illumina®

NOTA DE APLICACIÓN

Secuenciación del genoma completo a partir de muestras FFPE a su alcance

Un flujo de trabajo modificado de Illumina DNA Prep permite una secuenciación precisa a partir de diferentes calidades y cantidades de aporte de ADN

El protocolo de preparación de librerías optimizado permite la llamada de variantes sensibles a partir de ADN FFPE.

La potente secuenciación en los sistemas de alta productividad de Illumina proporciona una cobertura completa.

El flujo de trabajo integral incluye procesos de análisis DRAGEN™ altamente eficientes para obtener resultados precisos de WGS.

Introducción

La secuenciación del genoma completo (WGS, whole-genome sequencing) ofrece a los investigadores la capacidad de investigar todos los tipos de variantes en un único ensayo, incluida la variación en el número de copias (CNV, copy number variants), las variantes estructurales (SV, structural variants), los posibles genes de fusión y las deficiencias de recombinación homóloga (HRD, homologous recombination deficiency), que los paneles de genes selectivos pueden pasar por alto.

Se recomienda un aporte de ADN de alta calidad a partir de muestras de tejido para obtener datos de WGS precisos y fiables. Las muestras tumorales fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) son una de las fuentes de tejido más accesibles para la creación de perfiles moleculares. Sin embargo, el proceso de fijación, inclusión y extracción puede provocar degradación, fragmentación, reticulación y modificaciones químicas en el ADN que pueden comprometer la calidad de este material,[1,2] lo que dificulta la WGS. Se necesitan flujos de trabajo optimizados para habilitar la WGS del ADN extraído de muestras FFPE.

En esta nota de aplicación se expone un flujo de trabajo optimizado integral con Illumina DNA Prep para generar datos de WGS de alta calidad a partir de ADN obtenido de tejido FFPE. Las modificaciones menores del protocolo Illumina DNA Prep basado en la tagmentación, la secuenciación en los potentes sistemas de alta productividad de Illumina y el análisis secundario DRAGEN proporcionan un flujo de trabajo de WGS de alto rendimiento en pares de muestras tumorales-normales cuando se comienza por ADN obtenido de tejido FFPE (figura 1).

Métodos

Muestras

Se utilizaron dos líneas celulares congeladas en fresco (FF, fresh-frozen), HCC1187 (ATCC, n.º de catálogo CRL-2322) y COLO 829 (ATCC, n.º de catálogo CRL-1974), para evaluar el impacto del protocolo de preparación de librerías modificado en el rendimiento de la llamada de variantes. Colaboradores de investigación clínica externos proporcionaron ADN extraído de una cohorte de 241 muestras tumorales FFPE con muestras de sangre emparejadas, y tres muestras de ADN tumoral FFPE con muestras de ADN de tumor y sangre FF emparejadas. Se cuantificó el ADN extraído de las muestras de tejido FFPE y las muestras de sangre emparejadas con el lector de microplacas Spectramax Gemini XPS (Molecular Devices, n.º de catálogo XPS). La calidad del ADN se midió con 4200 TapeStation Instrument (Agilent, n.º de catálogo G2991BA), que proporciona un número de integridad del ADN (DIN, DNA integrity number) que oscila entre el 1 para el ADN degradado y el 10 para el ADN intacto.

Preparación de librerías

Las librerías se prepararon a partir de ADN extraído de muestras FFPE, FF o de sangre con Illumina DNA Prep, como se detalla en la guía de referencia de Illumina DNA Prep, con algunas modificaciones para permitir la detección de variantes sensibles a partir de muestras FFPE con ADN de calidad variable (tabla 1).

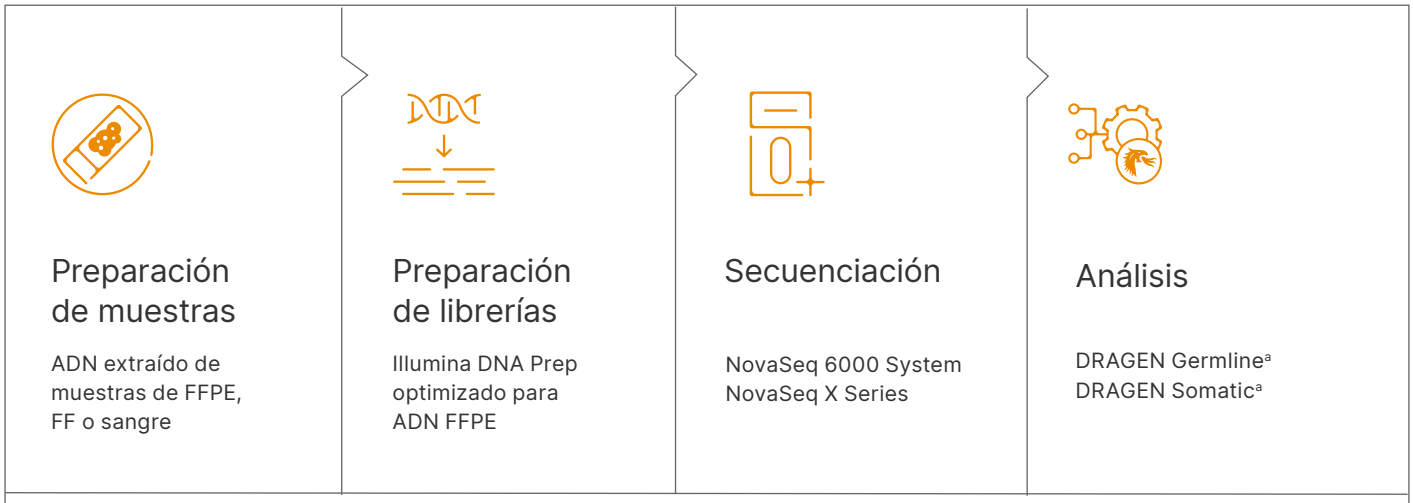


Figura 1: Flujo de trabajo integral de Illumina DNA Prep para el procesamiento de ADN derivado de FFPE para el análisis de WGS

a. Con ajustes específicos de FFPE.
FF: congelado en fresco; FFPE: fijado en formol y embebido en parafina.

Tabla 1: Modificaciones realizadas en el protocolo Illumina DNA Prep para permitir la WGS a partir de muestras FFPE

	Protocolo estándar de Illumina DNA Prep	Protocolo de FFPE de Illumina DNA Prep
Aporte de ADN	1-500 ng	FFPE: 10-200 ng[a] FF/sangre: 10-50 ng
Ciclos de PCR	5-12[b]	6
Selección de tamaño	Limpieza con bolas de doble lado	Limpieza de bolas de un solo lado con selección de tamaño de 0,7×
Volumen de elución final	30 µl	20 µl

a. El aporte de ADN recomendado para las muestras FFPE es de 100 ng.
b. Dependiendo del aporte de muestra.

Secuenciación

Las librerías preparadas se cargaron en celdas de flujo S4 y 10B y se secuenciaron en los sistemas NovaSeq™ 6000 o NovaSeq X Plus, respectivamente, con una configuración de experimento de 2 × 151 pb para permitir una alta cobertura y precisión para la WGS.

Análisis de datos

Una vez finalizada la secuenciación, los datos se analizaron utilizando los procesos de DRAGEN Germline y DRAGEN Somatic con ajustes específicos para el tejido FFPE. Para el proceso DRAGEN Germline, se utilizó la opción "--qc-coverage-ignore-overlaps true" para garantizar que se midiera correctamente la cobertura efectiva para muestras con fragmentos cortos. Dado que las muestras FFPE revelan un elevado número de llamadas de falsos positivos para variantes somáticas pequeñas en regiones de repetición específicas, incluidas las repeticiones de L1P y Alu, el proceso de DRAGEN Somatic se ejecutó con la opción adicional "--vc-excluded-regions-bed" y un archivo BED con la ubicación de las repeticiones de L1P y Alu. Los análisis somáticos se realizaron con la opción "Nucleotide (NTD) Error Bias Estimation" activada para corregir los patrones de error sistemáticos que pueden producirse durante el procesamiento de muestras FFPE. El filtro de ruido sistemático se utilizó para reducir las llamadas de falsos positivos teniendo en cuenta el ruido específico del centro. La lista de genes de susceptibilidad a cáncer sólido en adultos de Genomics England London (GEL) se utilizó para la detección de variantes somáticas.

Resultados

Recuperación de variantes somáticas en líneas celulares FF utilizando el protocolo de preparación de librerías modificado

Se utilizó el protocolo FFPE modificado de Illumina DNA Prep para evaluar la recuperación de variantes de nucleótido único (SNV, single nucleotide variant) e inserciones/deleciones (indel) de dos líneas celulares FF, HCC1187 y COLO 829. Los hallazgos demuestran una elevada recuperación de SNV e indels somáticas para ambas muestras, lo que confirma que el protocolo FFPE modificado era adecuado para su uso con líneas celulares FF (figura 2).

Cobertura de WGS en diversas calidades de ADN derivado de FFPE y cantidades de aporte

Se utilizó el protocolo FFPE modificado de Illumina DNA Prep para preparar librerías en una cohorte de 241 muestras de cáncer de mama con diferentes niveles de degradación del ADN. Se utilizaron DIN para evaluar la calidad del ADN de todas las muestras. Se calculó el porcentaje del genoma con una cobertura efectiva superior a 50× para todas las muestras con valores DIN variables en un intervalo de cantidades de aporte. Los resultados demuestran que el protocolo Illumina DNA Prep específico para FFPE permitió la WGS con una profundidad eficaz superior a 50× en muestras con DIN superior a 2,5 (figura 3). Las muestras de ADN FFPE con DIN por debajo de 2,5 mostraron una mayor variabilidad en la cobertura de secuenciación. El aumento de las cantidades de aporte de ADN dio como resultado una cobertura efectiva mejorada para las muestras con DIN superior a 2,5 (figura 3). Estos hallazgos ponen de relieve el DIN y la concentración de ADN de aporte como factores de predicción clave de la calidad de los datos de secuenciación en muestras de ADN derivadas de FFPE.

Alta concordancia entre las muestras FF y FFPE

El ADN extraído de las muestras FF es de alta calidad, con una degradación reducida y artefactos mínimos, lo que lo convierte en un material de aporte ideal para los estudios de WGS. Sin embargo, las muestras FF no se utilizan de forma rutinaria en la investigación clínica debido al coste y a las limitaciones prácticas. Las muestras FFPE son una fuente de tejido de archivo más accesible y de uso común. Mediante el uso del protocolo FFPE modificado de Illumina DNA Prep, se observó un alto nivel de concordancia entre las variantes somáticas identificadas en las muestras tumorales FFPE y FF emparejadas del mundo real (figura 4). Estos hallazgos demuestran la viabilidad de utilizar este protocolo optimizado para la detección de variantes somáticas en muestras FFPE para la investigación oncológica.

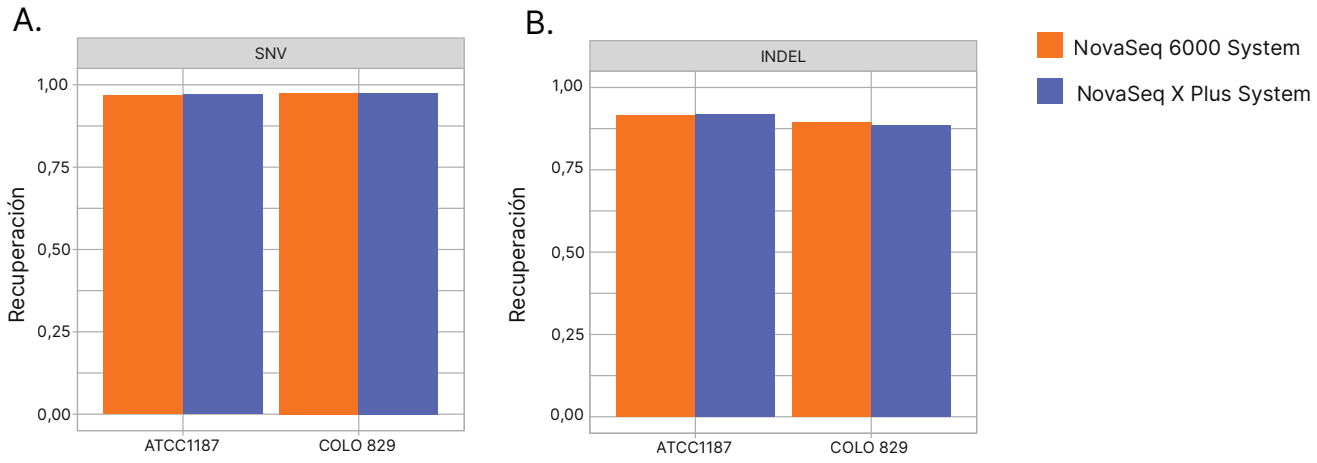


Figura 2: Alta recuperación de variantes somáticas en líneas celulares FF mediante el flujo de trabajo de FFPE modificado de Illumina DNA Prep

El ADN derivado de FF de dos líneas celulares (HCC1187 y COLO 829) preparado con el protocolo FFPE modificado de Illumina DNA Prep y la secuenciado en NovaSeq 6000 System y NovaSeq X Plus System muestra una alta recuperación de SNV e indels en comparación con el conjunto de verdad de control.

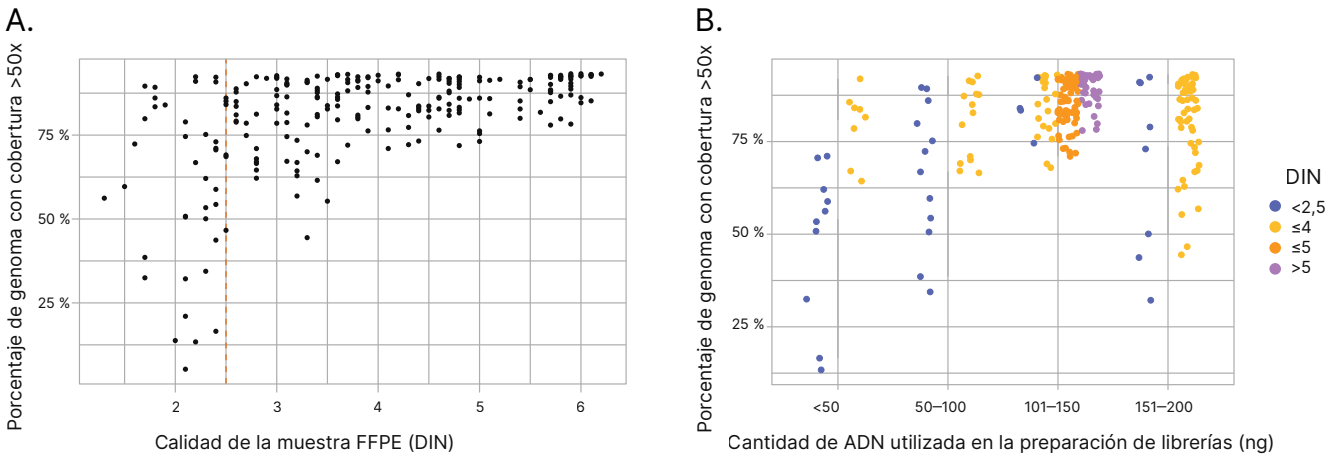


Figura 3: La solución Illumina DNA Prep permite la WGS de muestras de ADN derivadas de FFPE en diferentss cantidades y calidades de aporte

El porcentaje del genoma con una profundidad efectiva superior a 50× aumenta a medida que (A) la calidad del ADN obtenido de FFPE supera el DIN de 2,5 y (B) con el aumento de las cantidades de aporte de ADN utilizadas para la preparación de librerías, especialmente para muestras con DIN superior a 2,5. Las muestras degradadas con DIN por debajo de 2,5 muestran una mayor variabilidad en el rendimiento de la secuenciación.

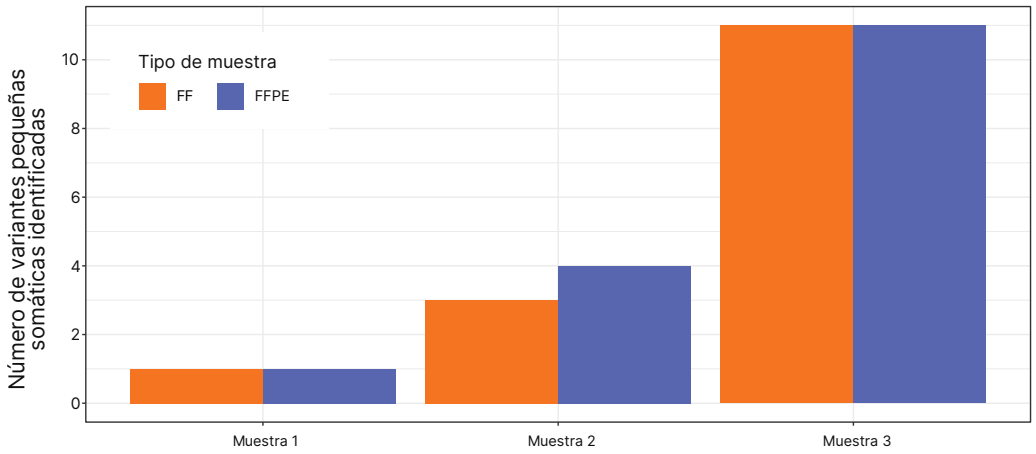


Figura 4: Alto nivel de concordancia entre variantes pequeñas somáticas detectadas con muestras FFPE y FF

Se secuenció el ADN de tres muestras tumorales FFPE y FF emparejadas utilizando el protocolo FFPE modificado de Illumina DNA Prep para ambos tipos de muestras. La detección de variantes para variantes con VAF ≥5 % dentro de la lista de genes del panel de tumores sólidos adultos de GEL para ADN FFPE y FF mostró una alta concordancia en todas las muestras analizadas.

Resumen

La generación de datos de WGS de alta calidad a partir de tejidos FFPE requiere protocolos optimizados para la preparación de librerías para tener en cuenta el ADN de aporte degradado o de baja calidad. Esta nota de aplicación detalla un protocolo de Illumina DNA Prep modificado específico para FFPE para generar datos de WGS a partir de ADN derivado de FFPE de calidad y cantidades de aporte variables. Los resultados demuestran una excelente recuperación de variantes y una alta concordancia entre variantes somáticas identificadas en muestras FFPE y FF. Con este flujo de trabajo integral, los investigadores tienen la capacidad de analizar muestras de tejido FFPE para generar datos de WGS de alta calidad.

Más información →

Illumina DNA Prep

NovaSeq X Series

Análisis secundario de DRAGEN

Receta DRAGEN para analizar los datos de WGS de librerías preparadas con un flujo de trabajo de FFPE modificado de Illumina DNA Prep

Archivo de ruido sistemático prediseñado

Bibliografía

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®

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

© 2026 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-03852 ESP v1.0