

종양 단독 WES 연구 워크플로우를 지원하는 Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

매칭되는 정상 샘플 없이 변이 검출 결과와
유전체 바이오마커 확인

인리치드 엑솜 시퀀싱(Enriched exome sequencing) 수행

FFPE 종양 단독 샘플에서 코딩 변이 및
유전자 복제수 변이 확인

저빈도 변이 검출

40 ng을 사용하여 일관적으로
SNV, Indel 및 CNV 식별

유전체 바이오마커 연구

TruSight™ Oncology 500과
일치하는 결과를 기반으로 TMB, MSI
및 HRD 측정

소개

유전체 프로파일링(Genomic profiling)은 다양한 종류의 종양에서 질병과 연관성이 있는 유전체 변이의 특성을 파악하기 위한 핵심적인 종양학 연구 도구로 자리 잡았습니다.¹ 전장 엑솜 시퀀싱(Whole-exome sequencing, WES)은 코딩 영역(coding region)을 광범위하게 확인할 수 있어, 한 번의 assay로 단일 염기서열 변이(single nucleotide variant, SNV), 삽입/결실(insertion/deletion, Indel), 유전자 복제수 변이(copy number variation, CNV), 종양 변이 부담(tumor mutational burden, TMB), 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI) 그리고 상동 재조합 결핍(homologous recombination deficiency, HRD)의 분석을 지원합니다.²⁻⁴ 또한 라이브러리 준비(Library preparation) 및 인리치먼트(enrichment) 방법의 발전으로 인해 적은 양의 DNA로도 WES 연구가 가능해져, 분석이 까다로운 샘플, 그중에서도 포르말린 고정, 파라핀 포매(formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) 조직과 같이 포르말린 고정 시 DNA의 무결성(integrity)과 수율(yield)을 저하시킬 수 있는 가교 결합(crosslinking) 및 절편화(fragmentation)가 발생하는 샘플이 사용되는 엑솜 시퀀싱의 적용 범위가 확대되었습니다.⁵

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment는 적은 양의 FFPE DNA를 사용하여 WES 연구를 진행할 수 있게 해 줍니다.⁶ 이 assay는 라이브러리 준비, 엑솜 인리치먼트, 시퀀싱 및 2차 분석 단계를 하나의 워크플로우에 통합합니다. 인리치먼트는 엑솜 전체에 걸쳐 코딩 영역을 타겟으로 하므로 코딩 변이 및 유전체 바이오마커(biomarker)에 대한 종합적인 연구가 가능해집니다.

이 assay는 종양-정상(tumor-normal) 샘플의 분석을 목적으로 개발되었으나, 항상 매칭된 정상 샘플을 확보할 수 있는 것은 아닙니다. 예를 들어 보관된 물질(archival material)에는 보통 종양 조직만 포함되어 있습니다. 이러한 어려움은 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)과 같이 일반적으로 환자가 이미 암이 상당히 진행된 상태에서 진단이 이루어지고 소조직 생검을 통해서만 조직이 채취되는 암에서 더 두드러집니다.⁷ 이 경우 채취한 물질은 양이 제한적이므로 진단 평가에 우선적으로 사용되며, 인접한 정상 조직은 보통 연구 목적으로 채취되거나 보관되지 않습니다.

이 Technical Note는 Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용해 진행한 종양 단독(tumor-only) WES의 성능 데이터를 제공합니다. 이 실험은 변이 검출 성능, CNV 분석, 그리고 TMB, MSI, HRD 등 유전체 바이오마커의 평가로 구성되었습니다. 추가적으로 이렇게 얻은 결과를 표적 종양학 연구 유전자 패널 assay인 TruSight Oncology 500과 비교하여 종양 단독 샘플의 바이오마커 추정치와 얼마나 일치하는지 확인했습니다.

방법

샘플 준비

여러 종류의 조직을 대표하는 인간의 FFPE 종양 조직 샘플을 상업적으로 구했습니다. 여기에 포함된 조직의 종류로는 방광(Amsbio), 결장(BioOptions, DLS, Cutting Edge Biomed), 간(Amsbio), 폐(BioOptions), 난소(Avaden BioSciences), 위(Tissue Solutions), 갑상선(BioOptions), 자궁(BioOptions)이 있습니다(표 1).

유전체 DNA(Genomic DNA, gDNA)는 QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호: 80234)를 사용해 FFPE 샘플에서 추출했습니다.

FFPE DNA 품질은 Illumina TruSight FFPE QC Kit(Illumina, 카탈로그 번호: 20139070)를 사용해 평가하였는데, 샘플들의 델타 QC(Δ QC) 값 범위는 -0.8(높은 품질의 FFPE DNA)에서 4.6(낮은 품질의 FFPE DNA)인 것으로 측정되었습니다. 또한 작은 DNA 변이 검출, CNV 분석, 그리고 TMB 및 HRD의 평가에는 상업용으로 제공되는 참조 물질(reference material)을 사용하였습니다(표 1).

Sereseq 참조 물질로는 Tumor Mutation DNA Mix v2 AF10 HC(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-0094), Solid Tumor CNV Mix, +3 copies(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-2866), gDNA TMB Mix Score 7(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-1326), gDNA TMB Mix Score 13(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-1586), FFPE TMB Reference Material Score 9(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-1308), HRD gDNA High-Positive Mix(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-2879), HRD gDNA Low-Positive Mix(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-2880), HRD gDNA Negative Mix(SeraCare, 카탈로그 번호: 0710-2881)가 사용되었습니다.

라이브러리 준비 및 시퀀싱

라이브러리는 샘플당 40 ng의 FFPE DNA를 사용하여 Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment 프로토콜에 따라 준비했습니다. 라이브러리 준비 단계는 DNA 처리, 고유한 분자 식별자(unique molecular identifier)를 활용하는 어댑터 라이게이션(adapter ligation), Exome 2.5 패널을 이용하는 하이브리드 캡처(hybrid-capture) 인리치먼트, 그리고 인리치먼트 후 증폭(postenrichment amplification)으로 구성되었습니다. 이렇게 준비된 라이브러리는 시퀀싱을 위해 assay 권장 사항에 따라 정량화(quantification), 정규화(normalization) 및 풀링(pooling)을 거쳤습니다.

시퀀싱은 NovaSeq™ 6000 시퀀싱 시스템으로 2 × 151 bp 페어드 엔드 리드(paired-end read)를 적용하여 수행했습니다. 시퀀싱 런(run)은 종양 샘플당 최소 100M(million) 개의 싱글 엔드 리드(single-end read)를 목표로 설정했습니다.

표 1: Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용한 종양 단독 WES의 결과 확인에 포함된 샘플

연구용 샘플 종류	설명	샘플 수	품질(ΔCq)
FFPE 종양 조직 ^a	방광, 결장, 간, 폐, 난소, 위, 갑상선 및 자궁 조직 포함	24	-0.8~4.6
변이 참조 물질	Seraseq Tumor Mutation DNA Mix v2 AF10 HC	1	N/A
유전자 복제수 참조 물질	Seraseq Solid Tumor CNV Mix, +3 copies	1	N/A
gDNA TMB 참조 물질	Seraseq gDNA TMB Mix Score 7 Seraseq gDNA TMB Mix Score 13	2	N/A
FFPE TMB 참조 물질 ^a	Seraseq FFPE TMB RM Score 9	1	N/A
HRD 참조 물질	Seraseq HRD gDNA High-Positive Mix Seraseq HRD gDNA Low-Positive Mix Seraseq HRD gDNA Negative Mix	3	N/A

a. 추출 필요
FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded(포르말린 고정, 파라핀 포매), gDNA = genomic DNA(유전체 DNA), HRD = homologous recombination deficiency(상동 재조합 결핍), N/A = not applicable(해당 없음), TMB = tumor mutational burden(종양 변이 부담), WES = whole-exome sequencing(전장 엑솜 시퀀싱)

데이터 분석

베이스 콜링(Base calling)과 디멀티플렉싱(demultiplexing)을 포함하는 1차 분석은 Illumina 시퀀싱 시스템 소프트웨어로 실행했습니다. 2차 분석은 DRAGEN™ Somatic 파이프라인을 사용해 Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment 프로토콜에 따라 실행했습니다.

리드는 인간 참조 유전체(reference genome)에 정렬(alignment)했습니다. 평균 타겟 커버리지(target coverage), 명시된 커버리지 임계값(threshold)을 달성한 타겟의 비율을 포함하는 품질 관리 메트릭스(quality control metrics)는 DRAGEN Secondary Analysis를 통해 일반적으로 생성되는 데이터 메트릭스를 사용하여 평가했습니다.

변이 검출에 앞서 중복 리드 마킹(duplicate marking)을 진행했습니다. 변이(SNV, Indel), CNV, TMB, MSI 및 HRD 메트릭스는 DRAGEN Secondary Analysis를 통해 생성되었습니다.

TruSight Oncology 500과의 비교

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용해 진행한 FFPE 종양 단독 WES의 결과를 TruSight Oncology 500으로 확보한 결과와 비교했습니다.

FFPE 종양 DNA 샘플은 [TruSight Oncology 500 레퍼런스 가이드](#)에 따라 처리했습니다. 시퀀싱 데이터는 경우에 따라 TruSight Oncology 500을 위한 DRAGEN Secondary Analysis 또는 TruSight Oncology 500 Local App 소프트웨어로 분석했습니다.

두 assay의 데이터 일치성 분석에는 변이 검출과 TMB 및 MSI 추정치가 포함되었습니다.

결과

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment 사용 시 다양한 변이 클래스와 유전체 바이오마커에 대한 종양 단독 WES의 성능을 FFPE 종양 샘플과 참조 물질을 활용하여 평가했습니다.

저빈도 변이 검출 결과

변이 검출 성능은 다양한 대립유전자 빈도(variant allele frequency, VAF) 레벨의 변이를 포함하는 참조 물질을 사용하여 평가했습니다. Illumina FFPE DNA Prep with

Exome 2.5 Enrichment는 40 ng의 FFPE DNA를 사용하여 100M 개의 싱글 엔드 리드로 시퀀싱했을 때 VAF가 5%인 Indel 및 SNV를 약 90% 검출했습니다(그림 1). 민감도(Sensitivity)는 VAF가 10%일 때 100%에 달했습니다. 검출 성능은 변이 클래스 전반에 걸쳐 일관되게 나타났습니다.

종양 단독 WES는 동일한 샘플에서 TruSight Oncology 500 표적 패널 워크플로우를 사용했을 때는 검출되지 않았던 변이를 식별했습니다. 간 종양 FFPE 샘플에서 검출된 대표적인 변이는 표에 요약되어 있습니다(표 2).

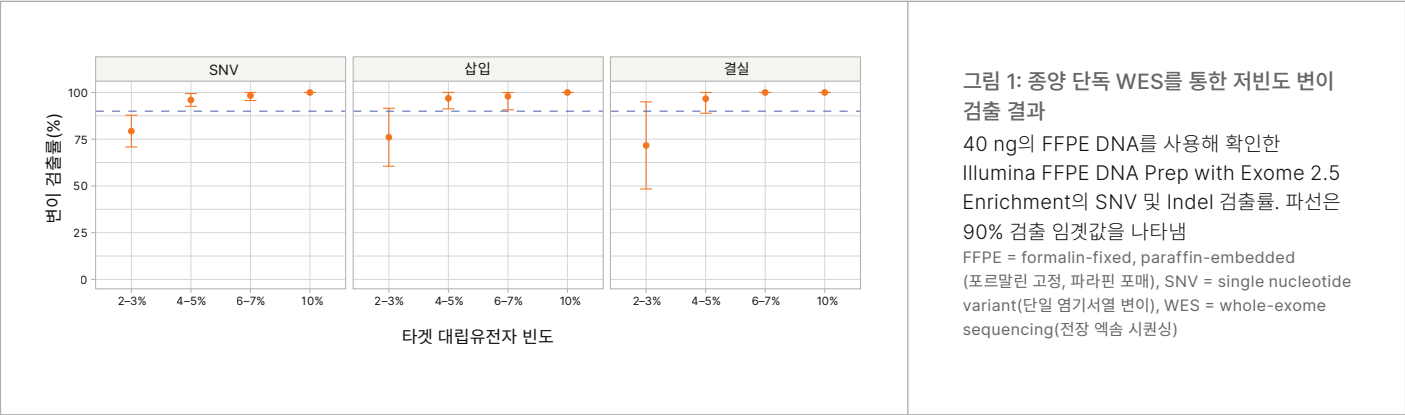


표 2: 간 종양 FFPE 샘플에서 종양 단독 WES로는 검출되었으나 TruSight Oncology 500으로는 검출되지 않은 변이

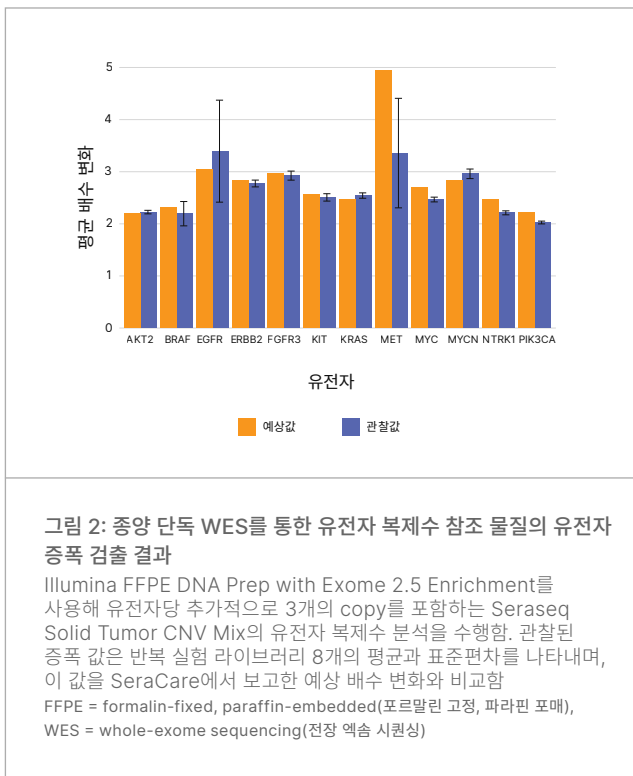
염색체	유전체 위치	유전자/유전자 ID	VAF(%)	COSMIC ID	COSMIC 보고 종양 부위	COSMIC 확인 체세포 변이
Chr12	11546742	PRB2	11.1	COSV66982301	대장(직장)	O
Chr9	66457027	ENSG00000288838	14.7	COSV63402916	대장; 간	O
Chr9	66457051	ENSG00000288838	13.9	COSV63402360	대장	O
Chr9	66457076	ENSG00000288838	14.2	COSV63403156	대장; 전립선	O
Chr9	66457259	ENSG00000288838	8.5	COSV63401697	대장	O
Chr9	136065941	N/A	23.4	COSV63004546	피부	O
Chr9	136065942	N/A	24.3	COSV63004548	피부	O

FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded(포르말린 고정, 파라핀 포매), VAF = variant allele frequency(대립유전자 빈도), WES = whole-exome sequencing(전장 엑솜 시퀀싱)

유전자 증폭 검출 결과

유전자 복제수 분석 성능은 유전자당 추가적으로 3개의 copy를 포함하는 대조 샘플을 사용하여 종양 단독 WES를 통해 평가했습니다. 그 결과, 평가한 12개의 유전자 모두에서 증폭이 검출되었습니다. 보고된 값은 유전자 복제수 참조 물질로 만든 반복 실험(replicate) 라이브러리 8개의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)입니다. 관찰된 배수 변화(fold change)는 제조사가 보고한 예상값과의 비교를 거쳤습니다(그림 2).

BRAF, *EGFR*, *MET* 등 몇몇 유전자에서는 높은 증폭 값이 관찰되었는데, 이는 부분적으로 중첩되는 영역이 있는 2개의 합성 제작물(synthetic construct)이 참조 물질에 포함되어 있기 때문입니다. 즉, 증폭 추정치의 증가는 이렇게 부분적인 중첩 영역에 걸쳐 발생한 유전자 복제수 이벤트에 기인했을 수 있습니다.



TMB 평가 결과

1 Mb(megabase, 메가베이스)의 gDNA당 TMB를 알려진 TMB 점수가 있는 gDNA 및 FFPE 참조 물질을 사용하여 평가했습니다. 관찰된 값은 명목(nominal) TMB 점수가 1 Mb당 변이 7개, 9개 및 13개로, 참조 물질의 예상 점수와 일치했습니다(표 3).

FFPE 샘플 23개의 종양 단독 WES를 통해 얻은 TMB 추정치는 TruSight Oncology 500으로 얻은 값과 높은 일치성을 보였습니다. 일치성 분석 결과, 평가한 샘플 전체에 걸친 결정 계수(coefficient of determination, R^2)는 0.999였습니다(그림 3).

표 3: Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용한 종양 단독 WES의 TMB 평가 결과

샘플	종양 단독 WES ^{a,b}	보고된 TMB 점수 ^c
TMB Mix Score 7	7.52 ± 0.21	7.16
TMB Mix Score 9	8.91 ± 0.43	6.07 ^d
TMB Mix Score 13	13.14 ± 0.16	12.57 ± 0.02 ^e

a. 비동의(Nonsynonymous) TMB 점수는 비동의 체세포 변이를 DRAGEN Secondary Analysis로 분석해 결정됨

b. TMB 점수는 SeraCare의 변이 기준과 일치하는 것으로 보고되었으며, TMB Mix Score 7 및 TMB Mix Score 13은 4회 반복 실험의 평균과 표준편차를, TMB Mix Score 9는 2회 반복 실험의 평균과 표준편차를 나타냄

c. SeraCare에서 보고한 값

d. TMB Mix Score 9로 지정되었으나, SeraCare는 TMB 점수를 6.07로 보고함⁸

e. 보고된 TMB Mix Score 13 점수는 3회 반복 실험의 평균 및 표준편차를 나타냄

FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded(포름알린 고정, 파라핀 포매),
TMB = tumor mutational burden(종양 변이 부담),
WES = whole-exome sequencing(전장 엑솜 시퀀싱)

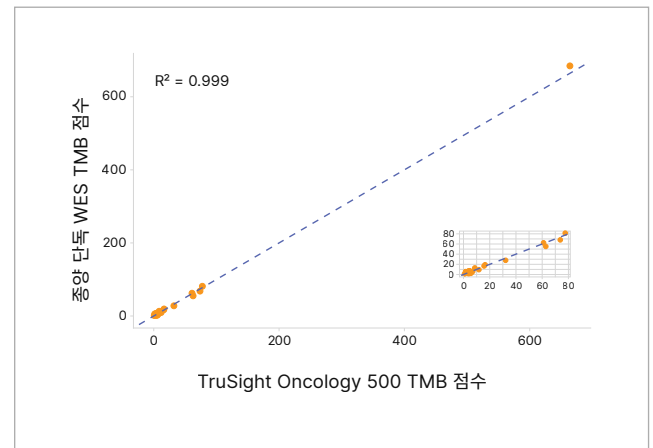


그림 3: 종양 단독 WES와 TruSight Oncology 500 간 일치하는 TMB 점수

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용해 얻은 TMB 점수는 TruSight Oncology 500을 사용해 얻은 TMB 점수와 높은 일치성을 보임. 우측 하단의 플롯은 TMB 점수가 80 TMB/Mb 이하인 구간을 나타냄

FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded(포름알린 고정, 파라핀 포매),
TMB = tumor mutational burden(종양 변이 부담),
WES = whole-exome sequencing(전장 엑솜 시퀀싱)

MSI 평가 결과

종양 단독 WES로 얻은 MSI 점수를 FFPE 샘플을 TruSight Oncology 500으로 분석해 얻은 점수와 비교했습니다. TruSight Oncology 500 워크플로우에서는 MSI 점수가 20보다 큰 경우 MSI-high로 분류됩니다. 두 방법의 MSI 점수는 Pearson 상관 계수(correlation coefficient)가 0.984로, 서로 높은 일치성을 보였습니다. 일부 샘플은 두 assay의 MSI 점수에 차이가 있었으나, 전반적인 샘플 오름차순 순위는 유지되었습니다(표 4).

표 4: Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용한 종양 단독 WES의 MSI 평가 결과^{a,b}

품질 (ΔCq)	FFPE 샘플 종류	종양 단독 WES	TruSight Oncology 500
-0.8	난소	0.29	3.2
1	결장	1.37	4.92
1.1	결장	38.96	55.65
1.4	갑상선	1.48	4.96
1.5	방광	1.34	4.84
1.6	자궁	0.25	2.42
1.8	결장	1.18	5.61
1.9	결장	56	68.03
2	폐	0.2	0.8
2.5	간	0.91	3.2
2.7	폐	0.73	4.07
2.7	갑상선	0.73	2.42
2.9	간	0.22	0.8
2.9	폐	0.18	2.5
3.1	자궁	12.39	14.05
3.4	폐	1.16	4.07
3.4	폐	0.39	2.54
3.9	폐	0.92	2.44
4	폐	0.22	4.8
4	폐	0.26	2.59
4.1	결장	30.68	39.52
4.1	위	0.25	1.64
4.6	결장	38.69	60
a. MSI JDsum 점수를 나타냄. TruSight Oncology 500은 MSI 점수가 20을 넘으면 MSI-high로 분류함 b. Pearson 상관 계수 = 0.984 MSI = microsatellite instability(현미부수체 불안정성), WES = whole-exome sequencing(전장 엑솜 시퀀싱)			

HRD 평가 결과

HRD 점수는 참조 물질의 종양 단독 WES를 통해 높은 양성(high-positive), 낮은 양성(low-positive) 또는 음성(negative) HRD 상태로 구분하여 평가한 후 Illumina TruSight Oncology 500 HRD와 추가적인 직교 검증 방법(orthogonal method)을 적용하여 얻은 제조사가 보고한 HRD 점수와 비교했습니다(표 5).⁹

 HRD 양성 샘플의 경우, 종양 단독 WES로 얻은 점수가 보고된 TruSight Oncology 500 HRD 점수보다 약간 높은 것으로 나타났으나, 이는 추가적인 직교 검증 방법을 통해 도출된 결과와 일치했습니다. HRD 음성 샘플의 경우, 모든 방법에 걸쳐 일관된 결과를 확인할 수 있었습니다.

표 5: Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment를 사용한 종양 단독 WES의 HRD 평가 결과

샘플	종양 단독 WES	직교 검증 방법	
		TruSight Oncology 500 HRD ^a	솔루션 A ^a
높은 양성 믹스	82.5 ± 3.5	72 ± 3	81
낮은 양성 믹스	77.5 ± 2.1	54 ± 2	77
음성 믹스	28.5 ± 2.1	31 ± 2	30
a. Illumina TruSight Oncology 500 HRD 및 솔루션 A로 얻은 HRD 점수는 Seraseq FFPE HRD Reference Material data sheet에 보고된 점수와 일치함 ⁹ FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded(포르말린 고정, 파라핀 포매), HRD = homologous recombination deficiency(상동 재조합 결핍), WES = whole-exome sequencing(전장 엑솜 시퀀싱)			

요약

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment의 종양 단독 WES 시 성능을 다양한 변이 클래스와 유전체 바이오마커를 대표하는 FFPE 종양 샘플과 참조 물질을 사용하여 평가했습니다. 이 assay는 알려진 변이가 있는 참조 물질을 사용했을 때 40 ng의 FFPE DNA에서 VAF가 5%인 Indel 및 SNV를 약 90% 검출했습니다. 유전자 증폭 검출은 평가한 모든 타겟에서 예상값과 일치하는 결과를 보였습니다. TMB, MSI 및 HRD 추정치 또한 예상값과 일치했으며, TruSight Oncology 500으로 얻은 결과와도 높은 일치성을 보였습니다. 이러한 결과는 FFPE 종양 샘플의 WES 수행 시 매칭된 정상 샘플이 없는 경우 Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment의 활용을 뒷받침합니다.

상세 정보

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

DRAGEN Secondary Analysis

참고 문헌

1. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. [Mutational landscape and significance across 12 major cancer types](#). *Nature*. 2013;502(7471):333-339. doi:10.1038/nature12634
2. Bartha Á, Györfy B. [Comprehensive outline of whole exome sequencing data analysis tools available in clinical oncology](#). *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):532. doi:10.3390/cancers11111725
3. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. [Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types](#). *Nat Genet*. 2019;51(2):202-206. doi:10.1038/s41588-018-0312-8
4. Kim SJ, Sota Y, Naoi Y, et al. [Determining homologous recombination deficiency scores with whole exome sequencing and their association with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer](#). *Transl Oncol*. 2021;14(2):100986. doi:10.1016/j.tranon.2020.100986
5. Spencer DH, Sehn JK, Abel HJ, et al. [Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens](#). *J Mol Diagn*. 2013;15(5):623-633. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.05.004
6. Illumina. Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment data sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-ffpe-dna-exome-enrich-data-sheet-m-gl-03347/illumina-ffpe-dna-exome-enrich-data-sheet-m-gl-03347.pdf. Published 2025. Accessed March 6, 2026.
7. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. [Updated molecular testing guideline for lung cancer patients](#). *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346. doi:10.5858/arpa.2017-0388-CP
8. SeraCare. Seraseq FFPE TMB RM Score 9 Revised Technical Product Report. seracare.com/globalassets/seracare-resources/tpr-0710-1308-seraseq-ffpe-tmb-rm-score-9-10705101.pdf. Published January 22, 2026. Accessed March 6, 2026.
9. SeraCare. Seraseq FFPE HRD Reference Material data sheet. seracare.com/globalassets/seracare-resources/ds-0710-2643-2645-seraseq-ffpe-hrd-rm.pdf. Published 2024. Accessed March 6, 2026.



무료 전화(한국) 080-234-5300
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. All rights reserved.
모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.
특정 상표 정보는 www.illumina.com/company/legal.html을 참조하십시오.
M-KR-00372 KOR