illumina[MD]

NOTE D'APPLICATION

Rendez possible le séquençage du génome entier à partir d'échantillons FFIP

Un flux de travail Illumina DNA Prep modifié permet un séquençage précis à partir d'une gamme de qualités et de quantités d'entrées d'ADN



Le protocole de préparation de la librairie optimisé permet l'appel des variants sensibles à partir de l'ADN FFIP



Le séquençage puissant sur les systèmes à débit élevé d'Illumina offre une couverture complète



Le flux de travail de bout en bout comprend des pipelines d'analyse DRAGEN[MC] hautement efficaces pour des résultats de SGE précis

Introduction

Le séquençage du génome entier (SGE) permet aux chercheurs d'étudier tous les types de variants dans un seul test, y compris la variation du nombre de copies, les variants structurels, les gènes de fusion potentiels et les déficiences de recombinaison homologue, qui peuvent être manquées par des panels de gènes ciblés.

Une entrée d'ADN de haute qualité à partir d'échantillons de tissus est recommandée pour obtenir des données de SGE précises et fiables. Les échantillons de tumeur fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFIP) sont l'une des sources de tissus les plus accessibles pour le profilage moléculaire. Cependant, le processus de fixation, d'inclusion et d'extraction peut entraîner la dégradation, la fragmentation, la réticulation et des modifications chimiques de l'ADN, ce qui peut compromettre la qualité de l'ADN[1,2], rendant le SGE difficile. Des flux de travail optimisés sont nécessaires pour permettre le SGE à partir d'ADN extrait d'échantillons FFIP.

Cette note d'application démontre un flux de travail rationalisé de bout en bout utilisant Illumina DNA Prep pour générer des données de SGE de haute qualité à partir d'ADN issu de tissus FFIP. Les modifications mineures apportées au protocole Illumina DNA Prep basé sur la tagmentation, le séquençage sur les puissants systèmes à débit élevé d'Illumina et l'analyse secondaire de DRAGEN permettent d'obtenir un flux de travail « tumeur/normal » de SGE haute performance lors du démarrage avec de l'ADN issu de tissus FFIP (figure 1).

Méthodes

Échantillons

Deux lignées cellulaires fraîches/congelées (FF) HCC1187 (ATCC, référence n° CRL-2322) et COLO 829 (ATCC, référence CRL-1974) ont été utilisées pour évaluer l'impact du protocole de préparation de la librairie modifié sur la performance d'appel des variants. L'ADN extrait d'une cohorte de 241 échantillons tumoraux FFIP avec leurs échantillons de sang correspondants et de trois échantillons d'ADN tumoral FFIP avec leurs échantillons d'ADN tumoral et sanguin FF correspondants, a été fourni par des collaborateurs externes en recherche clinique. L'ADN extrait d'échantillons de tissus FFIP et d'échantillons de sang correspondants a été quantifié à l'aide du lecteur de microplaques Spectramax Gemini XPS (Molecular Devices, référence n° XPS). La qualité de l'ADN a été mesurée à l'aide de l'instrument TapeStation 4200 (Agilent, référence n° G2991BA) qui fournit un numéro d'intégrité de l'ADN (DIN) allant de 1 pour l'ADN dégradé à 10 pour l'ADN intact.

Préparation des librairies

Les librairies ont été préparées à partir d'ADN extrait d'échantillons FFIP, FF ou de sang à l'aide d'Illumina DNA Prep, comme détaillé dans le guide de référence d'Illumina DNA Prep, avec quelques modifications pour permettre la détection de variants sensibles à partir d'échantillons FFIP avec un ADN de qualité variable (tableau 1).

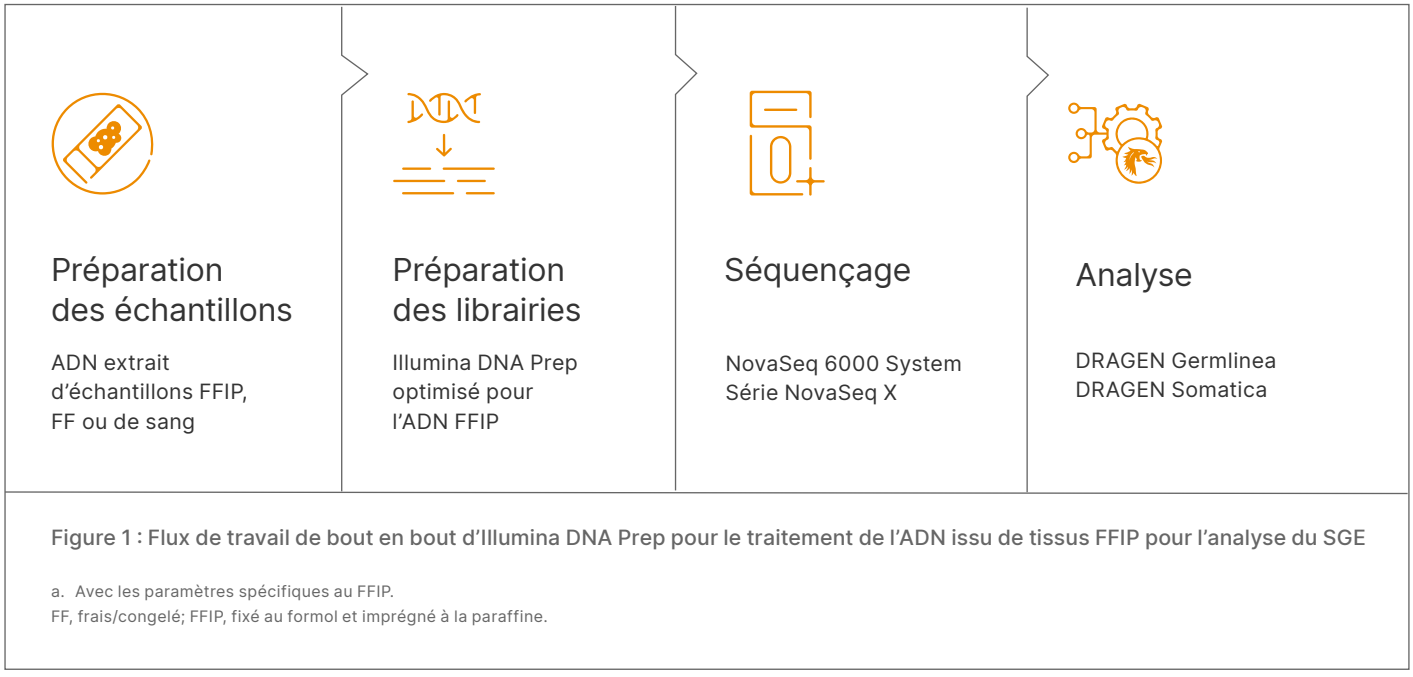


Figure 1 : Flux de travail de bout en bout d'Illumina DNA Prep pour le traitement de l'ADN issu de tissus FFIP pour l'analyse du SGE

a. Avec les paramètres spécifiques au FFIP.
FF, frais/congelé; FFIP, fixé au formol et imprégné à la paraffine.

Tableau 1 : Modifications apportées au protocole Illumina DNA Prep pour permettre le SGE à partir d'échantillons FFIP

	Protocole standard d'Illumina DNA Prep	Protocole FFIP d'Illumina DNA Prep
Entrée d'ADN	1 À 500 ng	FFIP : 10 À 200 ng[a] FF/sang : 10 À 50 ng
Cycles PCR	5 À 12[b]	6
Sélection de la taille	Nettoyage des billes à double face	Nettoyage des billes unilatérales avec sélection de la taille 0,7×
Volume d'élution final	30 µl	20 µl

a. L'entrée d'ADN recommandée pour les échantillons FFIP est de 100 ng.
b. Selon l'entrée de l'échantillon.

Séquençage

Les librairies préparées ont été chargées sur les Flow Cell S4 et 10B et séquencées sur les systèmes NovaSeq™ 6000 ou NovaSeq X Plus, respectivement, avec une configuration d'analyse de 2 × 151 pb pour permettre une couverture et une précision élevées du SGE.

Analyse des données

Une fois le séquençage terminé, les données ont été analysées à l'aide des pipelines DRAGEN Germline et DRAGEN Somatic avec des paramètres propres au FFIP. Pour le pipeline DRAGEN Germline, l'option « --qc-coverage-ignore-overlaps true » a été utilisée pour s'assurer que la couverture effective était mesurée correctement pour les échantillons présentant des fragments courts. Étant donné que les échantillons FFIP montrent un nombre élevé de faux positifs pour de petits variants somatiques dans des régions de répétition spécifiques, y compris les répétitions L1P et Alu, le pipeline DRAGEN Somatic a été analysé avec l'option supplémentaire « --vc-excluded-regions-bed » et un fichier BED avec l'emplacement des répétitions L1P et Alu. Les analyses somatiques ont été effectuées en maintenant activée l'option « Estimation du biais d'erreur des nucléotides (NTD) » afin de corriger les modèles d'erreur systématiques qui peuvent se produire lors du traitement des échantillons FFIP. Le filtre de bruit systématique a été utilisé pour réduire les faux positifs en tenant compte du bruit spécifique au site. La liste des gènes de susceptibilité aux cancers solides de l'adulte de Genomics England London (GEL) a été utilisée pour la détection des variants somatiques.

Résultats

Rappel de variants somatiques dans les lignées cellulaires FF à l'aide du protocole de préparation de la librairie modifié

Le protocole FFIP modifié d'Illumina DNA Prep a été utilisé pour évaluer le rappel de variants mononucléotidiques (SNV) et d'insertion-suppression (indel) à partir de deux lignées cellulaires FF, HCC1187 et COLO 829. Les résultats montrent un rappel élevé des SNV somatiques et des indels pour les deux échantillons, confirmant que le protocole FFIP modifié était adapté à une utilisation avec des lignées cellulaires FF (figure 2).

Couverture du SGE en fonction de la qualité d'ADN issu de tissus FFIP et de quantités d'entrées

Le protocole FFIP modifié d'Illumina DNA Prep a été utilisé pour préparer des librairies dans une cohorte de 241 échantillons de cancer du sein avec différents niveaux de dégradation de l'ADN. Les DIN ont été utilisés pour évaluer la qualité de l'ADN pour tous les échantillons. Le pourcentage du génome présentant une couverture effective supérieure à 50× a été calculé pour tous les échantillons, avec des valeurs DIN variables et des quantités d'entrées différentes. Les résultats montrent que le protocole Illumina DNA Prep spécifique au FFIP a permis le SGE avec une profondeur effective supérieure à 50× dans les échantillons dont le DIN est supérieur à 2,5 (figure 3). Les échantillons d'ADN FFIP dont le DIN est inférieur à 2,5 ont montré une variabilité accrue de la couverture du séquençage. L'augmentation des quantités d'entrées d'ADN a permis d'améliorer la couverture efficace des échantillons dont le DIN est supérieure à 2,5 (figure 3). Ces résultats mettent en évidence le DIN et la concentration d'ADN utilisés comme principaux facteurs prédictifs de la qualité des données de séquençage pour les échantillons d'ADN issus de tissus FFIP.

Concordance élevée entre les échantillons FF et FFIP

L'ADN extrait d'échantillons FF est de haute qualité avec une dégradation réduite et un minimum d'artéfacts, ce qui en fait une entrée idéale pour les études de SGE. Cependant, les échantillons FF ne sont pas couramment utilisés dans la recherche clinique en raison de leur coût et de leurs limites pratiques. Les échantillons FFIP sont une source de tissu archivé plus accessible et couramment utilisée. À l'aide du protocole FFIP modifié d'Illumina DNA Prep, un niveau élevé de concordance a été observé entre les variants somatiques identifiés dans les échantillons FFIP et leurs échantillons de tumeur FF réels correspondants (figure 4). Ces résultats démontrent la faisabilité de l'utilisation de ce protocole optimisé pour la détection des variants somatiques dans les échantillons FFIP pour la recherche sur le cancer.

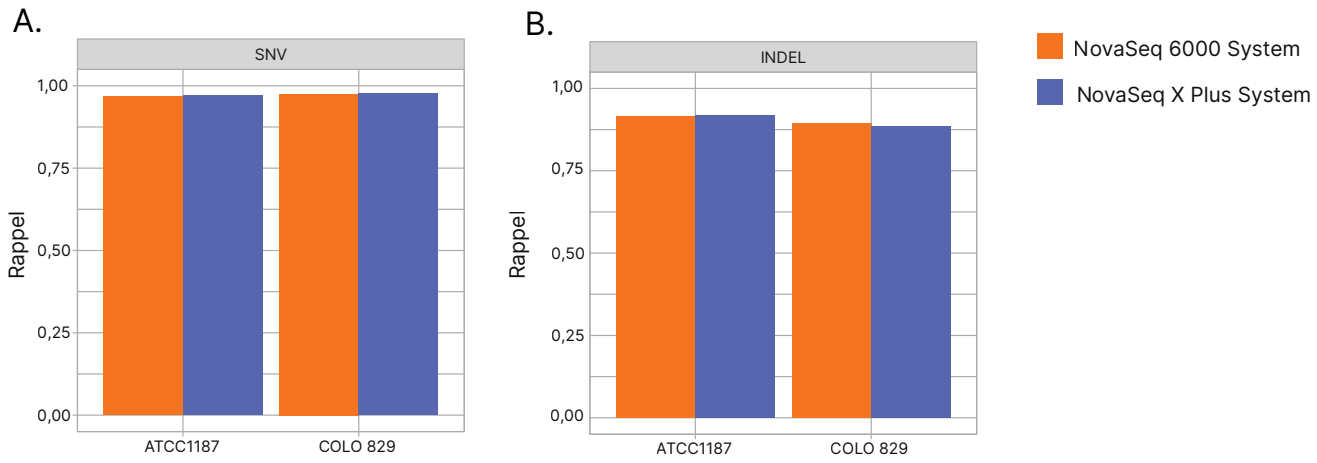


Figure 2 : Rappel élevé des variants somatiques dans les lignées cellulaires FF à l'aide du flux de travail FFIP modifié d'Illumina DNA Prep

L'ADN issu de FF provenant de deux lignées cellulaires (HCC1187 et COLO 829) préparées avec le protocole FFIP modifié d'Illumina DNA Prep et séquencées sur les systèmes NovaSeq 6000 et NovaSeq X Plus montre un rappel élevé des variants mononucléotidiques (SNV) et des insertions/suppressions (indels) par rapport à l'ensemble de référence représentatif de la réalité.

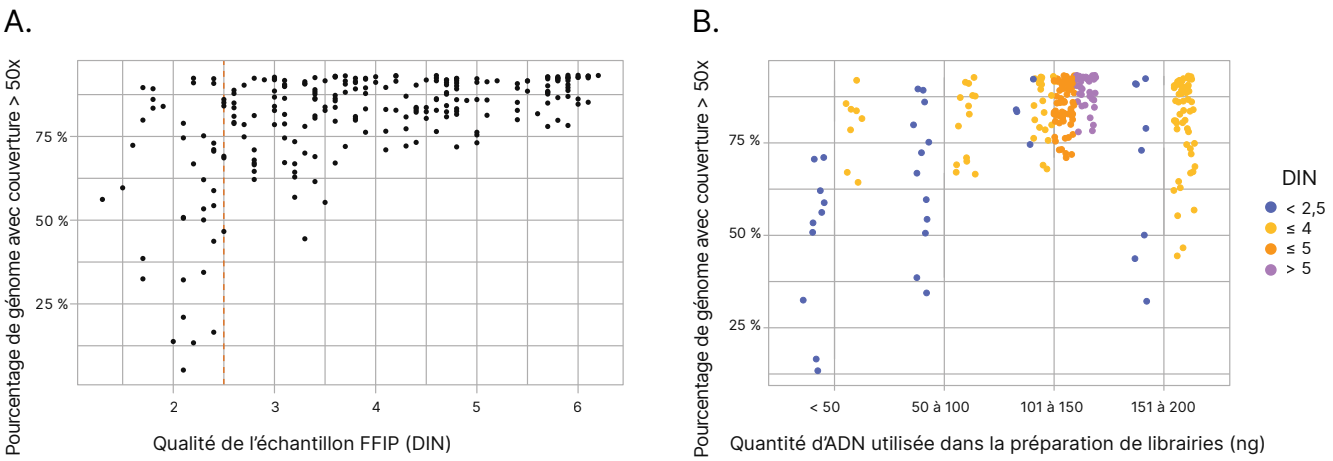


Figure 3 : La solution Illumina DNA Prep permet le SGE d'échantillons d'ADN issus de tissus FFIP sur une gamme de qualité et de quantités d'entrées

Le pourcentage du génome avec une profondeur effective supérieure à 50× augmente à mesure que (A) la qualité de l'ADN issu de tissus FFIP dépasse un DIN de 2,5 et (B) les quantités d'entrées d'ADN utilisées pour la préparation de librairies augmentent, en particulier pour les échantillons ayant un DIN supérieur à 2,5. Les échantillons dégradés dont le DIN est inférieur à 2,5 montrent une plus grande variabilité des performances de séquençage.

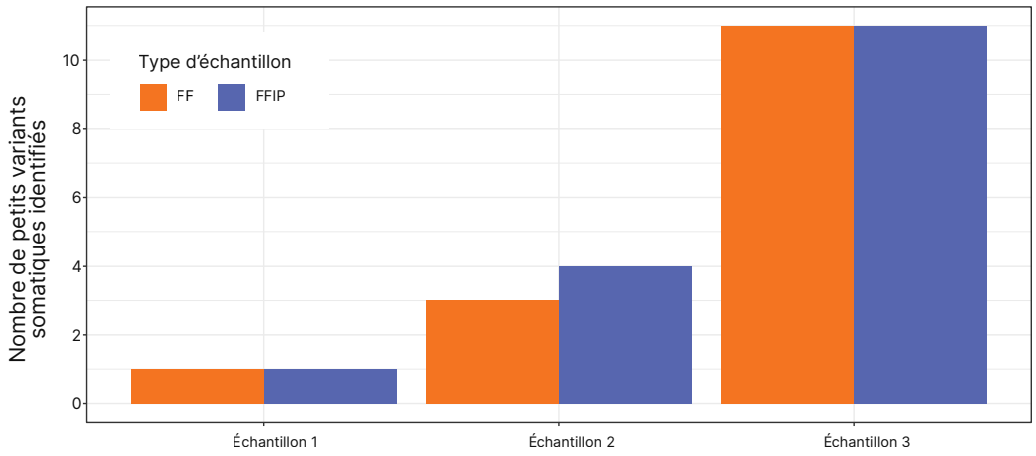


Figure 4 : Niveau élevé de concordance entre les petits variants somatiques détectés à l'aide d'échantillons FFIP et FF

L'ADN de trois échantillons de tumeur FFIP et de leurs échantillons FF correspondants a été séquencé en utilisant le protocole Illumina DNA Prep FFIP modifié pour les deux types d'échantillons. La détection des variants avec une FAV ≥ 5 % dans la liste des gènes du panel de tumeurs solides adultes GEL pour l'ADN FFIP et FF était hautement concordante pour tous les échantillons testés.

Résumé

La génération de données de SGE de haute qualité à partir de tissus FFIP nécessite des protocoles optimisés pour la préparation de librairies afin de tenir compte de l'ADN d'entrée dégradé ou de faible qualité. Cette note d'application décrit un protocole Illumina DNA Prep modifié, spécifique aux échantillons FFIP, permettant de générer des données de séquençage du génome entier (SGE) à partir d'ADN issu de tissus FFIP, de qualité et de quantité d'entrée variables. Les résultats démontrent un excellent rappel des variants et une concordance élevée entre les variants somatiques identifiés dans les échantillons FFIP et FF. Grâce à ce flux de travail de bout en bout, les chercheurs sont habilités à analyser les échantillons de tissus FFIP pour générer des données de SGE de haute qualité.

En savoir plus →

Illumina DNA Prep

Série NovaSeq X

Analyse secondaire DRAGEN

Formule DRAGEN pour l'analyse des données de SGE des librairies préparées à l'aide d'un flux de travail FFIP modifié d'Illumina DNA Prep

Fichier de bruit systématique prédéfini

Références

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

Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03852 FRA v1.0