

TruSight™ Hereditary Cancer Panel

Panel de NGS para la investigación del cáncer con 113 genes asociados al riesgo genético

- Evalúe las mutaciones de la estirpe germinal asociadas al riesgo de cáncer mediante el uso de contenido de panel completo y seleccionado por expertos.
- Enriquezca y prepare librerías listas para la secuenciación en 6,5 horas, con solo 2 horas de tiempo de participación activa.
- Consiga una excelente uniformidad de cobertura para una detección muy precisa de SNV, indels y CNV.
- Ajuste la productividad y secuencie de 2 a 256 muestras por experimento en los sistemas de secuenciación de sobremesa de Illumina.



Introducción

Las variantes genéticas desempeñan un papel importante en la determinación de la predisposición al cáncer. TruSight Hereditary Cancer Panel permite a los investigadores realizar una evaluación exhaustiva de los genes en los que se encuentran estas variantes. TruSight Hereditary Cancer Panel, que ha sido desarrollado en colaboración con expertos en genómica del cáncer, es un panel de secuenciación selectiva diseñado para evaluar las mutaciones de la estirpe germinal en 113 genes y 125 polimorfismos de nucleótido único (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) con fines de identificación y puntuación del riesgo poligénico.

El ensayo usa sondas de oligonucleótidos prediseñadas y listas para usar que cubren todas las regiones exónicas y 20 pb de regiones intrónicas adyacentes de cada gen selectivo. Las librerías se preparan mediante química de captura híbrida integrada con Illumina DNA Prep with Enrichment.* Illumina DNA Prep with Enrichment usa una química innovadora basada en bolas con un paso de hibridación única y simplificada para una preparación de librerías rápida y eficiente. Illumina DNA Prep with Enrichment es compatible con todos los sistemas de secuenciación de sobremesa de Illumina, lo que ofrece flexibilidad en el diseño de experimento en una amplia gama de productividad de muestras (tabla 1).¹ La combinación de la velocidad de Illumina DNA Prep with Enrichment con MiSeq™ System permite completar todo el flujo de trabajo (figura 1), desde la obtención de la muestra hasta la generación de datos, en 48 horas.

* Illumina DNA Prep se conocía anteriormente como Nextera™ DNA Flex Library Prep Kit. Los dos kits usan la misma química de tagmentación y tienen especificaciones de rendimiento del producto y configuraciones del kit idénticas.

Tabla 1: Especificaciones de TruSight Hereditary Cancer Panel

| Parámetro | Datos |
|---------------------------------------|--|
| Sistemas de secuenciación compatibles | iSeq™ 100 System, MiniSeq™ System, MiSeq System, MiSeqDx System (en modo de investigación), NextSeq™ 550 System, NextSeq 550Dx System (en modo de investigación) |
| Tamaño de panel | 403 kb, 113 genes (que cubren todos los exones), 125 SNP (48 SNP de ID y 77 SNP para la puntuación del riesgo poligénico) |
| N.º de sondas | 10 341 sondas de oligonucleótidos |
| Tipo de muestra | ADN genómico, sangre ^a o saliva ^a |
| Entrada de ADN | 50-1000 ng de ADN |
| Duración total del ensayo | 48 horas desde la obtención del ADN hasta la generación de datos |
| Tiempo de preparación de librerías | 6,5 horas de tiempo total, 2 horas de tiempo de participación activa |
| Productividad de muestras | 384 índices disponibles para una productividad variable de 2 a 256 muestras por experimento, con una cobertura promedio de 300× (cobertura mínima de 100×) |
| Muestras por tubo | 8 enriquecimientos (hasta 12 muestras por enriquecimiento) |

a. La extracción directa de sangre o saliva requiere el uso de Flex Lysis Reagent Kit (Illumina, n.º de catálogo 20018706).

De la obtención de la muestra a la generación de datos en 48 horas

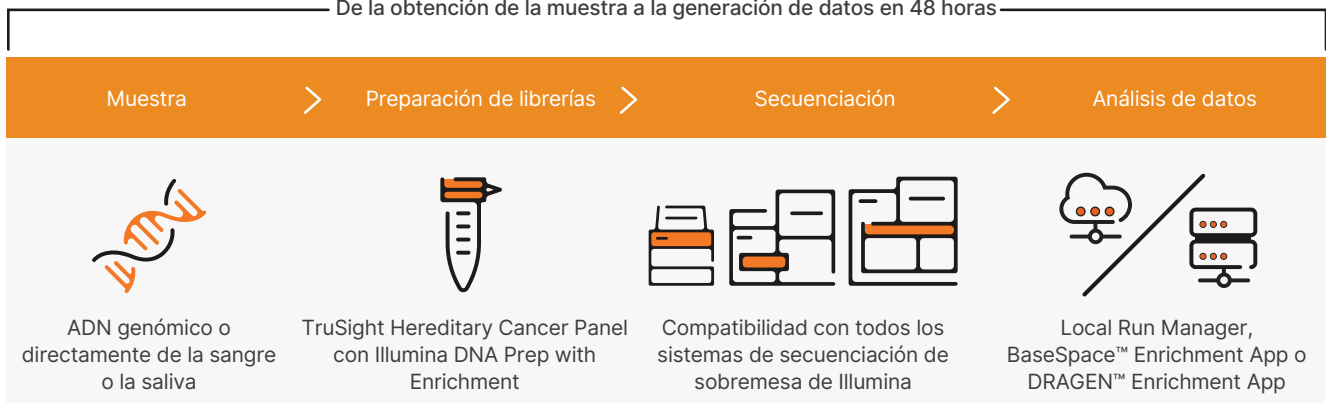


Figura 1: Flujo de trabajo de NGS rápido y versátil. TruSight Hereditary Cancer Panel usa la química de preparación de librerías de Illumina DNA Prep with Enrichment, que integra los pasos de preparación y enriquecimiento de librerías. Mediante un flujo de trabajo rápido, optimizado y simplificado, se obtienen librerías completamente enriquecidas en tan solo 6,5 horas. TruSight Hereditary Cancer es compatible con iSeq 100 System, MiniSeq System, MiSeq Series System y NextSeq System.

Flexibilidad de la productividad con los sistemas de secuenciación de Illumina

TruSight Hereditary Cancer Panel es compatible con varios sistemas de secuenciación de Illumina y proporciona flexibilidad y control sobre el diseño de experimento. Los usuarios pueden seleccionar instrumentos o kits de reactivos en función de las necesidades del laboratorio. La productividad de muestras puede variar de 2 a 256 muestras por experimento (tabla 2).

Diseño de contenido exhaustivo

TruSight Hereditary Cancer Panel incluye una amplia lista de genes que suelen estar asociados a una predisposición hereditaria a cánceres de mama, colon, ovario y gástrico (figura 2). El contenido ha sido desarrollado con aportaciones y comentarios de líderes de opinión clave de la evaluación del riesgo genético de Alemania, Francia y Reino Unido. El panel incluye 10 341 sondas dirigidas a 113 genes que se relacionan con la predisposición al cáncer (tabla 3) y que se han evaluado en estudios de casos de la población frente a controles. Asimismo, se incluyen 48 SNP para la determinación de la identidad y el sexo y 77 SNP para la puntuación del riesgo poligénico BOADICEA.^{2,3} El análisis permite detectar variantes de nucleótido único (SNV), inserciones/deleciones (indels) y variantes en el número de copias (CNV, Copy-Number Variants) en un único ensayo (tabla 4, tabla 5).

Tabla 3: Contenido genético de TruSight Hereditary Cancer Panel

| | | | | |
|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| <i>ACD</i> | <i>DIS3L2</i> | <i>GREM1</i> | <i>PIK3CA</i> | <i>SDHD</i> |
| <i>AIP</i> | <i>EPCAM</i> | <i>HOXB13</i> | <i>PMS2</i> | <i>SLX4</i> |
| <i>AKT1</i> | <i>ERCC1</i> | <i>KIF1B</i> | <i>POLD1</i> | <i>SMAD4</i> |
| <i>APC</i> | <i>ERCC2</i> | <i>KIT</i> | <i>POLE</i> | <i>SMARCA4</i> |
| <i>ATM</i> | <i>ERCC3</i> | <i>LZTR1</i> | <i>POT1</i> | <i>SMARCB1</i> |
| <i>BAP1</i> | <i>ERCC4</i> | <i>MAX</i> | <i>PRKAR1A</i> | <i>SMARCE1</i> |
| <i>BARD1</i> | <i>ERCC5</i> | <i>MEN1</i> | <i>PTCH1</i> | <i>SPINK1</i> |
| <i>BLM</i> | <i>FAM175A</i> | <i>MET</i> | <i>PTEN</i> | <i>SPRED1</i> |
| <i>BMPR1A</i> | <i>FANCA</i> | <i>MITF</i> | <i>RAD50</i> | <i>STK11</i> |
| <i>BRCA1</i> | <i>FANCB</i> | <i>MLH1</i> | <i>RAD51</i> | <i>SUFU</i> |
| <i>BRCA2</i> | <i>FANCC</i> | <i>MRE11A</i> | <i>RAD51B</i> | <i>TERF2IP</i> |
| <i>BRIP1</i> | <i>FANCD2</i> | <i>MSH2</i> | <i>RAD51C</i> | <i>TERT</i> |
| <i>CASR</i> | <i>FANCE</i> | <i>MSH3</i> | <i>RAD51D</i> | <i>TMEM127</i> |
| <i>CDC73</i> | <i>FANCF</i> | <i>MSH6</i> | <i>RB1</i> | <i>TP53</i> |
| <i>CDH1</i> | <i>FANCG</i> | <i>MUTYH</i> | <i>RECQL4</i> | <i>TSC1</i> |
| <i>CDK4</i> | <i>FANCI</i> | <i>NBN</i> | <i>RET</i> | <i>TSC2</i> |
| <i>CDKN1B</i> | <i>FANCL</i> | <i>NF1</i> | <i>RHBDF2</i> | <i>VHL</i> |
| <i>CDKN2A</i> | <i>FANCM</i> | <i>NF2</i> | <i>RINT1</i> | <i>WT1</i> |
| <i>CEBPA</i> | <i>FH</i> | <i>NSD1</i> | <i>RUNX1</i> | <i>XPA</i> |
| <i>CHEK2</i> | <i>FLCN</i> | <i>NTHL1</i> | <i>SDHA</i> | <i>XPC</i> |
| <i>CTRC</i> | <i>GALNT12</i> | <i>PALB2</i> | <i>SDHAF2</i> | <i>XRCC2</i> |
| <i>DDB2</i> | <i>GATA2</i> | <i>PDGFRA</i> | <i>SDHB</i> | |
| <i>DICER1</i> | <i>GPC3</i> | <i>PHOX2B</i> | <i>SDHC</i> | |

a. Para obtener la lista completa de SNP incluidos en el panel, visite www.illumina.com/TruSightHereditaryCancer.

Tabla 2: Preparación de lotes de muestras y variación de rendimiento entre instrumentos y kits de reactivos

| Sistema de secuenciación ^a | Kit de reactivos | Lecturas únicas | Rendimiento | Duración del experimento | Unidades de plexado de la muestra ^b |
|---|---------------------|-----------------|-------------|--------------------------|--|
| iSeq 100 System | 100 i1 | 4 M | 1,2 Gb | 19 h | 2 |
| | v2 Micro | 4 M | 1,2 Gb | 19 h | 2 |
| MiSeq System y MiSeqDx System | v2 Standard | 15 M | 4,5 Gb | 24 h | 9 |
| | v3 Standard | 25 M | 7,5 Gb | 28 h | 16 |
| MiniSeq System | Rendimiento medio | 8 M | 2,4 Gb | 17 h | 5 |
| | Rendimiento elevado | 25 M | 7,5 Gb | 24 h | 16 |
| NextSeq 550 System y NextSeq 550Dx System | Rendimiento medio | 130 M | 39 Gb | 26 h | 80 |
| | Rendimiento elevado | 400 M | 120 Gb | 39 h | 256 |

a. Los rendimientos y tiempos teóricos de iSeq 100 System y MiniSeq System se basan en las especificaciones del instrumento. La verificación interna de TruSight Hereditary Cancer Panel solo se ha realizado en MiSeq System y NextSeq 550 System.

b. La productividad de muestras se basa en una cobertura promedio de 300× por muestra.

Tabla 4: Detección de variantes en muestras de Horizon Discovery con TruSight Hereditary Cancer Panel^{a,b}

| Muestra | Gen | Variante | Tipo de variante | Consecuencia | MAF prevista | MAF observada con diferentes aportes de ADN ^c | | |
|---------|--------------|----------|------------------|--|--------------|--|--------|--------|
| | | | | | | 50 ng | 25 ng | 10 ng |
| HD793 | <i>BRCA1</i> | P871L | SNV | mutación con cambio de sentido | 100 % | 100 % | 100 % | 99,8 % |
| | <i>BRCA1</i> | S1613G | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 49,8 % | 47,7 % | 45,8 % |
| | <i>BRCA1</i> | K1183R | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 45,0 % | 43,9 % | 44,9 % |
| | <i>BRCA1</i> | K820E | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 48,1 % | 43,6 % | 45,6 % |
| | <i>BRCA1</i> | D435Y | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 42,8 % | 46,3 % | 44,6 % |
| | <i>BRCA2</i> | V2466A | SNV | mutación con cambio de sentido | 100 % | 99,9 % | 100 % | 100 % |
| | <i>BRCA2</i> | N289H | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 39,2 % | 40,5 % | 40,5 % |
| | <i>BRCA2</i> | N991D | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 48,6 % | 48,1 % | 48,0 % |
| | <i>BRCA2</i> | N1784fs | Delección | mutación por desplazamiento del marco de lectura | 50 % | 42,2 % | 35,7 % | 38,9 % |
| | <i>BRIP1</i> | S919P | SNV | mutación con cambio de sentido | 100 % | 99,7 % | 99,9 % | 100 % |
| | <i>NBN</i> | E185Q | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 41,1 % | 35,1 % | 38,5 % |
| HD794 | <i>BARD1</i> | R378S | SNV | mutación con cambio de sentido | 50 % | 50,5 % | 49,9 % | 48,0 % |
| | <i>BRCA2</i> | V2466A | SNV | mutación con cambio de sentido | 100 % | 99,9 % | 99,9 % | 99,8 % |
| | <i>BRCA2</i> | I2675fs | Inserción | mutación por desplazamiento del marco de lectura | 50 % | 41,0 % | 40,9 % | 40,3 % |
| | <i>BRIP1</i> | S919P | SNV | mutación con cambio de sentido | 100 % | 99,9 % | 100 % | 100 % |
| | <i>NBN</i> | E185Q | SNV | mutación con cambio de sentido | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |

a. La secuenciación se realizó en MiSeq System.

b. La alineación y la llamada de variantes se realizaron con la aplicación DRAGEN Enrichment. Los valores de la frecuencia del alelo menos común (MAF, Minor Allele Frequency)

c. observados son los valores promedio de cuatro réplicas técnicas.

Tabla 5: Detección de variantes en muestras de colaboración con TruSight Hereditary Cancer Panel^{a,b}

| Muestra | Gen | Alelo de referencia | Alelo de la variante | Tipo de variante | Consecuencia | MAF de la réplica 1 ^c | MAF de la réplica 2 ^c |
|---------|------------------------------|---------------------|----------------------|------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | Solapamiento de <i>PALB2</i> | | | CNV | cambio de número de copia | Detectado | Detectado |
| 2 | <i>RB1</i> | T | TTCAAAA | Inserción | Inserción dentro del marco de lectura | 54,1 % | 53,6 % |
| | <i>TSC2</i> | C | T | SNV | Detención obtenida | 49,8 % | 47,5 % |
| 3 | <i>POLE</i> | C | T | SNV | Variante con cambio de sentido | 44,1 % | 47,0 % |
| 4 | <i>CHEK2</i> | A | G | SNV | Variante con cambio de sentido | 40,8 % | 44,9 % |
| 5 | <i>MSH6</i> | GA | G | Delección | Variante por desplazamiento del marco de lectura | 50,9 % | 45,0 % |
| 6 | <i>BRCA2</i> | CG | C | Delección | Variante por desplazamiento del marco de lectura | 29,9 % | 36,3 % |
| 7 | <i>MLH1</i> | C | T | SNV | Detención obtenida | 31,0 % | 31,9 % |
| 8 | <i>BRCA1</i> | T | C | SNV | Variante con cambio de sentido | 39,6 % | 35,1 % |

a. La secuenciación se realizó en MiSeq System.

b. La alineación y la llamada de variantes se realizaron con la aplicación DRAGEN Enrichment.

c. Las llamadas de variantes observadas se correlacionan con genotipos previamente comunicados por nuestro colaborador (los datos no se muestran).



| Tipo de cáncer | Genes recomendados para el análisis |
|--|---|
|  Mamario | <i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53</i> |
|  Colon | <i>APC, AXIN2, BMPR1A, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3, MUTYH, NTLH1, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53</i> |
|  Ovárico | <i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53</i> |
|  Gástrico | <i>CDH1</i> |
|  Otro | <i>MEN1, NF2, RB1, RET, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, TSC1/2, VHL, TP53, WT1</i> |

Figure 2: Los genes incluían que tenían asociaciones conocidas con la predisposición genética a tipos específicos de cáncer.

Flujo de trabajo rápido de preparación y enriquecimiento de librerías

TruSight Hereditary Cancer Panel usa Illumina DNA Prep with Enrichment, lo que permite una rápida preparación de librerías, con librerías listas para la secuenciación en 6,5 horas, incluido solo 2 horas de tiempo de participación activa. Un componente clave de la solución Illumina DNA Prep with Enrichment es la tagmentación en bolas, que usa transposomas vinculados por bolas para mediar en una reacción de tagmentación uniforme (figura 3). Con esta estrategia no son necesarios pasos de fragmentación del ADN separados. En el caso de los aportes de ADN entre 10 y 50 ng, la normalización de ADN por saturación también evita la necesidad de pasos individuales de cuantificación y normalización de librerías antes del enriquecimiento. El enriquecimiento de objetivos se produce mediante la reconocida química de captura híbrida, que permite detectar de forma fiable las variantes relevantes para SNV, indels y CNV. Las librerías se hibridan con sondas marcadas con biotina específicas para las regiones de ADN selectivas. Los objetivos se capturan con bolas magnéticas de estreptavidina que se unen a las sondas con biotina y, a continuación, extraen de la solución los fragmentos unidos. Una vez que los fragmentos capturados se eluyen de las bolas, la librería selectiva está lista para la secuenciación.

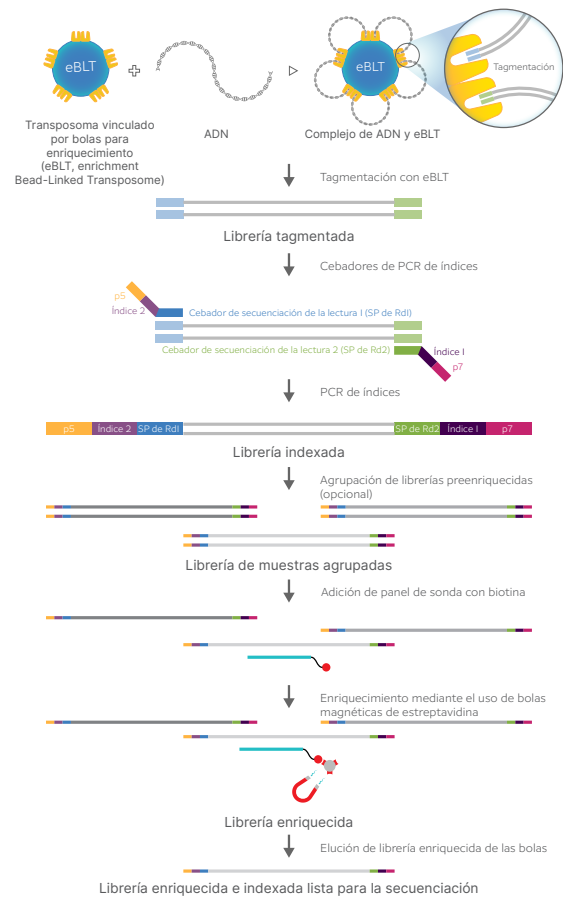


Figura 3: Flujo de trabajo de Illumina DNA Prep with Enrichment. Una reacción de tagmentación uniforme mediada por eBTL, seguida de una reacción de hibridación única, permite un flujo de trabajo rápido y versátil.

Datos precisos

Con capacidad para evaluar 113 genes por muestra, TruSight Hereditary Cancer Panel proporciona una gran productividad de muestras al tiempo que conserva una especificidad y uniformidad excelentes. A fin de demostrar el rendimiento del ensayo, se analizaron los criterios de medición de secuenciación de dos sistemas de secuenciación usando muestras de colaboradores de la investigación. Se prepararon ocho muestras (por duplicado) con un aporte de ADN de 50 ng con Illumina DNA Prep with Enrichment con enriquecimientos de ocho unidades de plexado y se secuenciaron en MiSeq System y NextSeq System y los datos se evaluaron con BaseSpace Enrichment App v3.1.0. Los resultados mostraron un alto porcentaje de uniformidad de cobertura (figura 4).

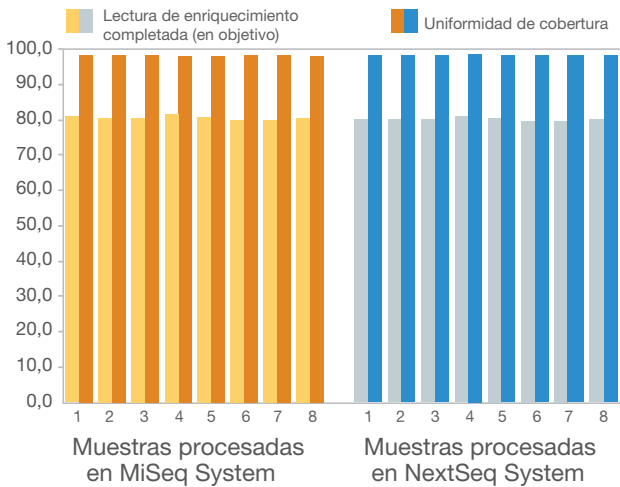


Figura 4: Alineación en el objetivo y uniformidad de cobertura. El ADN extraído de las muestras de colaboradores se preparó usando TruSight Hereditary Cancer Panel y se secuenciaron en MiSeq System (izquierda) y NextSeq 550 System (derecha). Se muestran los valores promedio de dos réplicas técnicas para cada muestra.

Llamada de variantes

Para demostrar el rendimiento de la llamada de variantes con diferentes niveles de aporte, se prepararon juegos de 16 muestras con aportes de ADN de 10 ng, 25 ng y 50 ng. Los juegos de muestras se componían de cuatro réplicas de cada una de las muestras de Horizon Discovery (HD), los estándares de referencia de ADNg BRCA Germline I (HD793) y BRCA Germline II (HD794). Cada nivel de aporte fue secuenciado en 16 unidades de plexado después de prepararse con Illumina DNA Prep with Enrichment con enriquecimientos de 8 unidades de plexado. La secuenciación se realizó en MiSeq System y los datos se evaluaron mediante la aplicación DRAGEN Enrichment. Los resultados coincidían con la lista publicada de Horizon Discovery para las muestras de HD793 y HD794, lo que demuestra resultados reproducibles en todos los niveles de aporte analizados. Se realizó otro análisis en las muestras de los colaboradores de la investigación que contenían variantes desconocidas (tabla 4). Se preparó un aporte de ADN de 50 ng de ocho muestras por duplicado usando Illumina DNA Prep with Enrichment con enriquecimientos de ocho unidades de plexado y se secuenciaron en MiSeq System. Mediante el uso de la aplicación DRAGEN Enrichment para el análisis de los datos, se detectaron variantes de diferentes clases (SNV, indels y CNV) (tabla 5), que se correlacionaban con genotipos previamente comunicados por nuestro colaborador.

Las aplicaciones DRAGEN Enrichment o BaseSpace Enrichment se pueden usar para que la llamada de variantes proporcione los resultados en formato VCF. Los clientes pueden seleccionar cualquier plataforma de análisis terciario de terceros para anotar e interpretar las variantes.

Para obtener más información, incluidos los parámetros de ensayo ajustables para el flujo de trabajo de Illumina DNA Prep with Enrichment y el impacto en las llamadas de variantes, lea los [parámetros definibles por el usuario en la nota técnica del flujo de trabajo de Illumina DNA Prep with Enrichment](#) y en la [nota técnica de Analyze germline CNVs with TruSight Hereditary Cancer Panel](#).

Resumen

TruSight Hereditary Cancer Panel permite a los investigadores acceder a un juego de contenido definido por expertos con el que analizar la variación dentro de genes previamente vinculados a una predisposición al cáncer. El juego de sondas optimizado proporciona una completa cobertura de las regiones selectivas con una elevada uniformidad de cobertura para identificar muchas variantes. La combinación de este contenido con el método de Illumina DNA Prep with Enrichment ofrece un flujo de trabajo rápido y sencillo con pocos requisitos de entrada de muestras, así como la versatilidad de poder usar cualquier sistema de secuenciación de sobremesa de Illumina. TruSight Hereditary Cancer Panel es una solución de secuenciación de gran eficiencia que acelera la detección de variantes asociadas a una predisposición al cáncer.

Información adicional

[TruSight Hereditary Cancer Panel](#)

Bibliografía

1. Illumina. [Hoja de datos de Illumina DNA Prep with Enrichment](#). Año de publicación: 2020. Fecha de consulta: 5 de septiembre de 2023.
2. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, et al. [Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants](#). *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5):djv036. Fecha de publicación: 8 de abril de 2015. doi:10.1093/jnci/djv036
3. University of Cambridge, Centre for Cancer Genetic Epidemiology. Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm (BOADICEA) ccge.medschl.cam.ac.uk/boadicea/. Fecha de consulta: 5 de septiembre de 2023.

Datos para realizar pedidos

| Producto | N.º de catálogo |
|--|-----------------|
| 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 |
| Illumina DNA Prep with Enrichment, (S) Tagmentation (96 Samples) | 20025524 |
| Illumina DNA Prep with Enrichment, (S) Tagmentation (16 Samples) | 20025523 |
| Illumina DNA Prep, (S) Tagmentation (96 Samples) | 20025520 |
| Illumina DNA Prep, (S) Tagmentation (16 Samples) | 20025519 |
| iSeq 100 i1 Reagent | 20021533 |
| iSeq 100 i1 Reagent | 20021534 |
| MiSeq Reagent Micro Kit v2 | MS-103-1002 |
| MiSeq Reagent Kit v2 | MS-102-2002 |
| MiSeq Reagent Kit v3 | MS-102-3003 |
| MiniSeq Mid Output Kit | FC-420-1004 |
| MiniSeq High Output Kit | FC-420-1003 |
| NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 | 20024905 |
| NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 | 20024908 |
| Flex Lysis Reagent Kit | 20018706 |



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-02150 ESP v1.0