

使用单一NGS检测方法分析 存档肿瘤样本中的甲基化和 体细胞变异

利用Illumina 5-Base DNA Prep分析FFPE DNA
的使用建议



采用可维持DNA完整性的温和化学技术，充分挖掘FFPE样本的发现能力



仅需40 ng不同质量的FFPE DNA起始样本，即可获得高准确性的基因组与甲基化组见解



仅需对检测方案做简易调整，即可对低起始量FFPE DNA样本产出稳定可靠的数据

简介

癌症是一种涉及基因组和表观基因组的疾病。¹ 识别驱动肿瘤生长的基因组突变与异常 DNA 甲基化，对解析癌症的发生、进展以及治疗反应至关重要。福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）组织样本是癌症研究中极具价值的存档基因组材料来源。但受限于FFPE DNA的降解问题，对这类样本开展全面分子分析存在较大难度。

Illumina 5-Base DNA Prep采用独特的化学技术与优化分析流程，可检测五种碱基：腺嘌呤（A）、胸腺嘧啶（T）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）以及5-甲基胞嘧啶（5mC），将全基因组测序（WGS）与甲基化测序整合为一套简便的检测方案。² 温和的单步甲基化碱基转化反应可保护DNA完整性，充分释放FFPE样本的发现能力。本应用笔记展示了Illumina 5-Base DNA Prep在FFPE肿瘤样本上的应用，并分享了实验方案建议，助力实现高准确性甲基化组分析与体细胞变异检出。

方法

基因组和甲基化组分析

从标准FFPE组织蜡块中提取基因组DNA，共10例不同肿瘤类型样本，包含肺癌、黑色素瘤、结直肠癌、结肠癌、乳腺癌及肾癌（表1）。采用TruSight™ FFPE QC Kit（因美纳，货号：20139070）测定FFPE DNA的质量（ΔCq）。每份FFPE样本取40 ng起始DNA，使用Illumina 5-Base DNA Prep（因美纳，货号：20140364）进行文库制备。选取3份FFPE样本，在标准实验方案基础上做小幅调整，分别制备25 ng、10 ng和1 ng的额外起始量样本（表2）。所有5-Base FFPE文库均在NovaSeq™ X Plus测序仪上测序，读长设置为2×151 bp，测序通量为5亿簇（10亿条双端read）。使用DRAGEN™ Somatic分析流程（v4.4.6）完成二级生信分析。

表1： 分析的FFPE肿瘤样本

FFPE样本	组织类型	品质（ΔCq）	DNA起始量
1	肺癌	1.00	40 ng、25 ng、10 ng、1 ng
2	肺癌	1.00	40 ng
3	肺癌	1.00	40 ng
4	黑色素瘤	1.21	40 ng
5	结直肠癌	1.50	40 ng
6	结肠癌	2.01	40 ng、25 ng、10 ng、1 ng
7	结肠癌	3.40	40 ng
8	乳腺癌	4.11	40 ng
9	黑色素瘤	4.11	40 ng、25 ng、10 ng、1 ng
10	肾癌	5.00	40 ng

肿瘤-正常体细胞变异分析

HCC1395乳腺癌细胞系（ATCC，货号：CRL-324）及其配对正常HCC1395BL细胞系（ATCC，货号：CRL-2325）经培养后，一部分制备为新鲜冷冻细胞沉淀，另一部分制成FFPE样本，之后再进行DNA提取。采用Illumina 5-Base DNA Prep构建文库：2个重复样本使用标准实验方案，另外2个重复样本不加因美纳甲基化转化酶，作为仅WGS对照组。所有文库于NovaSeq X Plus测序仪上测序，采用DRAGEN Somatic v4.5开展数据分析。在相同测序深度下，对比5-Base数据与WGS数据的肿瘤-正常样本变异检出结果。同时评估更高测序覆盖深度下5-Base数据的肿瘤-正常样本变异检出表现。

结果

适用于不同质量FFPE DNA样本的高性能基因组与甲基化组测序

采用推荐40 ng起始量，使用不同质量水平的FFPE肿瘤DNA构建因美纳5-五碱基DNA文库，测序表现稳定，已定位读数占比高（图1A），且大部分样本测序覆盖度可达30×及以上（图1B）。质量较差样本（ΔCq ≥ 3）若要达到30×覆盖度，可能需要提升测序深度。文库插入片段大小中位数约为110-150 bp；质量越差的FFPE样本，插入片段越短（图1C）。

基于FFPE肿瘤样本构建的因美纳5-Base DNA文库可实现高准确性甲基化检测（图2）。人体正常组织的总体CpG*甲基化预期比例为70%-80%。与正常组织相比，肿瘤样本表现为全基因组低甲基化特征，因此本研究观测到约50%-70%的甲基化比例符合预期（图2A）。CHG与CHH*位点甲基化水平较低（<2%），该结果与理论预期一致（图2A）。向FFPE样本中加入基因组DNA甲基化对照（GDMC），其Lambda与pUC19的已分类read结果显示：全部样本均具备高真阳性率、低假阳性率（图2B）。

* CpG，即胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸；胞嘧啶甲基化还存在CHG、CHH等其他序列环境，其中H代表A、C或T。

表2：Illumina 5-Base DNA Prep用于低起始量FFPE样本的实验方案调整及反应条件

方案步骤		剪切 ^b	连接		标签序列PCR	PCR后产物的纯化
方案调整		GDMC添加体积 ^b	UMI3接头体积 ^c	RSB接头体积 ^c	PCR循环数 ^c	SPRI比率 ^d
FFPE DNA起始量	40 ng ^a	2.5 μL	5 μL	-	8	0.8倍
	25 ng	2.5 μL (1:10稀释GDMC) ^b	2 μL	3 μL	9	0.8倍
	10 ng		1 μL	4 μL	10	0.8倍
	1 ng		1 μL	17 μL ^c	12	0.8倍

a. 40 ng为Illumina 5-Base DNA Prep处理FFPE DNA的推荐起始量。

b. 片段化条件与反应体系体积已针对FFPE样本完成优化。对于起始量为40 ng的样本，加入2.5 μL原液基因组DNA甲基化对照（GDMC）；起始量小于40 ng的样本，则加入2.5 μL经重悬缓冲液（RSB）1:10稀释后的GDMC。对于FFPE DNA超低起始量（1 ng）样本，可进一步稀释GDMC，以降低对照DNA产生的read占比。省略“片段化DNA片段筛选制备”步骤；该步骤原本用于去除小片段，而FFPE样本需要保留这类小片段。使用RSB将样本调整至末端修复反应的最优体系体积。

c. 仅加入5 μL稀释后的UMI3接头。调整接头起始量与PCR循环数，避免产生接头二聚体，在不过度扩增的前提下获得充足文库产量。UMI，唯一分子标记；RSB，重悬缓冲液。

d. 调整比例，去除残留的接头二聚体。SPRI，固相可逆化固定。

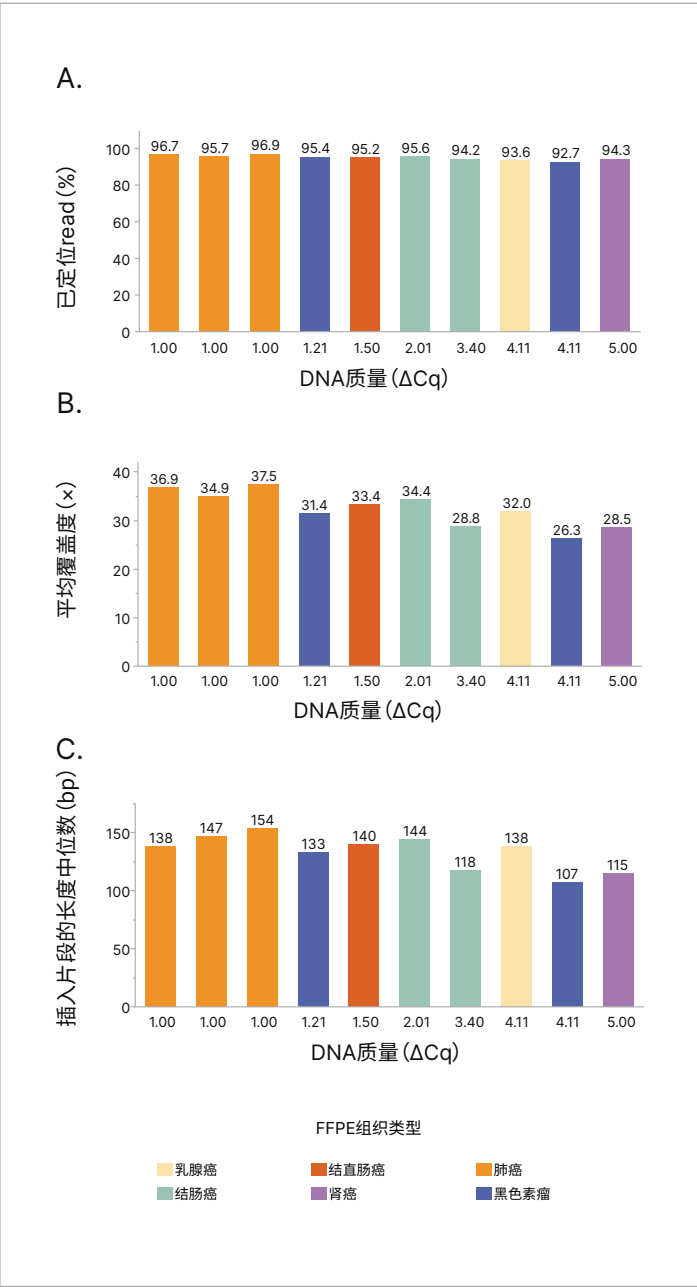


图1: Illumina 5-Base DNA Prep对不同质量FFPE DNA均可实现稳定测序性能

采用Illumina 5-Base DNA Prep对10例40 ng起始量的FFPE肿瘤样本(表1)进行文库制备, DRAGEN Somatic文库指标结果显示: (A) 不同组织类型、不同DNA质量(ΔCq)的样本均具备较高定位率。已定位read的统计计算不包含来源于基因组DNA甲基化对照(GDMC)的lambda与pUC19已分类read。(B) 在所检测的样本中, 平均覆盖度为26×–38×。质量较差的FFPE样本(ΔCq ≥ 3)若要达到30×覆盖度, 可能需要提升测序深度。文库插入片段大小中位数约为110–150 bp; 质量越差的FFPE样本, 插入片段越短。以2×151 bp读长对文库进行测序, 并将数据下采样至5亿测序簇。

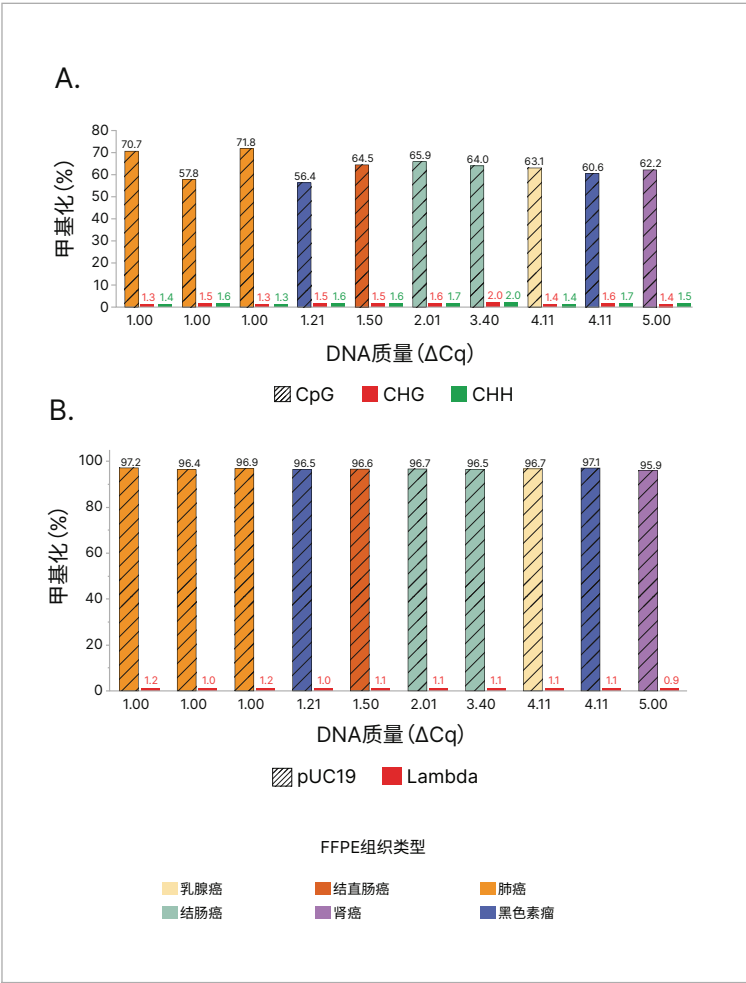


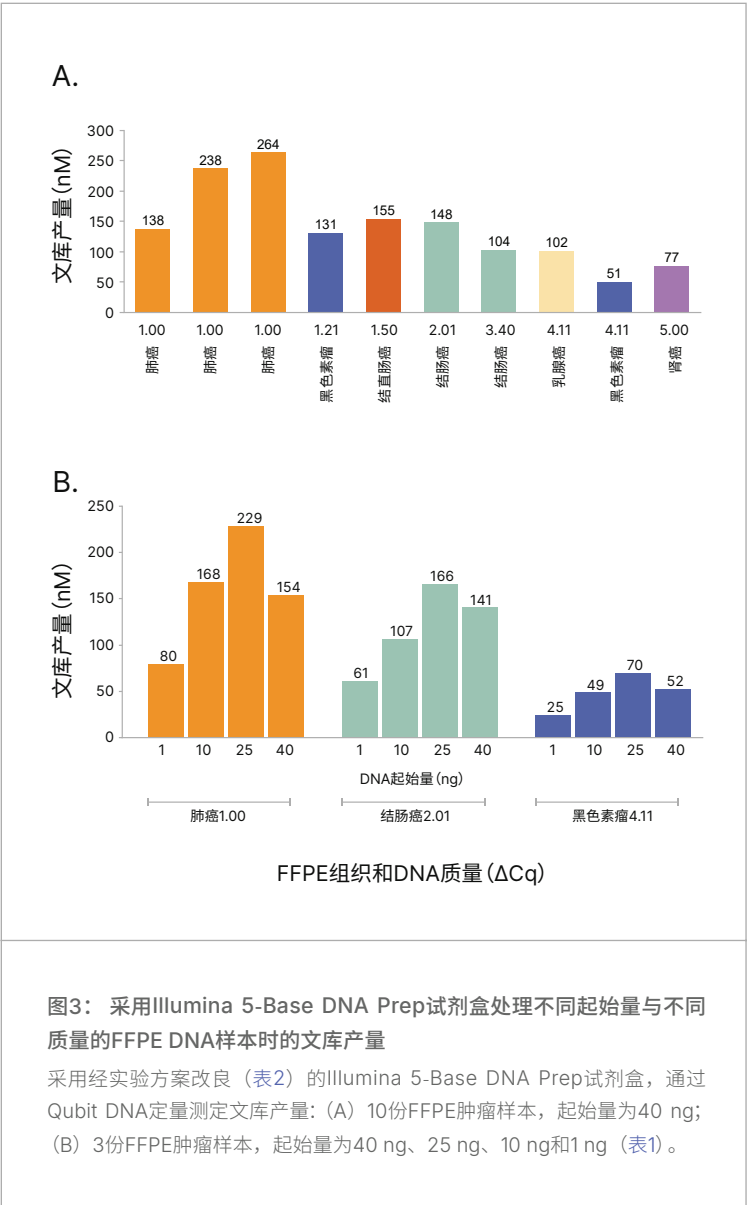
图2: Illumina 5-Base DNA Prep对不同质量FFPE DNA均可实现稳定甲基化检测

采用Illumina 5-Base DNA Prep对10例40 ng起始量的FFPE肿瘤样本(表1)进行文库制备, 甲基化相关指标显示: (A) CpG、CHG、CHH序列环境下胞嘧啶甲基化比例均处于预期范围。(B) 不同样本中, 来源于基因组DNA甲基化对照(GDMC)的Lambda、pUC19分类read均表现为高真阳性率、低假阳性率。

低起始量FFPE DNA的可靠基因组与甲基化组测序

对于可用于分析的FFPE样本材料有限的用户，DNA起始量要求会成为实验限制因素。只需对检测方案进行简单调整，包括UMI3接头稀释、基因组DNA甲基化对照（GDMC）稀释以及PCR循环数优化，即可开展低起始量样本检测（表2）。采用上述调整后，Illumina 5-Base DNA Prep，在不同起始量以及不同样本质量条件下，均可产出满足测序要求的文库产量（≥4 nM）（图3）。

选取3份FFPE肿瘤样本进行低于40 ng的起始量测试（表1）；在25 ng与10 ng DNA起始量条件下，测序指标与甲基化检测结果均表现稳定可靠（图4、图5）。起始量为1 ng时，最终文库中lambda与pUC19基因组相较于FFPE DNA的占比升高，因此观察到定位百分率下降。省略GDMC甲基化对照可进一步改善该问题。起始量为1 ng时，预计还会出现覆盖度较低且重复率较高的情况（图4）。



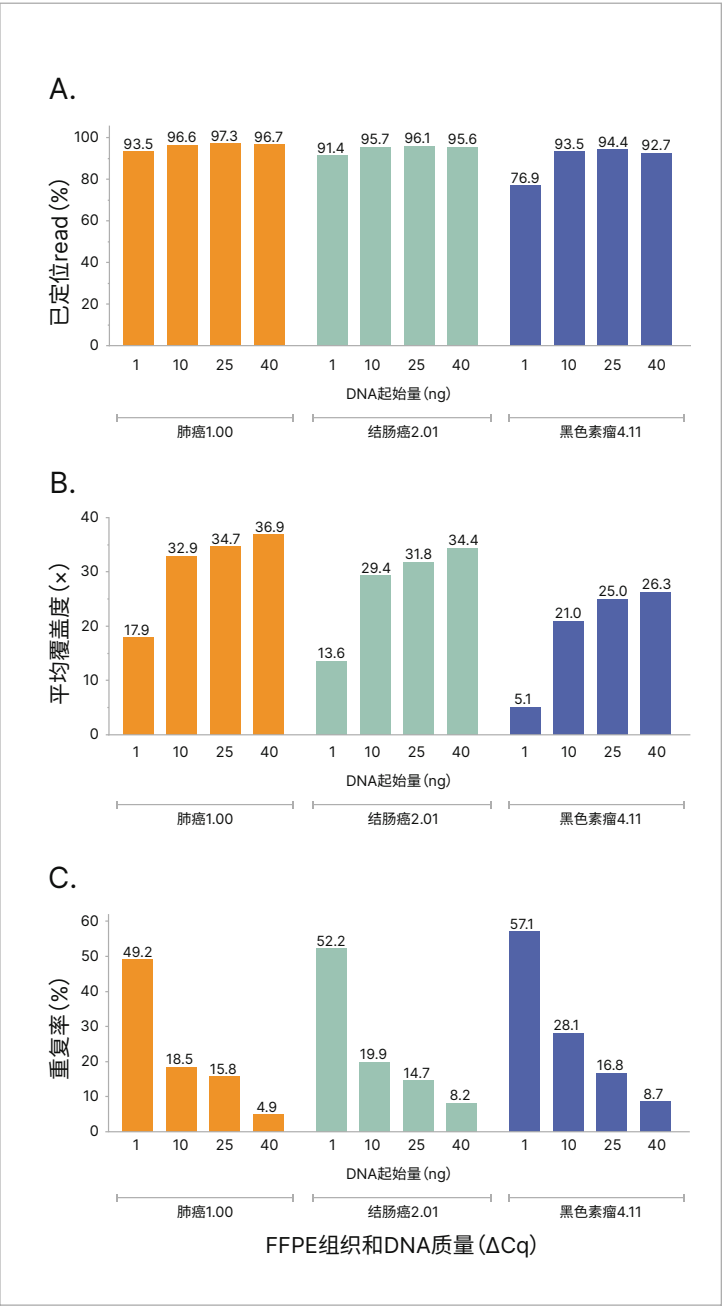


图4：Illumina 5-Base DNA Prep对不同起始量FFPE DNA均可实现稳定测序性能

采用经方案调整（表2）的Illumina 5-Base DNA Prep，对3份FFPE肿瘤样本分别以40 ng、25 ng、10 ng和1 ng的DNA起始量开展实验（表1），DRAGEN Somatic文库指标结果显示：（A）定位率较高；（B）平均覆盖度29×-37×；（C）起始量大于10 ng的高质量FFPE DNA，测序重复率低。质量较差的FFPE样本（ $\Delta Cq \geq 3$ ）以及更低起始量样本，若要达到30×覆盖度，可能需要提升测序深度。以2×151 bp读长对文库进行测序，并将数据下采样至5亿测序簇。

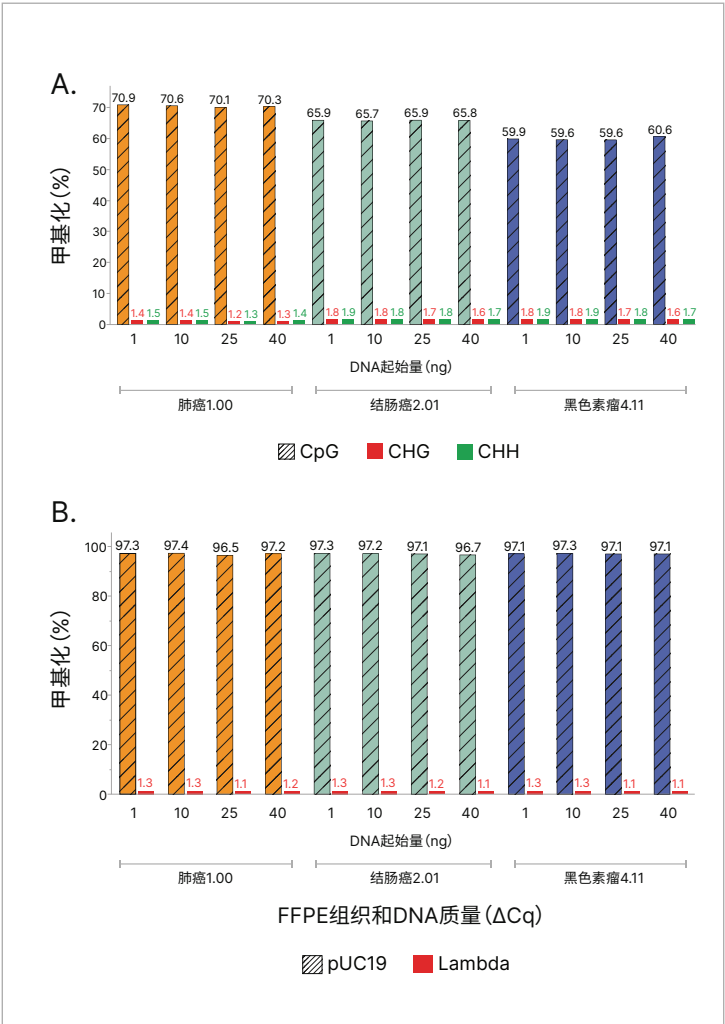


图5：Illumina 5-Base DNA Prep对不同起始量FFPE DNA均可实现稳定甲基化检测

采用经方案调整（表2）的Illumina 5-Base DNA Prep对3份FFPE肿瘤样本分别以40 ng、25 ng、10 ng和1 ng的投入量开展实验（表1），甲基化相关指标显示：（A）CpG、CHG、CHH序列环境中胞嘧啶的甲基化百分比在各起始量水平下均保持一致。（B）不同DNA起始量下，来源于基因组DNA甲基化对照（GDMC）的Lambda、pUC19分类read均表现为高真阳性率、低假阳性率。

FFPE样本的体细胞变异检测结果可与新鲜冷冻样本或WGS的结果相当

将配对肿瘤-正常细胞系分别制备为新鲜冷冻样本与FFPE样本，使用Illumina 5-Base DNA Prep制备文库，对单核苷酸变异（SNV）以及插入缺失变异（indel）均可实现高灵敏度的体细胞变异检出（图6）。在100×/40×覆盖度下，5-Base文库的SNV与插入缺失检测灵敏度和相同测序深度下未经过转化处理的WGS文库灵敏度差距约在2%以内。将测序深度提升至150×/50×覆盖度时，5-Base测序的检测灵敏度与WGS相当。福尔马林固定会造成DNA损伤，进而影响检测精确度；即便如此，5-Base测序在FFPE样本上的检测精确度仍大于90%（图6）。

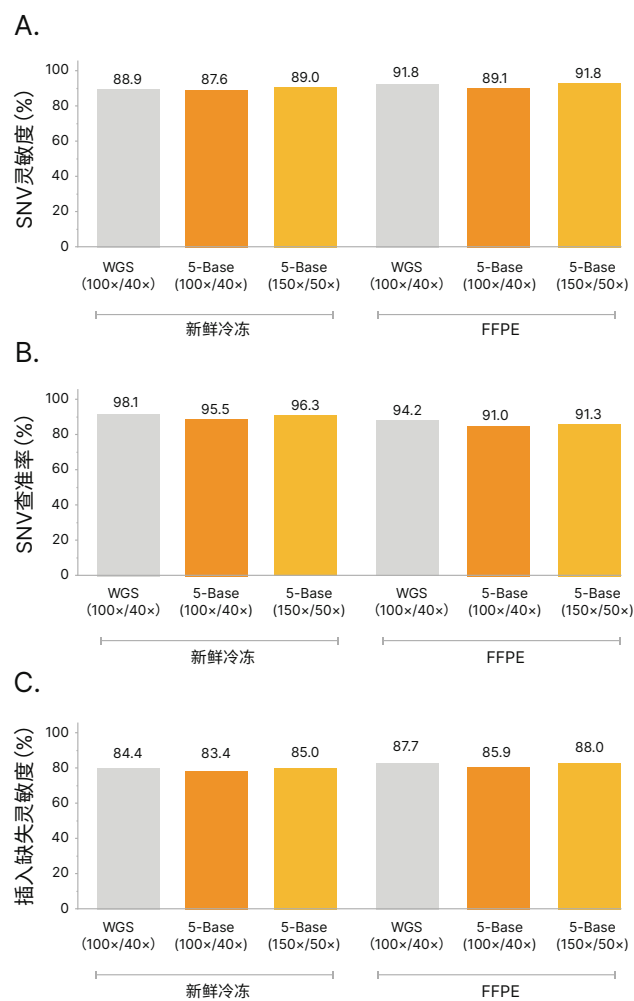


图6：使用Illumina 5-Base DNA Prep试剂盒对新鲜冷冻及经FFPE处理的细胞系进行肿瘤-正常体细胞变异检测

分别经新鲜冷冻或FFPE处理的HCC1395乳腺癌细胞系及其配对正常HCC1395BL细胞系的（A）单核苷酸变异（SNV）检出灵敏度、（B）单核苷酸变异（SNV）检出精确度，以及（C）插入缺失变异（indel）检出灵敏度。采用Illumina 5-Base DNA Prep构建文库：另外构建2个重复文库，不添加因美纳甲基化转化酶，作为仅WGS对照组。肿瘤样本数据分别下采样至100×覆盖度（橙色）、150×覆盖度（黄色）（对应24亿、40亿条双端read）；正常样本数据分别下采样至40×覆盖度（橙色）、50×覆盖度（黄色）（对应9.5亿、14亿条双端read）。本研究采用HCC1395的SEQC2 v1.2.2真值集。

总结

Illumina 5-Base DNA Prep将基因组与甲基化组测序整合为一套一体化工作流程，且可适配FFPE样本。温和的转化化学技术可保护DNA完整性，支持对不同质量的FFPE DNA开展双重分析。对于样本起始量有限的场景，仅需简单调整实验方案，即可获得稳定可靠的检测结果。使用Illumina 5-Base DNA Prep，癌症研究人员可利用珍贵的存档肿瘤组织，实现高准确性的体细胞变异检出与甲基化检测。

了解更多

[Illumina 5-Base DNA Prep](#)

[因美纳5-Base解决方案](#)

[基因组和甲基化组测序](#)

参考文献

1. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. [Epigenetics in cancer](#). *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36. doi:10.1093/carcin/bgp220
2. Illumina. Illumina 5-Base DNA Prep data sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689.pdf. Published 2025. Accessed June 18, 2026.

Illumina中国

上海办公室 • 电话 (021) 6032-1066 • 传真 (021) 6090-6279
北京办公室 • 电话 (010) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2026 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。
关于具体的商标信息，请访问 www.illumina.com.cn/company/legal.html。
M-GL-04497 v1.0



因美纳企业动态



因美纳市场助手



因美纳中国官方商城

illumina[®]