

Fluxo de trabalho fácil e rápido para identificar eventos de fusão de RNA para pesquisa de câncer

Usando o Illumina RNA Prep
with Enrichment for TruSight™
RNA Fusion e TruSight RNA
Pan-Cancer Panels



Introdução

As transcrições de RNA são expressas dinamicamente e são altamente informativas sobre a atividade e a condição dos tecidos no nível celular. O sequenciamento de RNA direcionado (RNA-Seq) de amostras tumorais é um método avançado para quantificar transcrições de RNA expressas e identificar fusões de genes relevantes para pesquisa de câncer. As células cancerosas acumulam numerosas alterações genéticas, mas normalmente apenas algumas alterações impulsionam a progressão do tumor.¹⁻³ A medição de padrões de expressão gênica usando RNA-Seq pode ajudar a diferenciar essas mutações condutoras de mutações passageiras.¹⁻³ A detecção de fusão gênica é importante para a pesquisa do câncer, pois 20% de todos os tumores humanos carregam translocações e fusões de genes.⁴⁻⁶ A maioria das fusões de genes tem um impacto significativo na tumorigênese e uma forte associação com fenótipo morfológico, tornando-as úteis como possíveis biomarcadores.⁴⁻⁶

O foco em um subconjunto de genes relevantes permite o RNA-Seq em um sistema de sequenciamento de bancada com alta sensibilidade e análise eficiente. O enriquecimento, ou sequenciamento de captura híbrida, oferece uma abordagem completa e abrangente para pesquisadores que exigem insights mais profundos sobre dados genômicos complexos. Esse método se destaca na detecção de regiões-alvo maiores e é altamente sensível, permitindo a identificação de uma ampla variedade de alterações genéticas, incluindo fusões conhecidas e desconhecidas, variantes de splice e outros biomarcadores críticos. Além disso, o enriquecimento mantém a eficácia mesmo com tipos de amostras desafiadoras, incluindo amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) e outras fontes de DNA comprometidas.

O TruSight RNA Fusion Panel e o TruSight RNA Pan-Cancer Panel são usados para RNA-Seq baseado em enriquecimento para ajudar pesquisadores clínicos a medir a expressão gênica e detectar fusões gênicas relevantes para o câncer.^{7,8} O TruSight RNA Fusion Panel abrange 507 genes associados à fusão e o TruSight RNA Pan-Cancer Panel tem como alvo 1.385 genes para avaliação abrangente de transcrições de RNA relacionadas ao câncer ([Tabela 1](#)). Ambos os painéis acomodam apenas 10 ng de entrada total de RNA para RNA de alta qualidade ou 20 ng para RNA de amostras FFPE.

Fluxo de trabalho fácil e rápido

O uso do Illumina RNA Prep with Enrichment com os painéis de oligos TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer oferece um fluxo de trabalho rápido para obter resultados focados para expressão gênica relacionada ao câncer e detecção de fusão ([Figura 1](#)). O protocolo simplificado de preparação de bibliotecas apresenta menos etapas, tempos de incubação mais curtos e vários pontos de interrupção seguros com um tempo total de ensaio de apenas nove horas.⁹ O Illumina RNA Prep with Enrichment usa tecnologia de tagmentação em beads para mediar uma reação de tagmentação uniforme, eliminando a necessidade de etapas de fragmentação separadas e economizando tempo.⁹ Isso é seguido por hibridização simplificada de ciclo único para enriquecimento baseado em painel de sonda. O enriquecimento pode ser realizado no formato de 1-plex ou 3-plex. Um programa de PCR de ciclo limitado amplifica exponencialmente os fragmentos enriquecidos para aumentar a quantidade de biblioteca. O sequenciamento é realizado em um sistema de sequenciamento de bancada da Illumina e os dados são analisados usando o BaseSpace™ Sequence Hub.

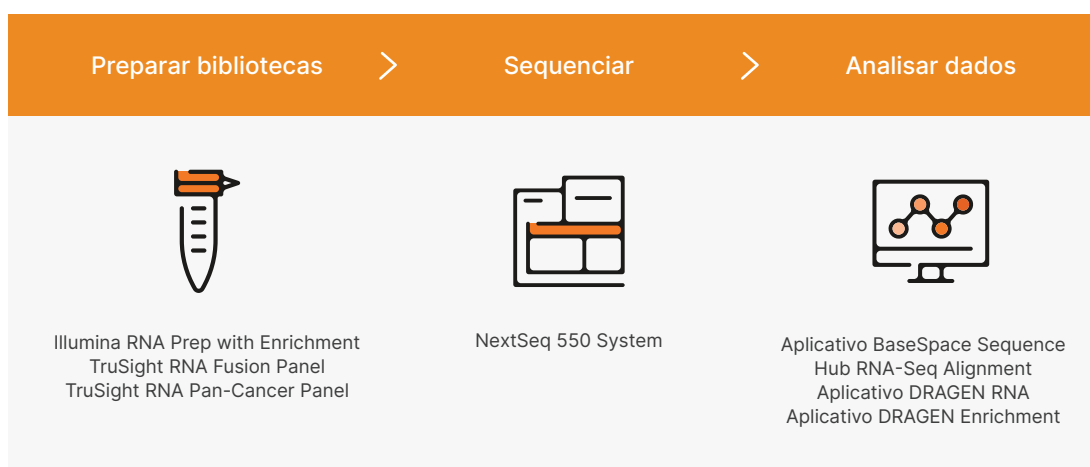


Figura 1: Fluxo de trabalho dos painéis TruSight RNA usando o Illumina RNA Prep with Enrichment — O RNA-Seq direcionado para pesquisa de câncer com os painéis TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer e o Illumina RNA Prep with Enrichment segue um fluxo de trabalho abrangente simplificado, incluindo preparação de bibliotecas, sequenciamento e análise de dados.

Tabela 1: Conteúdo do painel TruSight RNA

Nome do painel	Nº de sondas	Nº de genes alvo	Nº regiões exônicas alvo
TruSight RNA Fusion Panel	21.283	507	7.690
TruSight RNA Pan-Cancer Panel	57.010	1.385	21.043

Esta nota de aplicação fornece aos usuários dados de orientação e desempenho para uso do Illumina RNA Prep with Enrichment com os painéis TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer para identificar eventos de expressão gênica e fusão de RNA relacionados ao câncer.

Métodos

Preparação de bibliotecas

O desempenho do TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, Nº catálogo 20046101) e do TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina, Nº catálogo 20046104) com Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, Nº catálogo 20040536) foi testado usando tipos de amostras de RNA de alta qualidade (Tabela 2) e RNA FFPE (Tabela 3), em enriquecimento de 1-plex e 3-plex.

As amostras de RNA de alta qualidade usadas para o estudo de enriquecimento de 1-plex foram RNA de referência humana universal (UHR) (Thermo Fisher Scientific, Nº catálogo QS0639), RNA total da linhagem celular de leucemia humana K562 (ATCC, Nº catálogo CCL-243) e RNA de referência cerebral humano (HBRR) (Thermo Fisher Scientific, Nº catálogo QS0611) em entradas de 10 ng e 100 ng. As amostras FFPE usadas para o estudo de enriquecimento de 1-plex foram a amostra de câncer de cólon “FFPE-A”, a amostra de câncer de pulmão “FFPE-B”, a amostra primária de câncer desconhecido “FFPE-C” e a amostra de linfoma “FFPE-D” em entradas de 20 ng. Pelo menos três bibliotecas replicadas foram geradas de cada tipo de amostra e usadas para formar reações de enriquecimento de 1-plex. Os painéis de oligos TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer foram testados para cada tipo de amostra em enriquecimento de 1-plex.

As amostras de RNA usadas para o estudo de enriquecimento de 3-plex foram RNA de referência humana universal de alta qualidade e RNA total K562 em entradas de 10 ng, e a amostra de câncer de cólon “FFPE-E” em entrada de 20 ng. Três bibliotecas replicadas foram geradas de cada tipo de amostra e usadas para formar reações de enriquecimento de 3-plex. Os painéis de oligos TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer foram testados para cada tipo de amostra em enriquecimento de 3-plex.

Tabela 2: Amostras de RNA de alta qualidade

Descrição	Observação	Quantidade de entrada
RNA de referência humana universal	Derivado de uma mistura proprietária de 10 linhagens celulares humanas	10 ng, 100 ng
RNA total K562	Derivado de uma linhagem celular de leucemia mieloide crônica	10 ng, 100 ng
RNA de referência cerebral humano	Derivado de um pool multidoador de tecidos cerebrais humanos	10 ng, 100 ng

Tabela 3: Amostras de RNA FFPE

Amostra	Tecido	Diagnóstico	DV ₂₀₀ ^a	Quantidade de entrada
FFPE-A	Sedimento celular	Câncer de cólon	81,9	20 ng
FFPE-B	Pulmão	Câncer de pulmão	45,5	20 ng
FFPE-C	Desconhecido	Análise primária de câncer desconhecido ou não especificado	36,5	20 ng
FFPE-D	Desconhecido	Linfoma	56,1	20 ng
FFPE-E	Desconhecido	Câncer de cólon	59,7	20 ng

a. DV₂₀₀ é a porcentagem de fragmentos de RNA > 200 nucleotídeos. Valores de DV₂₀₀ fornecidos pelo repositório de amostras.

As bibliotecas foram preparadas seguindo o guia de referência Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, Nº documento 1000000124435 v03) usando os painéis TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer para as etapas de enriquecimento.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram diluídas até uma concentração de carga final de 1,8 pM, de acordo com o Guia de bibliotecas de desnaturação e diluição do NextSeq™ 550 System (Illumina, N° documento [15048776 v18](#)) e sequenciadas no NextSeq 550 System com comprimento da leitura de 2 × 74 bp usando o NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 ciclos) (Illumina, N° catálogo 20024907) a uma profundidade de ≥ 3 milhões de leituras por amostra. Observe que 3 milhões de leituras por amostra foi a profundidade mínima de sequenciamento escolhida para este estudo para examinar métricas no limite inferior do desempenho. Muitas aplicações de clientes se beneficiam de maior profundidade de sequenciamento, até 30 milhões de leituras por amostra.

Análise de dados

Os resultados de cobertura e alinhamento de transcrição foram gerados usando o aplicativo Illumina RNA-Seq Alignment v2.0.2 no BaseSpace Sequence Hub. Os resultados da análise de expressão foram gerados usando o aplicativo DRAGEN™ RNA v4.2.4. Os resultados do enriquecimento de leitura “padded” (PRE) e do enriquecimento exclusivo de leitura “padded” (PURE)

foram gerados usando o aplicativo DRAGEN Enrichment v4.2.4. A detecção de fusão foi verificada usando o aplicativo RNA-Seq Alignment v2.0.2 e o aplicativo DRAGEN RNA v4.2.4. Os dados tiveram a amostra reduzida para um milhão de leituras por amostra (para o enriquecimento de 1-plex) ou para quatro milhões de leituras por amostra (para o enriquecimento de 3-plex) para normalizar as diferenças de carga.

Resultados

Depleção de transcrições abundantes

Os resultados do aplicativo RNA-Seq Alignment incluem uma estimativa da proporção de RNA de espécies de transcrição altamente abundantes, como RNA ribossômico (rRNA), que normalmente têm baixo valor de informação. Essas espécies de transcrição abundantes são depletadas no fluxo de trabalho do Illumina RNA Prep with Enrichment durante a fase de enriquecimento. Com a preparação de 1-plex e 3-plex, as espécies de transcrição abundantes são reduzidas para menos de 20% das leituras e, frequentemente, para menos de 10% das leituras ([Figura 2](#)).

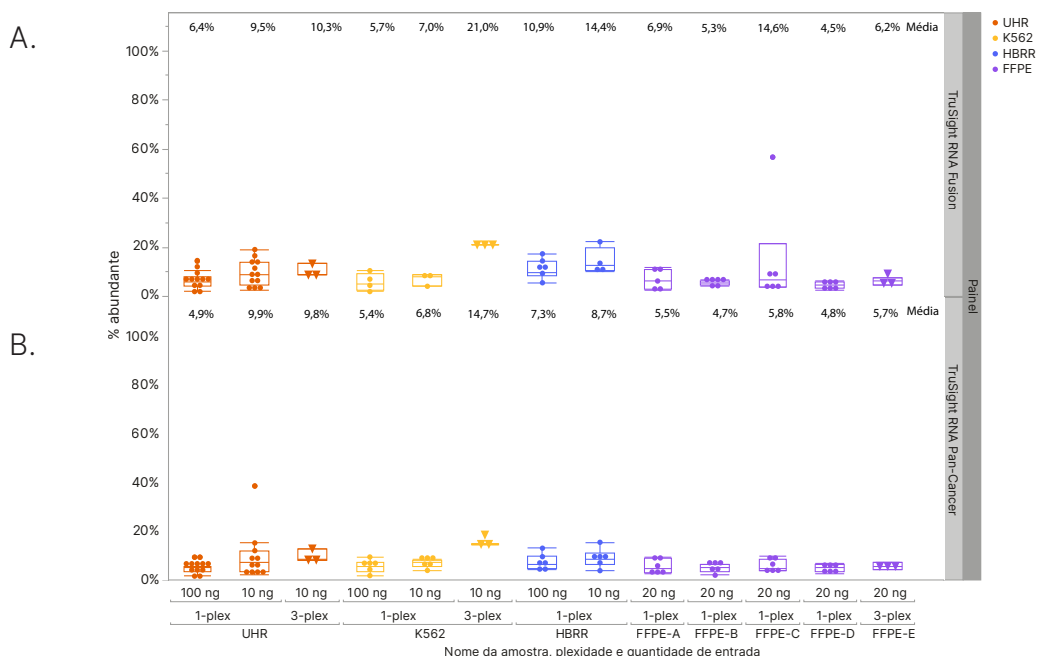


Figura 2: Depleção eficaz de espécies de RNA abundantes usando Illumina RNA Prep with Enrichment — Usando os painéis de oligos (A) TruSight RNA Fusion e (B) TruSight RNA Pan-Cancer para enriquecimento, menos de 20% das transcrições de RNA sequenciadas foram rRNA ou outras transcrições altamente abundantes. UHR, RNA de referência humana universal; HBRR, RNA de referência cerebral humano.

Percentual de duplicatas

O percentual de leituras duplicadas representa o percentual de leituras totais que correspondem a duplicatas de fragmentos de amostras exclusivas (frequentemente duplicatas de PCR). Valores mais baixos do percentual de duplicatas são geralmente preferidos e mostram o uso eficiente da largura de banda de sequenciamento. Neste estudo, as leituras foram normalizadas para três milhões de leituras por amostra, quando valores mais baixos de percentuais de duplicatas indicam maior conteúdo exclusivo de leitura. Aqui, as taxas de duplicação se correlacionam com a qualidade da amostra de RNA de entrada e com o tamanho do painel de oligos (Figura 3). O painel menor TruSight RNA Fusion produz mais duplicatas por amostra do que o painel TruSight RNA Pan-Cancer porque este último tem alvos mais exclusivos que podem ser capturados. Para bibliotecas enriquecidas de 1-plex, as amostras de RNA de alta qualidade exibem percentuais mais baixos de duplicatas do que a maioria das amostras FFPE e isso se deve à qualidade da amostra de entrada. Para bibliotecas enriquecidas de 3-plex, as amostras de UHR mostram uma taxa média de duplicação $\leq 32\%$, enquanto as amostras de linhagem celular K562 e FFPE-E mostram taxas de duplicação mais altas, indicando menos conteúdo de leitura exclusivo na biblioteca final.

Enriquecimento da leitura (%)

Valores elevados de enriquecimento de leitura demonstram que as sondas de painel capturaram bibliotecas alvo de forma eficiente durante o enriquecimento, resultando em sequenciamento reduzido de regiões indesejadas fora do alvo. Duas medidas de enriquecimento são PRE e PURE. PRE refere-se à porcentagem de leituras que mapeiam regiões-alvo do painel ou suas proximidades imediatas (regiões “padded”), incluindo leituras duplicadas. A métrica PURE exclui leituras duplicadas e pode parecer menor quando a proporção de leituras duplicadas é alta (Figura 4). O PRE é considerado uma métrica mais útil para algumas aplicações de RNA-Seq.

Para o estudo de enriquecimento de 1-plex, o enriquecimento entre as amostras de RNA de alta qualidade foi geralmente $> 70\%$ por ambas as métricas, indicando enriquecimento bem-sucedido. Isso foi verdadeiro para amostras de alta e baixa entrada. A eficácia do enriquecimento de amostras FFPE foi alta para todas as amostras para a métrica PRE e altamente variável para a métrica PURE, mas em média $> 50\%$. Essa variabilidade está correlacionada com o número de leituras duplicadas por amostra, conforme indicado pelo gradiente de cor no gráfico (Figura 4). Para o estudo de enriquecimento de 3-plex, PRE para RNA de alta qualidade é $> 70\%$ e para FFPE é $> 90\%$, sugerindo enriquecimento suficiente com os painéis TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer (Figura 4).

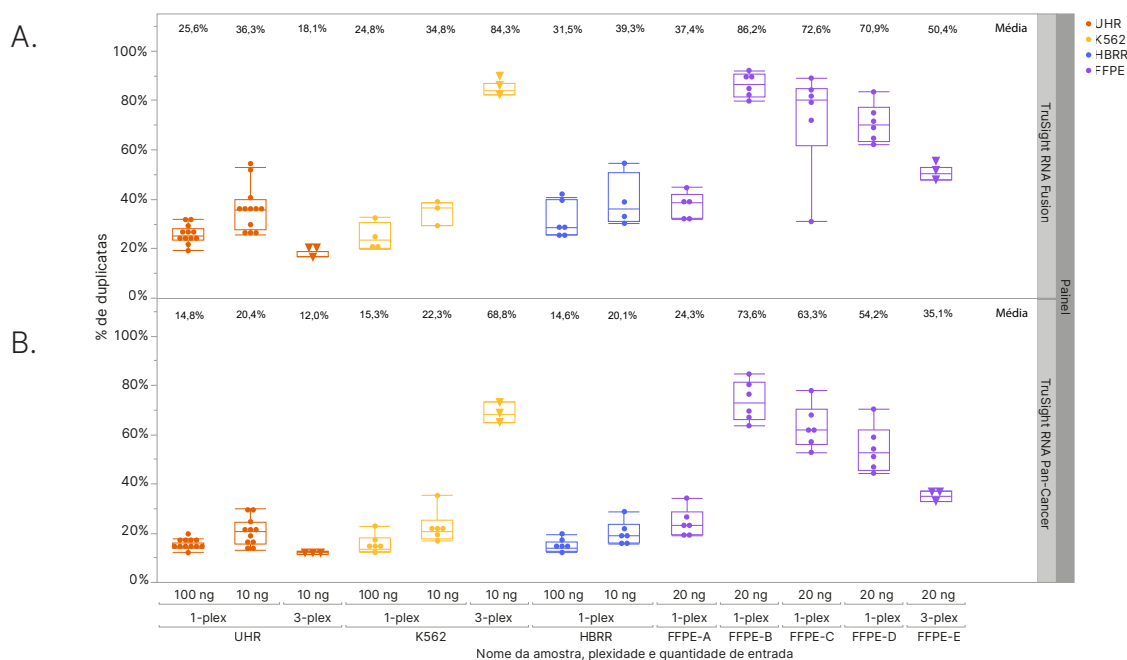


Figura 3: Percentual de duplicatas usando os painéis TruSight RNA e Illumina RNA Prep with Enrichment — Usando os painéis de oligos (A) TruSight RNA Fusion e (B) TruSight RNA Pan-Cancer para enriquecimento, as taxas de duplicatas se correlacionam com a qualidade da amostra de RNA de entrada e com o tamanho do painel de oligos.

Detecção de fusão de gene

Os painéis TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer permitiram a detecção confiável de fusão gênica (Tabela 4). A amostra de RNA da linhagem celular K562 contendo a fusão *BCR-ABL1* foi usada como o tipo de amostra aplicável para testar a detecção ao usar o Illumina RNA Prep with Enrichment. Os resultados mostraram uma taxa de identificação de 100% para fusão do gene *BCR-ABL1* na linhagem celular K562 em seis réplicas (10 ng e 100 ng, enriquecimento de 1-plex) e três réplicas (10 ng, enriquecimento de 3-plex) quando analisadas por meio dos aplicativos DRAGEN RNA v4.2.4 e BaseSpace Sequence Hub RNA-Seq Alignment v2.0.2.

Cobertura do éxon

A análise de dados com o aplicativo DRAGEN Enrichment revelou que o Illumina RNA Prep with Enrichment resultou em > 85% das bases cobertas alinhadas à sequência codificante e regiões não traduzidas (UTR) de RNA. Esses resultados demonstram alta eficiência de captura que concentra os esforços de sequenciamento no conteúdo de alto valor das regiões codificantes de RNA (Figura 5).

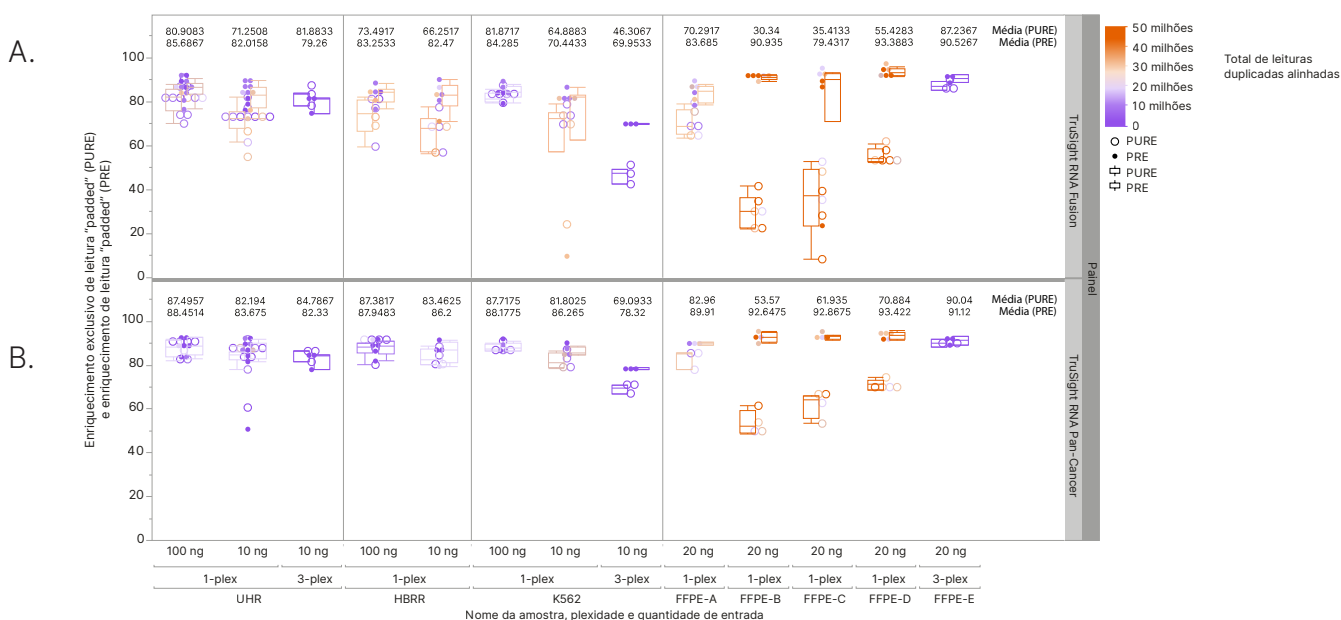


Figura 4: Alta eficiência de enriquecimento usando os painéis TruSight RNA e Illumina RNA Prep with Enrichment — O enriquecimento usando os painéis de oligos (A) TruSight RNA Fusion e (B) TruSight RNA Pan-Cancer mostrou alta eficiência em todos os tipos de amostras com PRE, uma métrica que inclui duplicatas. O PURE, uma métrica que exclui duplicatas, não é tão útil para aplicações RNA-Seq. As amostras com altas taxas de duplicatas mostram alta variabilidade no PURE. Aqui, a contagem de leituras duplicadas é codificada por cores de 0 (roxo) a 50 milhões (laranja). A análise do DRAGEN Enrichment é executada sem remover leituras duplicadas (ou seja, a caixa padrão da opção "Mark Duplicates" (Marcar duplicatas) deve estar desmarcada no aplicativo). Para produzir análise de enriquecimento para os painéis TruSight RNA Fusion e TruSight RNA Pan-Cancer usando o aplicativo DRAGEN Enrichment, o arquivo *.bed deve ser carregado manualmente para cada painel no BaseSpace Sequence Hub.

Tabela 4: Detecção de fusão gênica usando painéis TruSight RNA e Illumina RNA Prep with Enrichment

Fusão (fonte)	Painel	Enriquecimento	Entrada de RNA	Detection RNA-Seq Align v2.0.2	Detection DRAGEN RNA v4.2.4
BCR-ABL1 (K562)	TruSight RNA Fusion	1-plex	10 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
			100 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
		3-plex	10 ng	3/3 (100%)	3/3 (100%)
	TruSight RNA Pan-Cancer	1-plex	10 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
			100 ng	6/6 (100%)	6/6 (100%)
		3-plex	10 ng	3/3 (100%)	3/3 (100%)

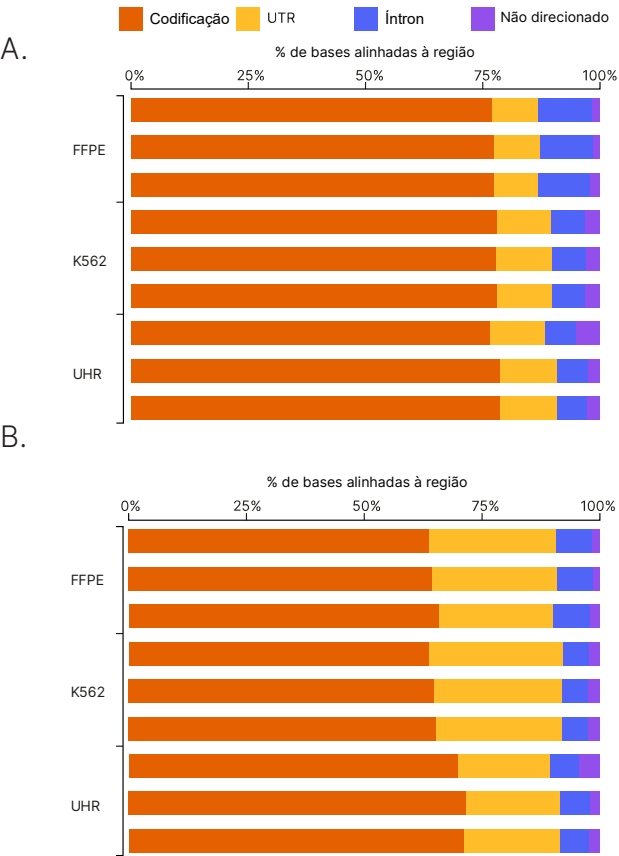


Figura 5: Cobertura de regiões de codificação com painéis TruSight RNA e Illumina RNA Prep with Enrichment — O uso de painéis de oligos (A) TruSight RNA Fusion e (B) TruSight RNA Pan-Cancer para enriquecimento resulta em eficiências de alta captura que se alinham à sequência de codificação e regiões não traduzidas (UTR).

Resumo

Ao se concentrar nos principais genes de interesse, o sequenciamento de RNA direcionado permite que os pesquisadores estudem conteúdo de alto valor enriquecido com transcrições associadas ao câncer. O Illumina RNA Prep with Enrichment e o TruSight RNA Fusion Panel ou TruSight RNA Pan-Cancer Panel demonstram resultados altamente reproduzíveis com a sensibilidade analítica necessária para detectar transcrições e fusões raras. Esse fluxo de trabalho garantiu desempenho completo para ambos os painéis, mesmo com quantidades menores de RNA de entrada ou RNA de qualidade inferior. Pesquisadores de câncer podem se beneficiar de um fluxo de trabalho rápido e fácil para análise direcionada de RNA.

Saiba mais

[TruSight RNA Fusion Panel](#)

[TruSight RNA Pan-Cancer Panel](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

Informações para pedido

Produto	N.º do 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

Referências

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/. Atualizado em 15 de outubro de 2024. Acessado em 20 de novembro 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. Publicado em 2020. Atualizado em 2023. Acessado em 07 de setembro 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. Publicado em 2017. Acessado em 07 de setembro 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. Publicado em 2015. Acessado em 07 de setembro de 2024.



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03103 PTB v1.0