illumina®

NOTA SULL'APPLICAZIONE

Sequenziamento dell'intero genoma con campioni FFPE

Un flusso di lavoro Illumina DNA Prep modificato consente il sequenziamento accurato a partire da DNA di qualità e quantità variabili



Il protocollo di preparazione delle librerie ottimizzato consente l'identificazione di varianti sensibili a partire da DNA FFPE



L'efficace sequenziamento sui sistemi ad alta processività Illumina permette una copertura completa



Il flusso di lavoro end-to-end include pipeline di analisi DRAGEN™ altamente efficienti per risultati WGS accurati

Introduzione

Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) offre ai ricercatori la possibilità di esaminare in un unico saggio tutti i tipi di varianti, tra cui variazione del numero di copie, varianti strutturali, potenziali geni di fusione e carenze di ricombinazione omologa, che potrebbero non essere rilevati dai pannelli genici mirati.

Per ottenere dati WGS accurati e affidabili, si raccomanda di utilizzare DNA di input di alta qualità da campioni di tessuto. I campioni di tumore fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) costituiscono una delle fonti di tessuto più accessibili per la profilazione molecolare. Tuttavia, i processi di fissazione, inclusione ed estrazione possono determinare nel DNA degradazione, frammentazione, formazione di crosslink e alterazioni chimiche, compromettendo la qualità del campione[1,2] e rendendo il WGS particolarmente complesso. Per consentire il WGS a partire dal DNA estratto da campioni FFPE, sono necessari flussi di lavoro ottimizzati.

Questa nota applicativa illustra un flusso di lavoro semplificato end-to-end che impiega Illumina DNA Prep per generare dati WGS di alta qualità a partire da DNA derivato da campioni FFPE. Piccole modifiche al protocollo Illumina DNA Prep basato sulla tagmentazione, il sequenziamento su potenti sistemi Illumina ad alta processività e l'analisi secondaria DRAGEN permettono di implementare un flusso di lavoro WGS tumor-normal ad alte prestazioni a partire da DNA derivato da campioni FFPE (Figura 1).

Metodi

Campioni

Per valutare l'impatto del protocollo di preparazione delle librerie modificato sulle prestazioni di identificazione di varianti, sono state utilizzate due linee cellulari fresche congelate (FF, Fresh-Frozen): HCC1187 (ATCC, n. di catalogo CRL-2322) e COLO 829 (ATCC, n. di catalogo CRL-1974). Collaboratori esterni alla ricerca clinica hanno fornito DNA estratto da una coorte di 241 campioni tumorali FFPE con i corrispondenti campioni di sangue e da tre campioni di DNA tumorale FFPE con il DNA tumorale FF e il DNA ematico corrispondenti. Il DNA estratto dai campioni di tessuto FFPE e dai campioni di sangue corrispondenti è stato quantificato mediante il lettore per micropiastre Spectramax Gemini XPS (Molecular Devices, n. di catalogo XPS). La qualità del DNA è stata misurata con 4200 TapeStation Instrument (Agilent, n. di catalogo G2991BA), che restituisce un numero di integrità del DNA (DIN, DNA Integrity Number) da 1 (DNA degradato) a 10 (DNA intatto).

Preparazione delle librerie

Le librerie sono state preparate a partire da DNA estratto da campioni FFPE, FF o ematici, utilizzando Illumina DNA Prep come descritto nella guida di riferimento del prodotto ma con alcune modifiche necessarie al fine di poter rilevare varianti sensibili nei campioni FFPE con DNA di qualità variabile (Tabella 1).



Figura 1: flusso di lavoro end-to-end Illumina DNA Prep per l'elaborazione del DNA derivato da FFPE ai fini dell'analisi WGS

a. Con impostazioni specifiche per i campioni FFPE.
FF (Fresh-Frozen), fresco congelato; FFPE (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded), fissato in formalina e incluso in paraffina.

Tabella 1: modifiche apportate al protocollo Illumina DNA Prep per consentire il WGS con campioni FFPE

	Protocollo standard Illumina DNA Prep	Protocollo Illumina DNA Prep FFPE
Input di DNA	1-500 ng	FFPE: 10-200 ng[a] FF/sangue: 10-50 ng
Cicli di PCR	5-12[b]	6
Selezione della dimensione	Purificazione con microsfere a doppia selezione	Purificazione con microsfere a singola selezione (0,7×)
Volume di eluizione finale	30 µl	20 µl

a. L'input di DNA raccomandato per i campioni FFPE è 100 ng.
b. A seconda dell'input di campione.

Sequenziamento

Le librerie preparate sono state caricate sulle celle a flusso S4 e 10B e sequenziate rispettivamente su NovaSeq™ 6000 System o NovaSeq X Plus System, con configurazione della corsa di 2 × 151 bp allo scopo di ottenere copertura e accuratezza elevate per il WGS.

Analisi dei dati

Al termine del sequenziamento, i dati sono stati analizzati per mezzo delle pipeline DRAGEN Germline e DRAGEN Somatic con impostazioni specifiche per i campioni FFPE. Per la pipeline DRAGEN Germline, è stata utilizzata l'opzione "--qc-coverage-ignore-overlaps true" al fine di assicurare la corretta misurazione della copertura effettiva nei campioni contenenti frammenti corti. Poiché i campioni FFPE mostrano un elevato numero di falsi positivi per piccole varianti somatiche in specifiche regioni di ripetizione, comprese le ripetizioni L1P e Alu, è stata eseguita la pipeline DRAGEN Somatic con l'opzione aggiuntiva "--vc-excluded-regions-bed" e un file BED contenente la posizione delle ripetizioni L1P e Alu. Le analisi somatiche sono state eseguite mantenendo l'opzione "Nucleotide (NTD) Error Bias Estimation" (Stima della distorsione da errore del nucleotide, NTD) per correggere i pattern di errore sistematici che possono verificarsi durante l'elaborazione dei campioni FFPE. È stato utilizzato il filtro del rumore sistematico per ridurre le identificazioni false positive tenendo conto del rumore specifico del sito. Per il rilevamento delle varianti somatiche, è stato utilizzato l'elenco dei geni di suscettibilità ai tumori solidi negli adulti di Genomics England London (GEL).

Risultati

Richiamo delle varianti somatiche nelle linee cellulari FF utilizzando il protocollo di preparazione delle librerie modificato

Il protocollo Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE è stato utilizzato per valutare il richiamo di varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) e inserzioni-delezioni (indel) in due linee cellulari FF: HCC1187 e COLO 829. I risultati dimostrano un elevato richiamo di SNV somatiche e indel per entrambi i campioni, confermando che il protocollo modificato per campioni FFPE è adatto all'uso con linee cellulari FF (Figura 2).

Copertura del WGS con DNA da FFPE di qualità e quantità variabili

Il protocollo Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE è stato utilizzato per preparare le librerie in una coorte di 241 campioni di cancro al seno con diversi livelli di degradazione del DNA. La qualità del DNA in tutti i campioni è stata valutata mediante i DIN. La percentuale del genoma con copertura effettiva superiore a 50× è stata calcolata per tutti i campioni con DIN variabili e diverse quantità di input. Dai risultati è emerso che il protocollo Illumina DNA Prep specifico per FFPE ha consentito il WGS con profondità effettiva di oltre 50× nei campioni con DIN superiore a 2,5 (Figura 3). Nei campioni di DNA FFPE con DIN inferiore a 2,5, è stata osservata maggiore variabilità della copertura del sequenziamento. L'aumento delle quantità di DNA di input ha determinato il miglioramento della copertura effettiva nei campioni con DIN superiore a 2,5 (Figura 3). Questi risultati evidenziano l'importanza del DIN e della concentrazione del DNA come fattori predittivi della qualità dei dati di sequenziamento nei campioni di DNA da FFPE.

Elevata concordanza tra campioni FF ed FFPE

Il DNA estratto dai campioni FF è di alta qualità, con degradazione ridotta e artefatti minimi, il che lo rende ideale per gli studi di WGS. I campioni FF, tuttavia, non vengono utilizzati abitualmente nella ricerca clinica a causa dei relativi costi e di limitazioni pratiche. I campioni FFPE costituiscono una fonte di tessuto d'archivio più accessibile e di uso comune. Con il protocollo Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE, è stato osservato un alto livello di concordanza tra le varianti somatiche identificate nei campioni di tumore FFPE e nei corrispondenti campioni di tumore FF reali (Figura 4). Questi risultati dimostrano la possibilità di utilizzare questo protocollo ottimizzato per il rilevamento delle varianti somatiche in campioni FFPE per la ricerca sul cancro.

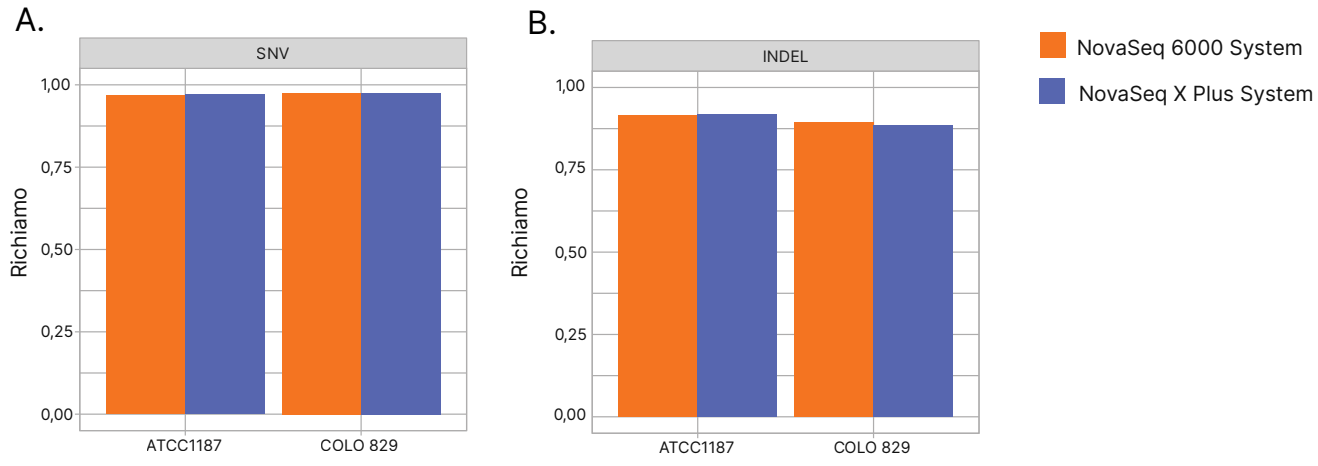


Figura 2: elevato richiamo delle varianti somatiche nelle linee cellulari FF con il flusso di lavoro Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE

Il DNA derivato da FF in due linee cellulari (HCC1187 e COLO 829), preparato con il protocollo Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE e sequenziato su NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System, mostra un elevato richiamo delle varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) e delle inserzioni-delezioni (indel) rispetto al truth set di riferimento.

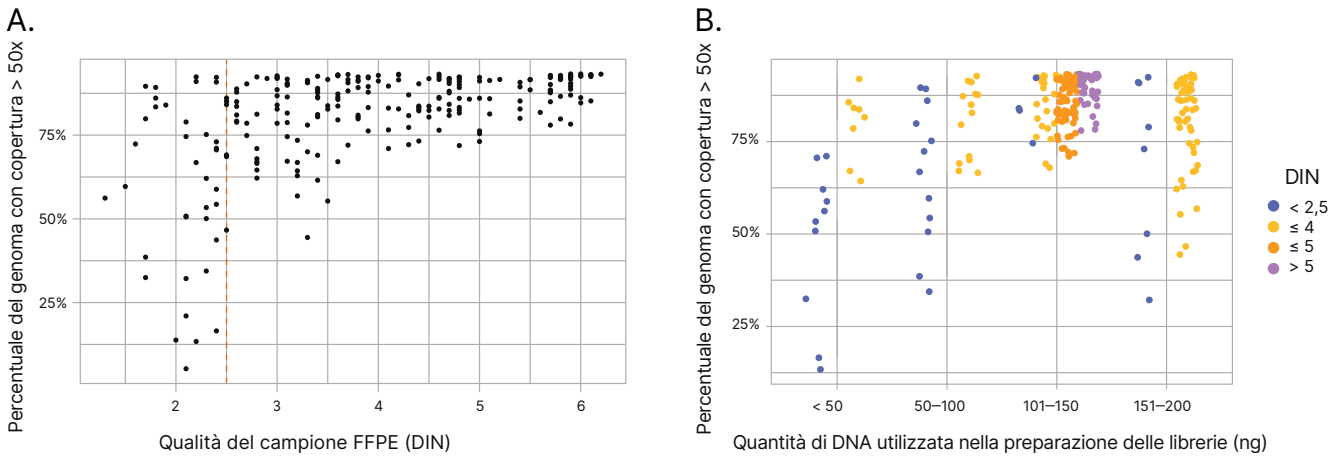


Figura 3: la soluzione Illumina DNA Prep consente il WGS di campioni di DNA derivati da FFPE di qualità e quantità variabili

La percentuale del genoma con profondità effettiva superiore a 50× cresce quando (A) la qualità del DNA derivato da FFPE supera il DIN di 2,5 e (B) le quantità di DNA utilizzate per la preparazione delle librerie aumentano, in particolare nei campioni con DIN superiore a 2,5. I campioni degradati con DIN inferiore a 2,5 mostrano maggiore variabilità nelle prestazioni di sequenziamento.

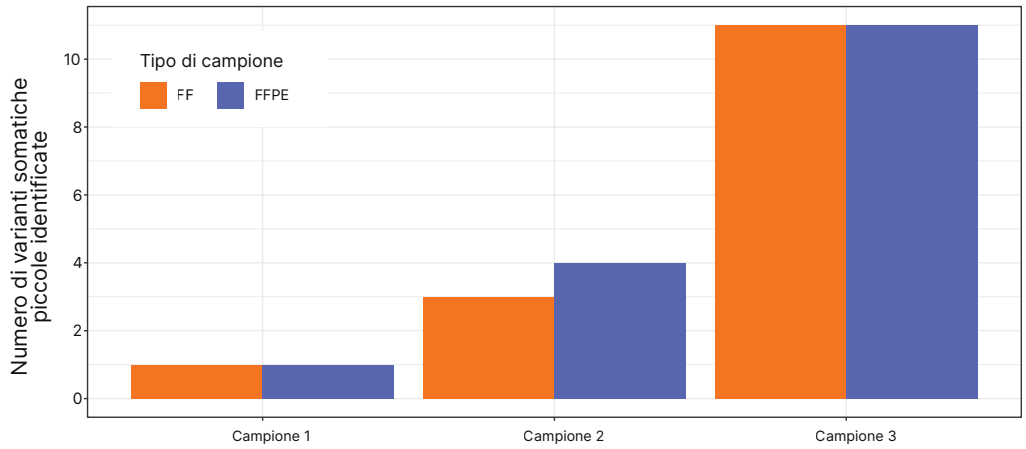


Figura 4: alto livello di concordanza tra le piccole varianti somatiche rilevate nei campioni FFPE ed FF

Il DNA di tre campioni di tumore FFPE e dei corrispondenti campioni FF è stato sequenziato per entrambi i tipi di campione con il protocollo Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE. Il rilevamento delle varianti con VAF pari o superiore al 5% nell'ambito dell'elenco dei geni di suscettibilità ai tumori solidi negli adulti del pannello GEL è risultato altamente concordante in tutti i campioni di DNA FFPE ed FF analizzati.

Riepilogo

La generazione di dati WGS di alta qualità a partire da tessuti FFPE richiede protocolli ottimizzati per la preparazione delle librerie, che tengano conto della degradazione o della bassa qualità del DNA di input. Questa nota applicativa illustra un protocollo Illumina DNA Prep modificato appositamente per i campioni FFPE per produrre dati WGS da DNA derivato da FFPE di qualità e quantità variabili. I risultati dimostrano un eccellente richiamo delle varianti e un'elevata concordanza tra le varianti somatiche identificate nei campioni FFPE ed FF. Grazie a questo flusso di lavoro end-to-end, i ricercatori possono analizzare i campioni di tessuto FFPE per generare dati WGS di alta qualità.

Maggiori informazioni →

Illumina DNA Prep

NovaSeq X Series

Analisi secondaria DRAGEN

Istruzioni DRAGEN per l'analisi dei dati WGS provenienti da librerie preparate con un flusso di lavoro Illumina DNA Prep modificato per campioni FFPE

File predefinito del rumore sistematico

Bibliografia

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

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03852 ITA v1.0