

Panel de objetivo principal AmpliSeq™ for Illumina

Panel de ADN o ARN objetivo que investiga 52 genes con una relevancia conocida en los tumores sólidos.

Puntos destacados

- Contenido genético significativo**

Biomarcadores objetivo en 52 genes significativos para tumores sólidos

- Flujo de trabajo rápido y optimizado**

Preparación de bibliotecas listas para la secuenciación en un único día a partir de tan solo 1 ng de ADN o ARN de alta calidad y 10 ng de ADN y ARN extraído de tejido FFPE

- Datos precisos**

Detección de mutaciones somáticas hasta una frecuencia mínima del 5 % mediante el empleo de análisis en el entorno local o basado en la nube

Introducción

El panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina es un ensayo de resecuenciación selectiva para el análisis de biomarcadores de 52 genes con una relevancia conocida en los tumores sólidos (Tabla 1). Gracias al panel de objetivo principal, los investigadores pueden analizar el ADN y el ARN simultáneamente. El panel de objetivo principal forma parte de un flujo de trabajo mejorado que incluye la preparación de bibliotecas basada en PCR AmpliSeq for Illumina, la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina y los análisis automatizados.

A partir de tan solo 1 ng de ADN y ARN de alta calidad (se recomiendan 10 ng de ADN y ARN si se trabaja con tejido FFPE), el panel permite el estudio de genes asociados a diferentes tipos de cáncer, como los de pulmón, colon, mama y próstata, así como los ováricos y los melanomas. La poca cantidad necesaria de entrada permite su uso con distintos tipos de muestra, como las de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFPE). Como parte de la solución de resecuenciación selectiva AmpliSeq for Illumina, el panel de objetivo principal permite una evaluación rápida y precisa de la variación genómica para la investigación oncológica clínica y traslacional.

Contenido genético significativo

El panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina tiene como objetivo cientos de mutaciones en 52 genes clave asociados a tumores sólidos (Tabla 2). El contenido genético de este panel se seleccionó en función de la documentación publicada, las directrices actuales (red nacional de centros oncológicos

integrales [NCCN, National Comprehensive Cancer Network], asociación de patología molecular [AMP, Association for Molecular Pathology], colegio estadounidense de patólogos [CAP, College of American Pathologists], sociedad europea de oncología médica [ESMO, European Society for Medical Oncology], etc.) y los ensayos clínicos relevantes.

Los investigadores pueden utilizar el panel para estudiar las variantes de nucleótido único (SNV), las inserciones/delecciones y las variantes de número de copias (CNV) en las muestras de ADN o en las fusiones genéticas de las muestras de ARN. Gracias a este panel listo para usar, los investigadores ahorran tiempo y esfuerzo en la identificación de objetivos, el diseño de amplicones y la optimización del rendimiento.

Tabla 1: Resumen del panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina

Parámetro	Especificación
N.º de genes	52
Objetivos	Genes significativos para tumores sólidos
Tamaño de objetivo acumulativo	ADN: 29 kb, ARN: 26 kb
Tipos de variante	SNV, inserciones/delecciones, CNV y fusiones de genes ^a
Tamaño del amplicón	ADN: 107 pb de media, ARN: 93 pb de media
N.º de amplicones	ADN: 269, ARN: 284
Cantidad necesaria de ADN/ARN de entrada	1-100 ng (valor recomendado de 10 ng por grupo)
N.º de grupos por panel	Panel de ADN: un grupo, panel de ARN: un grupo
Tipos de muestras compatibles	Tejido FFPE
Porcentaje de objetivos cubiertos a un mínimo de 500x al valor de rendimiento recomendado	>95 %
Uniformidad de cobertura (porcentaje de objetivos con una cobertura media superior a 0,2x)	>95 %
Porcentaje de lecturas alineadas en objetivo	>80 %
Duración total del ensayo ^b	5-6 horas
Tiempo de participación activa	<1,5 horas
Tiempo de ADN/ARN a datos	2,5 días

a. SNV: variantes de nucleótido único; indels: inserciones y delecciones, CNV: variantes en el número de copias.

b. El tiempo refleja únicamente la preparación de bibliotecas, sin incluir su cuantificación, normalización o agrupación.

Datos en el archivo de Illumina, Inc. (2017)

Tabla 2: Lista de genes para el panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina

Grupo de ADN				
AKT1	EGFR	FGFR4	JAK3	MYCN
ALK	ERBB2	GNA11	KIT	NRAS
AR	ERBB3	GNAQ	KRAS	PDGFRA
BRAF	ERBB4	HRAS	MAP1K2	PIK3CA
CCND1	ESR1	IDH1	MAP2K2	RAF1
CDK4	FGFR1	IDH2	MET	RET
CDK6	FGFR2	JAK1	MTOR	ROS1
CTNNB1	FGFR3	JAK2	MYC	SMO
DDR2				
Grupo de ARN				
ABL1	EGFR	ETV5	NTRK1	PPARG
ALK	ERBB2	FGFR1	NTRK2	RAF1
AKT3	ERG	FGFR2	NTRK3	RET
AXL	ETV1	FGFR3	PDGFRA	ROS1
BRAF	ETV4	MET		

Flujo de trabajo sencillo y optimizado

El panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina forma parte de una solución de ADN/ARN a variante que ofrece un contenido optimizado, una preparación sencilla de bibliotecas, sistemas de secuenciación con solo pulsar un botón y análisis simplificados de los datos.

La preparación de bibliotecas sigue un sencillo protocolo basado en PCR que puede completarse en tan solo cinco horas (para ADN) o seis horas (para ARN), con un tiempo de participación activa de <1,5 horas (para ADN) o <2 horas (para ARN). Las bibliotecas resultantes pueden normalizarse, agruparse y, posteriormente, cargarse en una celda de flujo para su secuenciación. Esta última se efectúa usando los procesos químicos reconocidos de secuenciación por síntesis (SBS) en cualquier sistema de secuenciación Illumina (Tabla 3).

Los datos resultantes pueden analizarse de forma local con Local Run Manager o transmitirse con facilidad a BaseSpace™ Sequence Hub. Local Run Manager y BaseSpace Sequence Hub pueden acceder al flujo de trabajo de análisis de amplicones de ADN para realizar la alineación y llamada de variantes.

BaseSpace Sequence Hub brinda acceso a BaseSpace Variant Interpreter, que asiste en la conversión de los datos de las llamadas de variantes en resultados anotados.



Más información sobre los [sistemas de secuenciación Illumina](#)



Más información sobre las [soluciones informáticas AmpliSeq for Illumina](#)

Tabla 3: Sistemas de secuenciación de Illumina que se recomienda utilizar con el panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina

Instrumento	N.º de muestras por experimento	Duración del experimento
iSeq™ 100 System	8	17 horas
MiniSeq™ System (rendimiento medio)	16	17 horas
MiniSeq System (rendimiento elevado)	48	24 horas
MiSeq System (procesos químicos Micro v2)	8	19 horas
MiSeq System (procesos químicos v2)	30	24 horas
MiSeq System (procesos químicos v3)	48	32 horas

Datos precisos

Gracias al panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina, los investigadores pueden analizar los biomarcadores en 52 genes de tumores sólidos clave mediante ADN y ARN.

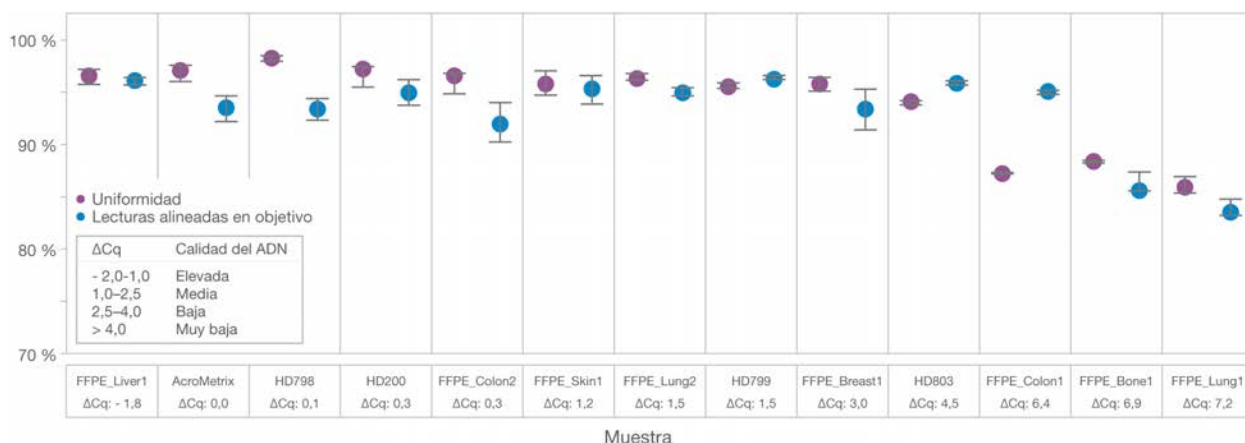


Figura 1: Uniformidad de cobertura y alineación en objetivo altas: Se preparó ADN extraído de muestras FFPE y de HD de calidad variable mediante el panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina y se secuenció en el instrumento. Las barras de error indican la variabilidad de los duplicados técnicos. El valor ΔCq es un indicador de la calidad del ADN aislado a partir de tejidos FFPE.

Cobertura y sensibilidad

Para demostrar las capacidades y la sensibilidad del ensayo, se evaluó una muestra de control de AcroMetrix, muestras de Horizon Discovery (HD) y tejidos FFPE mediante el panel de objetivo principal, así como MiniSeq™ System y MiSeq™ System. Los resultados revelaron una uniformidad de cobertura y un porcentaje en objetivo de lecturas alineadas elevados, incluso con una calidad de las muestras y tipos de tejido variables (Figura 1). Asimismo, se evaluaron muestras de HD de calidad variable para valorar la precisión de las llamadas de variantes. Los datos pusieron de manifiesto un alto grado de concordancia entre la frecuencia de variantes esperada y la detectada (Figura 2).

Detección de fusión de genes

Para demostrar la capacidad del panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina de reconocer variantes estructurales en las transcripciones de ARN, se evaluaron las muestras de HD y la referencia de Seraseq Fusion RNA Mix v2 usando el panel en MiniSeq System y MiSeq System. Los resultados mostraron un índice de llamada del 100 % para las fusiones de genes en estas muestras (Tabla 4).

Tabla 4: Altos índices de llamada para las fusiones de genes

Fusión	N.º de muestras NO detectadas	N.º de muestras detectadas	Índice de llamada
Fuente de ARN: HD784			
<i>CCDC6-RET</i>	0	16	100 %
<i>EML4-ALK</i>	0	16	100 %
<i>SLC34A2-FOS1</i>	0	16	100 %
<i>SLC34A2-FOS1</i>	0	16	100 %
Fuente de ARN: Seraseq Fusion RNA Mix v2			
<i>CD74-FOS1</i>	0	16	100 %
<i>EML4-ALK</i>	0	16	100 %
<i>ETV6-NTRK3</i>	0	16	100 %
<i>FGFR3-BAIAP2L1</i>	0	16	100 %
<i>FGFR3-TACC3</i>	0	16	100 %
<i>KIF5B-RET</i>	0	16	100 %
<i>LMNA-NTRK1</i>	0	16	100 %
<i>NCOA4-RET</i>	0	16	100 %
<i>PAX8-PPARG</i>	0	16	100 %
<i>SLC34A2-FOS1</i>	0	16	100 %
<i>SLC45A3-BRAF</i>	0	16	100 %
<i>TPRPS2-ERG</i>	0	16	100 %
<i>TPM3-NTRK1</i>	0	16	100 %

Se utilizaron dos muestras de ARN de fusión positiva, HD784 y Seraseq Fusion RNA Mix v2, para generar las bibliotecas de ARN con el panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina y se secuenciaron en MiniSeq System y MiSeq System.

Datos para realizar pedidos

Puede solicitar en línea los productos AmpliSeq for Illumina en la página www.illumina.com.

Producto	N.º de catálogo
Panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina (24 reacciones)	20019164
AmpliSeq for Illumina Library PLUS (24 reacciones)	20019101
AmpliSeq for Illumina Library PLUS (96 reacciones)	20019102
AmpliSeq for Illumina Library PLUS (384 reacciones)	20019103
Juego A de índices AmpliSeq for Illumina CD (96 índices, 96 muestras)	20019105
Síntesis de ADNc con AmpliSeq for Illumina (96 reacciones)	20022654
Panel de ID de muestra AmpliSeq for Illumina	20019162
ADN de FFPE directo AmpliSeq for Illumina	20023378
Ecuador de bibliotecas AmpliSeq for Illumina	20019171

Información adicional

Más información sobre el [panel de objetivo principal AmpliSeq for Illumina](#)

Más información sobre la [solución de secuenciación selectiva AmpliSeq for Illumina](#)

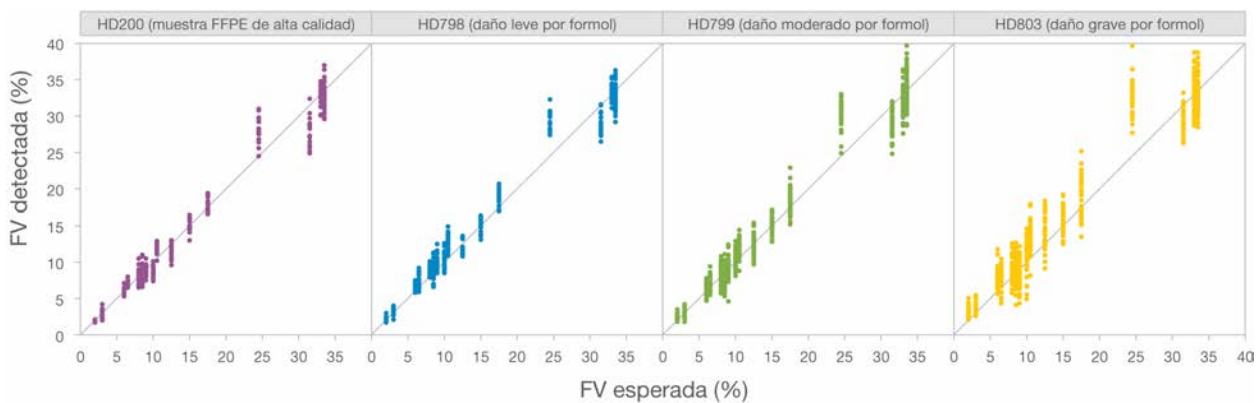


Figura 2: Alto grado de concordancia entre la frecuencia de variantes esperada y la detectada: Se preparó ADN obtenido de muestras de HD utilizando el panel de objetivo principal AmpliSeq para Illumina y se secuenció en el instrumento. Los resultados revelaron la detección del 100 % de las SNV esperadas. Los valores ΔCq quedan reflejados en la figura 1.