

illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Solução rápida e flexível para
detectar mutações de baixa
abundância no cfDNA

- Detecte variantes raras com frequências de alelos tão baixas quanto 0,2% de apenas 20 ng de cfDNA extraído do plasma
- Prepare bibliotecas prontas para sequenciamento a partir de painéis fornecidos pelo usuário em ~8,5–9,5 horas com 2,5–3 horas de tempo de manuseio
- Analise dados e identifique variantes com alta sensibilidade analítica usando a análise secundária do DRAGEN™

illumina®

Introdução

O DNA livre de células circulantes (cfDNA) no plasma surgiu como um biomarcador importante de doenças não invasivas em câncer, doenças cardiovasculares e transplantes de órgãos. Na pesquisa do câncer, a análise sequencial do cfDNA obtido de biópsias líquidas apresenta dados preciosos sobre a heterogeneidade do tumor, permite a identificação do perfil dos biomarcadores e desempenha um papel complementar ou alternativo às amostras de biópsia de tecido quando o tecido não está prontamente disponível. Como as amostras de plasma normalmente contêm baixas quantidades de cfDNA de células de interesse, é necessário um ensaio robusto e sensível para detectar variantes somáticas raras. Painéis de genes fixos permitem a identificação de variantes, mas são de utilidade limitada para estudar novos alvos e acomodar alterações em genes de interesse.

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é uma solução versátil de preparação de bibliotecas (Tabela 1) que aproveita o poder da tecnologia de sequenciamento de última geração (NGS) para obter detecção altamente sensível de variantes de baixa abundância em amostras de cfDNA. Este kit de alto desempenho faz parte de um fluxo de trabalho integrado de cfDNA para resultados que inclui a preparação de bibliotecas com painéis fornecidos pelo usuário, seguido por sequenciamento em sistemas de médio a alto rendimento da Illumina. A análise de dados é realizada usando o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment.

Fluxo de trabalho simplificado

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment faz parte de um fluxo de trabalho integrado de sequenciamento de cfDNA, oferecendo excelente desempenho e qualidade dos dados. O fluxo de trabalho escalável começa com o cfDNA extraído de sangue ou plasma, seguido pelo sequenciamento em sistemas de médio e alto rendimento da Illumina e a identificação de variantes altamente precisas usando o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment (Figura 1). Essa solução fácil de usar oferece alto desempenho em uma ampla variedade de tamanhos de conteúdo, é compatível com automação de manuseio de líquidos e acomoda multiplexação de amostras para dimensionamento eficiente.

Tabela 1: Visão geral do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Parâmetro	Especificação
Tipo de DNA	cfDNA de sangue ou plasma
Entrada de DNA ^a	10–30 ng
Multiplexação de amostra	192 índices duplos únicos
Marcação duplicada	Identificadores moleculares únicos (UMIs) não aleatórios
Plexação de enriquecimento	1-plex ou 4-plex
Sistemas de sequenciamento compatíveis	Sistemas NextSeq e NovaSeq
Tempo total do fluxo de trabalho ^b	~8,5–9,5 horas ^c
Tempo total de trabalho efetivo	~2,5–3 horas

a. Recomenda-se 20 ng de entrada de cfDNA.
b. Inclui etapas de preparação, enriquecimento e normalização da biblioteca.
c. Tempos de fluxo de trabalho para sondas de fita simples e dupla, respectivamente.

Preparação rápida e flexível da biblioteca

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é um ensaio baseado em ligação que usa uma única etapa de hibridização para preparação rápida da biblioteca (Figura 2). O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é compatível com oligonucleotídeos de enriquecimento da Illumina ou de fornecedores terceirizados, fornecidos pelo usuário, incluindo DNA de fita simples (ssDNA) da Integrated DNA Technologies (IDT) e DNA de fita dupla (dsDNA) da Twist Bioscience, para maior portabilidade do conteúdo. O kit acomoda um conteúdo de painel pequeno (ssDNA de 55 a 200 kb ou 70 a 200 kb de dsDNA), médio (> 200 a 750 kb de ssDNA) e grande (> 750 a 2.000 kb de ssDNA), permitindo padrões de estudo flexíveis. As bibliotecas prontas para sequenciamento são preparadas em ~8,5–9,5 horas, com apenas ~2,5–3 horas de tempo prático, permitindo que os pesquisadores passem do cfDNA extraído para o sequenciamento em um único dia. Para máxima eficiência e flexibilidade, o kit é compatível com cfDNA extraído diretamente de sangue periférico ou plasma usando métodos de purificação baseados em coluna ou beads comercialmente disponíveis.

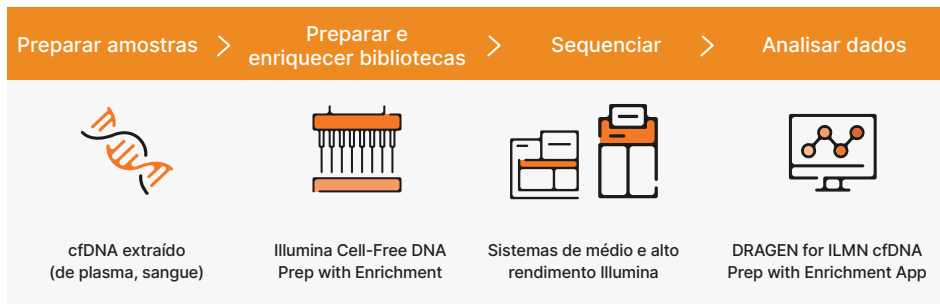


Figura 1: cfDNA para resultados de um único parceiro — Illumina é compatível com um fluxo de trabalho simplificado para sequenciamento de cfDNA, desde a preparação da biblioteca até a análise de dados. O cfDNA extraído é inserido na preparação da biblioteca usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. As bibliotecas são sequenciadas de acordo com as necessidades de escala e produtividade em um sistema de sequenciamento Illumina. Análise secundária rápida e precisa e identificação de variantes são realizadas com o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment.

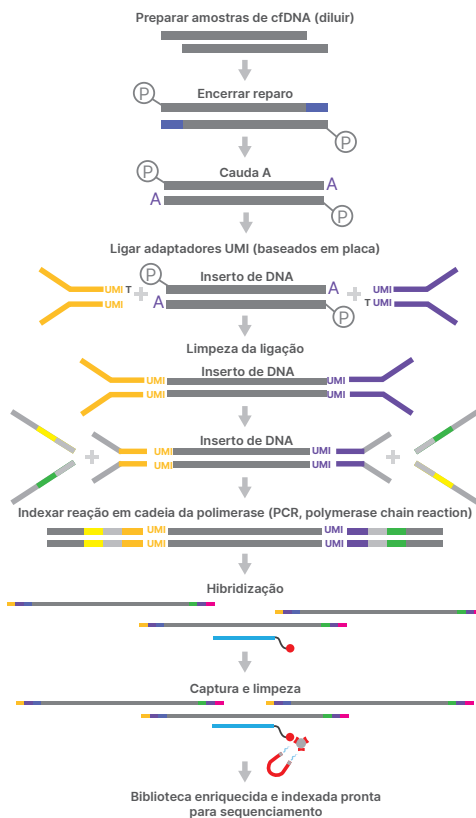


Figura 2: Química do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment — Primeiro, fragmentos de cfDNA são reparados e ligados a identificadores moleculares únicos (UMIs) não aleatórios. Índices duplos únicos são incorporados para multiplexação durante a amplificação de PCR. Em seguida, as bibliotecas são enriquecidas para regiões-alvo de interesse com sondas biotiniladas usando uma única etapa de hibridização. As bibliotecas enriquecidas são amplificadas e normalizadas para sequenciamento em sistemas de sequenciamento de médio ou alto rendimento da Illumina.

Para demonstrar a compatibilidade do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment com uma variedade de tamanhos e formatos de painel de enriquecimento, as bibliotecas foram preparadas a partir de 20 ng de cfDNA com painéis de enriquecimento pequenos (55 kb, ssDNA), médios (250 kb) ou grandes (2000 kb) (Tabela 2). As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no NextSeq™ 550 System (painel pequeno a 10M de leituras tipo paired-end por amostra) ou no NovaSeq™ 6000 System (painéis médios e grandes a 46M e 450M de leituras tipo paired-end por amostra, respectivamente). Os dados foram analisados com o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace™ Sequence Hub. Os resultados demonstram que o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment fornece > 1.500× de profundidade de cobertura colapsada por UMI e alta uniformidade de cobertura, avaliadas pela porcentagem de alvos com > 1.000× de cobertura, em painéis de enriquecimento com tamanhos e formatos variados (Figura 3).

Tabela 2: Parâmetros usados para padrões do painel de enriquecimento

Painel	Tamanho	Formato da sonda	Tipos de variante
Pequeno ^a	55 kb	80 bp de ssDNA	SNVs, indels
Médio-A ^b	250 kb	120 bp de dsDNA	SNVs, indels, fusões
Médio-B ^c	300 kb	80 bp de ssDNA	SNVs, indels, fusões, CNVs
Grande	2.000 kb	80 bp de ssDNA	SNVs, indels, fusões, CNVs

- As sondas foram dispostas lado a lado com sobreposição de 20 bp nas regiões de codificação para genes de interesse.
- As sondas foram dispostas de ponta a ponta nas regiões de codificação para genes de interesse. Os pontos de ruptura da fusão foram dispostos com sondas sobrepostas em 2×.
- As sondas foram dispostas lado a lado com sobreposição de 20 bp nas regiões de codificação dos genes de interesse e nos pontos de ruptura de fusão. Para a detecção de genes com pequenas regiões CDS (por exemplo, MYC), as sondas foram suplementadas em baixa densidade entre os introns.
- Design personalizado com otimização de laboratório úmido. SNV, variante de nucleotídeo único; indel, inserção-exclusão; CNV, variante do número de cópias.

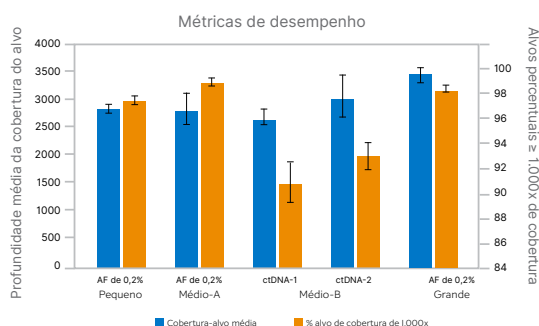


Figura 3: Compatibilidade com uma variedade de tamanhos de painel — Quatro réplicas de bibliotecas foram preparadas a partir de 20 ng de cfDNA usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment e sequenciadas no NextSeq 550 System (para painel pequeno) ou no NovaSeq 6000 System (para painéis médios e grandes) a uma profundidade média de leitura de 10M, 46M ou 450M de leituras tipo paired-end para painéis pequenos, médios e grandes, respectivamente. Os dados foram analisados com o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace Sequence Hub. Painéis pequenos e médios foram sequenciados a ~30.000× e o painel grande foi sequenciado a ~35.000× de cobertura no alvo.

Detecção de variante sensível de baixa frequência

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment apresenta melhorias na química de preparação de bibliotecas para melhorar a eficiência de conversão de bibliotecas e detectar variantes de baixa abundância com frequências de alelos variantes (VAF) tão baixas quanto 0,2%. Para demonstrar os resultados de alta qualidade obtidos usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, os cientistas da Illumina realizaram estudos avaliando a capacidade de identificar variantes de nucleotídeo único (SNVs), variações de número de cópias (CNVs) e fusões de genes (Figura 4, Figura 5). As bibliotecas preparadas usando o Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment foram sequenciadas no NextSeq 550 System (leituras tipo paired-end de 10M por amostra) ou no NovaSeq 6000 System em alta profundidade (leituras tipo paired-end de 46M e 450M por amostra para painéis médios e grandes, respectivamente). A identificação de variantes foi realizada usando o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace Sequence Hub. Os resultados demonstram a capacidade de detectar mutações em VAF a 0,2% a partir de apenas 20 ng de cfDNA para variantes pequenas, com mais de 90% de sensibilidade analítica (Tabela 3) e 99,98% de especificidade analítica.

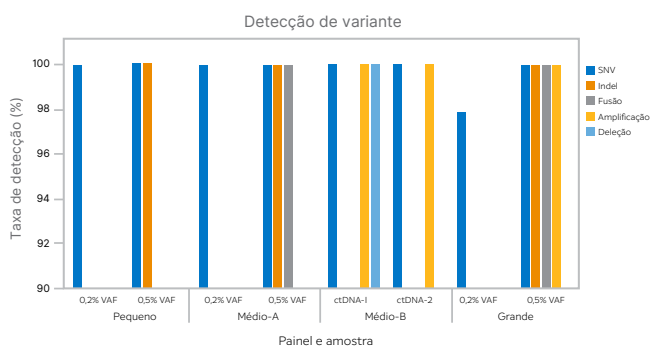


Figura 4: Detecção de variantes em baixa frequência de alelos variantes (VAF) — As bibliotecas Illumina Cell Free DNA Prep with Enrichment foram preparadas usando 20 ng de cfDNA de amostras de sangue total fortificadas com SNVs em frequência de alelos variantes (VAF) de 0,2% ou usando 20 ng de cfDNA de Seraseq ctDNA Mistura completa de mutação AF-0,5% (SeraCare, Catálogo nº 0710-0531). As bibliotecas preparadas foram sequenciadas na plataforma NextSeq 550 System (painel pequeno de ssDNA de 55 kb) ou NovaSeq 6000 (painéis médios e grandes de 2.000 kb) a uma profundidade média de leitura de 10M, 46M ou 450M de leituras tipo paired-end para painéis pequenos, médios e grandes, respectivamente. A identificação de variantes foi realizada usando o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace Sequence Hub. Painéis pequenos e médios foram sequenciados a ~30.000× e o painel grande a ~35.000× de cobertura no alvo.

Tabela 3: A detecção de variantes de baixa abundância com alta precisão

Tipo de variante	Sensibilidade analítica ^a
Pequenas variantes (0,2% VAF)	≥ 90%
Indels (0,5% VAF)	≥ 90%
Amplificações de genes (alteração de 1,3 vez)	≥ 95%
Deleções de genes (alteração de 0,6 vez)	≥ 95%
Rearranjos de genes (0,5% VAF)	≥ 95%

a. A sensibilidade analítica é definida como detecção percentual no nível de variante declarado.

Do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é compatível com a multiplexação de amostras e foi comprovada como uma técnica que oferece resultados precisos a SNV, inserção-deleção (indel), CNV e reidentificação de fusão gênica para bibliotecas enriquecidas de 1 e 4 plex (Figura 5, Figura 6).

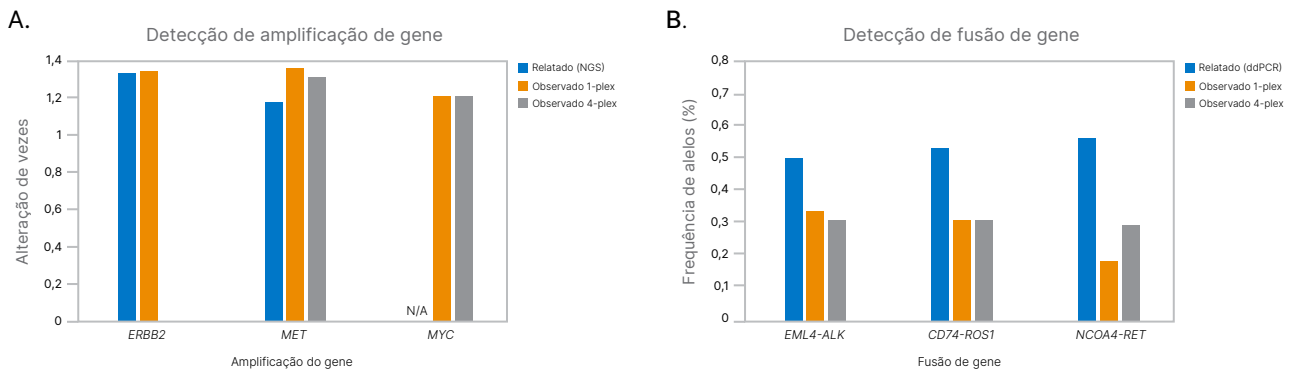


Figura 5: Detecção de amplificações e fusões de genes de baixa abundância — O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment demonstra excelente desempenho para detectar (A) amplificações de genes e (B) fusões de genes usando bibliotecas enriquecidas de 1 e 4 plex com conteúdo personalizado. As bibliotecas foram preparadas a partir de 20 ng de cfDNA da mistura de mutação completa de Seraseq ctDNA AF-0,5% (SeraCare, Catálogo nº 0710-0531). Quatro bibliotecas foram individualmente enriquecidas com um painel de tamanho de 2000 kb de 80 bp de ssDNA (1-plex) e as mesmas quatro bibliotecas foram enriquecidas novamente com o mesmo painel após o formato multiplex (4-plex). As bibliotecas foram sequenciadas no NovaSeq 6000 System a uma profundidade média de leitura de 400M de leituras tipo paired-end ($\geq 35.000\times$ de cobertura no alvo). Os dados foram analisados com o aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace Sequence Hub. As três amplificações e fusões de genes na amostra de referência foram detectadas em todas as réplicas de bibliotecas enriquecidas de 1-plex e 4-plex na alteração de vezes e frequência de alelos indicadas. Discrepâncias no VAF para fusões são atribuídas a diferenças entre métodos de teste. Observação: O SeraCare não verifica a amplificação do gene *MYC* por métodos NGS.

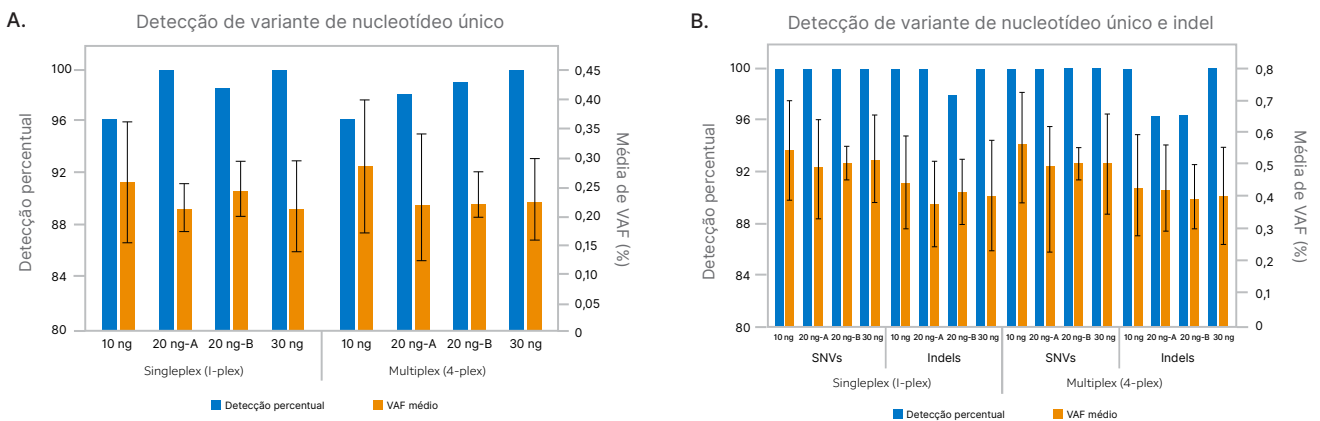


Figura 6: Detecção de variantes sensíveis com bibliotecas enriquecidas de 1-plex e 4-plex — Bibliotecas do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment foram preparadas a partir de amostras de cfDNA (10 ng, 20 ng ou 30 ng) fortificadas com SNVs a (A) 0,2% VAF ou (B) 0,5% VAF usando cfDNA de Seraseq ctDNA Mistura completa de mutação AF-0,5% (SeraCare, Catálogo nº 0710-0531). Quatro bibliotecas foram individualmente enriquecidas com um painel de 180 kb de 80 bp ssDNA (10 ng, 20 ng-A e 30 ng) ou painel de 180 kb de 80 bp-dsDNA (20 ng-B) para o formato singleplex (1-plex). As mesmas quatro bibliotecas foram enriquecidas novamente com o mesmo painel para o formato multiplex (4-plex). As bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 550 System a uma profundidade média de leitura de 33M de leituras tipo paired-end ($\geq 30.000\times$ de cobertura no alvo). O aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace Sequence Hub foi usado para analisar dados e identificar variantes.

Desempenho otimizado em todos os sistemas de sequenciamento Illumina

Para demonstrar o excelente desempenho do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment em sistemas de alto e médio rendimento da Illumina, as bibliotecas foram preparadas a partir de 20 ng de cfDNA de entrada a 0,5% VAF do Seraseq ctDNA Mistura completa de mutação AF-0,5% (SeraCare, Catálogo nº 0710-0531) enriquecido com um painel de 250 kb de 120 bp de dsDNA e sequenciado no NextSeq 550 System, NextSeq 2000 System ou NovaSeq 6000 System a uma profundidade média de leitura de 92M de leituras por amostra a ~30.000× de cobertura no alvo. A solução robusta e direta Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment produz resultados confiáveis em todos os sistemas de sequenciamento da Illumina, fornecendo > 1.500× de profundidade de cobertura colapsada por UMI e alta uniformidade de cobertura, conforme avaliado pela porcentagem de alvos com > 1.000× de cobertura (Figura 7).

Análise integrada de dados

O aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment usa algoritmos de bioinformática acelerados e totalmente integrados para garantir o desempenho ideal do ensaio. O software realiza correção de erros baseada em UMI,

alinhamento de sequências e identificação de variantes somáticas de pequenas variantes, CNVs e fusões de genes. O aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment é executado localmente em um Illumina DRAGEN Server v4.0.3 de fase 4 ou integrado ao NovaSeq 6000Dx System (no modo de pesquisa). O pipeline de análise também pode ser executado como um aplicativo em nuvem no BaseSpace Sequence Hub ou acessado por meio do Illumina Connected Analytics (ICA), uma plataforma genômica segura e baseada em nuvem para expandir a análise secundária sem a necessidade de adquirir e manter mais infraestrutura local.

O pipeline de análise integrado oferece aos usuários a flexibilidade de analisar seus dados com base nos painéis usados para o enriquecimento do alvo, com opções para alinhar seus dados de sequenciamento ao hg19 ou hg38, e realizar análises específicas e personalizar fluxos de trabalho para atender aos objetivos de pesquisa. Arquivos de ruído fornecidos pelo usuário podem ser usados para filtrar ruídos específicos do local e melhorar a detecção de pequenas variantes. O software também permite que os usuários marquem variantes de hematopoese clonal, excluam regiões especificadas de pequenas identificações de variantes, realizem identificações precisas de CNV e detectem hotspots somáticos com alta sensibilidade analítica usando um arquivo de hotspot somático personalizado ou, alternativamente, usem as regiões de hotspots somáticos DRAGEN integradas. Os usuários que acessam o aplicativo baseado na nuvem DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment podem explorar ainda mais opções para otimizar sua análise modificando limites para colapso de UMI e identificações de pequenas variantes.

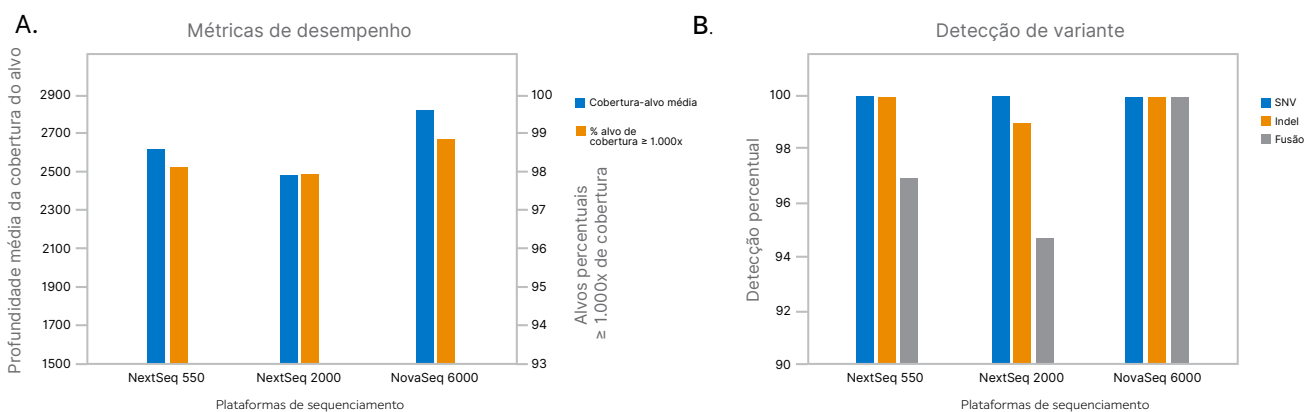


Figura 7: Compatibilidade com sistemas de médio e alto rendimento da Illumina — As bibliotecas Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment foram preparadas a partir de 20 ng de cfDNA com VAF conhecido de 0,5% e enriquecidas com um painel de dsDNA de 250 kb de 120 bp. As bibliotecas foram sequenciadas nos sistemas NextSeq 550, NextSeq 2000, ou NovaSeq 6000 a uma profundidade média de leitura de 46M de leituras tipo paired-end e ≥ 30.000× de cobertura no alvo. Oito bibliotecas agrupadas para a execução do NextSeq 550 System, 25 bibliotecas para a corrida do NextSeq 2000 System e 51 bibliotecas em uma cavidade da lâmina de fluxo S4 para a corrida do NovaSeq 6000 System. O aplicativo DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment no BaseSpace Sequence Hub foi usado para analisar dados e identificar variantes.

Fluxo de trabalho habilitado para automação

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é compatível com sistemas de manuseio de líquidos para automatizar a preparação de bibliotecas, permitindo que os laboratórios se ajustem às necessidades de produtividade variável. Com um fluxo de trabalho automatizado, os laboratórios podem alcançar um manuseio de amostras altamente reproduzível, manter resultados consistentes e impulsionar a eficiência. A automação também permite o dimensionamento rápido da produtividade sem a necessidade de tempo de manuseio adicional. Ganhos adicionais de eficiência podem ser obtidos adotando métodos qualificados da Illumina, disponíveis em nossos parceiros de automação* e revisados pela Illumina para garantir o desempenho do método e a qualidade dos dados.

Resumo

O Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment é uma solução versátil de preparação de bibliotecas otimizada para uso com cfDNA de baixa entrada extraído de amostras de plasma. A solução, que é fácil de utilizar, é compatível com uma variedade de tamanhos de painel, tanto com painéis de enriquecimento Illumina quanto com painéis de terceiros, proporcionando uma flexibilidade total no conteúdo. Com a solução Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, os pesquisadores podem detectar variação somática de baixa frequência com sensibilidade analítica excepcional. A solução Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment de alto desempenho, combinada com sequenciamento em poderosos sistemas de sequenciamento Illumina e análise acelerada de dados, oferece um fluxo de trabalho de sequenciamento de cfDNA de alta qualidade, abrangendo do processamento de amostras à análise de dados, de um único parceiro confiável.

* Métodos qualificados da Illumina disponíveis no final de 2024.



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

© 2024 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-02096 PTB v1.0

Saiba mais

[Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

Informações para pedido

Produto	N.º do catálogo
Illumina Cell-Free DNA Prep, Ligation (16 samples)	20104105
Illumina Cell-Free DNA Prep, Ligation (96 samples)	20104106
Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (16 samples)	20104107
Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex)	20104103
Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex) On-premises	20104104
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
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