

# Flusso di lavoro semplice e veloce per identificare gli eventi di fusione dell'RNA per la ricerca sul cancro

Utilizzo di Illumina RNA Prep  
with Enrichment per TruSight™  
RNA Fusion Panel e TruSight  
RNA Pan-Cancer Panel



## Introduzione

I trascritti di RNA sono espressi dinamicamente e altamente informativi in relazione all'attività e alla condizione dei tessuti a livello cellulare. Il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq, RNA sequencing) mirato dei campioni di tumore è un metodo efficace per quantificare i trascritti di RNA espressi e per identificare le fusioni geniche rilevanti per la ricerca oncologica. Le cellule tumorali accumulano numerose variazioni genetiche, ma in genere solo poche di queste guidano la progressione del tumore.<sup>1-3</sup> La misurazione dei modelli di espressione genica mediante RNA-Seq consente di differenziare queste mutazioni driver dalle mutazioni passeggero.<sup>1-3</sup> Il rilevamento della fusione genica è importante per la ricerca oncologica, poiché il 20% di tutti i tumori umani manifesta traslocazioni e fusioni geniche.<sup>4-6</sup> La maggior parte delle fusioni geniche ha un impatto significativo sulla tumorigenesi e una forte associazione con il fenotipo morfologico, che sono quindi utili come potenziali biomarcatori.<sup>4-6</sup>

L'attenzione a un sottogruppo di geni rilevanti consente di utilizzare l'RNA-Seq su un sistema di sequenziamento da banco con elevata sensibilità ed analisi efficiente. L'arricchimento, o il sequenziamento con ibridazione-cattura, offre un approccio efficace e completo per i ricercatori che necessitano di informazioni più approfondite sui dati genomici complessi. Questo metodo è eccellente nel rilevamento delle regioni target più grandi ed è altamente sensibile, consentendo l'identificazione di un'ampia gamma di alterazioni genetiche, incluse fusioni note e sconosciute, varianti di splicing e altri biomarcatori critici. Inoltre, l'arricchimento mantiene l'efficacia anche con tipi di campioni più difficili, inclusi quelli fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded) e altre fonti di DNA compromesso.

TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel sono utilizzati per l'RNA-Seq basato sull'arricchimento e consentono ai ricercatori clinici di misurare l'espressione genica e individuare le fusioni geniche oncologicamente rilevanti.<sup>7,8</sup> TruSight RNA Fusion Panel copre 507 geni associati alla fusione, mentre TruSight RNA Pan-Cancer Panel ha come target 1.385 geni per una valutazione completa dei trascritti di RNA correlati al cancro (Tabella 1). Entrambi i pannelli ospitano solo 10 ng di input di RNA totale per RNA di alta qualità o 20 ng per RNA da campioni FFPE.

## Flusso di lavoro semplice e veloce

L'utilizzo di Illumina RNA Prep with Enrichment con i pannelli di oligonucleotidi TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel offre un flusso di lavoro rapido per ottenere risultati mirati per l'espressione genica correlata al cancro e il rilevamento della fusione (Figura 1). Il protocollo ottimizzato di preparazione delle librerie comprende un numero minore di passaggi, tempi di incubazione più brevi e numerosi punti di arresto sicuri con un tempo totale per il saggio di sole nove ore.<sup>9</sup> Illumina RNA Prep with Enrichment utilizza la tecnologia di tagmentazione su microsfere per mediare una reazione di tagmentazione uniforme, eliminando la necessità di fasi di frammentazione separate e consentendo un risparmio in termini di tempo.<sup>9</sup> Questo procedimento è seguito da un'ibridazione semplificata a ciclo singolo per l'arricchimento basato sul pannello sonda. L'arricchimento può essere eseguito in formato a uno o a tre plex. Un programma di reazione a catena della polimerasi (PCR, polymerase chain reaction) a ciclo limitato amplifica esponenzialmente i frammenti arricchiti per aumentare la quantità di librerie. Il sequenziamento viene eseguito su un sistema di sequenziamento da banco Illumina e i dati vengono analizzati utilizzando BaseSpace™ Sequence Hub.



Figura 1: flusso di lavoro dei pannelli per RNA TruSight utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment. La tecnologia RNA-Seq mirata per la ricerca sul cancro con TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel e Illumina RNA Prep with Enrichment segue un flusso di lavoro completo e ottimizzato che include la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati.

Tabella 1: contenuto del pannello per RNA TruSight

Nome pannello	N. di sonde	N. di geni target	N. di regioni esoniche target
TruSight RNA Fusion Panel	21.283	507	7.690
TruSight RNA Pan-Cancer Panel	57.010	1.385	21.043

Questa nota sull'applicazione fornisce agli utenti indicazioni e dati sulle prestazioni per l'uso di Illumina RNA Prep with Enrichment con TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel per identificare l'espressione genica dell'RNA correlata al cancro e gli eventi di fusione.

## Metodi

### Preparazione librerie

Le prestazioni di TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, n. di catalogo 20046101) e di TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina, n. di catalogo 20046104) con Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, n. di catalogo 20040536) sono state testate utilizzando tipi di campione sia di RNA di alta qualità (Tabella 2) sia di RNA FFPE (Tabella 3), con arricchimento sia a uno sia a tre plex.

I campioni di RNA di alta qualità utilizzati per lo studio di arricchimento a un plex erano RNA di riferimento umano universale (UHR, Universal Human Reference) (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo QS0639), RNA totale dalla linea cellulare per la leucemia umana K562 (ATCC, n. di catalogo CCL-243) e RNA di riferimento di cervello umano (HBRR, Human Brain Reference RNA) (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo QS0611) sia a 10 ng sia a 100 ng di input. I campioni FFPE utilizzati per lo studio di arricchimento a un plex erano il campione di cancro del colon "FFPE-A", il campione di cancro del polmone "FFPE-B", il campione primario di cancro sconosciuto "FFPE-C" e il campione di linfoma "FFPE-D" a 20 ng di input. Da ciascun tipo di campione sono state generate almeno tre librerie di replicati, utilizzate per formare reazioni di arricchimento a un plex. Per ciascun tipo di campione con arricchimento a un plex sono stati analizzati pannelli di oligonucleotidi sia TruSight RNA Fusion Panel sia TruSight RNA Pan-Cancer Panel.

I campioni di RNA utilizzati per lo studio di arricchimento a tre plex erano RNA di riferimento umano universale e RNA totale K562 di alta qualità a 10 ng di input e il campione di cancro del colon "FFPE-E" a 20 ng di input. Da ciascun tipo di campione sono state generate tre librerie di replicati, utilizzate per formare reazioni di arricchimento a tre plex. Per ciascun tipo di campione con arricchimento a tre plex sono stati analizzati pannelli di oligonucleotidi sia TruSight RNA Fusion Panel sia TruSight RNA Pan-Cancer Panel.

Tabella 2: campioni di RNA di alta qualità

Descrizione	Nota	Quantità di input
RNA di riferimento umano universale	Derivato da una miscela brevettata di 10 linee cellulari umane	10 ng, 100 ng
RNA totale di K562	Derivato da una linea cellulare di leucemia mielogena cronica	10 ng, 100 ng
RNA di riferimento di cervello umano	Derivato da un pool di multidonatori di tessuti di cervello umano	10 ng, 100 ng

Tabella 3: campioni di RNA FFPE

Campione	Tessuto	Diagnosi	DV <sub>200</sub> <sup>a</sup>	Quantità di input
FFPE-A	Pellet cellulare	Cancro al colon	81,9	20 ng
FFPE-B	Polmone	Cancro del polmone	45,5	20 ng
FFPE-C	Sconosciuto	Cancro primario sconosciuto o non specificato	36,5	20 ng
FFPE-D	Sconosciuto	Linfoma	56,1	20 ng
FFPE-E	Sconosciuto	Cancro al colon	59,7	20 ng

a. DV<sub>200</sub> è la percentuale di frammenti di RNA maggiori di 200 nucleotidi. Valori DV<sub>200</sub> forniti dall'archivio dei campioni.

Le librerie sono state preparate seguendo la guida di riferimento per la tagmentazione Illumina RNA Prep with Enrichment (L) (Illumina, documento n. 1000000124435 v03) utilizzando TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel per le fasi di arricchimento.

## Sequenziamento

Le librerie preparate sono state diluite a una concentrazione di caricamento finale di 1,8 pM, secondo la Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie di NextSeq™ 550 System (Illumina, documento n. 15048776 v18) e sequenziate su NextSeq 550 System a una lunghezza di lettura di 2 × 74 bp utilizzando NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20024907) a una profondità di almeno tre milioni di letture per campione. Nota: tre milioni di letture per campione erano la profondità di sequenziamento minima scelta per questo studio per esaminare le metriche al margine inferiore delle prestazioni. Molte applicazioni dei clienti sfruttano una maggiore profondità di sequenziamento, arrivando fino a 30 milioni di letture per campione.

## Analisi dei dati

I risultati di copertura e allineamento dei trascritti sono stati generati utilizzando l'app Illumina RNA-Seq Alignment v2.0.2 su BaseSpace Sequence Hub. I risultati dell'analisi dell'espressione sono stati generati utilizzando l'app DRAGEN™ RNA v4.2.4. I risultati dell'arricchimento di letture "padded" (PRE, padded read enrichment) e dell'arricchimento di letture "padded"

(PURE, padded unique read enrichment) sono stati generati utilizzando l'app DRAGEN Enrichment v4.2.4. Il rilevamento della fusione è stato verificato utilizzando sia l'app RNA-Seq Alignment v2.0.2 sia l'app DRAGEN RNA v4.2.4. I dati sono stati sottocampionati a un milione di letture per campione (per l'arricchimento a un plex) o a quattro milioni di letture per campione (per l'arricchimento a tre plex) per normalizzare le differenze di caricamento.

## Risultati

### Deplezione di trascritti abbondanti

Gli output dell'app RNA-Seq Alignment includono una stima della percentuale di RNA proveniente da specie di trascritti altamente abbondanti come l'RNA ribosomiale (rRNA, ribosomal RNA), tipicamente di basso valore informativo. Durante la fase di arricchimento, queste abbondanti specie di trascritti sono sottoposte a deplezione nel flusso di lavoro di Illumina RNA Prep with Enrichment. Sia con la preparazione a un plex sia con la preparazione a tre plex, abbondanti specie di trascritti vengono ridotte a meno del 20% delle letture e, frequentemente, a meno del 10% delle letture (Figura 2).

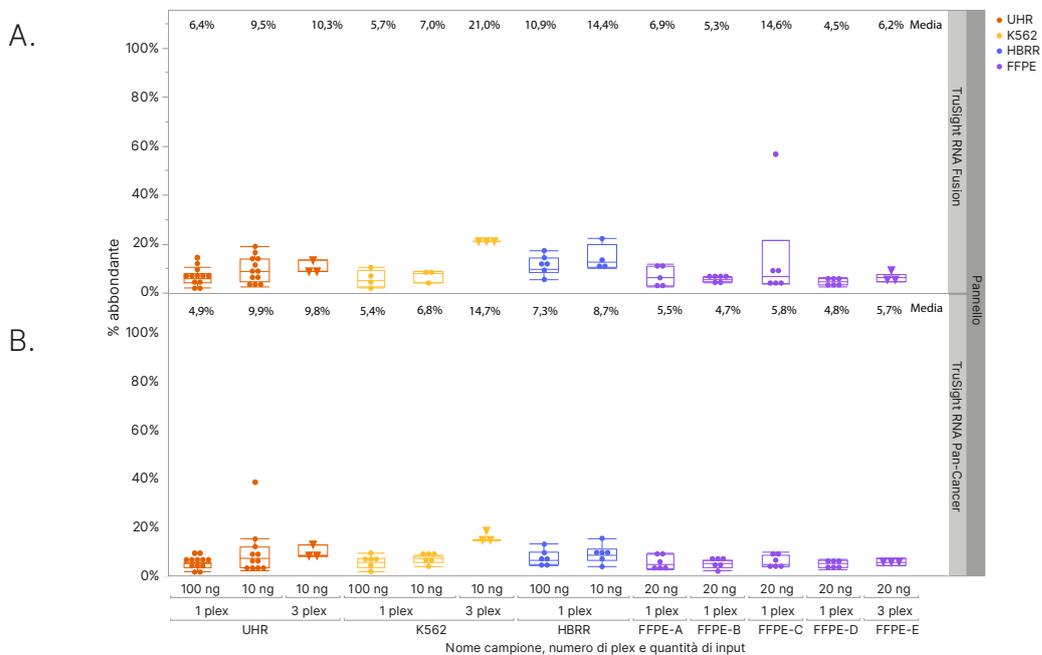


Figura 2: deplezione efficace di specie di RNA abbondanti utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment. Utilizzando i pannelli di oligonucleotidi (A) TruSight RNA Fusion Panel e (B) TruSight RNA Pan-Cancer Panel per l'arricchimento, meno del 20% dei trascritti di RNA sequenziati era un trascritto di rRNA o un altro trascritto altamente abbondante. UHR, RNA di riferimento umano universale; HBRR, RNA di riferimento di cervello umano.

Percentuale di duplicati

La percentuale di letture duplicate rappresenta la percentuale di letture totali che corrispondono a duplicati di frammenti di campione unici (spesso duplicati PCR). In genere si preferiscono i duplicati con un valore percentuale inferiore, perché consentono di utilizzare in modo efficiente la larghezza di banda di sequenziamento. In questo studio, le letture sono state normalizzate a tre milioni di letture per campione, dove i duplicati con un valore percentuale inferiore indicano un aumento del contenuto di letture uniche. In questo caso, le percentuali di duplicazione sono correlate alla qualità del campione di RNA di input e alla dimensione del pannello di oligonucleotidi (Figura 3). Il pannello ridotto fornito da TruSight RNA Fusion Panel produce più duplicati per campione rispetto a TruSight RNA Pan-Cancer Panel, poiché questo contiene più target unici che possono essere catturati. Per le librerie arricchite a un plex, i campioni di RNA di alta qualità presentano una percentuale di duplicati inferiore rispetto alla maggior parte dei campioni FFPE e ciò è dovuto alla qualità del campione di input. Per le librerie arricchite a tre plex, i campioni UHR mostrano una percentuale di duplicazione media pari al massimo al 32%, mentre i campioni FFPE-E e della linea cellulare K562 mostrano percentuali di duplicazione più elevate, indice di un contenuto di letture meno unico nella libreria finale.

Arricchimento lettura

Elevati valori di arricchimento delle letture dimostrano che le sonde del pannello hanno catturato in modo efficiente le librerie target durante l'arricchimento, riducendo il sequenziamento di regioni fuori target indesiderate. Due misure di arricchimento sono PRE e PURE. La metrica PRE si riferisce alla percentuale di letture che mappano le regioni target del pannello o le loro immediate vicinanze (regioni "padded"), incluse le letture duplicate. La metrica PURE esclude le letture duplicate e può apparire inferiore quando la proporzione di letture duplicate è elevata (Figura 4). La metrica PRE è considerata più utile per alcune applicazioni RNA-Seq.

Per lo studio di arricchimento a un plex, l'arricchimento tra i campioni di RNA di alta qualità era generalmente superiore al 70% per entrambe le metriche, indice di un arricchimento riuscito. Ciò è emerso per i campioni con input sia alto sia basso. L'efficacia dell'arricchimento dei campioni FFPE era elevata per tutti i campioni per la metrica PRE e altamente variabile per la metrica PURE, ma in media superiore al 50%. Questa variabilità è correlata al numero di letture duplicate per campione, come indicato dal gradiente di colore sul grafico (Figura 4). Per lo studio di arricchimento a tre plex, la metrica PRE per RNA di alta qualità è superiore al 70% e per FFPE è superiore al 90%; ciò suggerisce un arricchimento sufficiente sia con TruSight RNA Fusion Panel sia con TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Figura 4).

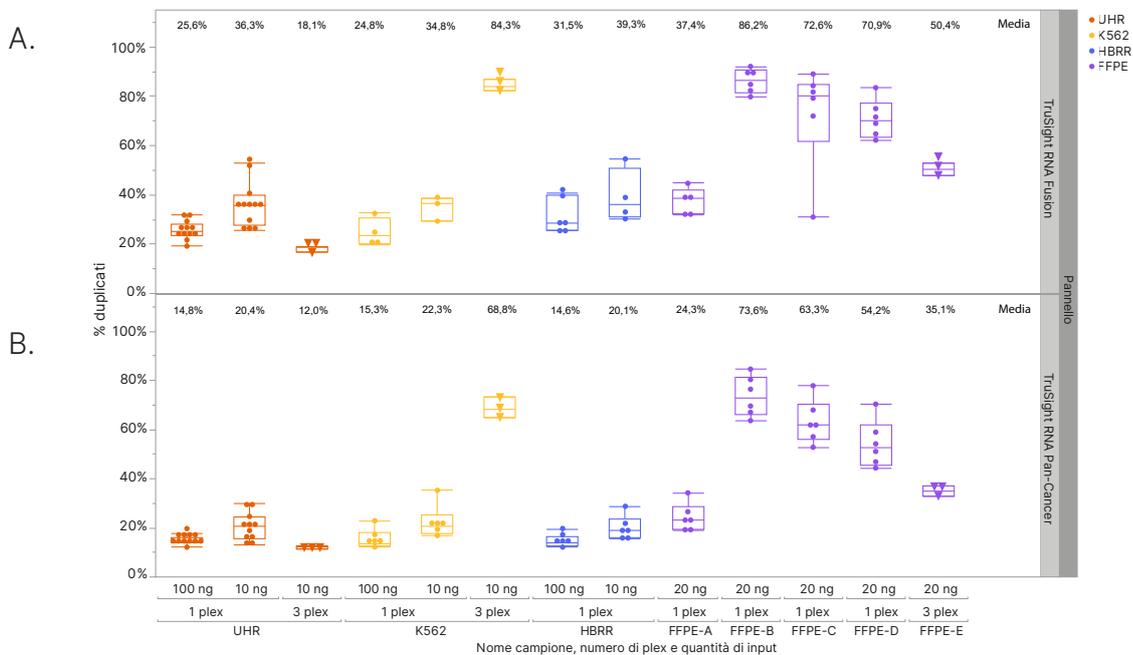


Figura 3: percentuale di duplicati utilizzando i pannelli per RNA TruSight e Illumina RNA Prep with Enrichment. Utilizzando i pannelli di oligonucleotidi (A) TruSight RNA Fusion Panel e (B) TruSight RNA Pan-Cancer Panel per l'arricchimento, le percentuali di duplicazione sono correlate alla qualità del campione di RNA di input e alla dimensione del pannello di oligonucleotidi.

Rilevamento fusione genica

TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel hanno consentito un rilevamento affidabile della fusione genica (Tabella 4). Il campione di RNA della linea cellulare K562 contenente la fusione *BCR-ABL1* è stato utilizzato come tipo di campione applicabile per analizzare il rilevamento con Illumina RNA Prep with Enrichment. I risultati hanno mostrato una percentuale di identificazione del 100% per la fusione genica *BCR-ABL1* nella linea cellulare K562 su sei replicati (10 ng e 100 ng, arricchimento a un plex) e tre replicati (10 ng, arricchimento a tre plex) quando analizzati con l'app DRAGEN RNA v4.2.4 e l'app BaseSpace Sequence Hub RNA-Seq Alignment v2.0.2.

Copertura dell'esone

L'analisi dei dati con l'app DRAGEN Enrichment ha rivelato che Illumina RNA Prep with Enrichment ha prodotto più dell'85% delle basi coperte, allineandosi alla sequenza codificante e alle regioni non tradotte (UTR, untranslated region) di RNA. Questi risultati dimostrano un'elevata efficacia di cattura che concentra gli sforzi del sequenziamento su contenuti di valore elevato delle regioni codificanti dell'RNA (Figura 5).

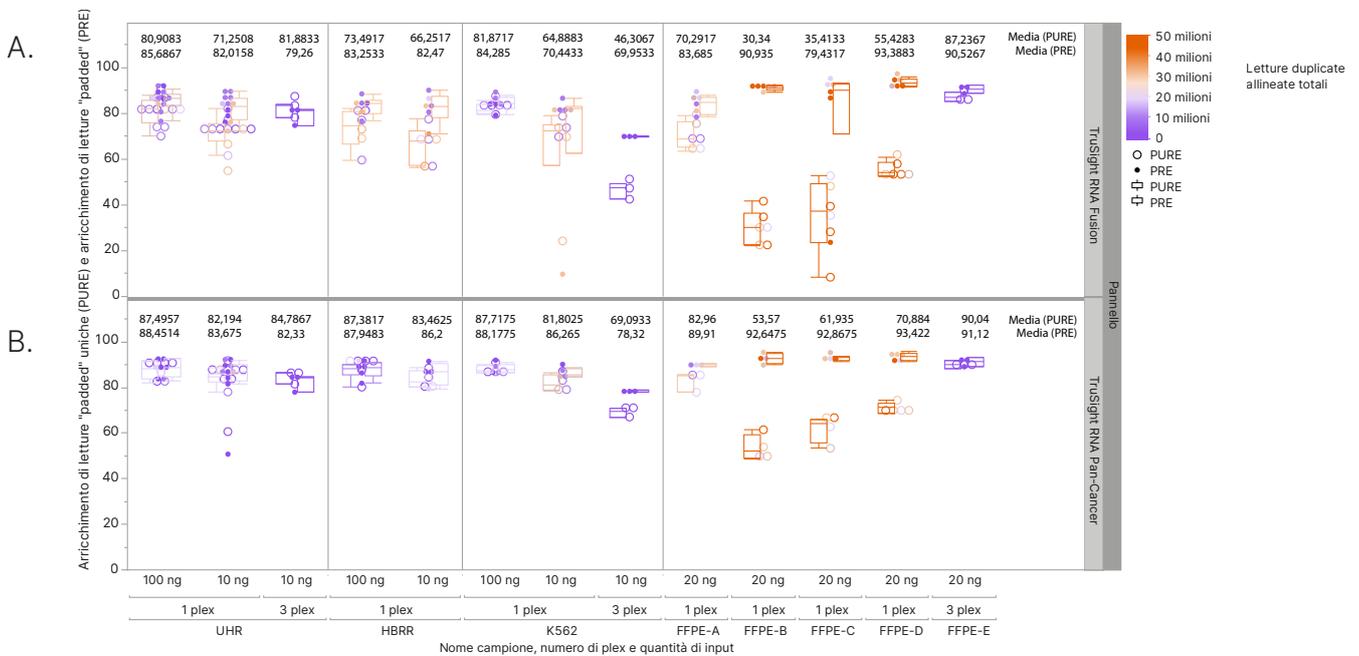


Figura 4: elevata efficienza di arricchimento utilizzando i pannelli per RNA TruSight e Illumina RNA Prep with Enrichment. L'arricchimento mediante i pannelli di oligonucleotidi (A) TruSight RNA Fusion Panel e (B) TruSight RNA Pan-Cancer Panel ha mostrato un'elevata efficienza tra i tipi di campione con PRE, una metrica che include duplicati. PURE, una metrica che esclude i duplicati, non è utile per le applicazioni RNA-Seq. I campioni con elevate percentuali di duplicati mostrano un'elevata variabilità di PURE. Qui, il conteggio delle letture duplicate è codificato a colori da 0 (viola) a 50 milioni (arancione). L'analisi DRAGEN Enrichment viene eseguita senza rimuovere le letture duplicate (ovvero, la casella di opzione predefinita "Mark Duplicates" (Contrassegna duplicati) deve essere deselezionata nell'app). Per produrre l'analisi di arricchimento per TruSight RNA Fusion Panel e TruSight RNA Pan-Cancer Panel utilizzando l'app DRAGEN Enrichment, il file \*.bed deve essere caricato manualmente per ciascun pannello in BaseSpace Sequence Hub.

Tabella 4: rilevamento della fusione genica utilizzando i pannelli per RNA TruSight e Illumina RNA Prep with Enrichment

Fusione (fonte)	Pannello	Arricchimento	Input RNA	Rilevamento RNA-Seq Align v2.0.2	Rilevamento DRAGEN RNA v4.2.4
<i>BCR-ABL1</i> (K562)	TruSight RNA Fusion	1 plex	10 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
			100 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
	TruSight RNA Pan-Cancer	3 plex	10 ng	3/3 (100%)	3/3 (100%)
			10 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
		1 plex	100 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
			3 plex	10 ng	3/3 (100%)

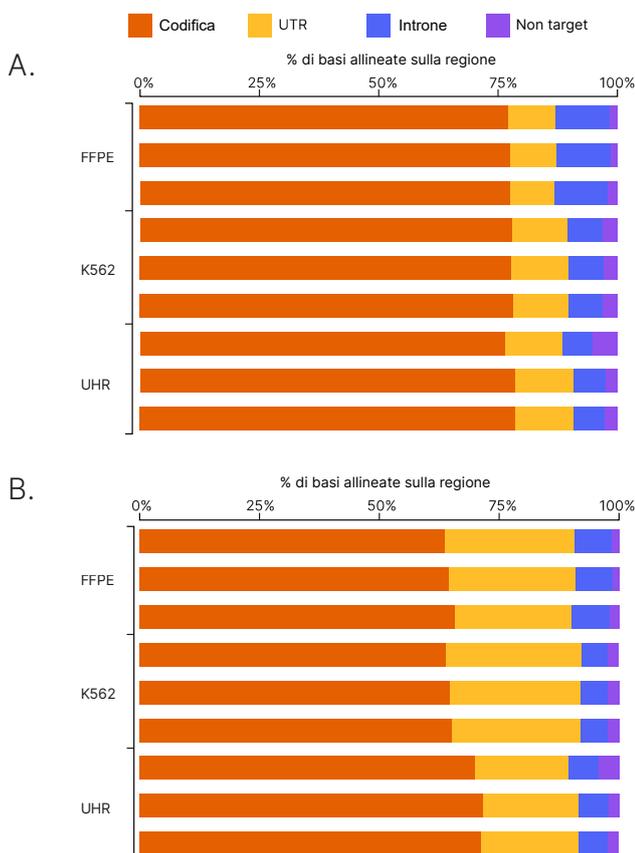


Figura 5: copertura delle regioni codificanti con i pannelli per RNA TruSight e Illumina RNA Prep with Enrichment. Utilizzando i pannelli di oligonucleotidi (A) TruSight RNA Fusion Panel e (B) TruSight RNA Pan-Cancer Panel per l'arricchimento si ottiene un'elevata efficacia di cattura che si allinea alla sequenza codificante e alle regioni non tradotte (UTR).

## Riepilogo

Concentrandosi sui geni di interesse principali, il sequenziamento dell'RNA target consente ai ricercatori di studiare il contenuto dello studio di valore elevato arricchito con trascritti associati al cancro. Illumina RNA Prep with Enrichment e TruSight RNA Fusion Panel o TruSight RNA Pan-Cancer Panel presentano risultati altamente riproducibili con la sensibilità analitica necessaria per rilevare trascritti e fusioni rari. Questo flusso di lavoro ha fornito prestazioni solide per entrambi i pannelli, anche con livelli di input di RNA inferiori o RNA di qualità inferiore. Ciò si traduce in un flusso di lavoro semplice e veloce per l'analisi dell'RNA target a vantaggio dei ricercatori oncologici.

## Maggiori informazioni

[TruSight RNA Fusion Panel](#)

[TruSight RNA Pan-Cancer Panel](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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

## Bibliografia

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/](http://mitelmandatabase.isb-cgc.org/). Aggiornato il 15 ottobre 2024. Consultato il 20 novembre 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](http://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). Pubblicato nel 2020. Aggiornato nel 2023. Consultato il 7 settembre 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](http://illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf). Pubblicato nel 2017. Consultato il 7 settembre 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](http://illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-pan-cancer-data-sheet-1170-2015-004.pdf). Pubblicato nel 2015. Consultato il 7 settembre 2024.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
 techsupport@illumina.com | [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2025 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
 M-GL-03103 ITA v1.0