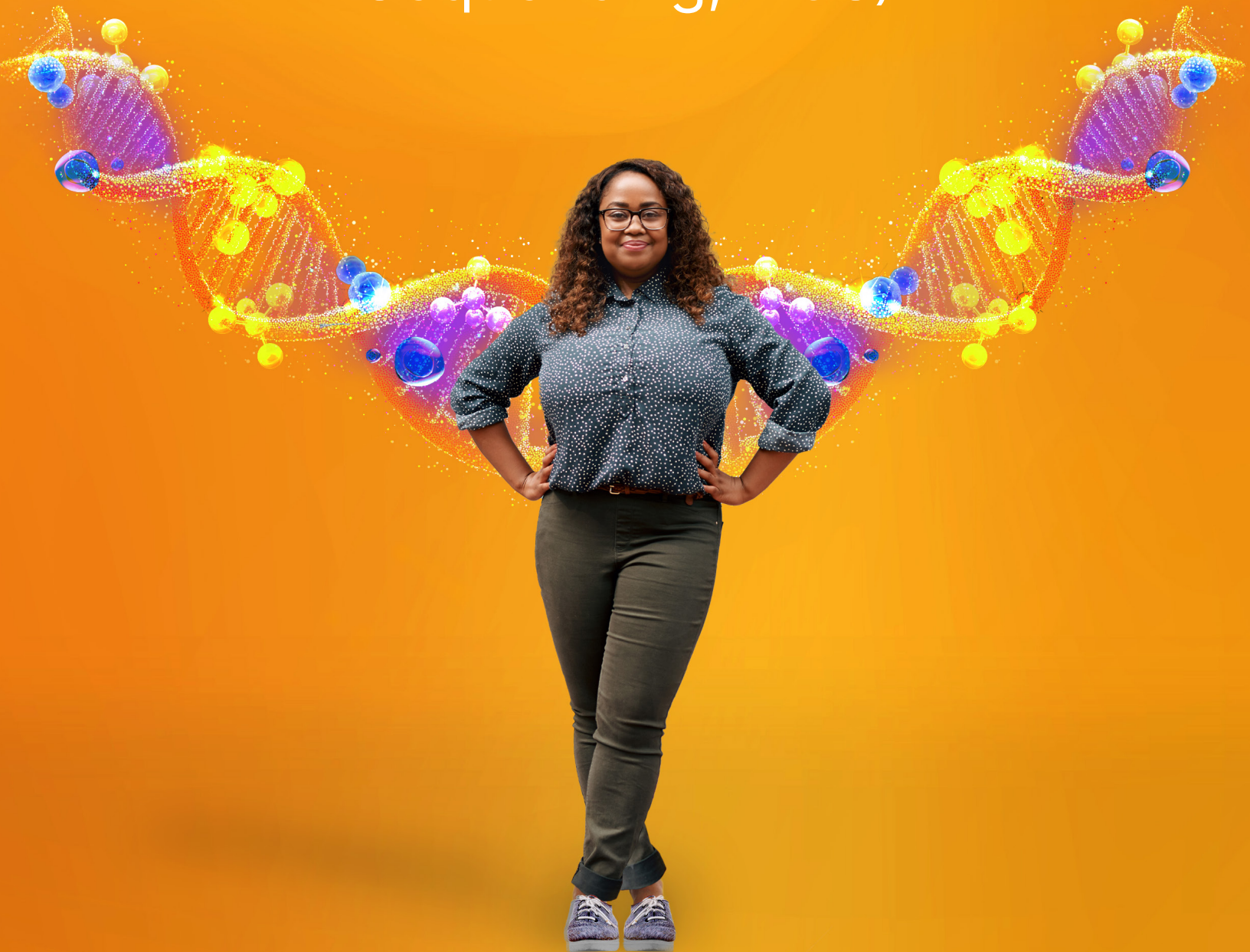


illumina®

Introducción a la secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS)




Índice

•	Sección 1: ¿Por qué este es el mejor momento para contemplar el uso de la secuenciación de nueva generación (NGS)?	3
	Poder de descubrimiento revolucionario con NGS	3
	La NGS es más accesible que nunca	4
	Aplicaciones de NGS	5
	La NGS acelera la investigación transcriptómica	6
	¿Cómo se compara la RNA-Seq con la qPCR?	6
	Transcriptómica basada en NGS en cualquier resolución biológica	7
•	Sección 2: ¿Cómo puede la NGS revolucionar su investigación?	8
	Beneficios de la NGS sobre los métodos moleculares tradicionales	8
	NGS supera los flujos de trabajo habituales	9
	NGS en acción	10
•	Sección 3: ¿Cómo es un flujo de trabajo de NGS?	11
	Descripción breve de NGS	11
	¿Qué puede hacer con los datos de NGS?	13
•	Sección 4: Cómo comenzar con la NGS	14
	Una guía paso a paso	14
	Resumen	15
	Glosario de términos	16
	Referencias	18
	Contraportada	21

¿Por qué este es el mejor momento para contemplar el uso de la secuenciación de nueva generación (NGS)?

Poder de descubrimiento revolucionario con NGS

La adopción de un enfoque imparcial en la investigación científica puede liberar el diseño experimental de los límites de la comprensión previa y las expectativas preconcebidas, lo que permite obtener información inexplorada sobre fenómenos, caminos y sistemas biológicos. La NGS ofrece la posibilidad de secuenciar grandes cantidades de material genético en una fracción del tiempo y el costo de los métodos tradicionales.¹⁻⁴ Esto permite pasar de la elaboración de perfiles de marcadores seleccionados con importancia conocida a la elaboración de perfiles de muchos marcadores, incluso aquellos con baja abundancia o importancia biológica desconocida. Los investigadores están aprovechando la lente imparcial de la NGS para revelar un panorama más amplio de entidades moleculares, lo que permite el descubrimiento de nuevos objetivos farmacológicos, redes de señalización y marcadores de enfermedades.²



“Cuando alguien está estudiando algo que es completamente nuevo o no está caracterizado, necesita un panorama mucho más amplio. En nuestro proyecto, hubo mucha incertidumbre sobre cuáles son los mecanismos que influyen en nuestros caminos. Y dado lo poco que sabíamos sobre los mecanismos, necesitábamos usar un enfoque más amplio como la NGS para comprender mejor el mecanismo en su totalidad.”

Amanda Touey, Dra. candidata en el laboratorio de la Dra. Paula Cohen en la Universidad Cornell

Por fortuna, no necesita ser un experto en NGS para comenzar. Este recurso tiene como objetivo sentar las bases para comprender el impacto en la investigación, los beneficios experimentales y el flujo de trabajo general de la NGS, a la vez que proporciona pasos factibles para comenzar.

El descubrimiento objetivo con NGS puede:

Ampliar el alcance de sus estudios experimentales

Encontrar las respuestas a sus preguntas de investigación más osadas

Impulsar su campo de especialización

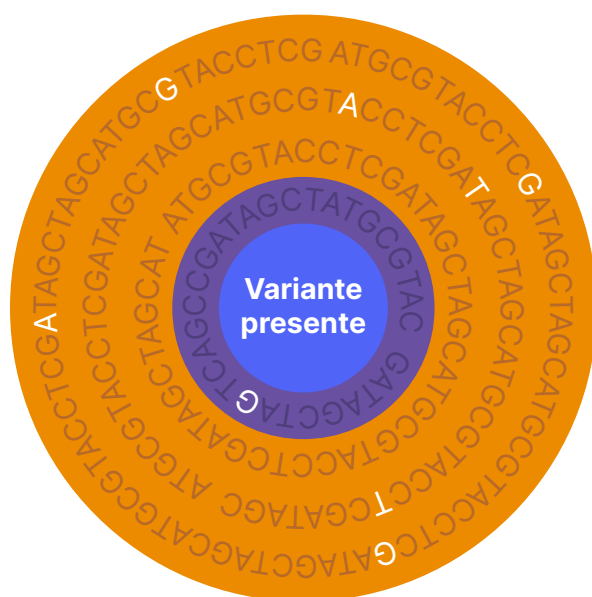
NGS potencia el descubrimiento objetivo: *expanda el alcance y el impacto de su investigación comenzando con una visión más amplia.*

La NGS es más accesible que nunca

El desarrollo de la secuenciación Sanger en 1977 fue el primer paso para desentrañar el código genético. Si bien este método fue revolucionario, se **limitaba a secuenciar una o varias regiones genéticas a la vez**.³

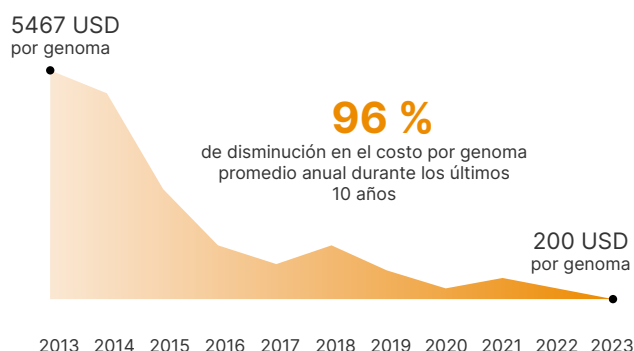
El comienzo de la era NGS, impulsada por el advenimiento de la tecnología de secuenciación por síntesis (Sequencing By Synthesis, SBS) de Illumina, ha expandido significativamente la secuenciación rápida y eficiente de grandes grupos de material genético.³⁻⁵ Además de una mayor velocidad y eficiencia, la NGS permite un mayor poder de descubrimiento (incluida la capacidad de identificar nuevas variantes) y una mayor resolución en comparación con la secuenciación Sanger y los métodos dirigidos tradicionales, como la PCR cuantitativa (qPCR).³⁻⁵

A pesar de estos beneficios, la barrera de entrada a la NGS inicialmente siguió siendo alta debido a los altos costos y la falta de experiencia generalizada.³ Sin embargo, en los últimos veinte años, el costo de la NGS ha disminuido rápidamente y los flujos de trabajo se han vuelto bien definidos, lo que lleva a un aumento en la accesibilidad.^{6,7,8} El análisis de datos de grandes conjuntos de datos de NGS también se ha vuelto cada vez más accesible y fácil de usar, lo que permite la interpretación automatizada de datos incluso sin conocimientos previos de bioinformática.^{3,4} En consecuencia, la adopción total de NGS para responder preguntas de investigación ha experimentado un auge, ejemplificado por el sorprendente aumento de publicaciones de investigación que emplean NGS durante la última década.⁹



- NGS
- Secuenciación Sanger
- qPCR

La NGS permite un mayor poder de descubrimiento en comparación con los métodos tradicionales: *revela variantes raras con una resolución de base única en cientos a miles de regiones objetivo.*³



La NGS es más rentable que nunca: *desde 2013, ha habido una disminución del 96 % en el costo promedio por genoma.*^{6,7}

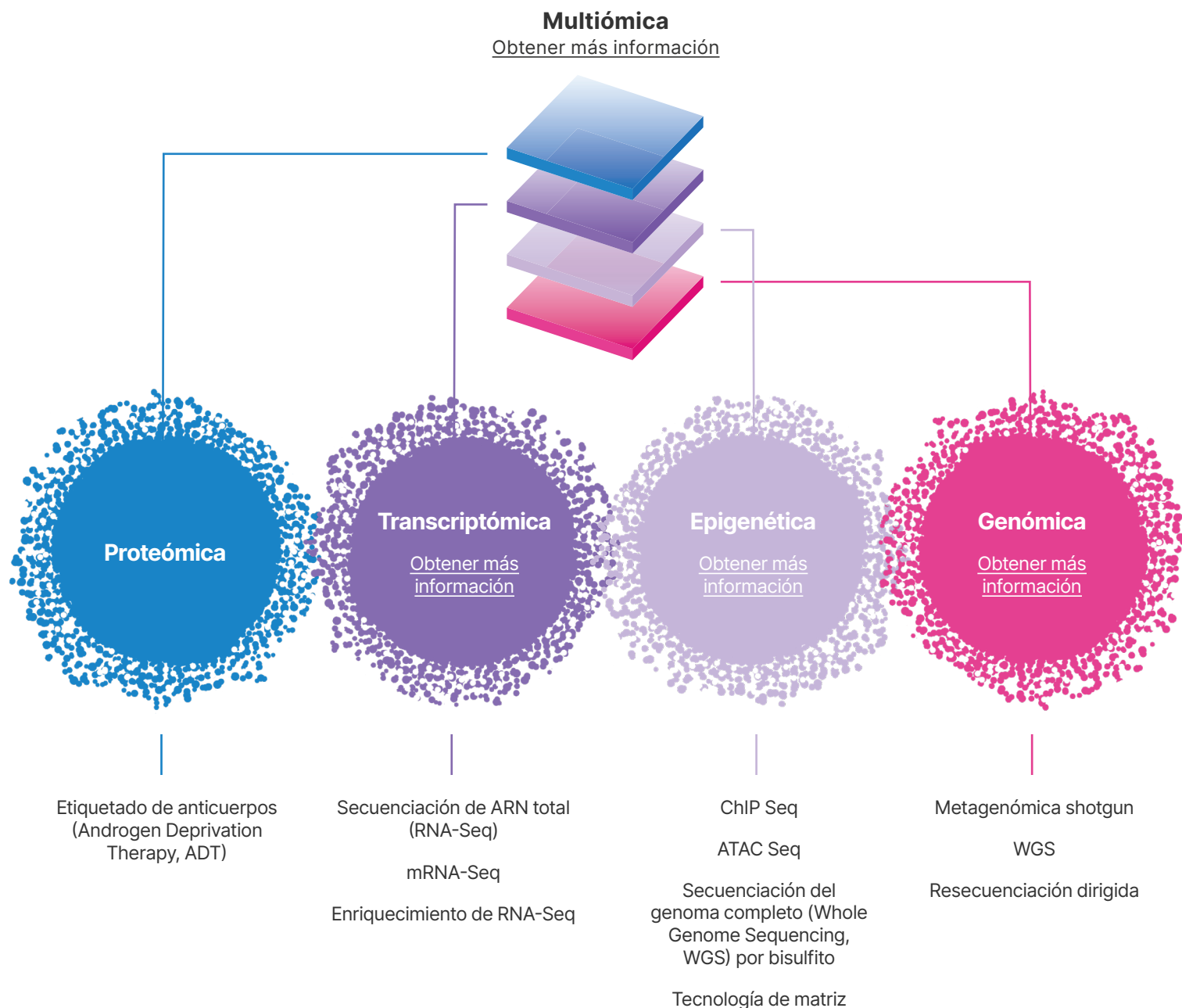


Las publicaciones de NGS están en aumento: *desde 2013, se ha pronosticado un aumento del 87 % en la cantidad de publicaciones que presentan datos obtenidos mediante NGS.*⁹

*total previsto para fin de año en función de las publicaciones mensuales en los primeros 3 meses de 2023

Aplicaciones de NGS

La NGS puede desempeñar un papel fundamental en la búsqueda de respuestas a una variedad de preguntas biológicas mediante una amplia gama de métodos publicados para diversos tipos de muestras. La NGS permite la investigación objetiva de múltiples “-omas” biológicos, como el proteoma, el transcriptoma, el epigenoma y el genoma. También se puede lograr un enfoque combinatorio que interroge a varios -omas a la vez, llamado multiómico, con la NGS.¹⁰⁻¹⁴



La NGS proporciona información sobre varias “ómicas”: obtenga acceso a métodos de proteómica, transcriptómica, epigenómica, genómica y multiómica combinatoria imparciales a gran escala al adoptar un flujo de trabajo de NGS en su laboratorio.¹⁰⁻¹⁴

La NGS acelera la investigación transcriptómica

La transcriptómica, la caracterización del conjunto completo o un subconjunto designado de transcritos de ARN producidas por el genoma, es un punto de entrada accesible para el uso de NGS, dada su versatilidad en todos los casos de uso y flujos de trabajo bien establecidos.^{10,15} La secuenciación de ARN basada en NGS permite a los investigadores generar conjuntos de datos a gran escala y de alto rendimiento que brindan información sobre la expresión y regulación genética en diversas muestras.¹⁰

Según su pregunta de investigación, la secuenciación de ARN (RNA-Seq) puede sentar las bases para lo siguiente:

1. Comprender cómo la expresión genética diferencial es responsable del desarrollo y el funcionamiento normales¹⁰
2. Descubrir los patrones de expresión genética que impulsan el desarrollo de enfermedades¹⁰
3. Identificar nuevos biomarcadores y dianas farmacológicas¹⁰
4. Dilucidar los efectos funcionales de las variantes genéticas¹⁰

La ARN-seq puede aplicarse a su investigación utilizando varias metodologías distintas que difieren por el alcance de los transcritos detectados.

Método	Descripción ¹⁰
mRNA-Seq	Medición sensible y precisa de la expresión génica, después del enriquecimiento del ARNm mediante captura de poli-A
Enriquecimiento de RNA-Seq	Enriquecimiento dirigido basado en sondas de transcritos específicos de interés a partir de muestras de baja cantidad o baja calidad
RNA-Seq total	Análisis masivo y de alto rendimiento del entorno de ARN total codificante y no codificante

La NGS permite varias metodologías de RNA-Seq: perfilar únicamente transcritos de ARNm, un subconjunto particular predefinido de transcritos de ARN o el conjunto completo de transcritos de ARN con RNA-Seq basado en NGS.

¿Cómo se compara la secuenciación de ARN con la qPCR?

Si bien la qPCR es un método confiable y ampliamente establecido para analizar la expresión génica, la secuenciación de ARN puede aumentar la calidad y la escala de un proyecto de investigación determinado al brindar visibilidad sobre cambios previamente indetectables en la expresión génica.^{10,16} Si bien la qPCR se basa en objetivos predefinidos, la secuenciación de ARN total y la secuenciación de ARNm no siempre requieren un conocimiento previo de los transcritos relevantes para su detección, lo que permite una visión imparcial del transcriptoma que permite a los investigadores comprender mejor los nuevos mecanismos moleculares subyacentes a los fenómenos biológicos.^{10,16}



Mayor poder de descubrimiento para detectar nuevos transcritos



Sensibilidad mejorada para detectar variantes raras y genes con baja expresión



Mayor rendimiento para la secuenciación simultánea de múltiples genes en múltiples muestras



Rango dinámico más amplio para cuantificar la expresión de los genes sin ruido de fondo ni saturación de señal

RNA-Seq ofrece más que qPCR: experimente un poder de descubrimiento imparcial e incomparable para interrogar el transcriptoma con NGS.^{10,16}

Transcriptómica basada en NGS en cualquier resolución biológica

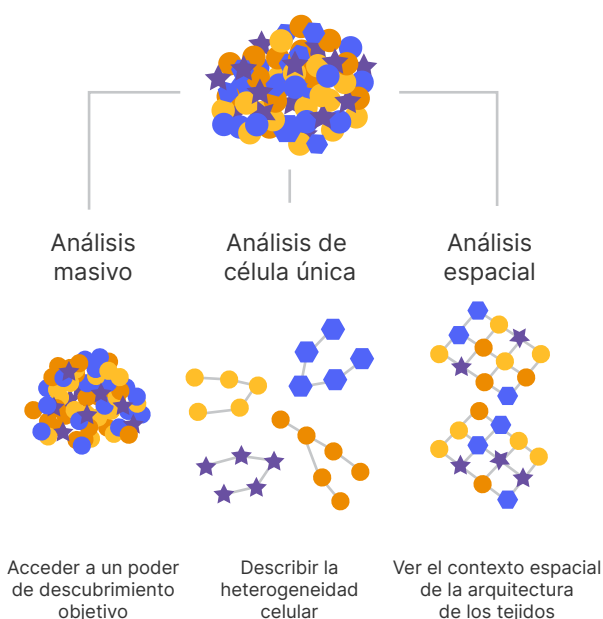
El proceso de analizar ARN a partir de muestras homogeneizadas de un tejido entero utilizando la RNA-Seq basada en NGS se denomina secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq masiva (bulk RNA-Seq)).¹⁰ La RNA-Seq masiva tiene flujos de trabajo excepcionalmente bien definidos y se ha implementado en miles de publicaciones científicas.^{10,17} La facilidad con la que se ejecuta la RNA-Seq masiva, combinada con su costo comparativamente bajo, la convierte en un método ideal para los investigadores de transcriptómica que son nuevos en la NGS. Dado que los tejidos están compuestos por múltiples tipos de células diferentes, la RNA-Seq masiva de tejidos enteros produce resultados promediados de los perfiles de expresión génica en estos diversos tipos de células.¹⁰

La secuenciación de ARN de célula única (scRNA-Seq) examina la expresión génica de una población de células únicas aisladas de una muestra de tejido.¹⁰ La implementación de la scRNA-Seq facilita la identificación de nuevos biomarcadores y tipos de células raras que de otro modo se omitirían con la RNA-Seq masiva.^{22,23} Esta resolución de células únicas es una herramienta valiosa en el estudio de múltiples fenómenos biológicos, incluido el microambiente tumoral y la diferenciación celular.^{18,19}

Además, la transcriptómica resuelta espacialmente, también llamada secuenciación espacial de ARN (RNA-Seq espacial), es un método innovador de perfil molecular que permite el análisis de la RNA-Seq de los genes dentro del contexto de una muestra de tejido.^{10, 20} Esto permite obtener información sobre cómo el microambiente tisular

puede influir en los perfiles de expresión génica de las células que lo comprenden, ya que las células pueden verse influenciadas por células vecinas, eventos de señales locales, interacciones entre células y más. Revelar la compleja mezcla de tipos de células de un tejido con técnicas espaciales ya ha permitido nuevos y significativos descubrimientos dentro de los campos de la neurociencia, la biología del desarrollo, el cáncer, y más.²¹

Si bien la RNA-Seq masiva carece de la resolución de la RNA-Seq espacial y de células únicas, este método puede usarse para comparar patrones de expresión génica entre poblaciones de células distintas mediante el uso primero de citometría de flujo para clasificar las células en poblaciones distintas, seguido de la RNA-Seq masiva para identificar diferencias transcriptómicas entre esas poblaciones.²⁴



Aplicaciones emergentes de las tecnologías de ARN-Seq: esté a la vanguardia de las metodologías espaciales y de células individuales que avanzan rápidamente con NGS.¹⁰

¿Cómo puede la NGS revolucionar su investigación?

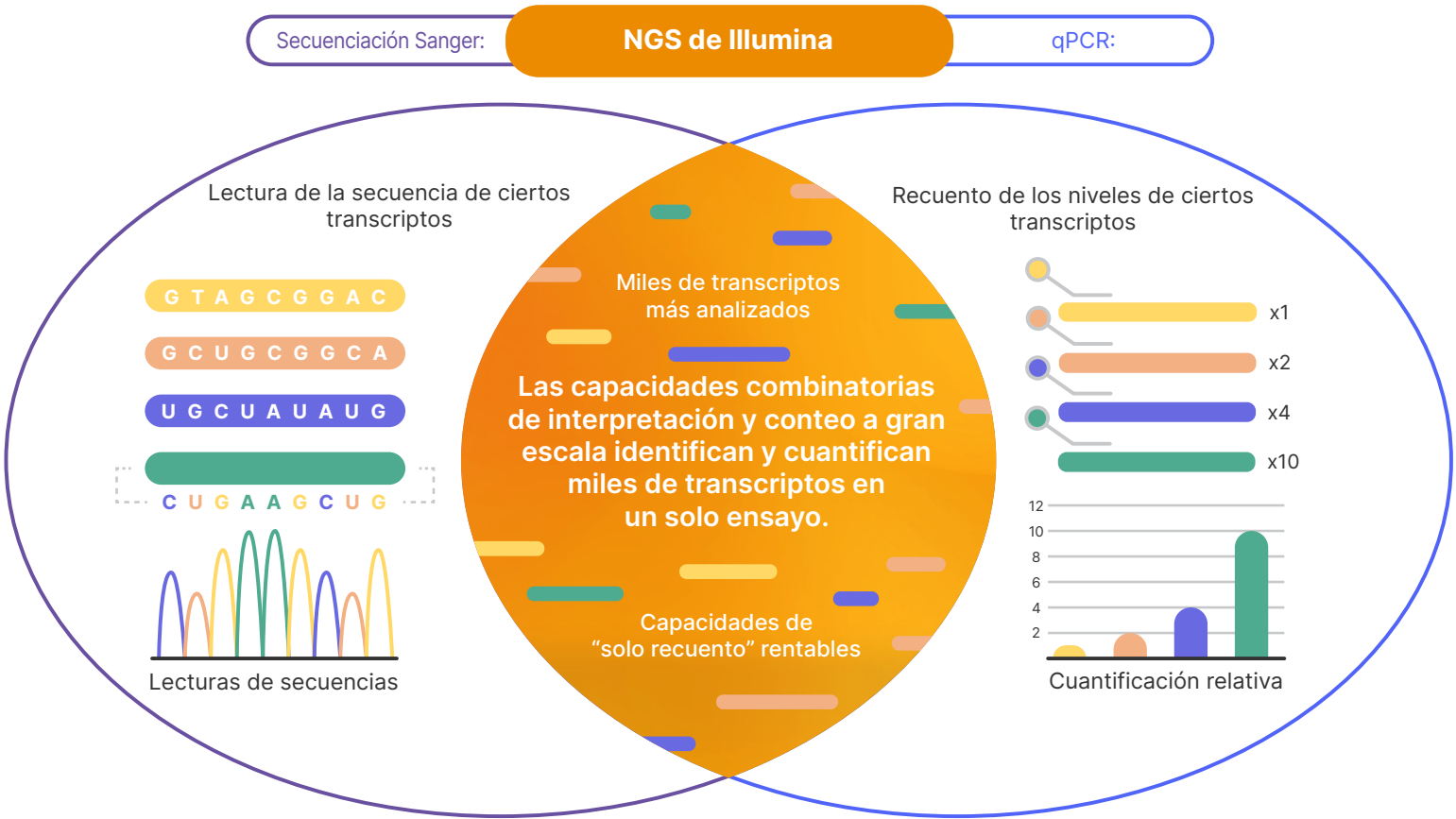
Beneficios de la NGS sobre los métodos moleculares tradicionales

Al analizar transcritos dentro de una muestra, los investigadores pueden elegir entre aplicaciones de interpretación o recuento.²⁵ “Interpretación” significa secuenciar transcritos de interés y alinearlos con una base de datos de referencia (“mapeo de lecturas”) para determinar la secuencia de ácido nucleico de los transcritos dentro de una muestra.²⁶ La secuenciación Sanger fue la metodología inicial utilizada para leer transcritos de interés.²⁷

Por otro lado, “recuento” se refiere a la cuantificación relativa de transcritos de interés dentro de una muestra, que proporciona información sobre la abundancia de transcritos y los cambios en la expresión génica en condiciones experimentales diferenciales.^{25,28} Tradicionalmente, la PCR cuantitativa (qPCR) ha sido la metodología de referencia utilizada para contar transcritos de interés.¹⁰ Al igual que estos experimentos de la qPCR, algunos métodos de NGS (como 3' RNA-Seq) no proporcionan la información de secuencia completa para un conjunto de genes expresados, sino más bien, proporcionan información suficiente para determinar si sus niveles de expresión han cambiado.²⁸

Los métodos transcriptómicos de Illumina ofrecen aplicaciones de interpretación, recuento y combinatorias de interpretación y recuento, según el método de NGS utilizado.^{10,28} Los métodos de interpretación basados en NGS, que secuencian transcritos completos de ARN, permiten a los investigadores identificar isoformas de ARN poco frecuentes, variantes de empalme y variantes de un solo nucleótido (SNV).¹⁰ Por otro lado, los métodos de recuento basados en NGS, que secuencian solo una parte del ARN (o un lector de código de barras para otro analito), permiten a los investigadores cuantificar la expresión génica a un bajo costo.^{10,29} Por último, los métodos de NGS que combinan la interpretación y el recuento permiten a los investigadores obtener una visión completa de la identidad de secuencia y la abundancia de transcritos en un solo ensayo de alto rendimiento.¹⁰

Para los estudios de detección de variantes con una gran cantidad de muestras, la NGS es el enfoque más eficiente y rentable para la secuenciación de decenas a miles de genes en comparación con los métodos convencionales.



Illumina NGS combina el poder de las aplicaciones tradicionales de interpretación y conteo: identifique secuencias completas y cuantifique los cambios de expresión en miles de transcritos en un solo ensayo con NGS.^{10, 25-28}

NGS supera los flujos de trabajo habituales

A diferencia de la qPCR y la secuenciación Sanger, la secuenciación de NGS puede identificar variantes en miles de regiones diana (hasta la resolución de base única) en un solo experimento.^{10,16,30}

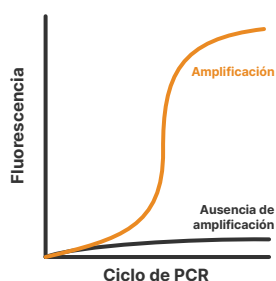
En comparación con la secuenciación Sanger, ciertos métodos NGS pueden:^{10,30}

- Evaluar más muestras de manera rentable
- Detectar múltiples variantes en todas las regiones del transcriptoma
- Aumentar la profundidad de secuenciación, la resolución de las mutaciones y el poder de descubrimiento

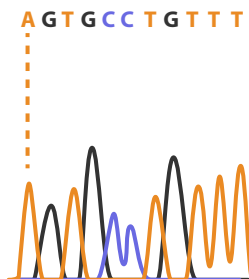
En comparación con la qPCR, ciertos métodos NGS pueden:^{10,16}

- Detectar transcritos conocidos y nuevos
- Cuantificar las lecturas de secuencias individuales para producir valores de expresión absolutos, no solo relativos
- Detectar cambios sutiles en la expresión génica, hasta un 10 %
- Identificar transcritos conocidos, isoformas de empalme alternativo, sitios de empalme y tipos de ARN pequeños y no codificantes

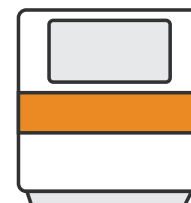
Al seleccionar el mejor método para responder una pregunta de investigación, es importante tener en cuenta no solo los beneficios de los métodos disponibles, sino también los desafíos y limitaciones asociados.



qPCR



Secuenciación Sanger



NGS

✓ Beneficios^{10,16,30}

- Flujo de trabajo familiar
- Equipo accesible disponible en la mayoría de los laboratorios

✗ Desafíos^{10,16,30}

- Solo accede a un conjunto predefinido de transcripciones
- Detecta solo transcritos conocidos, lo que limita el poder de descubrimiento
- Resolución de mutaciones y rendimiento limitados

✓ Beneficios^{10,16,30}

- Flujo de trabajo habitual
- Rentable cuando se secuencian entre 1 y 20 genes objetivo

✗ Desafíos^{10,16,30}

- Sensibilidad, rendimiento y poder de descubrimiento bajos
- No es rentable para >20 genes objetivo

✓ Beneficios^{10,16,30}

- La alta profundidad de secuenciación permite una alta sensibilidad (hasta el 1 %)
- Alto poder de descubrimiento
- Alta resolución de mutación
- La secuenciación masiva en paralelo permite flujos de trabajo de alto rendimiento y grandes conjuntos de datos
- Detecta cambios en la expresión génica de hasta el 10 %

✗ Desafíos^{10,16,30}

- No siempre es tan eficiente para la detección simple de una cantidad baja de genes objetivo

La NGS permite descubrimientos a gran escala, de alto rendimiento y objetivos: incorpore la NGS en su investigación para mejorar su poder de descubrimiento sobre los métodos moleculares tradicionales.

NGS en acción

La NGS está revolucionando una variedad de áreas de investigación básicas y traslacionales al proporcionar una visión más profunda de los mecanismos moleculares subyacentes a las funciones celulares y los estados de enfermedad en una variedad de sistemas biológicos (p. ej., muestras humanas, modelos animales y cultivo celular).

Área de investigación o enfermedad	Método de NGS	Aplicación	Ejemplo de investigación
Cáncer	RNA-Seq total	Secuenciación masiva de tumores para predecir la probabilidad de metástasis y los resultados clínicos asociados	Los investigadores evaluaron los perfiles de expresión génica de los tumores primarios de cáncer de ovario y aquellos que habían hecho metástasis. El análisis de RNA-Seq masiva reveló una firma de 100 genes expresados diferencialmente entre los dos tipos de tumores, lo que permitió a los investigadores predecir la probabilidad de metástasis tumoral, lo que sugirió una poca probabilidad de supervivencia. ³¹
Cáncer	scRNA-Seq	Estratificación de los tipos de células dentro de un tumor para predecir la respuesta clínica de un paciente a la terapia	Mediante el uso de la scRNA-Seq, los investigadores analizaron fibroblastos asociados al cáncer (CAF) en biopsias tumorales de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. En este análisis se encontraron tres subtipos distintos de CAF entre los tumores, cada uno diferente en sus perfiles de expresión génica y cada uno correlacionado con una terapia de respuesta clínica única. ³²
Cáncer	RNA-Seq total y WGS	Descubrimiento objetivo de transcritos y genes asociados al cáncer	Un estudio en el que se analizaron biopsias tumorales de 253 pacientes pediátricos con cáncer usando WGS y RNA-Seq reveló que el 86 % de los pacientes tuvo al menos un hallazgo que fue diagnóstico, pronóstico, susceptible o indicativo de una predisposición en la línea germinal. ³³ Curiosamente, el análisis de RNA-Seq de un tumor de uno de esos pacientes identificó una fusión génica en una vía dirigible que se sabe que impulsa la progresión del cáncer (la vía MEK). Este descubrimiento llevó a los médicos a cambiar su estrategia terapéutica (incorporación de inhibidores de MEK), lo que derivó en un tratamiento eficaz contra el cáncer. ³⁴
Secuenciación microbiana	RNA-Seq total	Identificación de microbiota viral diferencial en pacientes sanos frente a pacientes enfermos	El análisis de RNA-Seq profundo de la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn temprana o colitis ulcerosa halló una abundancia diferencial de ciertos transcritos virales en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que las firmas específicas del viroma intestinal pueden influir en la inflamación intestinal y contribuir a la patogénesis de estas enfermedades. ³⁵
Secuenciación microbiana	Metatranscriptómica ^a	Análisis longitudinal de las vías funcionales asociadas a la microbiota que influyen en la enfermedad	El análisis del metatranscriptoma de muestras fecales humanas aisladas de pacientes sanos y pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Inflammatory Bowel Disease, IBD) reveló ciertos transcritos metabólicos funcionales específicos de especies bacterianas que eran importantes para mantener la salud intestinal. ³⁶
Investigación de enfermedades complejas	RNA-Seq total	Identificación de polimorfismos de nucleótido único (Single-nucleotide Polymorphisms, SNP) no detectados previamente subyacentes a una enfermedad	Los investigadores utilizaron la RNA-Seq para evaluar a cuatro pacientes sanos y cuatro pacientes con silicosis e identificaron un SNP funcional en un único gen inmunomodulador que se asoció con una mayor susceptibilidad a la silicosis. ³⁷
Investigación de enfermedades complejas	RNA-Seq espacial y de células únicas	Descubrimiento de distintos nichos celulares que comprenden un tejido más grande	Los investigadores perfilaron el corazón humano y encontraron ocho regiones celulares distintas con expresión diferencial de canales iónicos y receptores acoplados a proteínas G que influyeron en una gran cantidad de interacciones celulares. ³⁸

a. Una técnica de NGS utilizada para estudiar los perfiles de expresión génica de todos los microbios presentes dentro de una muestra compleja dada.


La NGS potencia los descubrimientos en muchas áreas terapéuticas: descubra el potencial ilimitado de la NGS para impulsar su campo de investigación.

¿Cómo es un flujo de trabajo de NGS?

Descripción breve de NGS


El flujo de trabajo general para un experimento de NGS comienza con el aislamiento del material genético. Una vez que tenga su muestra, no necesita ser un experto en NGS para comenzar: envíe sus muestras a un proveedor de servicios local, como a un laboratorio académico o comercial central.

Muchos proveedores de servicios brindan apoyo integral, y la colaboración temprana en el proceso de diseño experimental es la mejor manera de obtener asistencia especializada en cada paso de su flujo de trabajo de NGS, desde la preparación de muestras hasta el análisis de datos.




El uso de un laboratorio central fue crucial para mi capacidad de comenzar con la NGS. Entre los estudios de posgrado y muchos otros métodos que necesitaba dominar, el uso del laboratorio me ayudó a comenzar sin ser un experta.

Amanda Touey, Dra. candidata en el laboratorio de la Dra. Paula Cohen en la Universidad Cornell

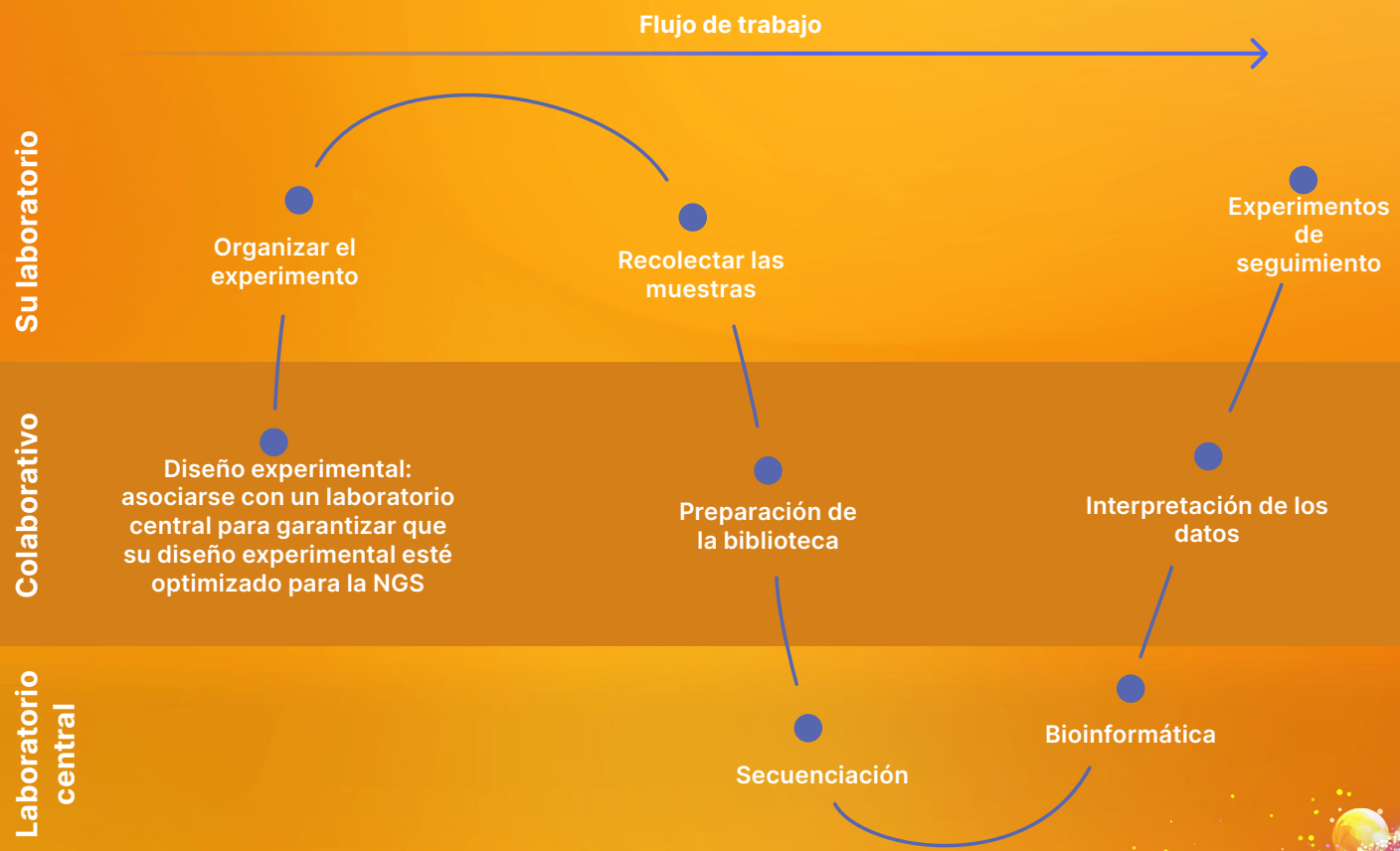


[A laboratorios centrales] les gusta involucrarse con los investigadores desde el principio para que podamos ayudar a dirigir el diseño experimental, comprender su pregunta biológica y luego tomar determinaciones a partir de allí en términos de cuál es el mejor método

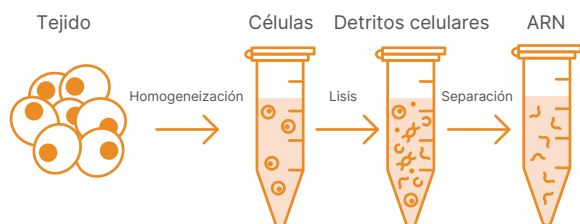
Dr. Adrian McNairn, biólogo principal de Genomics Innovation Hub

 Flujo de trabajo de la secuenciación de ARN de Illumina [Ver aquí](#)

La colaboración con los laboratorios centrales simplifica el flujo de trabajo de NGS



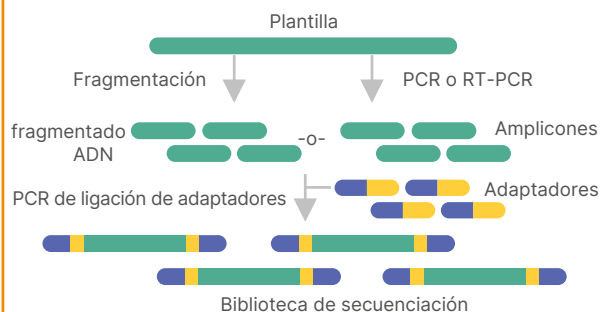
Paso 1 Extracción



Aislamiento del ARN

Purificación del ARN total o de tipos de ARN específicos a partir de muestras mediante la homogeneización de tejidos, la lisis celular y la eliminación de los detritos.

Paso 2 Preparación de biblioteca



Fragmentación y ligación de adaptadores

Tanto la fragmentación de la muestra como la adición de adaptadores identifican su muestra y hacen que sea compatible con los sistemas de secuenciación de Illumina.

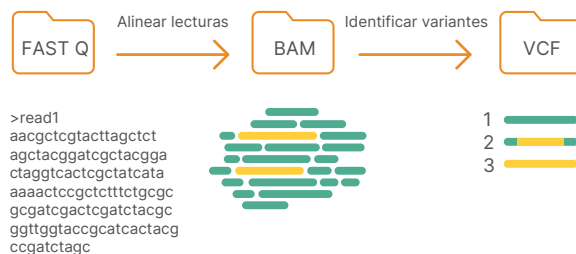
Paso 3 Secuenciación



Secuenciación por síntesis

La tecnología de secuenciación de Illumina emplea nucleótidos unidos a fluoróforos para permitir una fácil identificación de cada base mientras se incorpora durante la síntesis de ADN.

Paso 4 Análisis de datos



Bioinformática e interpretación

El análisis de datos integrado de la información sobre secuenciación le ofrece resultados tangibles que son importantes para sus preguntas de investigación.

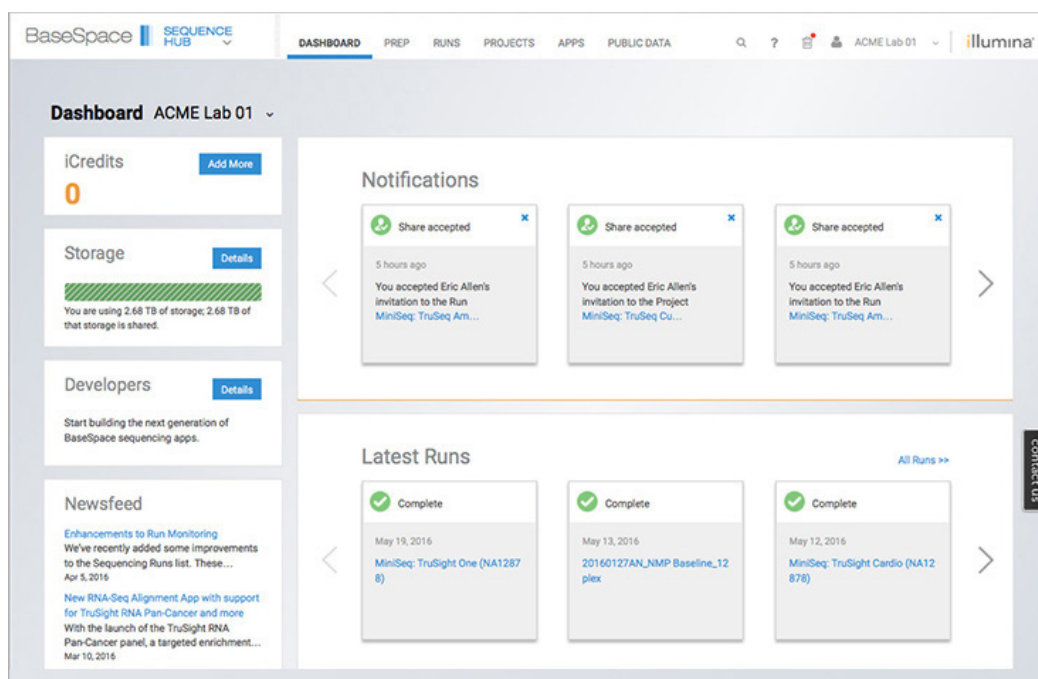
Flujo de trabajo de la NGS de Illumina: capacidades de secuenciación de vanguardia que potencian sus descubrimientos.

El flujo de trabajo de la NGS para otras aplicaciones: Acceda a nuestros libros electrónicos de [genómica](#), [epigenómica](#), [transcriptómica](#) y [multiómica](#).

¿Qué puede hacer con los datos de NGS?

Una vez que sus muestras de NGS se secuencian, los técnicos del laboratorio central pueden ayudarlo con cada paso del análisis y la interpretación de los datos. Los datos también se comparten y se pueden ver en el BaseSpace Sequence Hub de Illumina, lo que le permite acceder a sus datos de NGS y gestionarlos de forma fácil. Además, BaseSpace Sequence Hub ofrece una variedad de programas basados en aplicaciones con interfaces de usuario accesibles para simplificar la bioinformática, lo que permite la visualización e interpretación automatizadas de sus datos de secuenciación.

Ejemplo de panel de BaseSpace Sequence Hub



Aplicaciones de análisis de datos fáciles de usar



Alineamiento de RNA-Seq

Illumina, Inc.

La aplicación de alineamiento de RNA-Seq alinea las lecturas de RNA-Seq sin procesar con genomas de referencia, cuantifica la expresión génica e identifica pequeñas variantes y fusiones génicas.



Cancer Variant Caller

Samsung SDS

La aplicación Cancer Variant Caller detecta SNV e INDEL dado un archivo BAM con alta sensibilidad.



DRAGEN RNA Pathogen Detection

Illumina Inc.

DRAGEN RNA Pathogen Detection utiliza una referencia combinada de seres humanos + virus para analizar los datos de patógenos y crear archivos FASTA de consenso.



DRAGEN Differential Expression

BaseSpace Labs

La aplicación DRAGEN Differential Expression realiza análisis secundarios de transcritos de ARN.

Cómo comenzar con la NGS


Una guía paso a paso

Con su creciente accesibilidad y sus profundas aplicaciones en investigación, no hay mejor momento que este para comenzar a usar NGS. Illumina se compromete a apoyar su viaje por la NGS de principio a fin.



“ Ahora es el momento de comenzar porque el costo es adecuado y porque tenemos tanta experiencia en nuestro haber que realmente podemos facilitar cualquier experimento genómico que desee hacer o pueda pensar.

Ann Tate, supervisora de Servicios Técnicos en la Universidad de Cornell



Resumen

- > NGS es fácil de acceso e implementación, y no hay mejor momento para comenzar que este.
- > La RNA-Seq impulsada por NGS revela información más profunda sobre el transcriptoma para obtener respuestas más impactantes a sus preguntas de investigación.
- > No necesita ser un experto para comenzar: el flujo de trabajo de la NGS es accesible para todos.
- > Illumina es un experto destacado en NGS y un socio de confianza que puede ayudarlo a lograr el éxito en su investigación.

Glosario de términos

ATAC-seq: un método en el que el ADN genómico se expone a Tn5, una transposasa altamente activa que de manera preferente se inserta en regiones abiertas de cromatina y agrega cebadores de secuenciación. El análisis de NGS posterior proporciona información sobre la accesibilidad de la cromatina en todo el genoma.

Recuento: la cuantificación relativa de un gen dado dentro de una muestra.

Descubrimiento objetivo: la implementación de un enfoque experimental que no se basa en una hipótesis dirigida, sino que evalúa un gran alcance de perspectivas biológicas mediante la detección de alto rendimiento.

Etiquetado de anticuerpos (ADT): el uso de oligonucleótidos con código de barra de ADN conjugados a anticuerpos de una proteína específica para permitir la cuantificación de proteínas basada en NGS.

Genómica: el estudio del genoma, que es el conjunto completo de ADN dentro de una muestra biológica.

Interpretación: el proceso de analizar la secuencia completa de una molécula de ADN o ARN y mapearla en un genoma de referencia para la identificación génica.

Lectura: El proceso de secuenciación de ADN o ADNc de nueva generación implica el uso de instrumentos sofisticados para determinar la secuencia de una muestra de ADN o ARN. En términos generales, la “lectura” de una secuencia se refiere a la cadena de datos de bases A, T, C y G correspondientes al ADN o ADNc de la muestra. Con la tecnología Illumina, se generan millones de lecturas en una sola ejecución de secuenciación.

Metagenómica shotgun: un enfoque de secuenciación de nueva generación que permite a los investigadores tomar muestras integrales de todos los genes de todos los organismos presentes en una muestra compleja.

Metatranscriptómica: Una técnica de NGS para estudiar los perfiles de expresión génica de todos los microbios presentes dentro de una muestra compleja dada.

Multiómica: el estudio combinado de varias ómicas, que proporciona una visión multidimensional y holística de una muestra biológica.

Panel de secuenciación: Un subconjunto de genes o regiones genómicas de interés incluidos en un ensayo de NGS dirigido. El panel de secuenciación (regiones diana) puede amplificarse o enriquecerse mediante el uso de conjuntos de sondas específicas de una secuencia. El panel puede secuenciarse durante una fracción del tiempo y del costo en comparación con enfoques de secuenciación más amplios.

Poder de descubrimiento: la capacidad de identificar variantes nuevas o ácidos nucleicos regulados diferencialmente

Polimorfismo de nucleótido único (SNP): una variante genómica que surge de un único cambio de base en el código genético.

Preparación de la biblioteca: Un protocolo sobre biología molecular que convierte una muestra de ADN genómico o una muestra de ADNc de un transcripto a una biblioteca de secuenciación, que luego puede secuenciarse en un instrumento de NGS. El primer paso en la preparación de la biblioteca es la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN, seguida de la ligación de adaptadores 5' y 3' a cada fragmento de ADN. De forma alternativa, la “tagmentación” combina las reacciones de fragmentación y ligación en una sola etapa y aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca.

Proteómica: el estudio del proteoma, que es el conjunto completo de proteínas codificadas por un sistema biológico.

Resecuenciación dirigida: un enfoque de secuenciación de nueva generación en el que un subconjunto de genes o regiones diana se amplifica o enriquece antes de la secuenciación.

Resolución de mutaciones: El tamaño de la mutación, en pares de bases, que una tecnología puede detectar. Por ejemplo, el cariotipado proporciona una resolución de mutación de 5-10 Mb, mientras que la

hibridación genómica comparativa por arrays proporciona una “resolución más alta” mediante la detección de mutaciones de hasta 50 kb. Las técnicas de NGS proporcionan la resolución de las mutaciones más alta posible porque pueden proporcionar la detección de variantes de pares de base única (detectar la presencia de una mutación) y la identificación de nucleótidos (detectar la identidad de una mutación).

RNA-Seq masiva: un enfoque de secuenciación que evalúa el perfil de expresión génica promedio de una población de células.

Secuencia de ARN espacial: un enfoque de secuenciación que utiliza tejidos intactos para capturar el perfil de expresión génica de las células dentro de su entorno de tejido nativo.

Secuenciación de ARN (RNA-Seq): un método altamente sensible y preciso para el análisis de expresión génica, que puede evaluar el transcriptoma completo, en lugar de solo algunos transcritos seleccionados. Lectura: la secuencia inferida de la salida de pares de bases de una ejecución de secuenciación.

Secuenciación de ARN de células únicas (scRNA-Seq): un enfoque de secuenciación que aísla las células individuales para evaluar los perfiles de expresión génica de las células individuales que conforman una población más grande.

Secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-Seq): la combinación de usar anticuerpos de una proteína específica para inmunoprecipitar proteínas asociadas a la cromatina, seguida de la NGS para identificar sus sitios de unión al ADN.

Secuenciación de nueva generación (NGS): una tecnología de secuenciación paralela a gran escala que ofrece un rendimiento, una escalabilidad y una velocidad ultra altos.

Secuenciación Sanger: el método de secuenciación, también conocido como secuenciación de electroforesis capilar, desarrollado en 1977 por Frederick Sanger. Implica un método de secuenciación de ADN basado en la incorporación selectiva de didesoxinucleótidos de terminación de cadena mediante ADN polimerasa durante la replicación de ADN in vitro.

Secuenciación del genoma completo: un método integral de secuenciación de nueva generación para analizar genomas completos de muestras experimentales.

Secuenciación por síntesis (SBS): La tecnología SBS utiliza nucleótidos etiquetados con fluorescencia para secuenciar decenas de millones de plantillas de secuencia en paralelo. Durante cada ciclo de secuenciación, se agrega un único dNTP etiquetado a la cadena de ácido nucleico. La etiqueta de los nucleótidos sirve como un “terminador reversible” para la polimerización: después de la incorporación de dNTP, la etiqueta se identifica a través del estímulo láser y la obtención de imágenes, luego se escinde enzimáticamente para permitir la siguiente ronda de incorporación. Dado que los cuatro dNTP (A, C, T, G) unidos al terminador reversible están presentes, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación. Las llamadas de base se realizan de forma directa a partir de mediciones de intensidad de señal durante cada ciclo, lo que reduce en gran medida las tasas de error sin procesar en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base altamente precisa que elimina los errores específicos de la secuencia-contexto, lo que permite una sólida llamada de base en todo el genoma, incluidas las regiones de secuencia repetitiva y dentro de los homopolímeros.

Sensibilidad: En la secuenciación, la capacidad de detectar variantes raras de baja frecuencia.

Transcriptómica: el estudio del transcriptoma, que es el conjunto completo de ARN dentro de una muestra biológica.

Referencias

1. Wolff HB, Steeghs EMP, Mfumbilwa ZA, et al. Cost-Effectiveness of Parallel Versus Sequential Testing of Genetic Aberrations for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer in the Netherlands. *JCO Precis Oncol*. 2022;6:e2200201. doi:10.1200/PO.22.00201
2. NGS vs. qPCR. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-qpcr.html>. Consultado el 22 de marzo de 2023.
3. Illumina. Benefits of NGS Targeted Resequencing. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/targeted-resequencing-guide-770-2016-012.pdf>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
4. The Scientist. Modern Multiomics: Why, How, and Where to Next? May 15, 2023. <https://www.the-scientist.com/sponsored-article/modern-multiomics-why-how-and-where-to-next-71113>. Consultado el 22 de mayo de 2023.
5. Arteche-López A, Ávila-Fernández A, Romero R, et al. Sanger sequencing is no longer always necessary based on a single-center validation of 1109 NGS variants in 825 clinical exomes. *Sci Rep*. 2021;11(1):5697. Publicado el 11 de marzo de 2021. doi:10.1038/s41598-021-85182-w
6. National Human Genome Research Institute. DNA Sequencing Costs: Data. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>. Consultado el 10 de abril de 2023.
7. 3billion. Whole Genome Sequencing cost 2023. <https://3billion.io/blog/whole-genome-sequencing-cost-2023#:~:text=The%20major%20market%20leader%20Illumina,results%20at%20twice%20the%20speed>. Consultado el 10 de abril de 2023
8. Dahlö M, Scofield DG, Schaal W, Spjuth O. Tracking the NGS revolution: managing life science research on shared high-performance computing clusters. *Gigascience*. 2018;7(5):giy028. doi:10.1093/gigascience/giy028
9. Dimensions. Término de búsqueda: (NGS AND sequencing) O "next generation sequencing" O "next-generation sequencing" O "massively parallel sequencing" O "massive parallel sequencing" O "high-throughput sequencing" O "high throughput sequencing", Año de publicación especificado, tipo de publicación: Artículo. <https://app.dimensions.ai>. Consultado el 8 de abril de 2023.
10. Illumina. *High-impact discovery through gene expression and regulation research*. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/gene-expression-profiling-e-book-web.pdf>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
11. Illumina. Methods Guide. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/gated/methods-guide-770-2014-018.pdf>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
12. Epigenetics | Epigenetic Analysis Tools. <https://www.illumina.com/techniques/popular-applications/epigenetics.html>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
13. Illumina. *Titration of TotalSeq- A Universal Cocktail antibodies in bulk RNA-Seq reveals key expression differences*. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/qcs/assembled-assets/marketing-literature/biolegend-totalseq-dilution-application-note-m-gl-00475/biolegend-totalseq-dilution-application-note-m-gl-00475.pdf>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
14. Illumina. *The power of multiomics*. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gc/marketing-literature/multiomics/multiomics-ebook-m-gl-00120.pdf>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
15. Han Y, Gao S, Muegge K, Zhang W, Zhou B. Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. *Bioinform Biol Insights*. 2015;9(Suppl 1):29-46. Publicado el 15 de noviembre de 2015. doi:10.4137/BBI.S28991

16. Illumina. Advantages of next-generation sequencing vs. qPCR. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-qpcr.html>. Consultado el 22 de mayo de 2023.
17. Dimensions. Término de búsqueda: (RNA-Seq), tipo de publicación: Artículo. <https://app.dimensions.ai>. Consultado el 22 de mayo de 2023.
18. Zhang Y, Wang D, Peng M, et al. Single-cell RNA sequencing in cancer research. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):81. Publicado el 1 de marzo de 2021. doi:10.1186/s13046-021-01874-1.
19. Ranzoni AM, Tangherloni A, Berest I, et al. Integrative Single-Cell RNA-Seq and ATAC-Seq Analysis of Human Developmental Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2021;28(3):472-487.e7. doi:10.1016/j.stem.2020.11.015
20. Spatial Transcriptomics. 10x Genomics. <https://www.10xgenomics.com/spatial-transcriptomics>. Consultado el 23 de marzo de 2023.
21. Marx V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics. *Nature Methods*. 2021;18(1):9-14. doi:<https://doi.org/10.1038/s41592-020-01033-y>
22. Wang Y, Mashock M, Tong Z, et al. Changing Technologies of RNA Sequencing and Their Applications in Clinical Oncology. *Front Oncol*. 2020;10:447. Publicado el 9 de abril de 2020. doi:10.3389/fonc.2020.00447
23. Ke M, Elshenawy B, Sheldon H, Arora A, Buffa FM. Single cell RNA-sequencing: A powerful yet still challenging technology to study cellular heterogeneity. *Bioessays*. 2022;44(11):e2200084. doi:10.1002/bies.202200084
24. Kobayashi S, Nagafuchi Y, Okubo M, et al. Integrated bulk and single-cell RNA-sequencing identified disease-relevant monocytes and a gene network module underlying systemic sclerosis. *J Autoimmun*. 2021;116:102547. Doi:10.1016/j.jaut.2020.102547
25. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis [published correction appears in *Genome Biol*. 2016;17(1):181]. *Genome Biol*. 2016;17:13. Publicado el 26 de enero de 2016. Doi:10.1186/s13059-016-0881-8
26. EMBL-EBI Training. Functional genomics II: Read mapping or alignment. <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/rna-sequencing/performing-a-rna-seq-experiment/data-analysis/read-mapping-or-alignment/>. Consultado el 22 de mayo de 2023.
27. Technology Networks Genomics Research. RNA-Seq: Basics, Applications, and Protocol. <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/rna-seq-basics-applications-and-protocol-299461>. Publicado el 6 de abril de 2018. Consultado el 1 de junio de 2023.
28. Ma F, Fuqua BK, Hasin Y, et al. A comparison between whole transcript and 3' RNA sequencing methods using Kapa and Lexogen library preparation methods. *BMC Genomics*. 2019;20(1):9. Publicado el 7 de enero de 2019. doi:10.1186/s12864-018-5393-3
29. Cheng J, Liao J, Shao X, Lu X, Fan X. Multiplexing Methods for Simultaneous Large-Scale Transcriptomic Profiling of Samples at Single-Cell Resolution. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(17):e2101229. doi:10.1002/advs.202101229
30. Illumina. Differences between NGS and Sanger Sequencing. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-sanger-sequencing.html#:~:text=The%20critical%20difference%20between%20Sanger,of%20genes%20at%20one%20time>. Consultado el 22 de mayo de 2023.
31. Sallinen H, Janhonen S, Pölönen P, et al. Comparative transcriptome analysis of matched primary and distant metastatic ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1121. Publicado el 19 de noviembre de 2019. doi:10.1186/s12885-019-6339-0

32. Hu H, Piotrowska Z, Hare PJ, et al. Three subtypes of lung cancer fibroblasts define distinct therapeutic paradigms. *Cancer Cell*. 2021;39(11):1531-1547.e10. doi:10.1016/j.ccell.2021.09.003
33. Newman S, Nakitandwe J, Kesserwan CA, et al. Genomes for Kids: The Scope of Pathogenic Mutations in Pediatric Cancer Revealed by Comprehensive DNA and RNA Sequencing. *Cancer Discov*. 2021;11(12):3008-3027. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1631
34. Nature Portfolio. Dynamic cancer transcriptome exposes new therapeutic targets. *Nature*. Consultado el 26 de abril de 2023. <https://www.nature.com/articles/d42473-021-00571-z>
35. Ungaro F, Massimino L, Furfaro F, et al. Metagenomic analysis of intestinal mucosa revealed a specific eukaryotic gut virome signature in early-diagnosed inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2018;10(2):149-158. doi:<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1511664>
36. Schirmer M, Franzosa EA, Lloyd-Price J, et al. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat Microbiol*. 2018;3(3):337-346. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29311644/>
37. Zhou Y, Zhang Y, Zhao R, et al. Integrating RNA-Seq With GWAS Reveals a Novel SNP in Immune-Related HLA-DQB1 Gene Associated With Occupational Pulmonary Fibrosis Risk: A Multi-Stage Study. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:796932. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796932>
38. Kanemaru K, Cranley J, et al. Spatially resolved multiomics of human cardiac niches. *BioRxiv*. 2023. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.30.526202v1>

Lleve su investigación a lo más alto con la secuenciación de nueva generación

Estamos listos cuando usted lo está. ¡Comencemos!

¿Está contemplando el uso de la NGS para su investigación? Escanee el código QR o haga clic a continuación para comenzar su viaje.



<https://www.illumina.com/destination/new-to-ngs-ebook.html>



Número gratuito (EE. UU.): 1.800.809.4566 | Teléfono: +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas registradas son propiedad de Illumina, Inc. o de sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre la marca, consulte www.illumina.com/company/legal.html.