

# Aumento de la cobertura del promotor de *TERT* con TruSight™ Oncology 500 High-Throughput

Una sencilla modificación  
del protocolo mejora el  
rendimiento en regiones  
ricas en GC



## Introducción

La longitud de los telómeros tiene asociaciones conocidas con numerosas enfermedades humanas, entre las que se incluye el cáncer. La enzima telomerasa transcriptasa inversa (TERT) desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los telómeros. Se han observado mutaciones en el promotor de *TERT* en más de 50 tipos de cáncer.<sup>1</sup> Concretamente, se han observado dos mutaciones puntuales de mayor riesgo en el promotor de *TERT* en un 71 % de los melanomas<sup>2,3</sup> y un 83 % de los glioblastomas<sup>4</sup>, por lo que la secuenciación precisa de esta región del gen es fundamental para aplicaciones pronósticas. Sin embargo, la región promotora de *TERT* es rica en GC y contiene más de un 80 % de bases de GC<sup>5</sup>, lo que complica la amplificación y secuenciación del ADN.

En esta nota técnica describimos una modificación de la etapa de amplificación de librerías enriquecidas (EL-PCR) del protocolo TruSight Oncology 500 High-Throughput que optimiza la amplificación y la secuenciación posterior de regiones ricas en GC, como el promotor de *TERT*, sin comprometer el rendimiento de las porciones no ricas en GC del genoma. Se obtuvieron resultados similares con TruSight Oncology 500 (datos no mostrados).

## Métodos

### Protocolo de EL-PCR modificado

Durante la preparación de librerías, las sondas que contienen secuencias de amplificación PCR y adaptadores de secuenciación se unen a regiones específicas del ADN. Estos fragmentos de ADN se amplifican mediante la PCR y se purifican antes de cargarlos en una celda de flujo que se une a los fragmentos mediante los adaptadores ligados. Como se ha indicado anteriormente, puede ser problemático realizar la amplificación PCR de las regiones ricas en GC, lo que da como resultado un menor rendimiento y una menor cobertura de estas regiones durante la secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing). Con el objetivo de superar los problemas a la hora de secuenciar regiones ricas en GC mediante NGS, los científicos de Illumina aumentaron la duración de los ciclos durante la amplificación final (EL-PCR) de las librerías en el protocolo de TruSight Oncology 500 High-Throughput (tabla 1).

### Condiciones experimentales

La evaluación de los cambios en la duración de los ciclos se realizó con muestras de ADN fijado en formol e incluido en parafina (FFPE, formalin fixed, paraffin-embedded) positivo para cáncer de vejiga o tiroideo y una muestra de control de línea celular SeraCare.

Tabla 1: comparación de los protocolos de EL-PCR estándar y modificado

Paso	Temperatura (°C)	Desviación estándar	Duración modificada	N.º de ciclos
Desnaturalización	98 °C	30 s	30 s	1
	98 °C	10 s	30 s	
Ciclos	60 °C	30 s	30 s	18
	72 °C	30 s	60 s	
Extensión	72 °C	5 min	5 min	1
Retención	10 °C	Retención	Retención	–

Se generaron librerías siguiendo la Guía de referencia de TruSight Oncology 500 High-Throughput<sup>6</sup> empleando el protocolo de EL-PCR estándar o modificado. En el protocolo de EL-PCR modificado se amplió la duración de la amplificación de 41 a 57 minutos. Las librerías preparadas se secuenciaron en NovaSeq™ 6000 Sequencing System con la celda de flujo S2 y una longitud de lectura de 2 × 101 pb. El análisis se realizó con DRAGEN™ TruSight Oncology 500 Analysis Software v2.1.0.

## Resultados

Se observó una mejora de la cobertura de la región promotora de *TERT* rica en GC y de las regiones con mayor contenido de GC en las librerías preparadas empleando el protocolo de EL-PCR modificado (figura 1 y figura 2). Al mismo tiempo, la cobertura de regiones no ricas en GC se mantuvo elevada y no parecía verse afectada por los cambios en el protocolo de EL-PCR (figura 3). Además, los resultados se confirmaron con estudios adicionales con muestras positivas para cáncer de vejiga, mama, riñón, pulmón, piel o útero.<sup>7</sup> Cabe destacar que la calidad de la muestra original afectará a los resultados; las muestras de mayor calidad, aquellas con un menor ΔCq, mostrarán una mejor cobertura en comparación con las muestras de menor calidad.

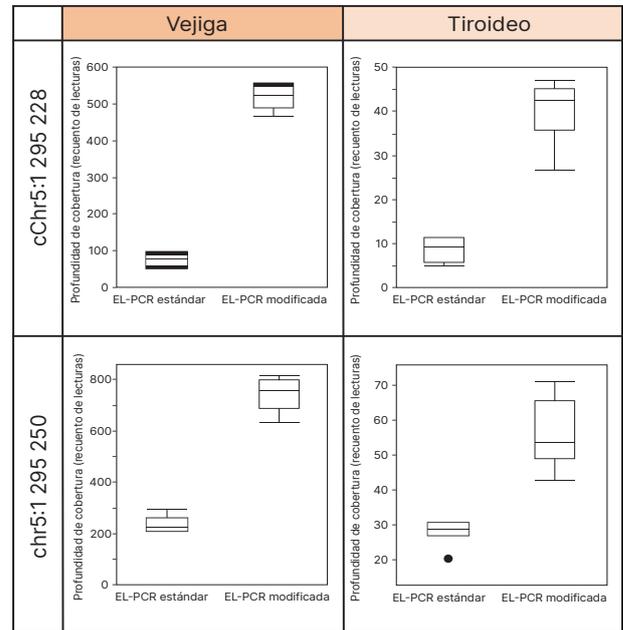


Figura 1: mejora de la cobertura del promotor de *TERT* utilizando el protocolo de EL-PCR modificado. Se muestra el análisis de dos posiciones de mutaciones de alto riesgo recurrentes en el promotor de *TERT*, chr5:1 295 228 y chr5:1 295 250 en muestras de cáncer de vejiga (n = 8) y tiroideo (n = 6). Cuando están mutadas, estos sitios muestran una transición de citidina a timidina.<sup>3</sup>

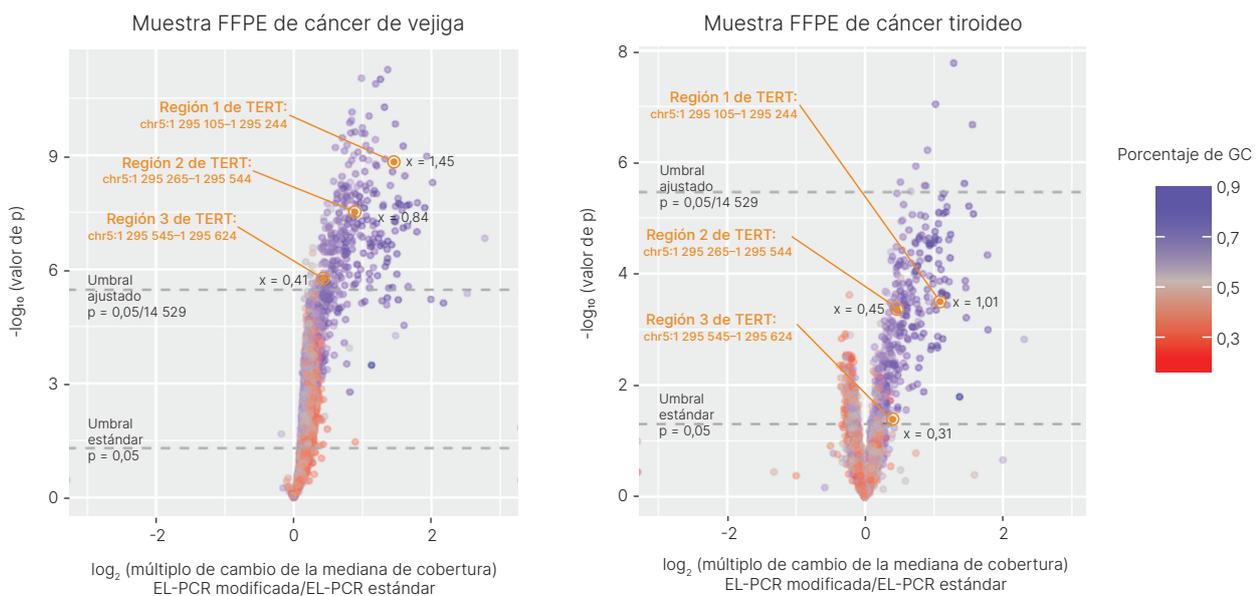


Figura 2: el protocolo de EL-PCR modificado aumenta la cobertura de las regiones con mayor contenido de GC. Se utilizó TruSight Oncology 500 High-Throughput con el protocolo de EL-PCR modificado para analizar muestras FFPE de cáncer de vejiga y tiroideo. Los datos de FASTQ se redujeron a 100 M de pares de lecturas para su análisis mediante un gráfico de volcán. Las gráficas muestran el análisis estadístico frente al múltiplo de cambio de la cobertura. Se muestran los valores de p umbral estándar (p < 0,05) y ajustados (p < 0,05/14 529). X indica el múltiplo de cambio entre los protocolos de EL-PCR modificado y estándar para la región de sonda concreta.

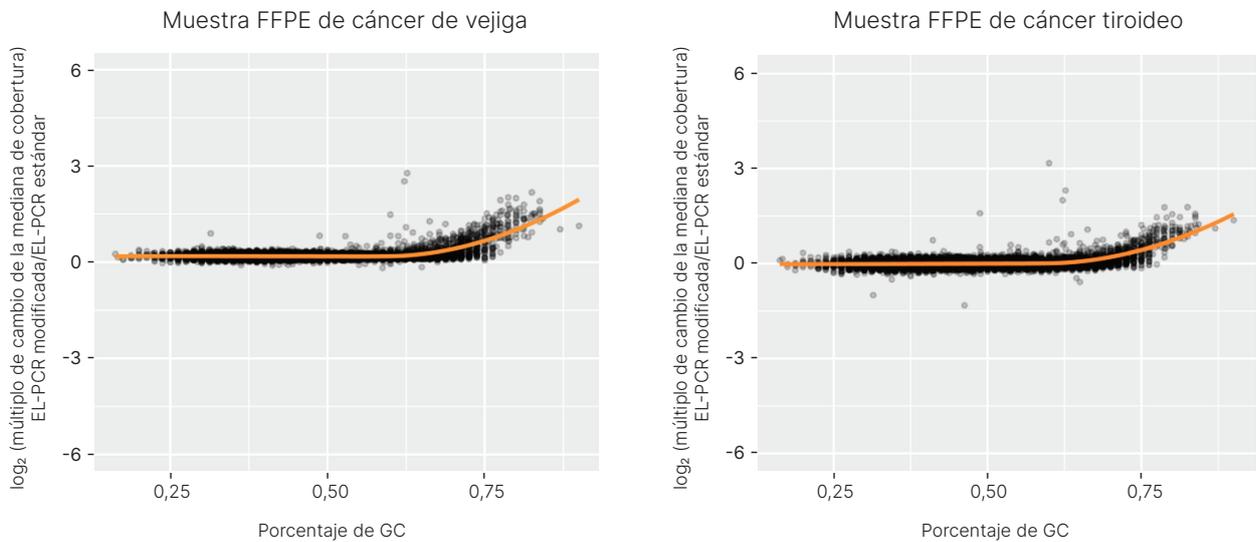


Figura 3: se siguió observando un alto rendimiento en regiones no ricas en GC. Aunque el protocolo de EL-PCR mejora la cobertura de regiones ricas en GC, no afecta al rendimiento global del ensayo. Los puntos de datos correspondientes a regiones con más del 70 % de GC tienen una tendencia ascendente, mientras que aquellos con menos del 70 % de GC se mantienen constantes, lo que indica que el aumento observado de la cobertura no se debe a una extracción significativa de lecturas de otras regiones.

## Resumen

Las porciones ricas en GC del genoma, como el promotor de *TERT*, pueden ser difíciles de secuenciar mediante NGS. El aumento de la duración de los ciclos durante la etapa de EL-PCR en el protocolo de preparación de librerías de TruSight Oncology 500 High-Throughput puede aumentar la cobertura de estas regiones posiblemente problemáticas, a la vez que se mantiene el alto rendimiento observado en regiones no ricas en GC.

## ¿Tiene alguna pregunta?

Póngase en contacto con [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com).

## Bibliografía

1. Bell RJA, Rube HT, Xavier-Magalhães A, et al. [Understanding TERT Promoter Mutations: a Common Path to Immortality](#). *Mol Cancer Res*. 2016;14(4):315-323. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0003
2. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. [TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma](#). *Science*. 2013;339(6122):959-961. doi:10.1126/science.1230062
3. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. [Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma](#). *Science*. 2013;339(6122):957-959. doi:10.1126/science.1229259
4. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. [TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6026. doi:10.1073/pnas.1303607110
5. Kang SY, Kim DG, Kim H, et al. [Direct comparison of the next-generation sequencing and iTERT PCR methods for the diagnosis of TERT hotspot mutations in advanced solid cancers](#). *BMC Med Genomics*. 2022;15:25. doi:10.1186/s12920-022-01175-2
6. Illumina. TruSight Oncology 500 High Throughput Reference Guide (Guía de referencia de TruSight Oncology 500 High Throughput) (1000000094853). <https://support.illumina.com/downloads/trusight-oncology-500-ht-reference-guide.html>. Fecha de publicación: 15 de abril de 2022. Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2023.
7. Datos en archivo. Illumina, Inc. 2023.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-02492 ESP v1.0