illumina®

ANWENDUNGSHINWEIS

Einsatz von FFPE-Proben zur Genomsequenzierung

Modifizierter Illumina DNA Prep-Workflow zur genauen Sequenzierung bei unterschiedlichen DNA-Zugabequalitäten und -mengen



Optimiertes Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung für sensitives Varianten-Calling bei FFPE-DNA



Leistungsstarke Sequenzierung auf Illumina-Hochdurchsatzsystemen für umfassende Coverage



Umfassender Workflow mit hocheffizienten DRAGEN™-Analysepipelines für genaue WGS-Ergebnisse

Einleitung

Die Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing) ermöglicht in der Forschung die Untersuchung aller Variantentypen in einem einzigen Assay, einschließlich Kopienzahlvarianten, struktureller Varianten, potenzieller Fusionsgene und homologer Rekombinationsdefizienzen, die bei gezielten Genpanels unter Umständen unberücksichtigt bleiben.

Für genaue und zuverlässige WGS-Daten wird die Zugabe hochwertiger DNA aus Gewebeproben empfohlen. Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Tumorproben sind eine der zugänglichsten Gewebequellen für das molekulare Profiling. Der Fixierungs-, Einbettungs- und Extraktionsprozess kann jedoch Degradation, Fragmentierung, Vernetzung und chemische Modifikationen der DNA zur Folge haben, was die DNA-Qualität beeinträchtigen[1, 2] und die WGS erschweren kann. Für die WGS von aus FFPE-Proben extrahierter DNA sind optimierte Workflows erforderlich.

Dieser Anwendungshinweis zeigt einen rationalisierten, umfassenden Workflow mit Illumina DNA Prep zur Generierung hochwertiger WGS-Daten aus DNA, die aus FFPE-Gewebe gewonnen wurde. Geringfügige Modifikationen am tagmentierungsbasierten Illumina DNA Prep-Protokoll, die Sequenzierung auf leistungsstarken Hochdurchsatzsystemen von Illumina und die DRAGEN-Sekundäranalyse ergeben einen Tumor-Normal-Workflow für die WGS mit hoher Performance, wenn aus FFPE-Gewebe gewonnene DNA als Ausgangsmaterial verwendet wird (Abbildung 1).

Methoden

Proben

Die Auswirkungen des modifizierten Protokolls zur Bibliotheksvorbereitung auf die Performance des Varianten-Callings wurden anhand von zwei frisch gefrorenen (FF, fresh-frozen) Zelllinien (HCC1187 (ATCC, Katalog-Nr. CRL-2322) und COLO 829 (ATCC, Katalog-Nr. CRL-1974) bewertet. Aus einer Kohorte von 241 FFPE-Tumorproben mit entsprechenden Blutproben und drei Tumor-FFPE-DNA-Proben mit entsprechenden FF-Tumor- und Blut-DNA-Proben extrahierte DNA wurde von externen Partnern aus der klinischen Forschung bereitgestellt. Aus FFPE-Gewebeproben und entsprechenden Blutproben extrahierte DNA wurde mit dem Spectramax Gemini XPS Microplate Reader (Molecular Devices, Katalog-Nr. XPS) quantifiziert. Die DNA-Qualität wurde mit dem 4200 TapeStation Instrument (Agilent, Katalog-Nr. G2991BA) gemessen, das eine DNA-Integritätsnummer (DIN) zwischen 1 (degradierte DNA) und 10 (intakte DNA) bereitstellt.

Bibliotheksvorbereitung

Bibliotheken wurden mit Illumina DNA Prep aus DNA vorbereitet, die aus FFPE-, FF- oder Blutproben extrahiert wurde. Gegenüber dem im Illumina DNA Prep-Referenzhandbuch erläuterten Verfahren wurden einige Modifikationen vorgenommen, die den sensitiven Variantennachweis anhand von FFPE-Proben mit DNA von unterschiedlicher Qualität ermöglichen (Tabelle 1).

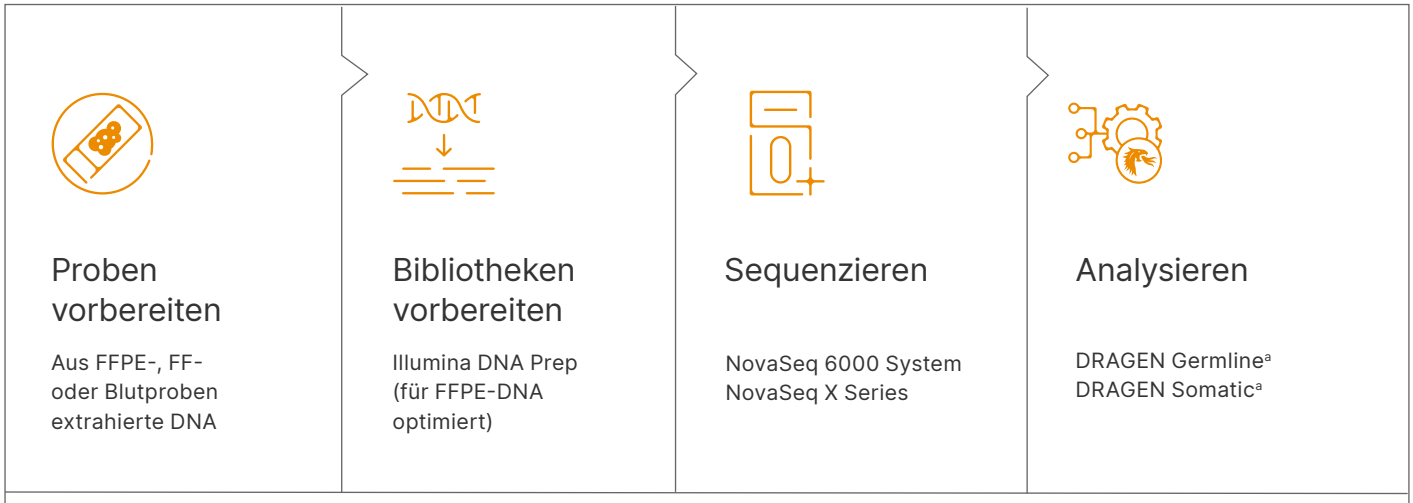


Abbildung 1: Umfassender Illumina DNA Prep-Workflow zur Verarbeitung von zur WGS-Analyse aus FFPE-Gewebe gewonnener DNA

a. Mit FFPE-spezifischen Einstellungen.
FF: fresh-frozen (frisch gefroren); FFPE: formalinfixiert, in Paraffin eingebettet.

Tabelle 1: Für die WGS aus FFPE-Proben vorgenommene Änderungen am Illumina DNA Prep-Protokoll

	Illumina DNA Prep-Standardprotokoll	Illumina DNA Prep-FFPE-Protokoll
DNA-Zugabe	1–500 ng	FFPE: 10–200 ng[a] FF/Blut: 10–50 ng
PCR-Zyklen	5–12[b]	6
Größen-auswahl	Doppelseitige Bead-Reinigung	Einseitige Bead-Reinigung mit einer Größenauswahl von 0,7-fach
Finales Elutions-volumen	30 µl	20 µl

a. Die empfohlene DNA-Zugabemenge für FFPE-Proben beträgt 100 ng.
b. Je nach Probenzugabe.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden auf S4- und 10B-Fließzellen geladen und auf dem NovaSeq™ 6000 System bzw. dem NovaSeq X Plus System mit einer Laufkonfiguration von 2 × 151 bp sequenziert, die eine hohe Coverage und Genauigkeit der WGS ermöglicht.

Datenanalyse

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Daten unter Verwendung FFPE-spezifischer Einstellungen mit der DRAGEN Germline- und der DRAGEN Somatic-Pipeline analysiert. Bei der DRAGEN Germline-Pipeline wurde mit der Option „--qc-coverage-ignore-overlaps true“ sichergestellt, dass die effektive Coverage für Proben mit kurzen Fragmenten korrekt gemessen wurde. Da FFPE-Proben bei kleinen somatischen Varianten in bestimmten Repeatregionen, einschließlich L1P- und Alu-Repeats, eine hohe Anzahl falsch positiver Calls ergeben, wurde die DRAGEN Somatic-Pipeline mit der zusätzlichen Option „--vc-excluded-regions-bed“ und einer BED-Datei mit der Position von L1P- und Alu-Repeats ausgeführt. Somatische Analysen wurden mit aktivierter „Nucleotide (NTD) Error Bias Estimation“ zur Korrektur systematischer Fehlermuster durchgeführt, die während der Verarbeitung von FFPE-Proben auftreten können. Der Anzahl falsch positiver Calls wurde mit dem Filter für das systematische Rauschen reduziert, da hierbei das standortspezifische Rauschen berücksichtigt wird. Der Nachweis somatischer Varianten erfolgte anhand der Genomics England London (GEL) Solid Adult Cancer-Suszeptibilitätsgenliste.

Ergebnisse

Recall somatischer Varianten in FF-Zelllinien mit dem modifizierten Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung

Der Recall von Einzelnukleotidvarianten (SNV, Single-Nucleotide Variant) und Insertionen/Deletion (Indel) wurde anhand des modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Protokolls und zwei FF-Zelllinien (HCC1187 und COLO 829) beurteilt. Die Ergebnisse zeigen einen hohen Recall bei somatischen SNVs sowie bei Indels für beide Proben. Damit ist das modifizierte FFPE-Protokoll für FF-Zelllinien geeignet (Abbildung 2).

WGS-Coverage bei unterschiedlichen Qualitäten und Zugabemengen von aus FFPE-Gewebe gewonnener DNA

Bibliotheken für eine Kohorte von 241 Brustkrebsproben mit unterschiedlichem DNA-Degradationsgrad wurden mit dem modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Protokoll vorbereitet. Die DNA-Qualität für alle Proben wurde anhand von DIN beurteilt. Der prozentuale Anteil des Genoms mit mehr als 50-facher effektiver Coverage wurde bei allen Proben mit variablen DIN-Werten für unterschiedliche Zugabemengen berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass das FFPE-spezifische Illumina DNA Prep-Protokoll die WGS mit über 50-facher effektiver Tiefe bei Proben mit einer DIN von mehr als 2,5 ermöglicht (Abbildung 3). Bei FFPE-DNA-Proben mit einer DIN unter 2,5 zeigte sich eine höhere Variabilität der Sequenzierungscoverage. Die Erhöhung der DNA-Zugabemengen verbesserte bei Proben mit einer DIN von mehr als 2,5 die effektive Coverage (Abbildung 3). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass es sich bei der DIN und der Zugabe-DNA-Konzentration um wichtige Prädiktoren für die Qualität der Sequenzierungsdaten handelt, die für aus FFPE-Gewebe gewonnene DNA-Proben ermittelt werden.

Hohe Übereinstimmung zwischen FF- und FFPE-Proben

Aus FF-Proben extrahierte DNA ist von hoher Qualität. Der Grad der Degradation und die Anzahl der Artefakte sind gering, was diese Proben zu einer idealen Zugabe für WGS-Studien macht. FF-Proben kommen aufgrund der Kosten und praktischen Einschränkungen jedoch in der Regel nicht in der klinischen Forschung zum Einsatz. FFPE-Proben sind dagegen eine zugänglichere und häufiger verwendete Quelle für archiviertes Gewebe. Bei Verwendung des modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Protokolls wurde eine hohe Übereinstimmung zwischen somatischen Varianten ermittelt, die in FFPE- und entsprechenden FF-Tumorproben aus der klinischen Praxis nachgewiesen wurden (Abbildung 4). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass das optimierte Protokoll zum Nachweis somatischer Varianten in FFPE-Proben für die Krebsforschung geeignet ist.

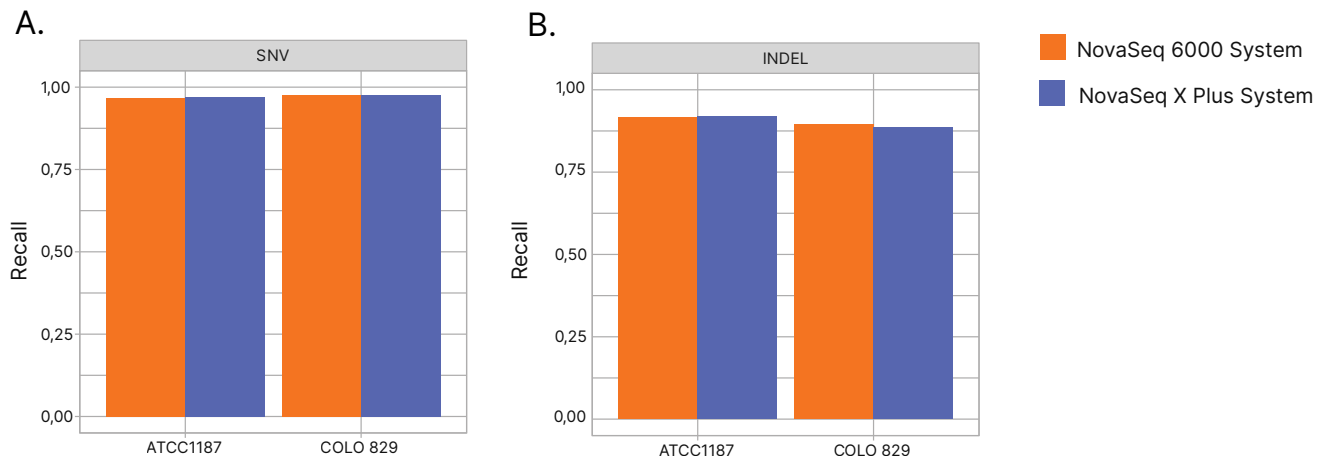


Abbildung 2: Hoher Recall somatischer Varianten in FF-Zelllinien mit dem modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Workflow

Bei aus FF gewonnener DNA aus zwei Zelllinien (HCC1187 und COLO 829), die mit dem modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Protokoll vorbereitet und auf dem NovaSeq 6000 System und dem NovaSeq X Plus System sequenziert wurde, zeigt sich im Vergleich zu Referenzdaten ein hoher Recall von Einzelnukleotidvarianten (SNV, Single Nucleotide Variant) und Insertionen/Deletionen (Indels).

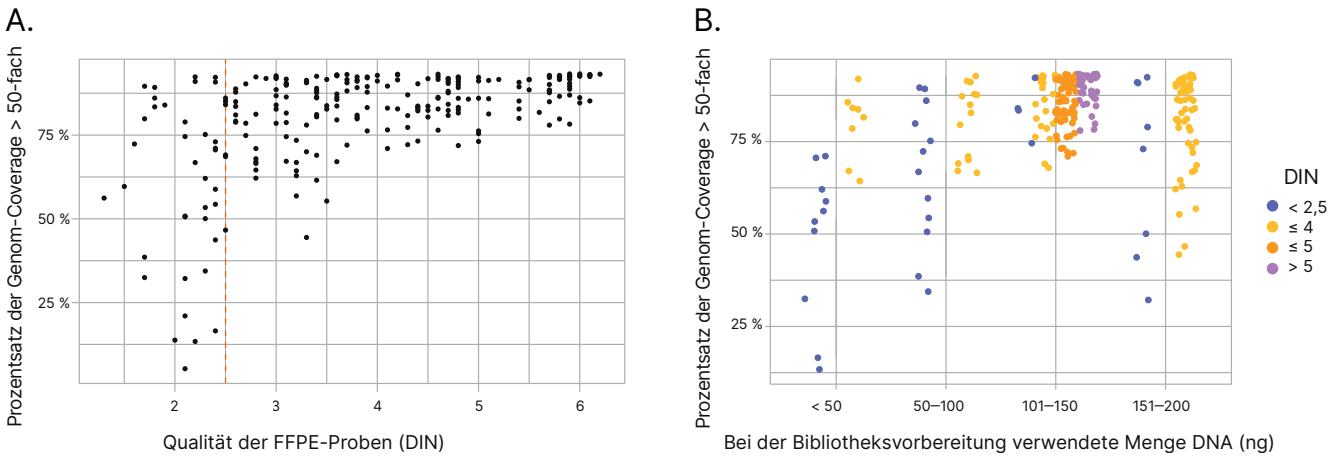


Abbildung 3: Die Illumina DNA Prep-Lösung ermöglicht die WGS von aus FFPE-Gewebe gewonnenen DNA-Proben bei einem breiten Spektrum an Qualitätsstufen und Zugabemengen.

Der prozentuale Anteil des Genoms mit mehr als 50-facher effektiver Tiefe wächst, wenn (A) die Qualität von aus FFPE-Gewebe gewonnener DNA eine DIN von 2,5 überschreitet, und (B) die DNA-Zugabemenge bei der Bibliotheksvorbereitung erhöht wird, insbesondere für Proben mit einer DIN über 2,5. Bei degradierten Proben mit einer DIN unter 2,5 ist die Variabilität der Sequenzierungsperformance höher.

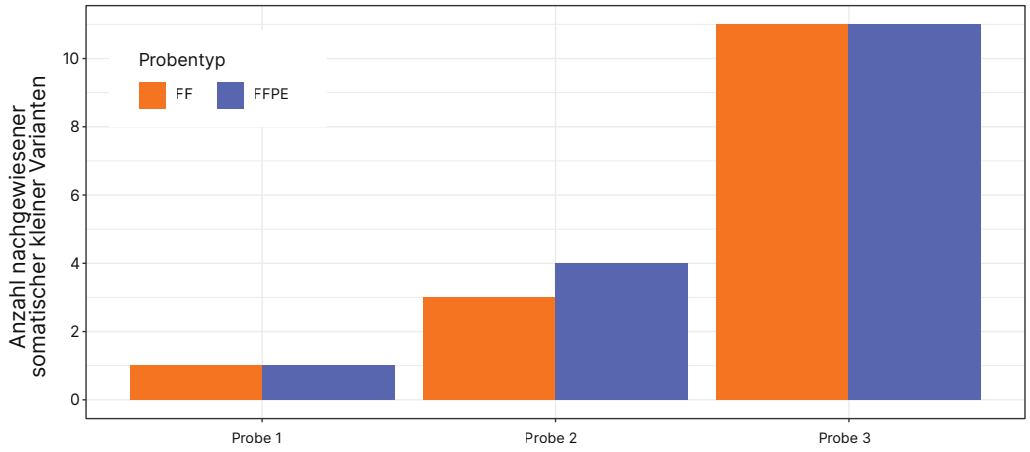


Abbildung 4: Hohe Übereinstimmung zwischen somatischen kleinen Varianten, die anhand von FFPE- und FF-Proben nachgewiesen wurden

DNA aus drei FFPE- und entsprechenden FF-Tumorproben wurde für beide Probentypen mit dem modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Protokoll sequenziert. Der Nachweis von Varianten mit VAF ≥ 5 % innerhalb der Genliste des GEL-Panels für solide Tumoren bei Erwachsenen für FFPE- und FF-DNA lieferte bei allen getesteten Proben hochgradig übereinstimmende Ergebnisse.

Zusammenfassung

Zur Generierung hochwertiger WGS-Daten aus FFPE-Gewebe sind optimierte Bibliotheksvorbereitungsprotokolle erforderlich, die die verminderte oder geringe Qualität der Zugabe-DNA berücksichtigen. Dieser Anwendungshinweis erläutert ein modifiziertes FFPE-spezifisches Illumina DNA Prep-Protokoll zur Generierung von WGS-Daten anhand von in unterschiedlicher Qualität und unterschiedlichen Mengen vorliegender DNA, die aus FFPE-Gewebe gewonnen wurde. Die Ergebnisse zeigen einen herausragenden Varianten-Recall und eine hohe Übereinstimmung zwischen somatischen Varianten, die in FFPE- und FF-Proben nachgewiesen wurden. Mit diesem umfassenden Workflow lassen sich in der Forschung hochwertige WGS-Daten anhand von FFPE-Gewebeproben generieren.

Weitere Informationen →

Illumina DNA Prep

NovaSeq X Series

DRAGEN-Sekundäranalyse

DRAGEN-Rezept zur Analyse von WGS-Daten aus Bibliotheken, die mit einem modifizierten Illumina DNA Prep-FFPE-Workflow vorbereitet wurden

Vorab erstellte Datei mit systematischem Rauschen

Quellen

1. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61(1):64-71. doi:10.1373/clinchem.2014.223040
2. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11):1520-1530. doi:10.5858/arpa.2013-0691-RA

illumina®

1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03852 DEU v1.0