

TruSeq™ RNA Exome

Una solución reproducible y económica para analizar ARN aislado de muestras de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFEP) y otras de baja calidad.

Puntos destacados

- Obtención de datos de gran calidad de muestras complicadas**
 Evalúa las muestras degradadas, incluidos los tejidos FFPE, para secuenciar el ARN
- Cobertura excepcional con contenido específico**
 Potencia la precisión de descubrimiento a una profundidad de secuenciación reducida al centrarse en regiones codificantes del transcriptoma
- Aporte de muestras reducido**
 Consigue datos de gran calidad con tan solo 10 ng de ARN total
- Solución con un flujo de trabajo integrado y flexible**
 El flujo de trabajo exhaustivo simplifica la secuenciación de la captura del exoma del ARN y permite el plexado sencillo o múltiple de hasta 4 unidades

Esto provoca vistas del transcriptoma significativamente diferentes, lo que a su vez se traduce en una reducción de la fiabilidad de los datos y en un aumento de los requisitos presupuestarios.

Obtención de datos de gran calidad de muestras complicadas

Para afrontar estos retos y facilitar el acceso a información valiosa de muestras FFPE u otras de baja calidad, Illumina ofrece TruSeq RNA Exome, comercializado anteriormente como TruSeq RNA Access Library Prep Kit (figura 1). Con este flujo de trabajo, los investigadores podrán aplicar la tecnología de secuenciación de última generación (NGS, por sus siglas en inglés) en estudios de expresión genética en los que se utilice ARN aislado de muestras de baja calidad. Dado que se centra en las regiones codificantes del ARN, TruSeq RNA Exome precisa menos lecturas y menor aporte de ARN, lo que aumenta la cantidad de muestras por experimento y permite realizar análisis de transcriptomas más rentables.

Cobertura excepcional

TruSeq RNA Exome incluye un conjunto de sondas con un alto grado de optimización que ofrece una cobertura completa de las secuencias codificantes de ARN. TruSeq RNA Exome incluye más de 425 000 sondas, cada una diseñada según el genoma de referencia NCBI37/hg19, que cubren el 98,3 % del exoma RefSeq. El conjunto de sondas se ha diseñado para capturar más de 210 000 objetivos, que abarcan 21 415 genes de interés (tabla 1).

Introducción

Existen millones de muestras de tejidos de archivo FFEP que proporcionan un archivo de información enorme y de valor incalculable para la investigación de enfermedades, especialmente de cáncer. Normalmente, estas muestras van asociadas a datos fenotípicos a largo plazo que pueden generar información sobre cambios de expresión genética que se producen en diversas fases de la enfermedad. Lamentablemente, el proceso de fijación y el almacenamiento de muestras FFEP pueden degradar en gran medida el ARN, lo que dificulta la realización de estudios de creación de perfiles de expresiones genéticas fiables y reproducibles con secuenciación de ARN.^{1,2} Puede extraerse ARN útil de muestras FFEP, pero los métodos de análisis que se utilizan hoy en día generan resultados con un alto grado de variabilidad o precisan una secuenciación exhaustiva y costosa.

Tabla 1: Detalles de cobertura de TruSeq RNA Exome

| Especificaciones de cobertura | TruSeq RNA Exome |
|-------------------------------------|------------------|
| N.º de genes objetivo | 21 415 |
| N.º de regiones exónicas objetivo | 214 126 |
| N.º de sondas | 425 437 |
| Porcentaje de exoma RefSeq cubierto | 98,3 % |

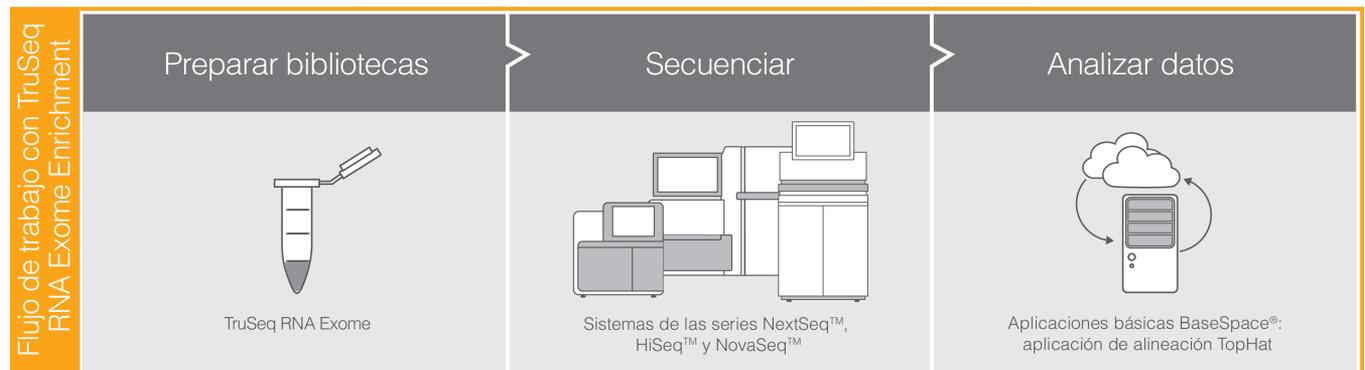


Figura 1: Flujo de trabajo de TruSeq RNA Exome: TruSeq RNA Exome forma parte de una solución integrada de secuenciación de última generación que incluye la preparación simplificada de bibliotecas y la captura de transcriptoma codificante, la secuenciación y el análisis sencillo de los datos.

Contenido específico

TruSeq RNA Exome proporciona una gran eficacia de captura que centra los esfuerzos de secuenciación en el contenido de gran valor de las regiones codificantes del ARN. Para demostrarlo, se prepararon bibliotecas con tumor pulmonar FFEP y muestras normales utilizando TruSeq Stranded Total RNA y TruSeq RNA Exome. La secuenciación y el análisis efectuados con la aplicación de alineación TopHat de BaseSpace revelaron que TruSeq RNA Exome produjo la alineación de más del 85 % de las bases cubiertas con secuencia codificante y regiones no traducidas (UTR) de ARN, en comparación con la cantidad menor al 40 % que se alineó con TruSeq Stranded Total RNA (figura 3). Al trabajar con contenido más específico, TruSeq RNA Exome produce conjuntos de datos más pequeños que permiten un análisis más rápido y una manipulación más sencilla de los datos.

Aporte de muestras reducido

La elevada eficacia de captura y la uniformidad de cobertura minimizan la profundidad de secuenciación necesaria para determinar con precisión y sin sesgos los niveles de expresión. Desde tan solo 10 ng de ARN total, es posible lograr la profundidad de secuenciación necesaria para disfrutar de una cuantificación y detección precisas de transcripciones y fusiones de genes. Esta baja demanda de aporte hace de TruSeq RNA Exome la solución ideal para muestras valiosas con material inicial limitado.

Flujo de trabajo sencillo y flexible

TruSeq RNA Exome está diseñado y totalmente optimizado para proporcionar flexibilidad en las necesidades de multiplexado. Es una solución sencilla y flexible dentro del flujo de trabajo integrado de secuenciación de última generación de Illumina que incluye la preparación de bibliotecas, la secuenciación y el análisis de los datos (figura 1).

Preparación racionalizada de bibliotecas

Las bibliotecas para secuenciación de ARN monocatenario se preparan con el proceso químico acreditado TruSeq. Este método añade oligonucleótidos únicos en cada biblioteca y los etiqueta en grupos sucesivos en un carril (figura 2A). Este paso de agrupación de varias muestras permite cargar más muestras en un único experimento de secuenciación, lo que hace viables los estudios de alto rendimiento. Tras el agrupamiento de las bibliotecas, se lleva a cabo una fase de captura que genera una biblioteca objetivo desprovista de ARN ribosómico y regiones intrónicas o intergénicas. Las bibliotecas agrupadas se hibridan en sondas marcadas con biotina específicas para las regiones codificantes de ARN (figura 2B). A continuación, se capturan los objetivos específicos del grupo añadiendo bolas de estreptavidina que se ligan a las sondas con biotina (figura 2C). Los imanes extraen los fragmentos de ARN ligados de la solución (figura 2D). Dichos fragmentos de ARN capturados se eluyen de las bolas y se hibridan para obtener una segunda reacción de enriquecimiento. Tras la amplificación, se dispondrá de una biblioteca objetivo lista para la generación de grupos y la secuenciación posterior. Los reactivos se suministran en una cantidad suficiente para proporcionar flexibilidad al plexado de muestras, desde secuenciación de una sola unidad a multiplexado de 4 unidades. Los reactivos de mezcla maestra facilitan un inicio rápido y hacen que el proceso sea fácilmente automatizable.

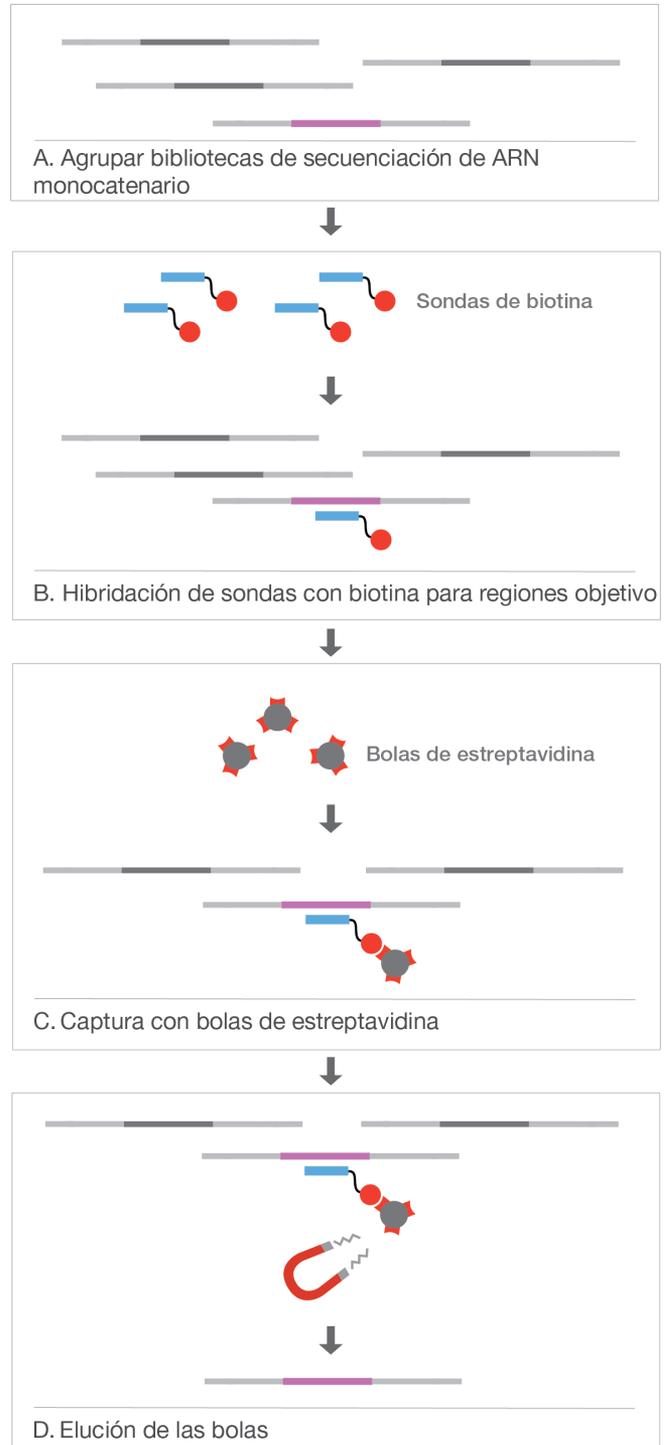
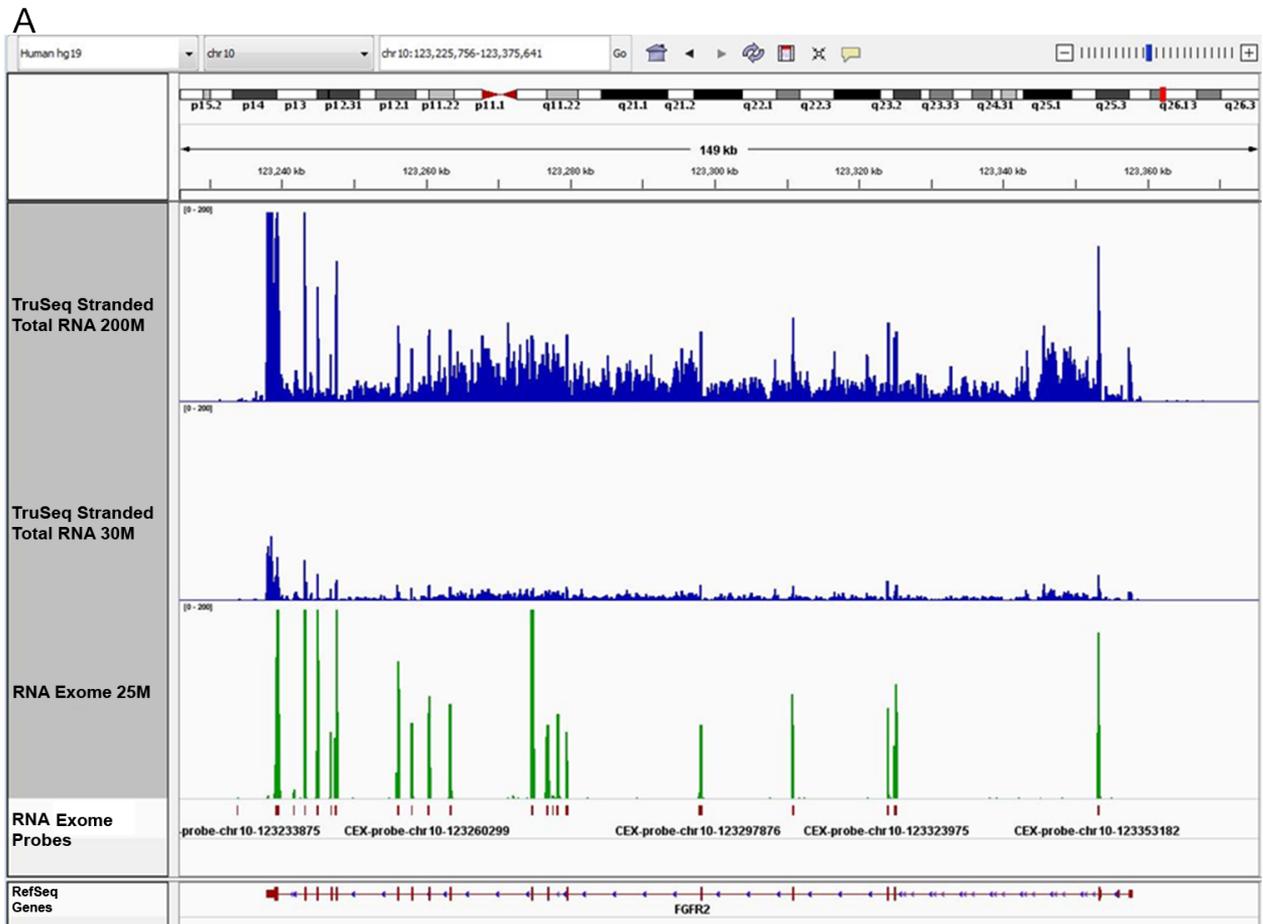


Figura 2: Proceso químico de captura de TruSeq RNA Exome: TruSeq RNA Exome ofrece un protocolo fácil y racionalizado para aislar las regiones objetivo de interés de las muestras.



B

Porcentaje de bases alineadas por región

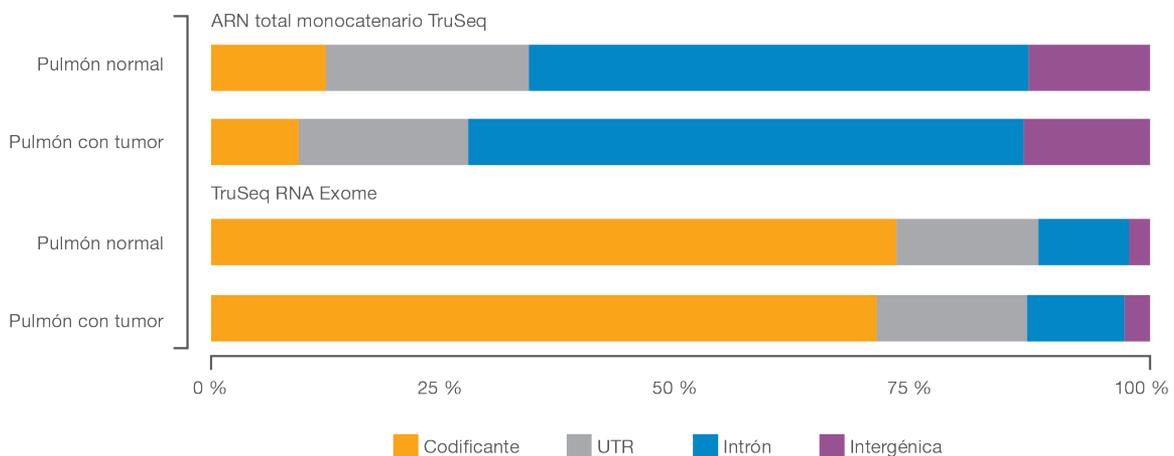


Figura 3: Atención puesta en las regiones codificantes del ARN con TruSeq RNA Exome: Se prepararon muestras de tumor pulmonar FFEP y muestras normales utilizando TruSeq Stranded Total RNA y TruSeq RNA Exome. Las bibliotecas se secuenciaron a 200 millones y 25 millones de lecturas, respectivamente. (A) Las muestras preparadas con TruSeq RNA Exome presentan una cobertura de exones mucho mayor, incluso con 1/8 menos de lecturas. Con el fin de realizar una comparación, se redujeron las lecturas de los datos de las muestras de TruSeq Stranded Total RNA a 30 millones. (B) Usando la aplicación de alineación TopHat de BaseSpace, más del 85 % de los datos generados con TruSeq RNA Exome se alinearon con transcripciones (codificantes y UTR).

Secuenciación rentable

Al centrarse en las regiones codificantes del ARN y combinar TruSeq RNA Exome con instrumentos de alto rendimiento como los de las series NextSeq, HiSeq y NovaSeq, los laboratorios pueden secuenciar 5 veces más muestras por experimento sin sacrificar la calidad de los datos (figuras 3 y 4). TruSeq RNA Exome genera información extremadamente precisa que aumenta el porcentaje de lecturas exónicas útiles en el conjunto de regiones codificantes de ARN muy fragmentado. Las lecturas se centran en las regiones de interés, con lo que el presupuesto se aprovecha de forma eficaz para las lecturas (tabla 2) sin sacrificar la precisión del descubrimiento de fusiones de genes (figura 5).

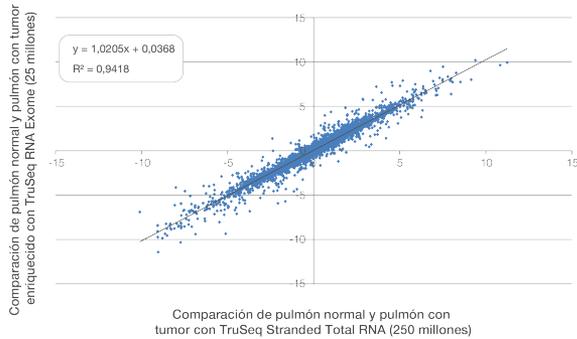


Figura 4: Datos precisos con un pequeño porcentaje de lecturas: Se prepararon bibliotecas con TruSeq RNA Exome (25 millones de lecturas) y TruSeq Stranded Total RNA (250 millones de lecturas) a partir de muestras de tumor pulmonar y muestras normales. El análisis de la expresión diferencial revela que los valores con factor de multiplicación log₂ encuentran una elevada correspondencia en el intervalo analítico completo (R² = 0,9418).

Tabla 2: TruSeq RNA Exome estira el presupuesto de las lecturas

| Sistema de secuenciación | Secuenciación de ARN fresco, congelado o FFEP ^a |
|--|--|
| Proceso químico del sistema MiSeq™ v3 | 1 muestra por experimento |
| Sistema NextSeq 500, celda de flujo de rendimiento medio | 5 muestras por experimento |
| Sistema NextSeq 500, celda de flujo de rendimiento elevado | 16 muestras por experimento |
| Sistema HiSeq 2500, modo de análisis rápido | 24 muestras por experimento |
| Sistema HiSeq 2500, modo de rendimiento elevado | 160 muestras por experimento |
| Sistema NovaSeq 6000, celda de flujo S2 | 132 muestras por experimento |

a. Secuenciado a 25 millones de lecturas por muestra (2 × 75 pb).

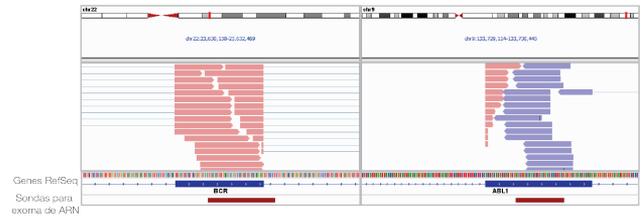


Figura 5: Descubrimiento eficiente de fusiones de genes: TruSeq RNA Exome permite la detección de transcripciones de fusiones expresadas sin la necesidad de diseñar sondas específicas para la unión de fusiones. La fusión BCR-ABL bien definida se detecta eficazmente en la muestra de ARN de referencia humana universal (Universal Human Reference RNA, UHRF) a 25 millones de lecturas.

Análisis de datos cómodo y sencillo

Los conjuntos de datos de TruSeq RNA Exome se pueden analizar utilizando las aplicaciones de software de secuenciación de ARN de BaseSpace Sequence Hub. Estas aplicaciones proporcionan las herramientas para análisis de datos preferidas por los especialistas con una interfaz intuitiva y simple diseñada para personas inexpertas en informática. TopHat 2 posibilita una alineación de alta fiabilidad para mediciones de abundancia, así como para la detección de zonas de unión exón-intrón, fusión de genes y SNP. CuffDiff permite el descubrimiento de transcripciones sensibles y el análisis de expresiones diferenciales. TopHat Fusion ofrece una detección sólida y de alta fiabilidad de fusiones de genes, mientras que el proceso Isaac™ de Illumina brinda llamadas de variantes fiables.³ Los archivos resultantes se pueden utilizar en muchos otros programas de análisis secundarios. Dichas aplicaciones de secuenciación de ARN permiten agregar de forma sencilla informes de varias muestras, recibir notificaciones en dispositivos móviles cuando finalizan los trabajos y organizar de manera eficaz los archivos para colaborar y compartir.

Resumen

Las muestras FFEP ofrecen una gran cantidad de información a la que históricamente ha sido complicado acceder. Como parte de una solución integrada de secuenciación de Illumina, TruSeq RNA Exome proporciona un método reproducible y económico de secuenciación de ARN a partir de muestras FFEP y otras de baja calidad.

Información adicional

Para obtener más información sobre la secuenciación de captura del exoma del ARN, visite

www.illumina.com/techniques/sequencing/ma-sequencing/ma-exome-capture-sequencing.html.

Datos para realizar pedidos

| Producto | N.º de catálogo |
|--|-----------------|
| TruSeq RNA Library Prep for Enrichment (48 muestras) | 20020189 |
| TruSeq RNA Enrichment (hasta 48 muestras a 4 unidades de plexado, 12 enriquecimientos) | 20020490 |
| TruSeq RNA Single Indexes Set A (12 índices, 48 muestras) | 20020492 |
| TruSeq RNA Single Indexes Set B (12 índices, 48 muestras) | 20020493 |
| Exome Panel (45 Mb) | 20020183 |

Referencias

1. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlimpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1261.
2. Penland SK, Keku TO, Torrice C, et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Lab Invest*. 2007;794:383–391.
3. Raczky C, Petrovski R, Saunders CT et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. *Bioinformatics*. 2013;29:2041–2043.