificante
- La secuenciación de ARN mensajero (ARNm) cuantifica de manera exacta y sensible la expresión genética, identifica isoformas conocidas y nuevas en el transcriptoma codificante y mide la expresión específica del alelo

Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation ofrece una solución optimizada para la RNA-Seq selectiva y una gran versatilidad con respecto al tipo y a la cantidad de entrada, para permitir una amplia variedad de aplicaciones de RNA-Seq, posibilitando estudios de detección y descubrimiento, como la expresión específica de alelos, la detección de fusiones, el cribado de biomarcadores y otras. La combinación de Illumina RNA Prep with Enrichment con Illumina Exome Panel ofrece una perspectiva integral del transcriptoma codificante, con lo que se obtiene la mayor capacidad 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 emplea la tagmentation en bolas, seguida de un único paso de hibridación simplificado de 90 minutos para lograr un flujo de trabajo rápido (figura 1). La tagmentation en bolas emplea transposomas vinculados por bolas para el enriquecimiento (eBLT, enrichment Bead-Linked Transposomes) optimizados para el ARN (eBLTL), que producen una reacción de tagmentation uniforme y evitan pasos de fragmentación separados para ahorrar tiempo.

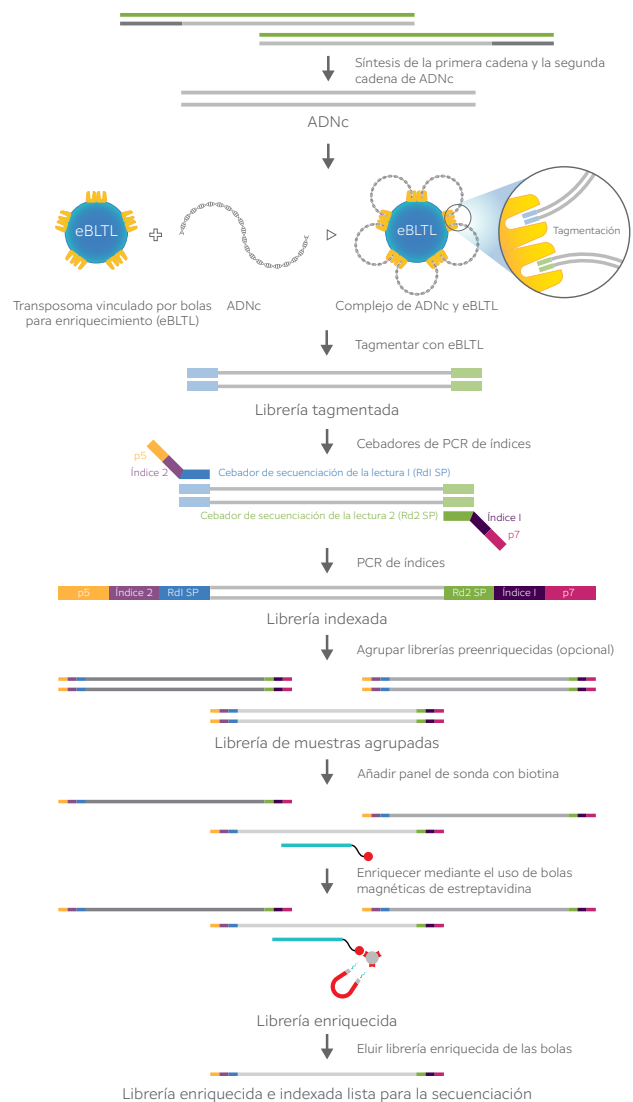


Figura 1: Química de Illumina RNA Prep with Enrichment. Después de la síntesis del ADN complementario (ADNc), se realiza una reacción de tagmentation uniforme con los eBLTL como mediadores, seguida de una reacción de hibridación única de 90 minutos que posibilita un flujo de trabajo rápido y versátil.

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 muy reproducible, un menor riesgo de errores humanos y tiempos de participación activa más reducidos.

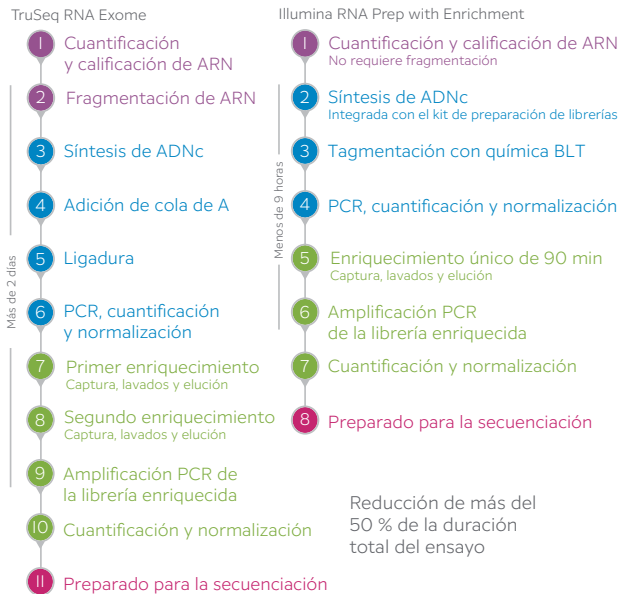


Figura 2: Illumina RNA Prep with Enrichment ofrece un flujo de trabajo rápido. La tagmentación en bolas y un único paso de hibridación de 90 minutos se combinan para lograr flujos de trabajo más rápidos y con menos pasos que TruSeq RNA Exome.

Datos de alta calidad

Datos de alta precisión a partir de muestras con una entrada reducida 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 entrada de ARN procedente de muestras recién obtenidas o congeladas (figura 3). Tumor: las muestras de biopsia normales o las muestras de tejido de archivo FFPE proporcionan una rica fuente de información biológica para la creación de perfiles de expresión genética; sin embargo, su estudio puede ser complejo debido a la degradación de los ácidos nucleicos a causa del proceso de fijación y almacenamiento.¹ Illumina RNA Prep with Enrichment produce datos de calidad con una entrada reducida de ARN de tan solo 20 ng procedente de muestras FFPE. En combinación, estos resultados demuestran que Illumina RNA Prep with Enrichment es una solución ideal para muestras degradadas cuando el material de partida es limitado.

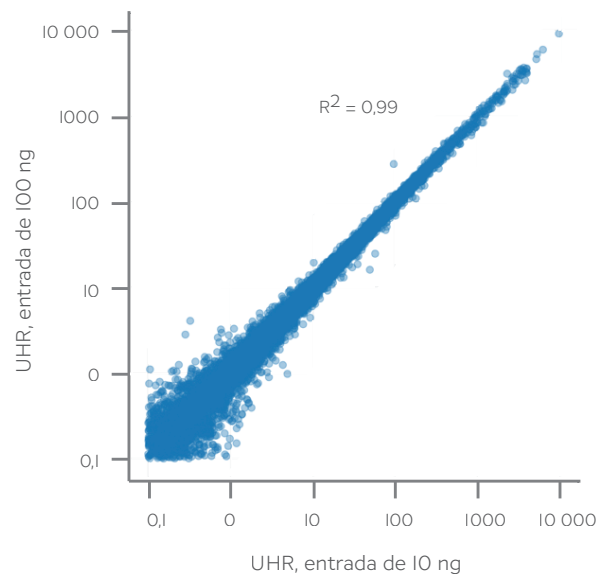


Figura 3: Datos de alta calidad a partir de muestras con un aporte reducido. Illumina RNA Prep with Enrichment logra una alta concordancia de datos entre cantidades de entrada de 10 ng y 100 ng de ARN total de referencia humana universal (UHR). Las librerías de ARN de UHR se secuenciaron en NovaSeq 6000 System, obteniéndose submuestras en grupos de 25 millones por librería. Los datos se analizaron mediante la aplicación BaseSpace RNA-Seq Alignment v1.1.1.

Detección de fusión génica en muestras con una entrada reducida y FFPE.

Para demostrar la capacidad de Illumina RNA Prep with Enrichment para reconocer variantes estructurales dentro de los transcritos de ARN, las muestras recién obtenidas/congeladas y FFPE se enriquecieron usando Illumina Exome Panel y se secuenciaron en NovaSeq™ 6000 System. Los resultados mostraron un índice de llamada del 100 % para las fusiones génicas *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).

Tabla 1: Detección de fusión génica

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

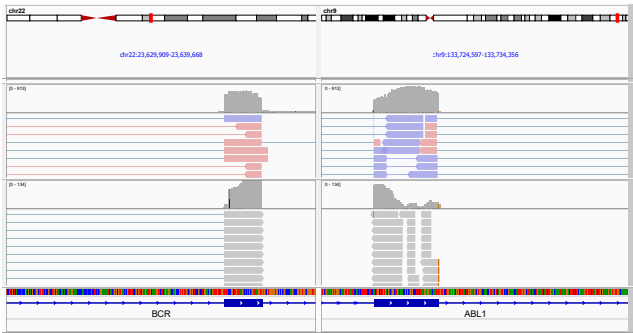


Figura 4: Detección de la fusión génica *BCR-ABL1*. Las librerías preparadas con 10 ng de ARN de la estirpe celular K-562 mediante Illumina RNA Prep with Enrichment e Illumina Exome Panel detectaron correctamente la fusión génica *BCR-ABL1* utilizando Broad Integrative Genomics Viewer (IGV). La pista de alineamiento superior muestra todas las lecturas; la pista inferior muestra solo las lecturas compatibles con la fusión *BCR-ABL1*.

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

RNA-Seq selectiva y asequible

Cobertura exónica excepcional

Illumina RNA Prep with Enrichment se puede utilizar con Illumina Exome Panel, que incluye un conjunto de sondas muy optimizado para proporcionar una cobertura integral de las secuencias de ARN de codificación (tabla 2).

Tabla 2: Especificaciones de Illumina Exome Panel

Especificaciones de cobertura	Illumina Exome Panel
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 %

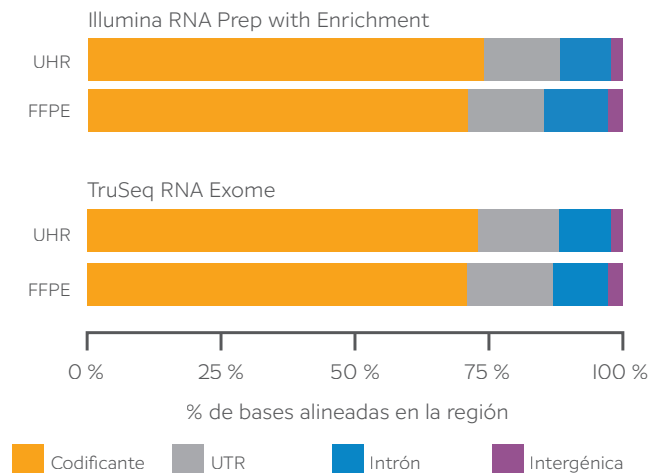


Figura 5: Cobertura de las regiones de codificación con Illumina RNA Prep with Enrichment. Las librerías preparadas a partir de 10 ng de ARN de UHR y 20 ng de ARN FFPE con Illumina RNA Prep with Enrichment e Illumina Exome Panel muestran más del 85 % de los datos alineados a la codificación y a las UTR. Los datos de las librerías de TruSeq RNA Exome se muestran a modo de comparación. Las librerías se secuenciaron en NovaSeq 6000 System a 2 × 100 pb, obteniéndose submuestras de 25 millones de lecturas.

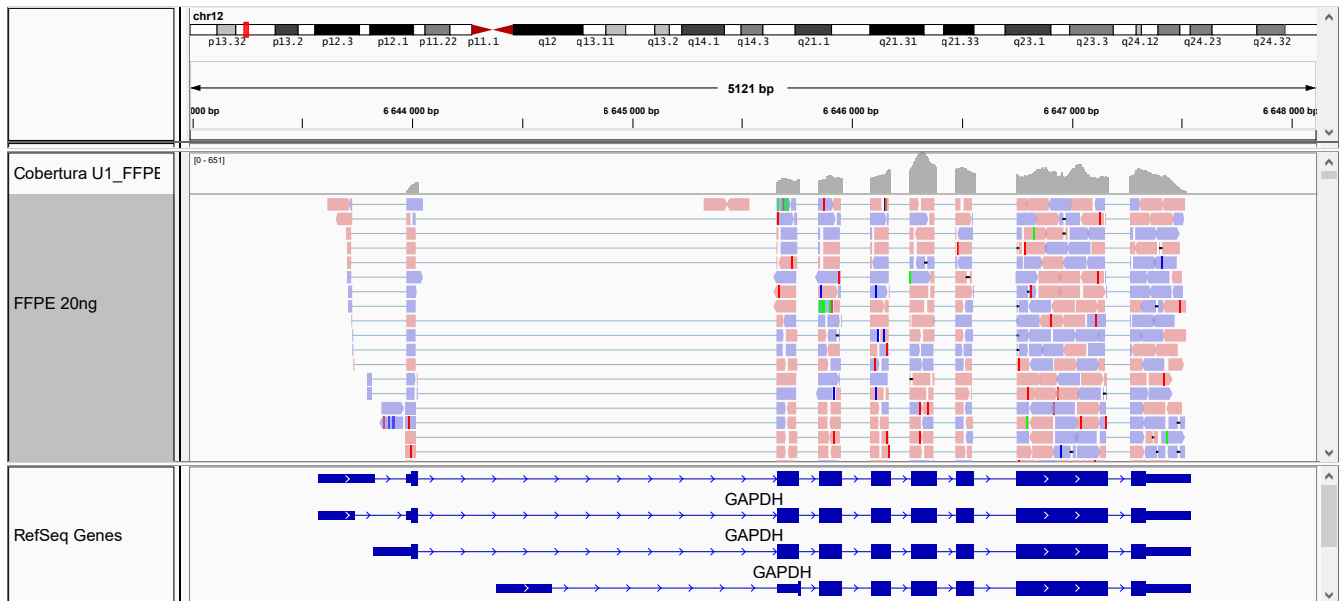


Figura 6: Cobertura de las regiones de codificación de Illumina RNA Prep with Enrichment. Una librería preparada a partir de 20 ng de muestra FFPE de baja calidad y enriquecida con Illumina Exome Panel se secuenció a 25 millones de lecturas. Se muestra la cobertura del gen de control *GAPDH* mediante Broad IGV con las lecturas alineadas en los exones de codificación, donde se demuestra una buena captura de objetivos.

Concordancia con TruSeq RNA Exome

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

Productividad flexible y ampliable

Al combinar Illumina RNA Prep with Enrichment y los sistemas de secuenciación de Illumina de productividad media o alta, incluidos NextSeq™ 550 System y NovaSeq 6000 System, 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 S4 de NovaSeq 6000 para lograr así una productividad significativamente superior.

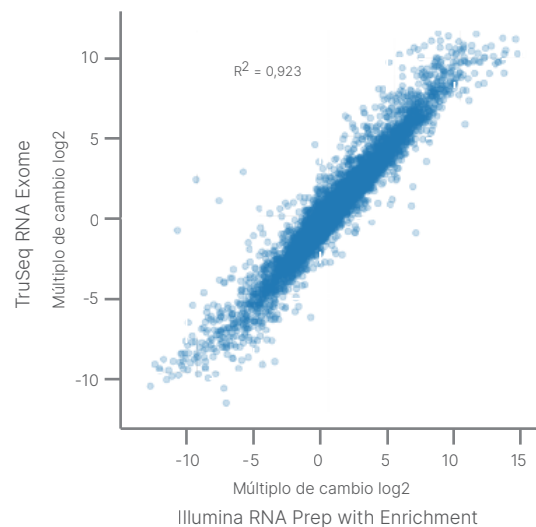


Figura 7: Concordancia con TruSeq RNA Exome. La gráfica de Illumina RNA Prep with Enrichment muestra una elevada concordancia con TruSeq RNA Exome al medirse con un factor de cambio de log₂ para el ARN de UHR (Agilent, n.º de catálogo 740000) frente a ARN de cerebro humano total (ThermoFisher Scientific, n.º de catálogo AM7962). Todas las librerías se prepararon con una entrada de 10 ng. Las librerías de TruSeq RNA Exome se enriquecieron como un plexado de 4 unidades, mientras que en las librerías de Illumina RNA Prep with Enrichment el plexado fue de 3 unidades. Todos los datos se redujeron a 25 millones de grupos por librería. Los datos se analizaron con la aplicación BaseSpace Cufflinks Assembly & DE de BaseSpace v2.1.0.

Diseño modular para una gran variedad de aplicaciones de ARN

Al combinar el rendimiento de la preparación de librerías de ARN y enriquecimiento con la precisión demostrada de la química de secuenciación por síntesis (SBS, Sequencing By Synthesis),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 Illumina Exome Panel, para el análisis de las regiones de codificación del transcriptoma, y Respiratory Virus Oligos Panel, más específico, con unas 7800 sondas diseñadas para detectar virus respiratorios, cepas recientes de gripe y el SARS-CoV-2. Es posible que sea necesario realizar una validación y ajustes en el protocolo cuando se combina 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 RNA-Seq selectiva y una gran flexibilidad en cuanto al tipo de aporte, incluidas muestras degradadas, y admite entradas reducidas. Su diseño modular admite una gran variedad de aplicaciones de RNA-Seq en todas las regiones de interés, p. ej., con Illumina Exome Panel y Respiratory Virus Oligos Panel, 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

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples) ^a	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples) ^b	20040537
Illumina RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091655
Illumina RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091657
Illumina RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091659
Illumina RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20091661
Illumina Exome Panel	20020183
Illumina Respiratory Virus Oligo Panel v2	20044311
Viral Surveillance Panel, RUO (96 reactions)	20088154
Pan-Coronavirus Panel, RUO (96 reactions)	20088155

a. El kit incluye reactivos para 1 unidad de plexado y 16 reacciones de enriquecimiento.
b. El kit incluye reactivos para 3 unidades de plexado y 32 reacciones de enriquecimiento.

Bibliografía

- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, and Schlimpberger M. [Determinants of RNA quality from FFPE samples. PLoS ONE. 2007;2\(12\): e1261. doi: 10.1371/journal.pone.0001261](#)
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature. 2008;456:53-59. doi: 10.1038/nature07517.](#)



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

© 2023 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-02145 ESP v1.0