

Nachweis seltener somatischer Varianten in FFPE-Tumorproben mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

- Unique Molecular Identifiers für die Fehlerkorrektur ermöglichen eine genauere Sequenzierung
- Flexibles Versuchsdesign dank Eignung für vom Anwender bereitgestellte Anreicherungspanels
- Skalierbarer Workflow für DNA, die aus Liquid-Biopsy-Proben oder FFPE-Gewebeproben extrahiert wurde



Einleitung

FFPE-Gewebeprobe (formalinfixiert, in Paraffin eingebettet) sind eine wichtige Quelle von Material für die molekulare Charakterisierung von Tumorproben. Leider kann die Fixierung und die Einbettung von Gewebeprobe in Paraffin die Fragmentierung und Vernetzung von Nucleinsäuren sowie chemische Veränderungen bei diesen zur Folge haben.¹ Die daraus resultierende geringe bzw. wechselnde Nucleinsäurequalität erschwert die genetische Tumoranalyse, insbesondere in Hinblick auf den Nachweis seltener Mutationen. Zur Verarbeitung von Zugabematerialien aus FFPE-Proben für die nachgeschaltete Analyse sind daher robuste und sensitive NGS-Workflows (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) erforderlich.

Die Ergänzung von per Gewebebiopsie gewonnenen Genomanalyseergebnissen durch Liquid-Biopsy-Daten liefert umfassende Einblicke in die Tumorbiologie. Bei Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment handelt es sich um ein vielseitiges Bibliotheksvorbereitungskit zur Vorbereitung von für die Sequenzierung geeigneten Bibliotheken sowohl aus zirkulierender zellfreier DNA (cfDNA, cell-free DNA) als auch genomischer DNA (gDNA), die aus FFPE-Gewebeprobe extrahiert wurde (Abbildung 1). Der Workflow umfasst Unique Molecular Identifiers (UMIs) für die Fehlerkorrektur und die Reduzierung falsch positiver Ergebnisse, was einen genauen und sensitiven Nachweis von seltenen Mutationen in FFPE-Tumorproben ermöglicht. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ist kompatibel mit Anreicherungs sonden bzw. -panels von Illumina und Drittanbietern. Dies ermöglicht ein flexibles Versuchsdesign. Der vorliegende Anwendungshinweis demonstriert die herausragende Leistung von Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment bei der Generierung hochwertiger NGS-Bibliotheken und der Bestimmung von seltenen somatischen Varianten anhand von FFPE-Proben.

Methoden

Proben

Die Bibliotheken wurden anhand einer Kombination aus Humangewebe und Zelllinien (jeweils FFPE-Proben) vorbereitet (Tabelle 1). Die getesteten FFPE-Zelllinien stammten von Horizon Discovery (Katalog-Nr. HD301 und HD653) sowie SeraCare Life Sciences* (FFPE TST Custom DNAv2). Die FFPE-Humangewebeprobe wurden vom Illumina Biological Specimen Inventory System bereitgestellt. Die FFPE-DNA wurde mit dem AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 80234) extrahiert, mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q32850) quantifiziert und mit dem Infinium™ FFPE QC Kit (Illumina, Katalog-Nr. WG-321-1001) qualifiziert.

DNA-Fragmentierung

Die DNA-Fragmentierung erfolgte anhand von mechanischer Scherung. DNA aus FFPE-Proben wurde in Tris-EDTA(TE)-Puffer auf 0,23 ng/µl für eine Zugabe von 10 ng, 0,45 ng/µl für eine Zugabe von 20 ng bzw. 0,90 ng/µl für eine Zugabe von 40 ng verdünnt. Anschließend wurden 52 µl jeder verdünnten Probe in einem Well eines 8 microTUBE Strip (Covaris, Katalog-Nr. 520053) einer Scherung mit dem Covaris LE220 Focused-ultrasonicator unterzogen (Tabelle 2).

* SeraCare Life Sciences gehört jetzt zu LCG Diagnostics.



Abbildung 1: Workflow für die Verarbeitung von FFPE-Proben mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment.

Tabelle 1: Mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment analysierte Proben

Proben-ID	Probentyp	Probenquelle	ΔCq -Wert
8.752	FFPE-Gewebe (human)	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	5,7
315	FFPE-Gewebe (human)	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	5,5
4.075	FFPE-Gewebe (human)	Kolorektales Karzinom	4,2
679	FFPE-Gewebe (human)	Mammakarzinom	4,1
11.883	FFPE-Gewebe (human)	Kolorektales Karzinom	2,9
3.952	FFPE-Gewebe (human)	Mammakarzinom	2,2
448	FFPE-Gewebe (human)	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	2,1
449	FFPE-Gewebe (human)	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	1,5
FFPE TST Custom DNAv2	FFPE-Zelllinie	n. z.	0,87
HD653	FFPE-Zelllinie	n. z.	-1,23
HD301	FFPE-Zelllinie	n. z.	-1,87

Tabelle 2: Empfohlene Einstellungen für die Scherung mit Covaris-Ultraschallgeräten

Einstellung	Covaris LE220	Covaris E220	Covaris ME220
Spitzenimpulsleistung	450 Watt	175 Watt	50 Watt
Tastverhältnis	30 %	10 %	30 %
Zyklen pro Burst	200	200	1.000
Verarbeitungsdauer	250 s	280 s	10 s
Temperatur	7 °C	7 °C	12 °C
Impulswiederholungen	n. z.	n. z.	20
Durchschnittliche Leistung	n. z.	n. z.	15 Watt
Sonstiges	n. z.	Verstärker	Wellenleiter

Die Daten für die vorliegende Studie wurden mit dem Covaris LE220 Focused-ultrasonicator generiert.

Bibliotheksvorbereitung und -anreicherung

Im Anschluss an die Ultraschallscherung wurden gemäß den Anweisungen im Benutzerhandbuch zu Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Bibliotheken aus fragmentierter DNA vorbereitet. Je nach Paneltyp und Anreicherungsformat wurden spezifische Anreicherungsprotokolle verwendet. Für die vorliegende Studie wurden zwei Anreicherungspanels verwendet: ein anwendungsspezifisches 80-bp-ssDNA-Panel (single-stranded DNA, einsträngige DNA) mit einer Größe von 2.000 kb und ein Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. Bei letzterem handelte es sich um ein 120-bp-dsDNA-Panel (double-stranded DNA, doppelsträngige DNA) mit einer Größe von 37,5 Mb. Die Anreicherung wurde nach dem 1-Plex- oder 4-Plex-Anreicherungsworkflow durchgeführt, wie im [Benutzerhandbuch zu Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#) erläutert, wobei während der enzymatischen inversen PCR für das Panel mit 2.000 kb bzw. das Exom-Panel 14- bzw. 12-Zyklen durchgeführt wurden.

Sequenzierung

Mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel angereicherte Bibliotheken wurden[†] auf dem NovaSeq™ 6000 System mit einer Read-Länge von 2 × 151 bp sequenziert. Alle anderen Bibliotheken wurden auf einem NextSeq™ 550 System mit einer Read-Länge von 2 × 149 bp sequenziert.

[†] Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ist mit sämtlichen Illumina-Systemen mit mittlerem und hohem Durchsatz kompatibel. Die Leistung bei aus FFPE-Proben vorbereiteten Bibliotheken wurde jedoch nur auf dem NovaSeq 6000 System und dem NextSeq 550 System getestet.

Datenanalyse

Für die cloudbasierte Datenanalyse wurden die Rohdaten der Sequenzierung (BCL-Dateien) demultiplexiert und in BaseSpace™ Sequence Hub in FASTQ-Dateien konvertiert. Die nachgeschaltete Sekundäranalyse erfolgte mit der DRAGEN™ Enrichment App v4.0.3, die Somatic Small Variant Caller mit Standardeinstellungen ausführt. Als Referenz-Humangenom diente UCSC hg 19 Alt-Aware. Die UMI-Einstellungen waren aktiviert, wobei das UMI-abhängige Varianten-Calling auf „Low Depth“ (Geringe Tiefe) festgelegt war. Die Mindestanzahl unterstützender Reads für UMI wurde auf 1 festgelegt. Die Variantenannotation von Illumina Connected Annotation (früher als Nirvana bezeichnet) für das Keimbahn-Tagging war mit zusätzlichen DRAGEN-Befehlszeilenargumenten aktiviert.‡ Die Varianten wurden mit bcftools 1.17 gefiltert und mithilfe von rtg vcfeval 3.12.1 mit Referenzvarianten verglichen.

Ergebnisse

Um die herausragende Leistung von Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment bei der Generierung hochwertiger Sequenzierungsbibliotheken aus FFPE-DNA zu demonstrieren, wurden wichtige Leistungsmetriken für aus FFPE-Zelllinien und FFPE-Tumorproben extrahierte DNA ausgewertet.

Herausragende Bibliotheksleistungsmetriken für FFPE-Proben

Die mittlere Target-Coverage wurde bei zwei Sequenzierungstiefen (10 und 20 Mio. Cluster) ausgewertet. Dadurch wurde sichergestellt, dass vorbereitete Bibliotheken in der Zielregion die erforderliche Coverage-Tiefe aufweisen, um den Nachweis seltener Varianten zu ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass hochwertige FFPE-DNA ($\Delta Cq \leq 2$) Bibliotheken generiert, die eine mittlere Target-Coverage-Tiefe von > 100-fach erreichen, selbst bei einer Zugabe von nur 10 ng DNA (Abbildung 2). Die Coverage nimmt bei minderer Probenqualität (höherer ΔCq -Wert) ab, lässt sich jedoch durch eine tiefere Sequenzierung oder höhere Zugabemengen verbessern (Abbildung 2B). Das Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment-Kit generiert Bibliotheken mit einer Fragmentlänge von > 110 bp und liefert hochwertige Sequenzierungsdaten, die in Form der Read-Anreicherung und des Prozentsatzes der Targets mit ≥ 50 -facher Coverage für FFPE-Proben mit $\Delta Cq \leq 4$ bewertet wurden (Abbildung 2C).

‡ --umi-verbose-metrics true --umi-start-mask-length 1 --umi-end-mask-length 3 --germline-tagging-db-threshold 10 --tmb-enable-proxi-filter true --vc-enable-germline-tagging true

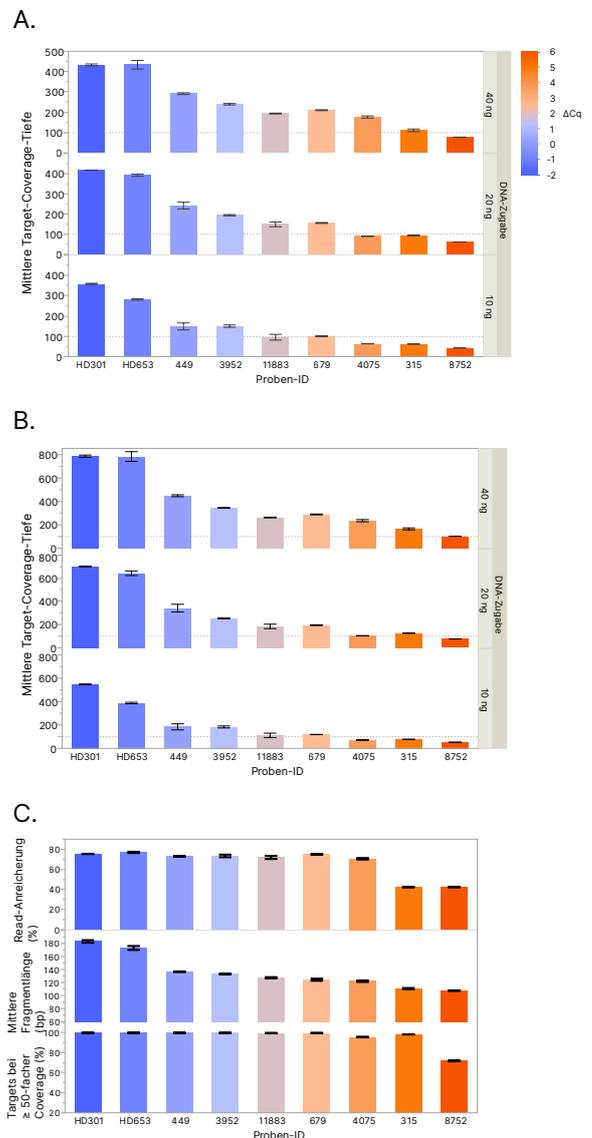


Abbildung 2: Leistungsmetriken für aus FFPE-Proben unter Verwendung von Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment vorbereitete Bibliotheken: Die Bibliotheken in dreifacher Ausfertigung wurden anhand von DNA vorbereitet, die aus FFPE-Zelllinien (HD301 und HD653) und FFPE-Geweben unterschiedlicher Qualität und Zugabemengen (10, 20 und 40 ng) aus Mamma-, kolorektalen und Lungenkarzinomen extrahiert wurde. Die Proben werden von links nach rechts in der Reihenfolge abnehmender Qualität (durch den ΔCq -Wert angegeben) dargestellt, wobei die Proben mit der höchsten Qualität blau und diejenigen mit der niedrigsten Qualität rot gekennzeichnet sind. Bibliotheken wurden mit einem 80-bp-ssDNA-Panel mit einer Größe von 2.000 kb angereichert und auf dem NextSeq 550 System bei 2×149 bp sequenziert. Die mittlere Target-Coverage wurde bei zwei Lesetiefen ausgewertet: (A) 10 Mio. und (B) 20 Mio. Cluster. (C) Herausragende Bibliotheksleistungsmetriken für FFPE-Proben Die dargestellten Daten gelten für Zugabemengen von 20 ng DNA und 20 Mio. Cluster.

Sensitiver Nachweis seltener Varianten

Die Sensitivität des Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit für den Nachweis von Einzelnukleotid-Varianten (SNVs, Single-Nucleotide Variants) und Insertions- und Deletionsmutationen (Indels) wurde anhand einer anwendungsspezifischen FFPE-Zelllinie mit krebssassoziierten Varianten bestimmt (FFPE TST Custom DNaV2, SeraCare). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment zeigte eine hohe analytische Sensitivität mit der Fähigkeit, ca. 90 % der SNVs mit einer Variantenallelfrequenz (VAF) zwischen 1 und 2 % nachzuweisen (Abbildung 3, Tabelle 3). Die Sensitivität für den Nachweis von Indels mit einer VAF über 2 % betrug > 80 % (Abbildung 3, Tabelle 3).

Kompatibilität mit dem 1-Plex- und dem 4-Plex-Anreicherungsformat

Vergleichbare Leistungsmetriken, einschließlich der mittleren Target-Coverage-Tiefe, des Prozentsatzes der Targets mit ≥ 50 -facher Coverage und des Prozentsatzes der Read-Anreicherung, wurden sowohl für das 1-Plex- als auch für das 4-Plex-Anreicherungsformat bei Proben mit einer Qualität von ΔCq 1,5–4,2 (Abbildung 4) erreicht.

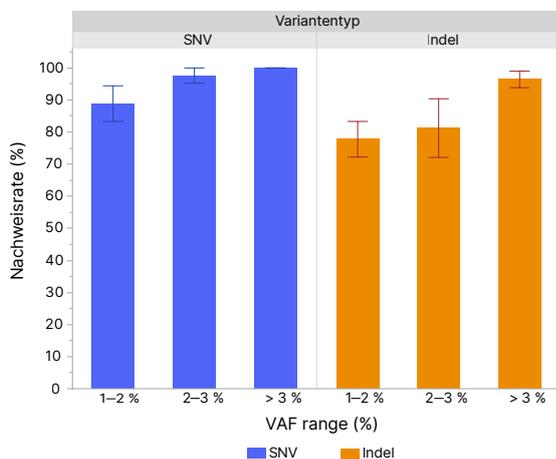
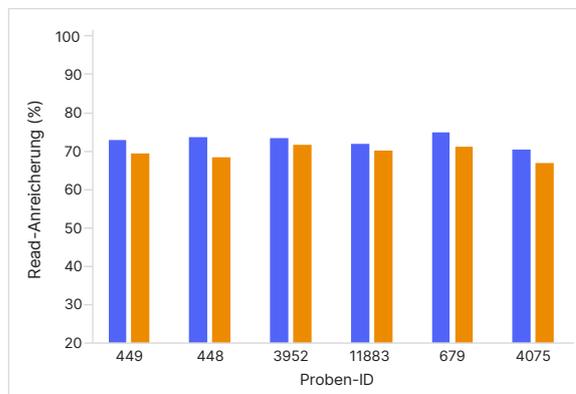
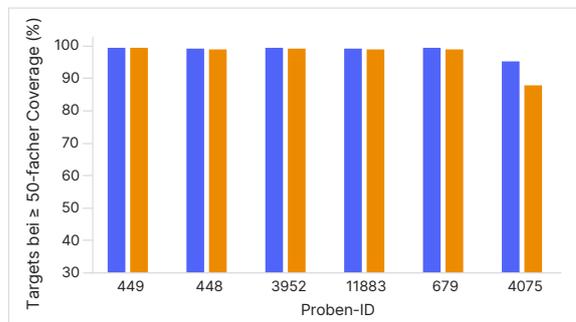
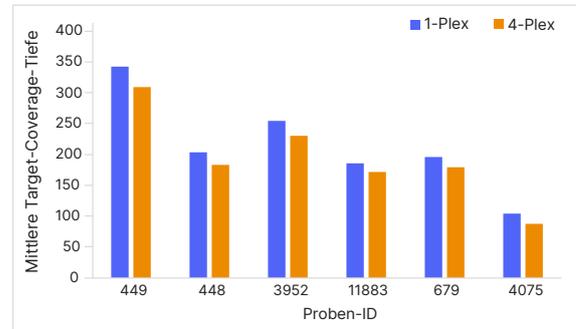


Abbildung 3: Nachweis von Varianten mit niedrigen Allelfrequenzen: Varianten in FFPE-DNA aus einer Wildtyp-Zelllinien-Probe (GM24385) wurden auf mindestens drei Stufen mit einer spezifischen Allelzielfrequenz verdünnt. Es wurden sechs Bibliotheksreplikate mit einer DNA-Zugabe von 10 ng pro Allelfrequenzstufe vorbereitet und nach dem 1-Plex-Anreicherungsworkflow mit einem Panel mit 80-bp-ssDNA mit einer Größe von 2.000 kb angereichert. Die Bibliotheken wurden auf einem NextSeq 550 System bei 2×149 bp sequenziert. Von den Sequenzierungs-Reads wurde eine Teilmenge von 20 Mio. Clustern untersucht. Die Nachweisrate (n/6) wurde für die einzelnen Variantentypen in verschiedenen VAF-Bereichen bestimmt.



Probenqualität (ΔCq) 1,5 2,9 4,2

Abbildung 4: Leistungsmetriken für das 1-Plex- und das 4-Plex-Anreicherungsformat: Aus ausgewählten FFPE-DNA-Gewebeproben (Zugabe von 20 ng DNA) vorbereitete Bibliotheken mit unterschiedlichem ΔCq -Wert wurden einzeln mit einem 80-bp-ssDNA-Panel mit einer Größe von 2.000 kb (1-Plex, blaue Balken) angereichert. Dieselben Bibliotheken wurden mit demselben Panel unter Verwendung des Multiplex-Formats (4-Plex, orangefarbene Balken) erneut angereichert. Die Bibliotheken wurden auf dem NextSeq 550 System mit 2×149 bp sequenziert und von den Sequenzierungs-Reads wurde eine Teilmenge von 20 Mio. Clustern untersucht.

Tabelle 3: Übersicht der einzelnen somatischen Varianten, die mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment nachgewiesen wurden

COSMIC-ID	Gen	Variantentyp	Aminosäureänderung	VAF bestimmt (%) ^a	Anzahl der bestimmten Replikate ^b
COSV51614178	<i>MLH1</i>	SNV	p.V384D	2,0	6
COSV57169334	<i>MYD88</i>	SNV	p.L273P	2,3	6
COSV58963463	<i>CSF3R</i>	SNV	p.T618I	2,6	6
COSV55545304	<i>KRAS</i>	SNV	p.K117N	2,9	6
COSV50630049	<i>CBL</i>	SNV	p.L380P	2,9	5
COSV61615239	<i>IDH1</i>	SNV	p.R132H	3,0	5
COSV52274101	<i>MSH6</i>	SNV	p.E1322*	3,5	6
COSV59205440	<i>SF3B1</i>	SNV	p.G742D	3,9	6
COSV56057713	<i>BRAF</i>	MNV	p.V600K	2,1	6
COSV64288359	<i>PTEN</i>	Del	p.C250Wfs*2	2,3	6
COSV56542602	<i>VHL</i>	Del	p.P99Qfs*60	2,5	6
COSV52740986	<i>TP53</i>	Del	p.K291Tfs*48	2,7	6
COSV55388067	<i>KIT</i>	Del	p.W557_E561del	3,2	5
COSV61376874	<i>ARID1A</i>	Del	p.A339Lfs*24	3,2	6
COSV62688630	<i>CTNNB1</i>	Del	p.S45del	4,7	6
COSV67575778	<i>JAK2</i>	Del	p.N542_E543del	5,3	5
COSV56060749	<i>BRAF</i>	Ins	p.T599dup	1,9	6
COSV55386625	<i>KIT</i>	Ins	p.A502_Y503dup	2,8	6
COSV64290304	<i>PTEN</i>	Ins	E242Lfs*15	3,1	6
COSV51766549	<i>EGFR</i>	Ins	p.A767_V769dup	3,5	6
COSV51772596	<i>EGFR</i>	Ins	p.N771_H773dup	3,6	6
COSV57195669	<i>CEBPA</i>	Ins	p.H24Afs*84	5,0	6

a. Durchschnitt der nachgewiesenen Replikate.

b. Bei insgesamt 6 Replikaten.

Herausragende Bibliotheksleistung mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel

Das Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment Kit mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel generierte aus FFPE-Zelllinien konsistent Bibliotheken mit einer Länge von > 150 bp (Abbildung 5). Metriken, die eine hohe Leistung belegen, wurden für alle Bibliotheken erzielt, die mit einer Zugabemenge von ≥ 20 ng vorbereitet wurden, einschließlich Read-Anreicherung, Prozentsatz der alignierten Reads und Coverage-Einheitlichkeit. Die Leistungsmetriken von Bibliotheken mit 1-Plex- und 4-Plex-Anreicherung waren vergleichbar.

Sensitiver Nachweis von Varianten mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel

Die Auswirkung der Sequenzierungstiefe auf die mittlere Target-Coverage und den Variantennachweis wurde für Bibliotheken bewertet, die mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel angereichert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine mittlere Target-Coverage von bis zu 500-fach erreicht wurde, wenn acht Exombibliotheken in einer Lane einer NovaSeq 6000 S4-Fließzelle sequenziert wurden (Abbildung 6). Bei der Untersuchung der Sequenzierungs-Reads in Teilmengen von 200 und 400 Mio. Reads nach Filterung insgesamt, erzielten Bibliotheken eine mittlere Target-Coverage von ca. 150-fach bzw. ca. 300-fach. Die Ergebnisse waren unabhängig von der Zugabemenge und der Anreicherungsplexität.

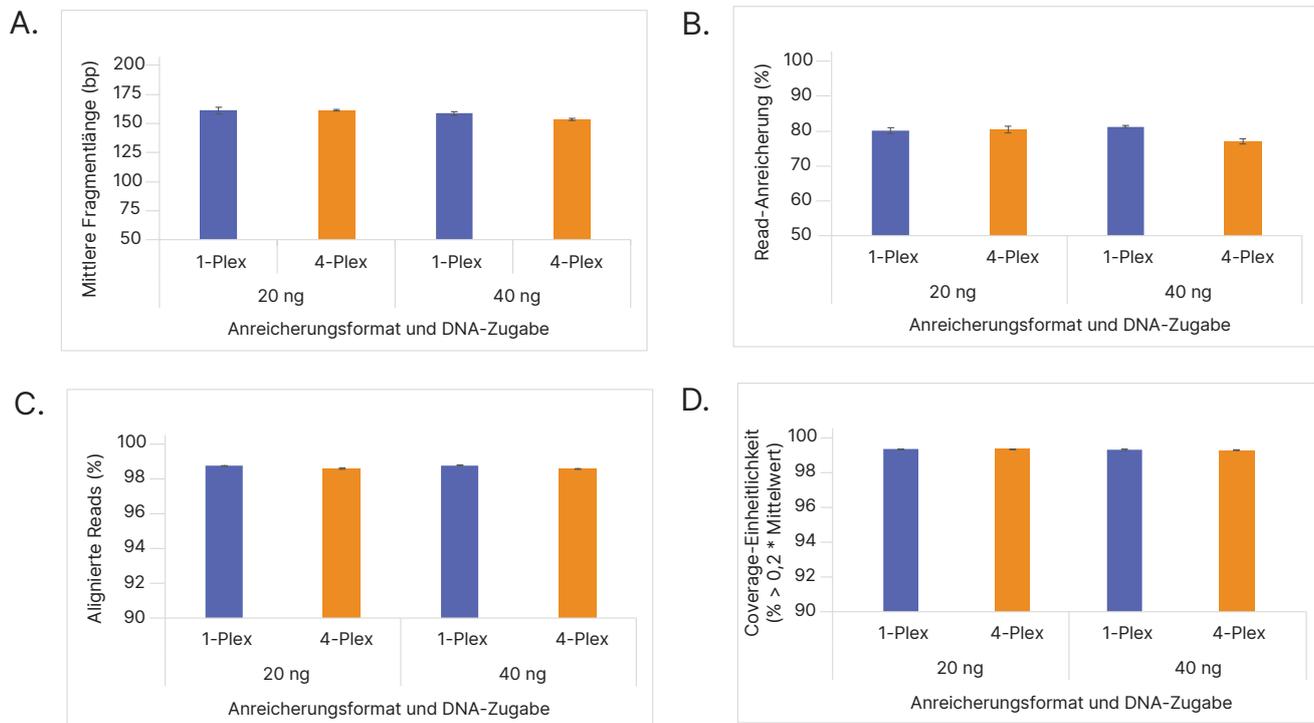


Abbildung 5: Bibliotheksleistungsmetriken beim Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel: Vier Bibliotheksreplikate wurden mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment anhand einer anwendungsspezifischen FFPE-Zelllinie mit krebssassoziierten Varianten (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare) vorbereitet. Die Varianten wurden auf eine Zielallelfrequenz von ca. 2 % verdünnt. Die Bibliotheken wurden entweder mit einer DNA-Zugabe von 20 oder 40 ng vorbereitet. Die Anreicherung erfolgte mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel gemäß dem im Benutzerhandbuch zu Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment erläuterten 1-Plex- oder 4-Plex-Anreicherungsworkflow für dsDNA-Sonden. Pro S4-Lane wurden acht mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel angereicherte Bibliotheken auf dem NovaSeq 6000 System mit einer Read-Länge von 2×151 bp sequenziert. Von den Sequenzierungsdaten wurde eine Teilmenge von 200 Mio. Clustern (oder 400 Mio Reads nach Filterung insgesamt) untersucht und die Bibliotheksleistungsmetriken wurden zwischen den beiden Zugaben verglichen.

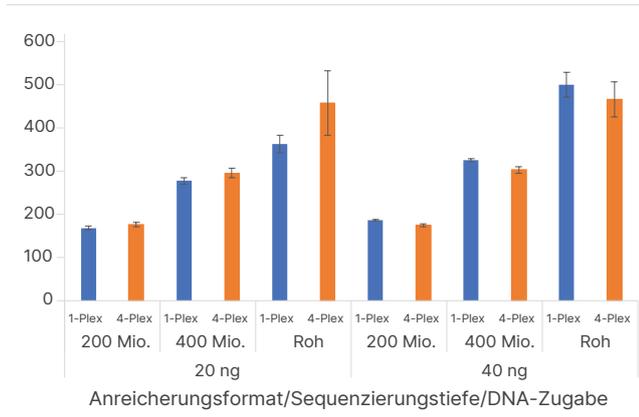
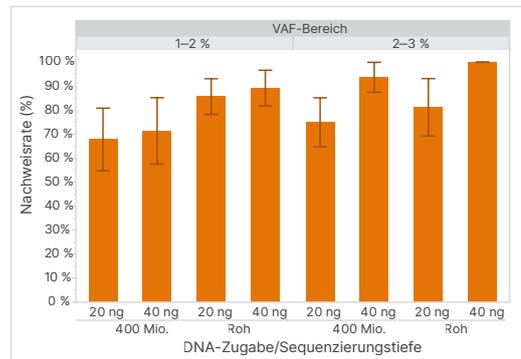


Abbildung 6: Die mittlere Target-Coverage wurde mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel erzielt: Vier Bibliotheksreplikate wurden mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment aus 20 bzw. 40 ng DNA vorbereitet, die aus einer anwendungsspezifischen FFPE-Zelllinie gewonnen wurde, die krebssassoziierte Varianten enthält (FFPE TST Custom DNA_{v2}, SeraCare). Die Varianten wurden auf eine Zielallelfrequenz von ca. 2 % verdünnt. Die Anreicherung wurde mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel gemäß dem 1-Plex-Anreicherungsworkflow für dsDNA-Sonden (blaue Balken) bzw. dem entsprechenden 4-Plex-Workflow (orangefarbene Balken) durchgeführt. Pro S4-Lane wurden acht Bibliotheken auf dem NovaSeq 6000 System mit einer Read-Länge von 2 × 151 bp sequenziert. Von den Sequenzierungsdaten wurde eine Teilmenge von 100 oder 200 Mio. Clustern (bzw. 200 oder 400 Mio Reads nach Filterung insgesamt) untersucht und die Bibliotheksleistungsmetriken wurden ausgewertet. Die Roh-Reads reichten von 296 bis 417 Mio. Clustern (592–834 Mio Reads nach Filterung insgesamt) für mit 1-Plex angereicherte Bibliotheken bzw. von 319 bis 544 Mio. Clustern (638 Mio.–1,08 Mrd. Reads nach Filterung insgesamt) für mit 4-Plex angereicherte Bibliotheken.

Bei multiplexierten (4-Plex-)Bibliotheken, die mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel vorbereitet wurden, konnte eine Sensitivität von 80 % für SNVs mit einer VAF zwischen 2 und 3 % erzielt werden, wenn die Reads für 20-ng-Bibliotheken in einer Teilmenge von 200 Mio. Clustern untersucht wurden. Die SNV-Nachweisrate verbesserte sich bei einer Zugabemenge von 40 ng oder bei tieferer Sequenzierung, insbesondere bei Varianten mit einer VAF zwischen 1 und 2 % (Abbildung 7A). Mit dem Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel vorbereitete multiplexierte Bibliotheken erreichten eine Sensitivität von 80–90 % für Indels mit einer VAF zwischen 2 und 3 %. Die Ergebnisse variieren je nach Zugabemenge und Sequenzierungstiefe. Über einer VAF von 3 % wurden bei Zugabemengen von 20 und 40 ng 100 % der Indels nachgewiesen (Abbildung 7B).

A. SNV-Nachweis



B. Indel-Nachweis

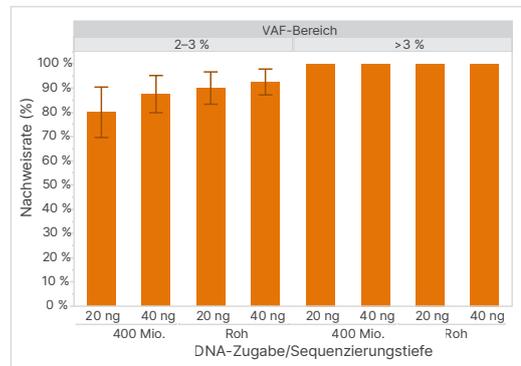


Abbildung 7: Nachweis somatischer Varianten mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel: Vier Bibliotheksreplikate wurden mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment aus 20 bzw. 40 ng DNA vorbereitet, die aus einer anwendungsspezifischen FFPE-Zelllinie gewonnen wurde, die krebssassoziierte Varianten enthält (FFPE TST Custom DNA_{v2}, SeraCare). Die Varianten wurden auf eine Zielallelfrequenz von ca. 2 % verdünnt. Die Anreicherung wurde mit dem Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel gemäß dem 4-Plex-Anreicherungsworkflow für dsDNA-Sonden durchgeführt. Pro S4-Lane wurden acht Bibliotheken auf dem NovaSeq 6000 System mit einer Read-Länge von 2 × 151 bp sequenziert. Die Sequenzierungsdaten wurden in einer Teilmenge von 200 Mio. Cluster (bzw. 400 Mio Reads nach Filterung insgesamt) untersucht und die Bibliotheksleistungsmetriken wurden ausgewertet. Die Roh-Reads für angereicherte Bibliotheken reichten von 319 bis 544 Mio. Clustern (638 Mio.–1,08 Mrd. Reads nach Filterung insgesamt).

Zusammenfassung

Zur erfolgreichen molekularen Charakterisierung von Tumorproben per NGS müssen hochwertige Bibliotheken aus FFPE-DNA vorbereitet werden. Der vorliegende Anwendungshinweis demonstriert die herausragende Leistung von Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment bei der Vorbereitung von für die Sequenzierung geeigneten Bibliotheken, die anhand von aus FFPE-Proben extrahierter DNA genaue Daten für das Calling somatischer Varianten und die nachgeschaltete Analyse liefern. Dieses vielseitige Bibliotheksvorbereitungskit eignet sich für den Einsatz gemeinsam mit vom Anwender bereitgestellten Anreicherungspanels (bis auf Exomebene). Dank der Übertragbarkeit der Inhalte können Labore das Versuchsdesign an die jeweilige Forschungsaufgabe anpassen.

Weitere Informationen

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

[DRAGEN Enrichment App](#)

[DRAGEN-Rezept zur Analyse von FFPE-Probenbibliotheken, die mit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment vorbereitet wurden](#)

Quellen

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



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. ausserhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02524 DEU v2.0