illumina®

NOTA DE APLICAÇÃO

Desbloqueio do sequenciamento do genoma completo a partir de amostras FFPE

Um fluxo de trabalho modificado do Illumina DNA Prep permite o sequenciamento preciso de uma variedade de quantidades e qualidade de entrada de DNA



Protocolo otimizado de preparação de bibliotecas para permitir a identificação de variantes sensíveis do FFPE DNA



Sequenciamento poderoso em sistemas de alto rendimento da Illumina com cobertura abrangente



Fluxo de trabalho de ponta a ponta que inclui pipelines de análise DRAGEN™ altamente eficientes para resultados precisos do WGS

Introdução

O sequenciamento do genoma completo (WGS) dá aos pesquisadores a capacidade de investigar todos os tipos de variantes em um único ensaio, incluindo variação do número de cópias, variantes estruturais, genes de fusão potenciais e deficiências de recombinação homóloga, que podem ser perdidas por painéis de genes direcionados.

A entrada de DNA de alta qualidade de amostras de tecido é recomendada para obter dados WGS precisos e confiáveis. As amostras tumorais fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFPE) são uma das fontes de tecido mais acessíveis para determinação do perfil molecular. No entanto, o processo de fixação, inclusão e extração pode levar à degradação, fragmentação, formação de ligações cruzadas e modificações químicas no DNA que podem comprometer a qualidade do DNA,[1,2] tornando o WGS desafiador. Fluxos de trabalho otimizados são necessários para habilitar o WGS a partir do DNA extraído de amostras FFPE.

Esta nota de aplicação demonstra um fluxo de trabalho simplificado de ponta a ponta usando o Illumina DNA Prep para gerar dados WGS de alta qualidade a partir de DNA derivado de FFPE. Pequenas modificações no protocolo Illumina DNA Prep com base em tagmentação, sequenciamento em poderosos sistemas de alto rendimento da Illumina e o DRAGEN secondary analysis fornecem um fluxo de trabalho de WGS tumor–normal de alto desempenho ao iniciar com DNA derivado de FFPE (Figura 1).

Métodos

Amostras

Duas linhagens celulares recém-congeladas (FF), HCC1187 (ATCC, N.º do catálogo CRL-2322) e COLO 829 (ATCC, N.º do catálogo CRL-1974) foram usadas para avaliar o impacto do protocolo de preparação de biblioteca modificado no desempenho de identificação de variantes. O DNA extraído de uma coorte de 241 amostras tumorais FFPE com amostras de sangue correspondentes e três amostras tumorais de DNA FFPE com amostras tumorais e de DNA sanguíneo FF correspondentes foram fornecidos por colaboradores externos de pesquisa clínica. O DNA extraído de amostras de tecido FFPE e amostras de sangue correspondentes foi quantificado usando o leitor de microplacas Spectramax Gemini XPS (Molecular Devices, N.º do catálogo XPS). A qualidade do DNA foi medida usando o 4200 TapeStation Instrument (Agilent, N.º do catálogo G2991BA), que fornece um número de integridade do DNA (DIN) variando de 1 para DNA degradado a 10 para DNA intacto.

Preparação da biblioteca

As bibliotecas foram preparadas a partir de DNA extraído de amostras FFPE, FF ou de sangue usando o Illumina DNA Prep, conforme detalhado no guia de referência do Illumina DNA Prep, com algumas modificações para permitir a detecção de variantes sensíveis de amostras FFPE com DNA de qualidade variável (Tabela 1).

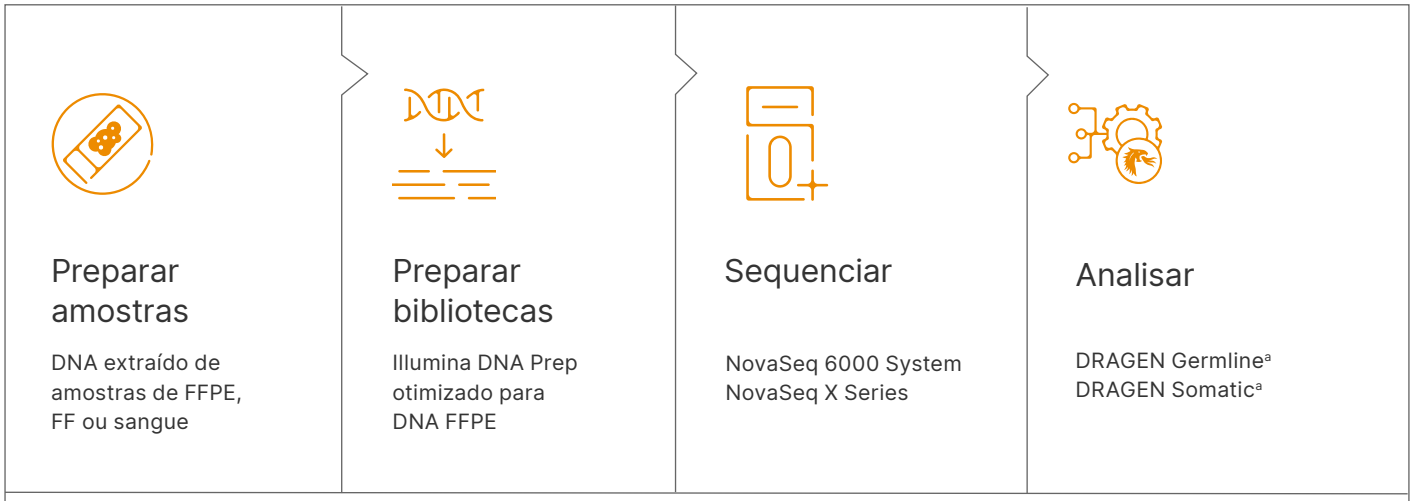


Figura 1: Fluxo de trabalho completo do Illumina DNA Prep para processamento de DNA derivado de FFPE para análise de WGS

a. Com configurações específicas de FFPE.
FF, recém-congelado; FFPE, fixado em formalina e emblocado em parafina.

Tabela 1: Modificações feitas no protocolo Illumina DNA Prep para permitir WGS de amostras FFPE

	Protocolo padrão do Illumina DNA Prep	Protocolo FFPE do Illumina DNA Prep
Entrada de DNA	1 A 500 ng	FFPE: 10 A 200 ng[a] FF/sangue: 10 A 50 ng
Ciclos de PCR	5 A 12[b]	6
Seleção do tamanho	Limpeza com beads em etapa dupla	Limpeza com beads em etapa única com seleção de tamanho de 0,7×
Volume de eluição final	30 µl	20 µl

a. A entrada de DNA recomendada para amostras FFPE é de 100 ng.
b. Dependendo da entrada da amostra.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram carregadas em lâminas de fluxo S4 e 10B e sequenciadas nos sistemas NovaSeq™ 6000 ou NovaSeq X Plus, respectivamente, com uma configuração de corrida de 2 × 151 bp para permitir alta cobertura e precisão para WGS.

Análise de dados

Após a conclusão do sequenciamento, os dados foram analisados usando pipelines DRAGEN Germline e DRAGEN Somatic com configurações específicas de FFPE. Para o pipeline DRAGEN Germline, a opção "--qc-coverage-ignore-overlaps true" foi usada para garantir que a cobertura eficaz fosse medida corretamente para amostras com fragmentos curtos. Como amostras FFPE apresentam um alto número de identificações falso-positivas para pequenas variantes somáticas em regiões repetitivas específicas, incluindo repetições L1P e Alu, o pipeline DRAGEN Somatic foi executado com a opção adicional "--vc-excluded-regions-bed" e um arquivo BED com a localização das repetições L1P e Alu. As análises somáticas foram realizadas com 'Nucleotide (NTD) Error Bias Estimation' mantido ativado para corrigir padrões de erro sistemáticos que podem ocorrer durante o processamento de amostras FFPE. O filtro de ruído sistemático foi usado para reduzir as identificações falso-positivas, considerando o ruído específico do local. A lista de genes de suscetibilidade ao câncer sólido em adultos da Genomics England London (GEL) foi usada para detecção de variantes somáticas.

Resultados

Recolhimento de variante somática em linhagens celulares FF usando o protocolo de preparação de biblioteca modificado

O protocolo modificado Illumina DNA Prep FFPE foi usado para avaliar a variante de nucleotídeo único (SNV) e o recall de inserção-deleção (indel) de duas linhagens celulares de FF, HCC1187 e COLO 829. Os achados demonstram alto recall de SNVs e indels somáticos para ambas as amostras, confirmando que o protocolo FFPE modificado foi adequado para uso com linhagens celulares de FF (Figura 2).

Cobertura de WGS em uma variedade de qualidade de DNA derivado de FFPE e quantidades de entrada

O protocolo modificado Illumina DNA Prep FFPE foi usado para preparar bibliotecas em uma coorte de 241 amostras de câncer de mama com níveis variados de degradação do DNA. DINs foram usados para avaliar a qualidade do DNA para todas as amostras. A porcentagem do genoma com cobertura eficaz superior a 50× foi calculada para todas as amostras com valores DIN variáveis em uma faixa de valores de entrada. Os resultados demonstram que o protocolo Illumina DNA Prep específico para FFPE permitiu o WGS com uma profundidade eficaz superior a 50× em amostras com DIN superior a 2,5 (Figura 3). As amostras de DNA FFPE com DIN abaixo de 2,5 mostraram maior variabilidade na cobertura do sequenciamento. O aumento das quantidades de entrada de DNA resultou em melhor cobertura eficaz para amostras com DIN superior a 2,5 (Figura 3). Esses achados destacam DIN e a concentração de DNA de entrada como preditores-chave da qualidade dos dados de sequenciamento em amostras de DNA derivadas de FFPE.

Alta concordância entre amostras FF e FFPE

O DNA extraído de amostras de FF é de alta qualidade com degradação reduzida e artefatos mínimos, tornando-o uma entrada ideal para estudos de WGS. No entanto, as amostras de FF não são rotineiramente usadas em pesquisa clínica devido a limitações de custo e práticas. As amostras FFPE são uma fonte de tecido de arquivo mais acessível e comumente usada. Com o uso do protocolo Illumina DNA Prep FFPE modificado, foi observado um alto nível de concordância entre variantes somáticas identificadas em FFPE e amostras tumorais do mundo real FF correspondentes (Figura 4). Esses achados demonstram a viabilidade do uso desse protocolo otimizado para detecção de variantes somáticas em amostras FFPE para pesquisa de câncer.

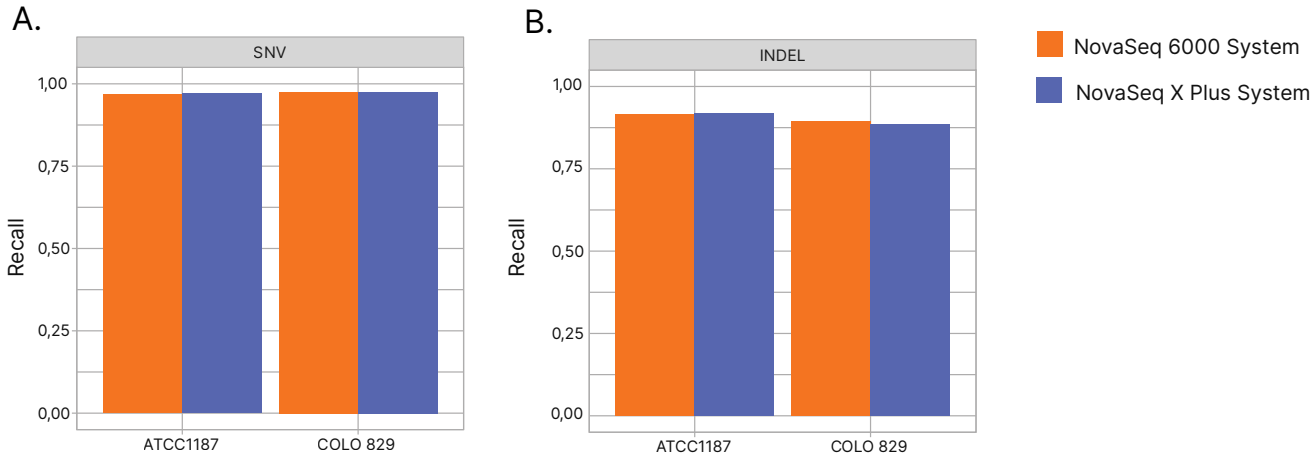


Figura 2: Alto recall de variante somática em linhagens celulares FF usando o fluxo de trabalho modificado do Illumina DNA Prep FFPE

O DNA derivado de FF de duas linhagens celulares (HCC1187 e COLO 829) preparado com o protocolo Illumina DNA Prep FFPE modificado e sequenciado nos sistemas NovaSeq 6000 e NovaSeq X Plus mostra alto recall de variantes de nucleotídeo único (SNV) e deleções de inserção (indels) em comparação com o conjunto de verdade de referência.

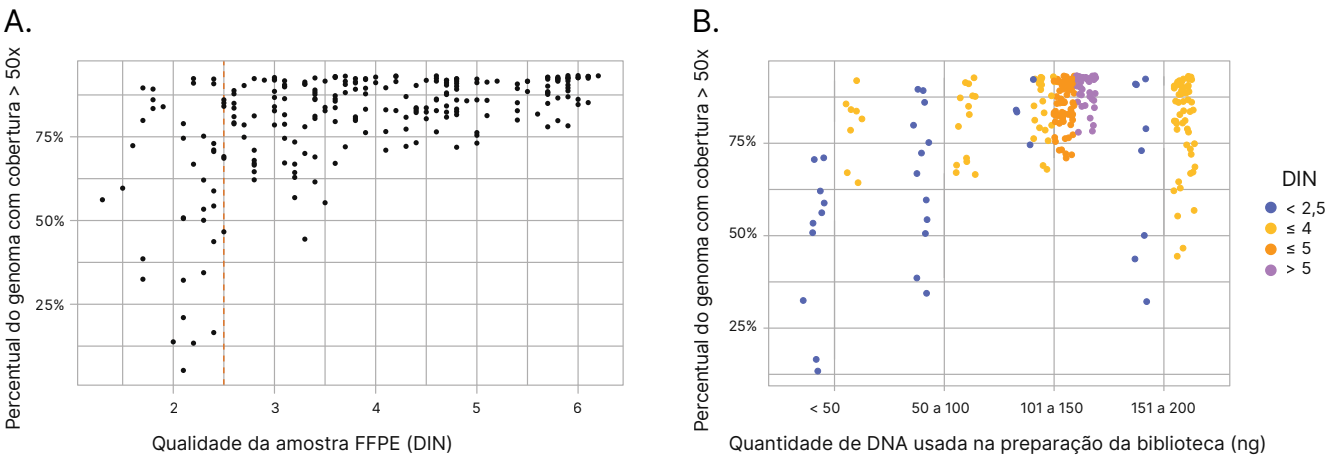


Figura 3: A solução Illumina DNA Prep permite o WGS de amostras de DNA derivadas de FFPE em uma variedade de quantidades de qualidade e entrada

A porcentagem do genoma com mais de 50× de profundidade eficaz aumenta quando (A) a qualidade do DNA derivado de FFPE ultrapassa um DIN de 2,5 e (B) se utilizam maiores quantidades de DNA de entrada para aumentar a preparação da biblioteca, especialmente em amostras com DIN acima de 2,5. Amostras degradadas com DIN abaixo de 2,5 mostram maior variabilidade no desempenho do sequenciamento.

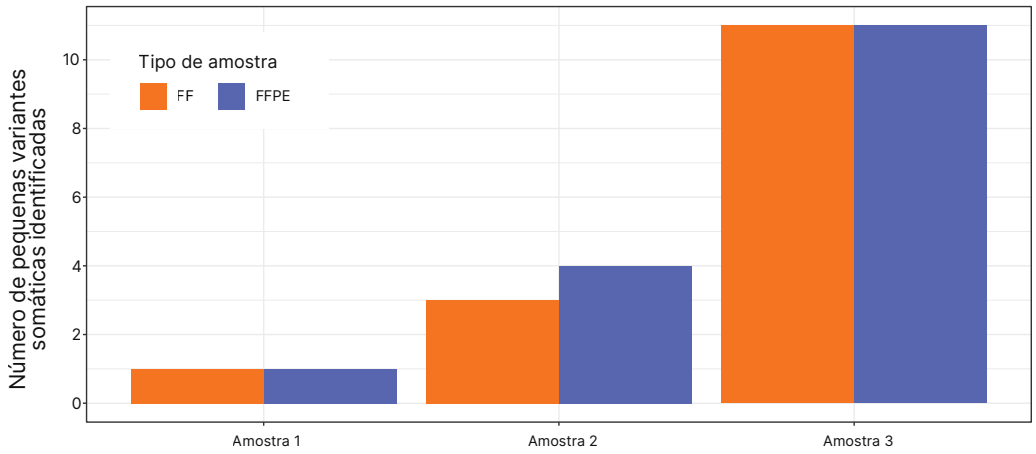


Figura 4: Alto nível de concordância entre pequenas variantes somáticas detectadas usando amostras FFPE e FF

O DNA de três amostras tumorais FFPE e FF correspondentes foi sequenciado usando o protocolo modificado Illumina DNA Prep FFPE para ambos os tipos de amostra. A detecção de variantes com VAF ≥ 5% na lista de genes do painel GEL de tumores sólidos em adultos para DNA FFPE e FF apresentou alta concordância em todas as amostras testadas.

Resumo

A geração de dados de WGS de alta qualidade a partir de tecidos FFPE requer protocolos otimizados para a preparação da biblioteca para levar em conta DNA de entrada degradado ou de baixa qualidade. Esta nota de aplicação detalha um protocolo Illumina DNA Prep específico para FFPE modificado para gerar dados de WGS a partir de DNA derivado de FFPE de qualidade e entrada variáveis. Os resultados demonstram excelente recall de variantes e alta concordância entre variantes somáticas identificadas em amostras FFPE e FF. Com esse fluxo de trabalho de ponta a ponta, os pesquisadores podem analisar amostras de tecido FFPE para gerar dados WGS de alta qualidade.

Saiba mais →

Illumina DNA Prep

NovaSeq X Series

DRAGEN secondary analysis

Receita DRAGEN para analisar dados WGS de bibliotecas preparadas usando um fluxo de trabalho do Illumina DNA Prep modificado para FFPE

Arquivo pré-construído de ruído sistemático

Referências

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, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03852 PTB v1.0