

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Resultados de exoma rápidos,
flexíveis e escaláveis com
suporte para amostras FFPE
de baixa entrada

- Detecte variantes raras com baixas frequências de alelos do gDNA extraído do tecido FFPE
- Prepare bibliotecas prontas para sequenciamento em ≤ 10 horas com ~ 4 horas de trabalho efetivo
- Analise dados e identifique variantes com alta sensibilidade analítica usando a análise secundária do DRAGEN™
- Habilite a interpretação definida pelo usuário e a geração de relatórios de pesquisa com o Illumina Connected Insights



Sequenciamento de exoma de amostra para insights com um parceiro confiável

No campo da pesquisa de câncer, amostras fixadas em formalina e embocadas em parafina (FFPE) contêm uma abundância de informações valiosas para estudos de câncer. Como as amostras FFPE geralmente produzem DNA altamente degradado, elas podem ser difíceis de analisar com métodos de sequenciamento de última geração (NGS).

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment é uma solução versátil de preparação de bibliotecas (Tabela 1) que aproveita o poder da tecnologia NGS para obter detecção altamente sensível de variantes de baixa abundância em amostras FFPE de baixa entrada. Esta solução de fornecedor único abrange o kit de preparação da biblioteca, o Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e os sistemas de sequenciamento de médio a alto rendimento da Illumina, incluindo o NextSeq™ 2000 System e o NovaSeq™ X Series. A análise de dados é realizada usando pipelines DRAGEN disponíveis no BaseSpace™ Sequence Hub e no Illumina Connected Analytics. O Illumina Connected Insights pode ser usado para possibilitar a análise e a interpretação definidas pelo usuário.

Fluxo de trabalho simplificado

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment faz parte de um fluxo de trabalho normal de tumor de sequenciamento completo de exoma (WES) integrado que oferece excelente desempenho e qualidade de dados. O fluxo de trabalho escalável começa com DNA genômico extraído (gDNA) de amostras FFPE, seguido pela preparação e enriquecimento da biblioteca. As bibliotecas enriquecidas são sequenciadas nos sistemas de médio e alto rendimento da Illumina e a identificação de variantes altamente precisa é realizada usando o DRAGEN secondary analysis (Figura 1). Essa solução fácil de usar oferece alto desempenho para sequenciamento de exoma, fornece volumes de preenchimento fáceis de automação e acomoda multiplexação de amostras para dimensionamento eficiente (Tabela 1).

Tabela 1: Visão geral do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Parâmetro	Especificação
Tipo de DNA	gDNA do tecido FFPE
Entrada de DNA	DNA FFPE de 40 ng
Multiplexação de amostra	96 a 192 índices duplos exclusivos
Marcação duplicada	Identificadores moleculares únicos (UMIs) não aleatórios
Plexação de enriquecimento	4-plex
Sistemas de sequenciamento compatíveis	NextSeq 2000 System, lâminas de fluxo P3 ou P4 NovaSeq 6000 System, lâminas de fluxo SP, S1 ou S2 NovaSeq X Series, lâmina de fluxo 1,5B
Tempo total do fluxo de trabalho ^a	≤ 10 horas
Tempo total de trabalho efetivo	~4 horas

a. Inclui etapas de preparação, enriquecimento e normalização da biblioteca.

Preparação rápida e flexível da biblioteca

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment é um ensaio baseado em ligação que usa uma única etapa de hibridização para preparação rápida da biblioteca (Figura 2). Ele usa o Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e permite a interrogação de alvos mitocondriais ou adicionais quando complementado com o Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel ou o Illumina Custom Enrichment Panel v2.

As bibliotecas prontas para sequenciamento são preparadas em ≤ 10 horas, com apenas ~4 horas de trabalho efetivo, permitindo que os pesquisadores passem do DNA extraído para o sequenciamento em um único dia. O QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, N.º do catálogo 80234) é recomendado para extração de DNA de amostras FFPE.



Figura 1: De amostras a relatórios com um único parceiro, a Illumina oferece suporte a um fluxo de trabalho simplificado para WES, abrangendo preparação de bibliotecas, sequenciamento e análise de dados.

a. A linha de produtos Illumina Connected Insights é compatível com a análise definida pelo usuário por meio de chamadas da interface de programação da aplicação (API) para fontes de conhecimento de terceiros. A integração do Illumina Connected Insights estará disponível com uma atualização do software DRAGEN no Q2 de 2025.

Cobertura flexível e escalável

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment usa um painel de enriquecimento de exoma focado, abrangente e atualizado. Essa cobertura focada proporciona uma solução tumoral-normal WES econômica em um número ideal de amostras por corrida de sequenciamento (Tabela 2). A cobertura do genoma mitocondrial (chrM) pode ser adicionada facilmente usando o Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel como um painel de spike-in no protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Regiões específicas de interesse podem ser adicionadas com painéis de spike-in personalizados de até 10.000 sondas usando o Illumina Custom Enrichment Panel v2.

Desempenho de alta qualidade

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment apresenta a mesma química de preparação e enriquecimento de bibliotecas que o Illumina Cell-Free DNA with Enrichment para permitir um desempenho excepcional com amostras FFPE.

 Leia a [ficha de dados do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#) para saber mais.

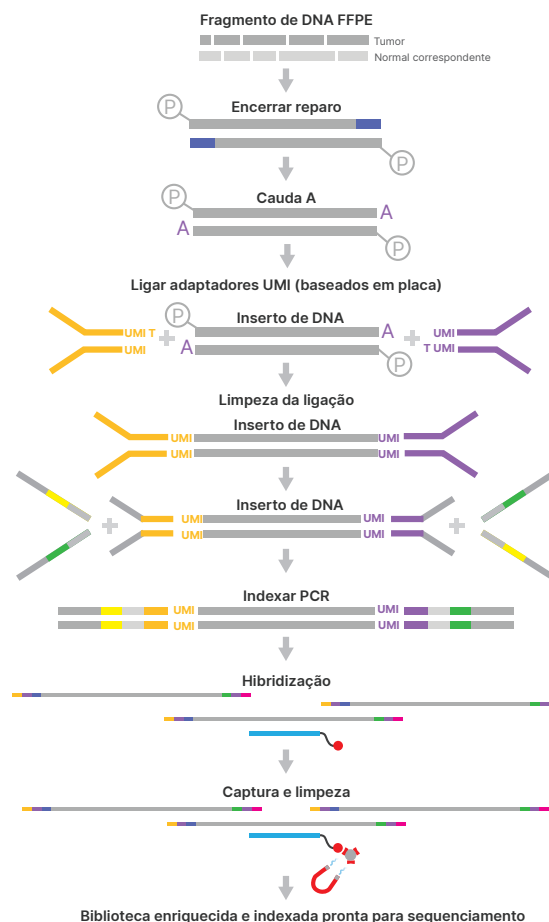


Figura 2: Preparação simplificada de bibliotecas baseadas em ligação com enriquecimento de exoma: após o enriquecimento de captura híbrida, as bibliotecas de exoma estão prontas para sequenciamento.

Tabela 2: Plexidade de sequenciamento para bibliotecas do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Tipo de amostra	Profundidade desejada da cobertura-alvo média ^a	Leituras single-end recomendadas	Número máximo de bibliotecas por lâmina de fluxo					
			NextSeq 2000 System		NovaSeq 6000 System			NovaSeq X Series
			P3	P4	SP	S1	S2	
Tumor	≥ 130×	≥ 100 milhões	8	12	4	12	28	12
Normal	≥ 30×	≥ 28 milhões	8	12	4	12	28	12

a. A cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos.

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra excelente desempenho do ensaio de enriquecimento com amostras de tecido FFPE. As bibliotecas foram preparadas a partir de 40 ng de DNA FFPE de entrada de 12 pares tumor-normais usando o kit Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment e o Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. O sequenciamento foi realizado no NovaSeq 6000 System usando a lâmina de fluxo S1 com uma profundidade de sequenciamento direcionada ≥ 100 milhões de leituras single-end para tumor e ≥ 28 milhões de leituras single-end para amostras normais correspondentes. As bibliotecas tumorais de amostras FFPE de média a alta qualidade mostram uma profundidade de cobertura-alvo média acima de 130× (onde a cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não pares sobrepostos a contagem dupla) e ≥ 90% dos alvos atingiram cobertura ≥ 50×, com impacto mínimo em outras métricas de controle de qualidade (CQ) da biblioteca (Figura 3).

Detecção sensível de variantes de baixa frequência

A biblioteca Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment detecta variantes pequenas de DNA em baixas frequências de alelos variantes (VAF). As bibliotecas foram preparadas usando 40 ng de Seraseq Tumor Mutation DNA Mix v2 AF10 (SeraCare, N.º do catálogo 0710-0094) como amostra "tumoral" e 40 ng de Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (SeraCare, Catálogo número 0710-0137) como amostra "normal" pareada. A mistura de mutação foi diluída para < 10% de VAF. Doze réplicas de biblioteca "tumorais" e quatro "normais" por nível de VAF foram preparadas. As 13 bibliotecas enriquecidas de 4-plex com o painel Twist for Illumina Exome 2.5 foram sequenciadas em duas lâminas de fluxo S2 no NovaSeq 6000 System com comprimento da leitura de 2 × 151 bp. Para análise, as leituras de sequenciamento das bibliotecas de tumor foram

subamostradas para uma profundidade de leitura de 100M, 70M e 46M single-end para explorar a relação entre cobertura no alvo colapsada por UMI e detecção de variantes. As leituras para bibliotecas normais foram subamostradas para 28M de leituras single-end. A identificação de variantes foi realizada usando o aplicativo DRAGEN Somatic no BaseSpace Sequence Hub.

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment detecta amplificações de genes com uma alteração de dobra de 2,5 vezes. As réplicas da biblioteca foram preparadas usando 40 ng ou 20 ng (quatro réplicas cada) de Seraseq Solid Tumor CNV Mix +3 cópias (SeraCare, N.º do catálogo 0710-2866) como amostra "tumoral" e 40 ng de DNA do Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (SeraCare, Catálogo número 0710-0137) como amostra "normal" pareada. As bibliotecas foram sequenciadas em uma lâmina de fluxo S1 no NovaSeq 6000 System com comprimento da leitura de 2×151 bp e as leituras de sequenciamento foram subamostradas para 100 milhões de leituras single-end para CNV Mix e 28 milhões de leituras para a amostra de WT DNA Reference. A identificação somática de CNV foi realizada com o aplicativo DRAGEN Somatic no BaseSpace Sequence Hub usando um arquivo de linha de base de um painel de normais construído a partir de 45 amostras de tecido FFPE normais e analisado com o algoritmo de segmentação padrão do DRAGEN. Os valores apresentados correspondem à média e ao desvio padrão das oito réplicas de CNV Mix e são comparados com a alteração de dobra esperada informada pela SeraCare.

O ensaio alcança 90% de detecção de variantes de nucleotídeo único (SNVs) (Figura 4A) e inserções/deleções (indels) (Figura 4B) a 5% de VAF de entrada de 40 ng com 100M de leituras single-end. A sensibilidade a 6–7% de VAF permanece alta com apenas 46M de leituras por biblioteca de tumor. Foi observada sensibilidade de 100% para a detecção de 12 amplificações de gene com alteração de dobra de ~2,5 vezes em uma amostra de controle com três cópias adicionais por gene (Figura 5).

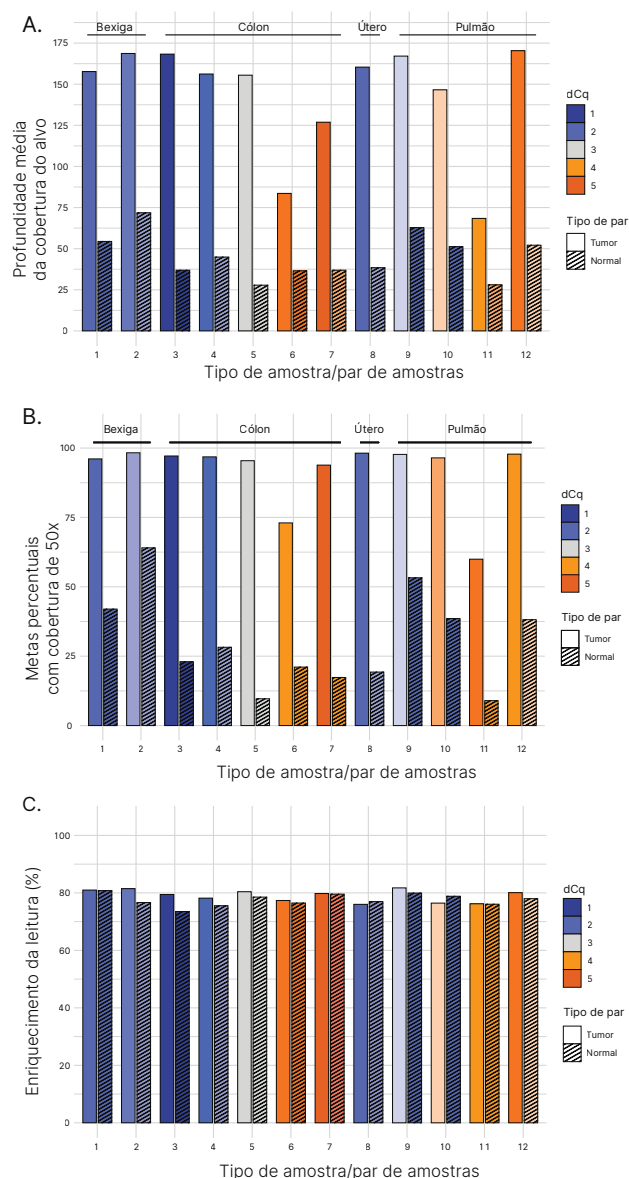


Figura 3: Métricas de desempenho para amostras de tecido FFPE: bibliotecas tumorais-normais de amostras de tecido FFPE de média a alta qualidade alcançaram excelentes métricas de enriquecimento, incluindo > 70% de enriquecimento de leitura, alta profundidade de cobertura-alvo média e > 90% de alvos com cobertura $\geq 50\times$.

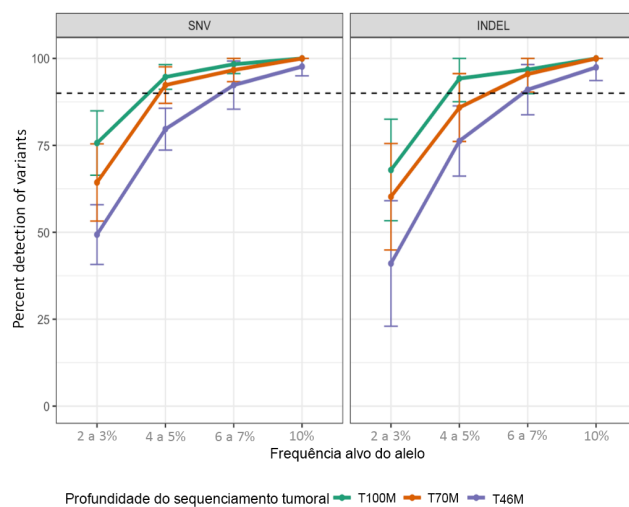


Figura 4: Detecção de variantes em VAF baixo: os resultados demonstram que o Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment alcança 90% de detecção de SNVs e indels em 5% de VAF a partir de 40 ng de entrada com 100M de leituras single-ends (linha verde). Como esperado, a taxa de detecção para variantes VAF de 4–5% diminui com o número de leituras. No entanto, a sensibilidade permanece alta para variantes em torno de 6 a 7% de VAF com apenas 46M de leituras single-end (linha roxa) por biblioteca de tumor. A linha tracejada representa 90% de detecção de variantes.

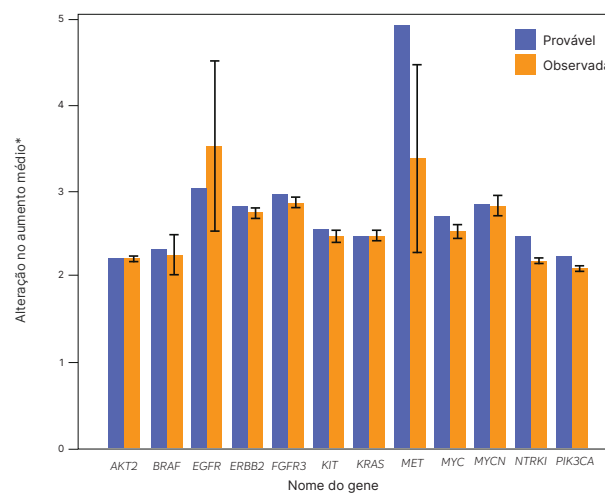


Figura 5: Detecção de amplificação gênica: foi observada sensibilidade de 100% usando Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment para a detecção de 12 amplificações gênicas em uma amostra de controle com três cópias adicionais por gene. Os valores apresentados correspondem à média e ao desvio padrão das oito réplicas de CNV Mix e são comparados com a alteração de dobra esperada informada pela SeraCare. *A SeraCare relata que *BRAF*, *EGFR* e *MET* foram amplificados usando dois construtos sintéticos com pequenas áreas de sobreposição. Portanto, eventos de CNV abrangendo essas regiões de sobreposição podem mostrar valor de amplificação inflado.

Avaliação precisa da carga mutacional tumoral (TMB)

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment combina o conteúdo abrangente do exoma do Twist for Illumina Exome 2.5 Panel e o sofisticado pipeline de bioinformática somática do DRAGEN para fornecer estimativas precisas de TMB. A capacidade do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment de avaliar a TMB foi avaliada usando padrões de referência SeraCare TMB e DNA FFPE de amostras de tecido. As bibliotecas Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment foram preparadas com 40 ng de padrões Seraseq gDNA TMB Mix Score 7 e TMB Mix Score 13 e suas respectivas amostras "normais" (SeraCare, N.º do catálogo 0710-1326 e 0170-1586, respectivamente). Os dados de sequenciamento foram analisados com o aplicativo DRAGEN Enrichment e os arquivos BAM importados como pares normais do tumor para o aplicativo DRAGEN Somatic. Os resultados mostram que os valores observados de TMB atendem aos valores esperados (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação precisa de TMB com Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Mistura de TMB de gDNA Seraseq	Pontuação TMB esperada	Pontuação TMB do aplicativo DRAGEN Somatic
TMB - alto	13	16,7 (0,1)
TMB - baixo	7	9,4 (0,1)

Os valores relatados são a média e o desvio padrão de seis réplicas técnicas.

Concordância com o TruSight™ Oncology 500

As bibliotecas Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment foram preparadas com 40 ng de DNA FFPE do tumor e amostras normais correspondentes. As bibliotecas foram sequenciadas em várias lâminas de fluxo S2 do NovaSeq 6000 System com comprimento da leitura de 2 × 151 bp e leituras de sequenciamento para bibliotecas normais tumorais e correspondentes subamostradas para o número recomendado de leituras (Tabela 2). Os dados foram analisados com o aplicativo DRAGEN Enrichment e os arquivos BAM importados como pares tumor/normal para o aplicativo DRAGEN Somatic no BaseSpace Sequence Hub. Em paralelo, 40 ng do mesmo DNA FFPE das amostras tumorais foram processados com TruSight Oncology 500 e os dados analisados usando o software local TruSight Oncology 500 v2.2.1.

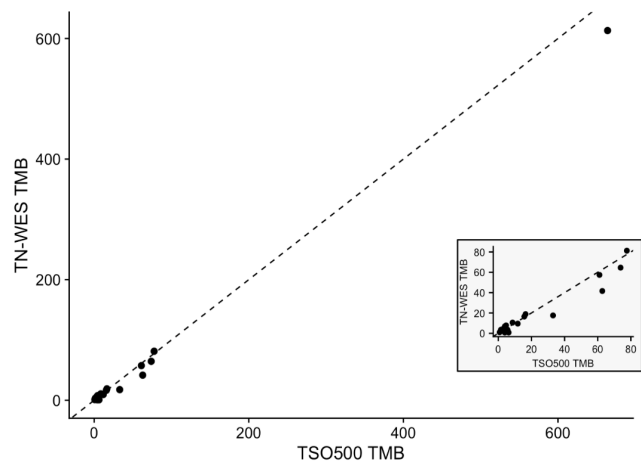


Figura 6: Avaliação precisa de TMB: a avaliação de TMB com o Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra alta concordância com as pontuações de TMB obtidas com TruSight Oncology 500. O gráfico de inserção mostra os valores de TMB com zoom ≤ 80.

Os resultados mostram alta concordância ($R^2 = 0,999$) com a pontuação de TMB relatada pelo fluxo de trabalho do TruSight Oncology 500, demonstrando excelente desempenho do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment para avaliar esse biomarcador oncológico importante (Figura 6). Um pipeline de análise para biomarcadores de instabilidade de microssatélites (MSI) e deficiência de recombinação homóloga (HRD) está em desenvolvimento; os resultados do aplicativo DRAGEN Somatic devem ser considerados preliminares. Entre em contato com seu especialista em vendas para saber mais sobre esses biomarcadores.

Flexibilidade de conteúdo com Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment é compatível com sondas personalizadas projetadas para cobrir novos alvos ou aumentar a cobertura de regiões de maior interesse. Os painéis são projetados para uma lista personalizada de alvos e adicionados facilmente como sondas de spike-in no protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Os painéis personalizados v2 da Illumina são projetados por meio da [ferramenta de design on-line DesignStudio™](#), ou com a ajuda da equipe do Illumina Concierge.

Tabela 4: Compatibilidade do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment com conteúdo suplementar

Painel	Twist for Illumina Mitochondrial	Custom Enrichment v2 Panel A	Custom Enrichment v2 Panel B	
Tamanho do painel (bases)	16.659	244.283	1.590.551	
Número de sondas	139	2.804	10.353	
Número de genes cobertos	37	79	1.038	
Relação entre painel de spike-in/painel de exoma	0,008 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	
Leituras de sequenciamento ^b	100 milhões	100 milhões	100 milhões	110M–220M ^c
Exoma da cobertura-alvo média	136×	137×	111×	151×
Região de spike-in da cobertura-alvo média ^d	1397×	193×	52×	72×
Percentual de cobertura-alvo do exoma ≥ 50×	93%	93%	85%	93%
Percentual de cobertura-alvo de spike-in ≥ 50×	99,70%	99%	42%	57%

a. 2 µl de diluição 1:50 do Twist for Illumina Mitochondrial Panel, ou 2 µl do Custom Enrichment v2 Panel misturados com 3 µl do Twist for Illumina Exome 2.5 Panel.

b. Número de leituras de sequenciamento single-end em milhões.

c. Indica a faixa de leituras de sequenciamento observadas para as diferentes amostras tumorais de DNA FFPE.

d. A cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos.

Para demonstrar a compatibilidade do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment com uma ampla variedade de tamanhos de painel de spike-in, o protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment foi realizado com o Twist for Illumina Mitochondrial Panel ou dois Illumina Custom Enrichment Panels v2 (Tabela 4). Os resultados demonstram uma correlação entre o tamanho do painel de spike-in e a cobertura de alvos de exoma e spike-in. Uma cobertura mais alta é obtida com o painel mitocondrial pequeno, enquanto uma cobertura excelente é obtida para os alvos do exoma e do spike-in ao usar um painel de spike-in de tamanho médio (Painel A). Para o grande painel de spike-in B, a cobertura do exoma permanece alta, enquanto a cobertura para a região visada pelo painel de spike-in é modesta, mas pode ser aumentada com sequenciamento mais profundo. Uma cobertura mais profunda de regiões sobrepostas (Figura 7A) ou cobertura de sequenciamento para novos alvos (Figura 7B) é observada na presença de painéis de spike-in. Além disso, foi observado um aumento de ~10 vezes na profundidade da cobertura-alvo média e na porcentagem de alvos com cobertura ≥ 50× nas regiões visadas pelo Custom Enrichment v2 Panel B quando o painel de spike-in foi combinado com o Twist for Illumina Exome 2.5 Panel durante a reação de enriquecimento (Tabela 5).

Tabela 5: O spike-in do Illumina Custom Enrichment v2 Panel melhora as métricas de enriquecimento

Parâmetro	Twist for Illumina Exome 2.5	Twist for Illumina Exome 2.5 + spike-in Panel ^a
Profundidade da cobertura-alvo média para a região de spike-in ^b	5,5×	52×
Spike-in da uniformidade de cobertura	20%	89%
Alvos de porcentagem de spike-in com cobertura ≥ 20×	5%	78%
Alvos de porcentagem de spike-in com cobertura ≥ 50×	4%	42%

a. Custom Enrichment v2 Panel B, consulte na Tabela 4 os detalhes do painel.

b. A cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos.

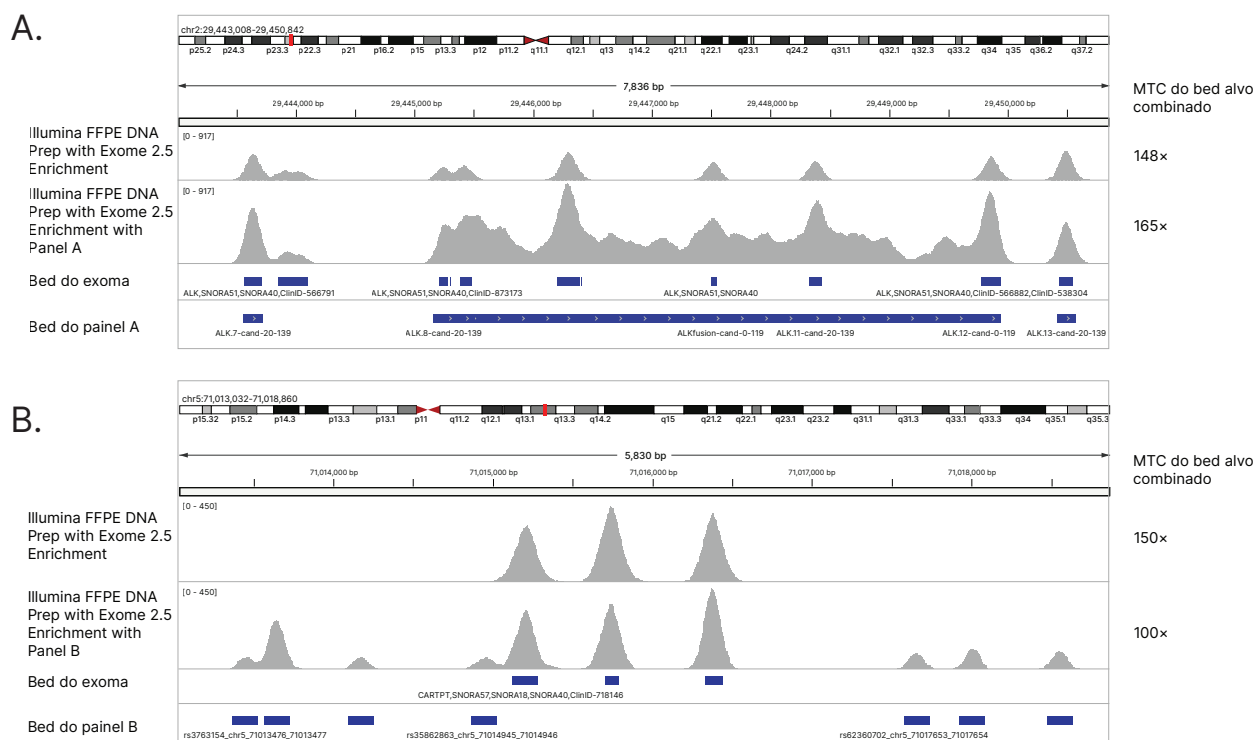


Figura 7: Cobertura de sequenciamento mais profunda com painéis de spike-in do Illumina Custom Enrichment v2 —(A) A comparação da cobertura-alvo média (MTC, calculada com a configuração de não fazer contagem repetida dos pares sobrepostos) de regiões sobrepostas entre o Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment Panel e o Custom Enrichment v2 Panel A (consulte a Tabela 4) com ou sem um painel de spike-in mostra um aumento de mais de duas vezes na cobertura na presença do Painel A de spike-in. (B) A comparação da cobertura de novas regiões direcionadas pelo Custom Enrichment v2 Panel B (consulte a Tabela 4) com ou sem painel de spike-in mostra cobertura na presença do Painel B de spike-in.

Resumo

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment oferece uma solução versátil de preparação de bibliotecas otimizada e de fornecedor único para uso com DNA de baixa entrada extraído de amostras de tecido FFPE. Com a solução Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, os pesquisadores podem detectar variação somática de baixa frequência com sensibilidade analítica excepcional. A solução Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment de alto desempenho, combinada com sequenciamento em poderosos sistemas de sequenciamento Illumina e análise acelerada de dados, oferece um fluxo de trabalho normal de tumor NGS de alta qualidade para DNA FFPE, abrangendo desde o processamento de amostras até a análise de dados, de um único parceiro confiável.

Saiba mais

[Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment](#)

[DRAGEN secondary analysis](#)

[Illumina Connected Insights](#)

Informações para pedidos

Produto	N.º do catálogo
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex)	20104103
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex), on-premises ^a	20104104
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (16 Samples)	20104105
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (96 Samples)	20104106
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Enrichment (16 Reactions)	20104107
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034701
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034702
Illumina UMI DNA/RNA UD v3 indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20126235
Illumina UMI DNA/RNA UD v3 indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20126237
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set A for Automation	20066404
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set B for Automation	20063213
Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel	20076914
Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel	20093180
a. 10.000 Gb; licença de 1 ano do DRAGEN Server incluída.	



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 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-03347 PTB v1.0