

# Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

用于检测 cfDNA 中低频突变的快速、灵活的解决方案

- 利用从血浆中提取的仅 20 ng cfDNA 即可检测等位基因频率低至 0.2% 的罕见变异
- 在 8.5-9.5 小时内即可搭配用户提供的 panel 制备好可直接用于测序的文库，手动操作时间为 2.5-3 小时
- 使用 DRAGEN™ 二级分析分析数据并识别高分析灵敏度变异

## 简介

血浆中的循环游离 DNA (cfDNA) 已成为癌症、心血管疾病和器官移植中重要的非侵入性疾病生物标志物。在癌症研究领域，通过对液体活检样本中的 cfDNA 进行测序可以帮助科学家深入了解肿瘤异质性，开展生物标志物分析，并在不易获得组织时作为组织活检样本的补充或替代。由于血浆样本中来自目标细胞的 cfDNA 通常较少，因此需要可靠、灵敏的检测方法来检测罕见的体细胞变异。固定基因 panel 可以识别变异，但在研究新靶点以及目标基因发生变化时应用有限。

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 是一种通用的文库制备解决方案 (表 1)，它利用新一代测序 (NGS) 技术的强大功能，可以实现 cfDNA 样本中低频变异的高灵敏度检测。这款高性能试剂盒是从“cfDNA 到结果”的集成工作流程的一部分，其中包括使用用户提供的 panel 进行文库制备，然后在因美纳高通量基因测序仪上进行测序。使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 进行数据分析。

## 一体化的工作流程

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 是集成的 cfDNA 测序工作流程的一部分，可提供卓越的性能和数据质量。这种可扩展的工作流程首先从全血或血浆中提取 cfDNA，然后在因美纳高通量基因测序仪上进行测序，并使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 进行高度准确的变异检出 (图 1)。这种用户友好的解决方案能够针对各种 panel 大小提供高性能，兼容自动化液体处理，并适用于样本多重分析，可以实现高效扩展。

表 1: Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 概述

参数	规格 / 描述
DNA 类型	来自全血或血浆的 cfDNA
DNA 起始量	10-30 ng
样本多重分析	192 个唯一双标签序列
重复序列标签	非随机唯一分子标签 (UMI)
富集重数	1 重或 4 重
支持的基因测序仪	NextSeq 和 NovaSeq 基因测序仪
工作流程总时间 <sup>b</sup>	~ 8.5-9.5 小时 <sup>c</sup>
手动操作总时间	~ 2.5-3 小时

a. 建议的 cfDNA 起始量为 20 ng。  
 b. 包括文库制备、富集和均一化步骤。  
 c. 分别为单链和双链探针的工作流程时间。

## 快速灵活的文库制备

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 是一种基于连接的检测方法，通过单个杂交步骤快速制备文库 (图 2)。Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 兼容用户提供的因美纳或第三方供应商的富集寡核苷酸，包括 Integrated DNA Technologies (IDT) 的单链 DNA (ssDNA) 和 Twist Bioscience 的双链 DNA (dsDNA)，具有更出色的 panel 可移植性。该试剂盒可用于 55-2000 kb ssDNA 和 70-2000 kb dsDNA panel 内容，从而实现灵活的研究设计。可在约 8.5-9.5 小时内制备好可直接用于测序的文库，手动操作时间约为 2.5-3 小时，使研究人员能够在一天内完成从提取 cfDNA 到测序的整个流程。为了获得更高的效率和灵活性，该试剂盒可用于使用市售的基于柱法或磁珠的纯化方法直接从外周血或血浆中提取的 cfDNA。



图 1：从 cfDNA 到结果，单个合作伙伴满足所有需求——从文库制备到数据分析，因美纳为 cfDNA 测序一体化工作流程提供支持。Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 使用提取的 cfDNA 作为文库制备的起始材料。根据因美纳基因测序仪的规模和通量需求对文库进行测序。随后，用户可以使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 进行准确、快速的二级分析和变异检出。

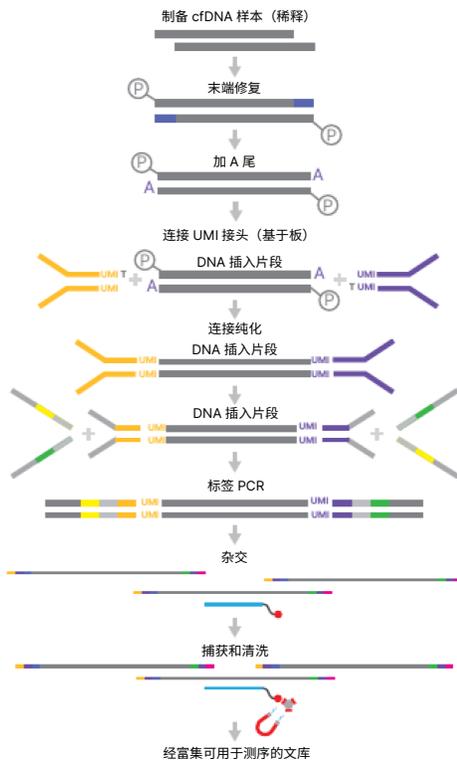


图 2：Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 化学技术——首先，修复 cfDNA 片段并将其连接到非随机唯一分子标签 (UMI)。唯一分子标签用于 PCR 扩增过程中的多重分析。接下来，使用单一杂交步骤，通过生物素化探针富集文库中感兴趣的目标区域。富集文库经过扩增和均一化，可在因美纳高通量或高通量基因测序仪上进行测序。

为了证明 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 与各种大小和形式的富集 panel 的兼容性，使用小型 (55 kb, ssDNA)、中型 (250 kb) 或大型 (2000 kb) 富集 panel (表 2)，通过 20 ng cfDNA 制备文库。制备好的文库在 NextSeq™ 550 基因测序仪 (小型 panel 每个样本 10M 双端 read) 或 NovaSeq™ 6000 基因测序仪 (中型和大型 panel 每个样本分别为 46M 和 450M 双端 read) 上进行测序。在 BaseSpace™ Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 分析数据。结果表明，对于不同大小和形式的富集 panel，Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 可提供 >1500x 的 UMI 去冗余覆盖深度和高覆盖均一性 (根据 >1000x 覆盖度的靶点百分比进行评估) (图 3)。

表 2：用于富集 panel 设计的参数

Panel	大小	探针形式	变异类型
小型 <sup>a</sup>	55 kb	80 bp ssDNA	SNV、插入缺失
中型 -A <sup>b</sup>	250 kb	120 bp dsDNA	SNV、插入缺失、融合
中型 -B <sup>c</sup>	300 kb	80 bp ssDNA	SNV、插入缺失、融合、CNV
大型 <sup>d</sup>	2000 kb	80 bp ssDNA	SNV、插入缺失、融合、CNV

a. 探针在目标基因编码区平铺覆盖 (具有 20 bp 重叠)。

b. 探针在目标基因编码区端到端平铺覆盖。融合断点覆盖有两个重叠的探针。

c. 探针在目标基因编码区以及融合断点平铺覆盖 (具有 20 bp 重叠)。对于具有小 CDS 区域的基因 (如 MYC) 的 CNV 检测，在内含子区域以低密度补充探针。

d. 通过湿实验室优化进行定制设计。

SNV: 单核苷酸变异; indel: 插入缺失; CNV: 拷贝数变异。

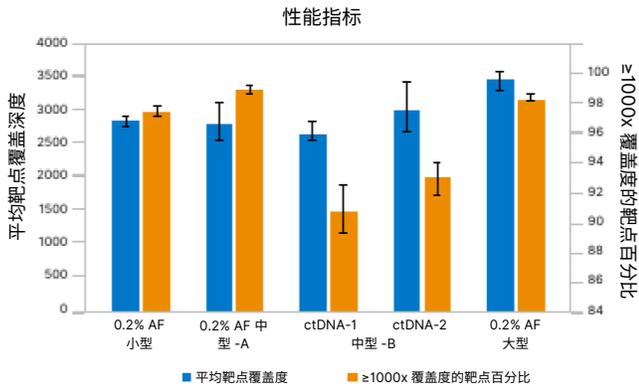


图 3：与各种大小的 panel 的兼容性——使用 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment，通过 20 ng cfDNA 制备 4 个平行重复文库，并在 NextSeq 550 基因测序仪（用于小型 panel）或 NovaSeq 6000 基因测序仪（用于中型和大型 panel）上进行测序，小型、中型和大型 panel 的平均读取深度分别为 10M、46M 和 450M 双端 read。在 BaseSpace Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 分析数据。小型和中型 panel 以约 30,000x 的目标覆盖度进行测序，大型 panel 以约 35,000x 的目标覆盖度进行测序。

## 低频变异高灵敏检出

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 对文库制备化学技术进行了改进，以提高文库转换效率，并可检测出变异等位基因频率（VAF）低至 0.2% 的低频变异。为了证明使用 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 可获得高质量结果，因美纳科学家开展了相关研究来评估其检出单核苷酸变异（SNV）、拷贝数变异（CNV）和基因融合的能力（图 4、图 5）。使用 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 制备的文库在 NextSeq 550 基因测序仪（每个样本 10M 双端 read）或 NovaSeq 6000 基因测序仪上进行高覆盖深度测序（中型和大型 panel 每个样本分别为 46M 和 450M 双端 read）。在 BaseSpace Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 进行变异检出。结果表明，对于小变异，通过 20 ng cfDNA 即可检出低至 0.2% VAF 的突变，并实现了超过 90% 的分析灵敏度（表 3）和 99.98% 的分析特异性。

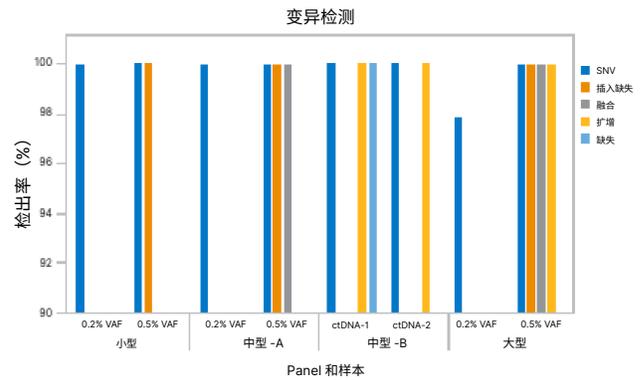


图 4：低变异等位基因频率（VAF）下的变异检测——使用来自全血样本的 20 ng cfDNA（加标 0.2% 变异等位基因频率（VAF）的 SNV）或来自 SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5%（SeraCare，货号 0710-0531）的 20 ng cfDNA 制备 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 文库。制备好的文库在 NextSeq 550 基因测序仪（55 kb ssDNA 小型 panel）或 NovaSeq 6000（250 kb 中型和 2000 kb 大型 panel）平台上进行测序，小型、中型和大型 panel 的平均读取深度分别为 10M、46M 和 450M 双端 read。在 BaseSpace Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 进行变异检出。小型和中型 panel 以约 30,000x 的目标覆盖度进行测序，大型 panel 以约 35,000x 的目标覆盖度进行测序。

表 3：以高准确度检测低频变异

变异类型	分析灵敏度
小变异 (0.2% VAF)	$\geq 90\%$
插入缺失 (0.5% VAF)	$\geq 90\%$
基因扩增 (1.3 倍数变化)	$\geq 95\%$
基因缺失 (0.6 倍数变化)	$\geq 95\%$
基因重排 (0.5% VAF)	$\geq 95\%$

a. 分析灵敏度是指在规定的变异水平上检测到的百分比。

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 支持样本多重分析，并且经过验证可为 1 重和 4 重富集文库提供准确的 SNV、插入缺失 (indel)、CNV 和基因融合召回率（图 5、图 6）。

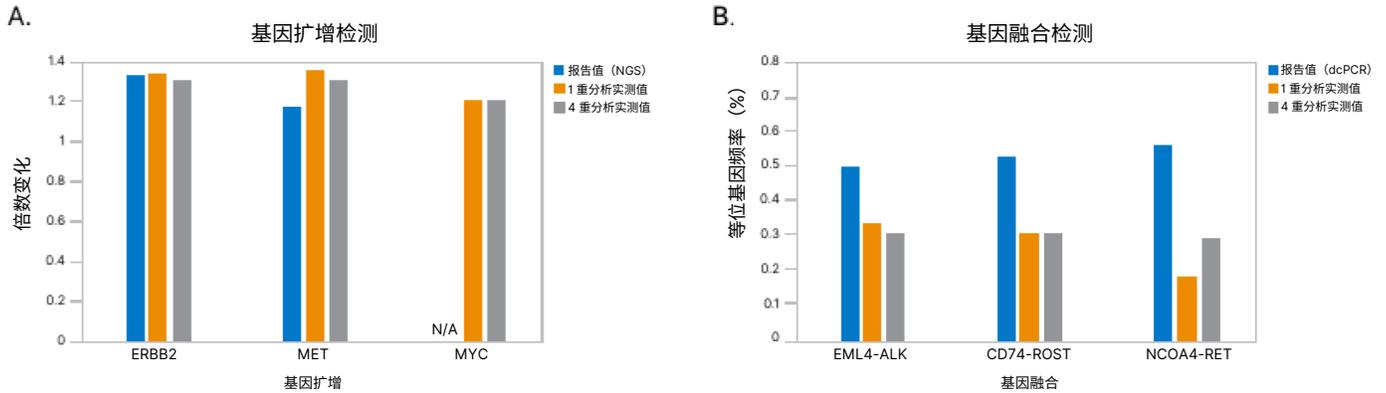


图 5: 检测低频基因扩增和基因融合——使用具有定制内容的 1 重和 4 重富集文库时, Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 在检测 (A) 基因扩增和 (B) 基因融合方面具有卓越性能。使用来自 SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, 货号 0710-0531) 的 20 ng cfDNA 制备文库。用 80bp ssDNA 2000 kb 大小的 panel 对 4 个文库分别进行富集 (1 重), 然后按照多重 (4 重) 形式使用相同的 panel 对 4 个文库进行重新富集。在 NovaSeq 6000 基因测序仪上对文库测序, 平均读取深度为 400M 双端 read (目标覆盖度 $\geq 35,000\times$ )。在 BaseSpace Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 分析数据。在 1 重和 4 重富集文库的所有重复中, 在标明的倍数变化和等位基因频率下检测到参考样本中的 3 个基因扩增和融合。融合 VAF 的差异归因于检测方法之间的差异。注: SeraCare 不通过 NGS 方法验证 MYC 基因扩增。

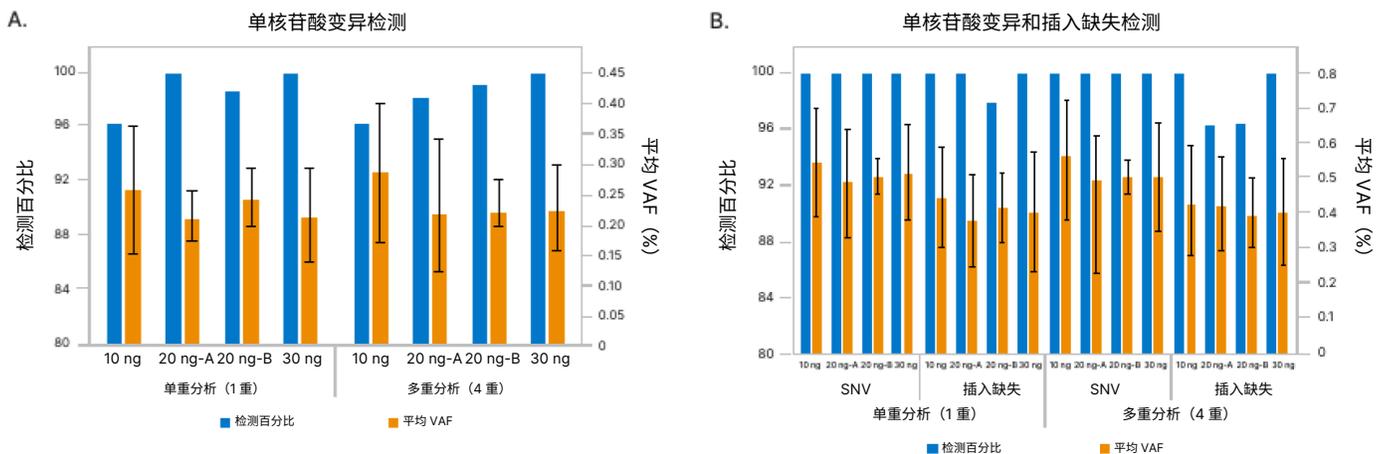


图 6: 使用 1 重和 4 重富集文库进行灵敏的变异检测——使用来自 SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, 货号 0710-0531) 的 cfDNA 样本 (10 ng、20 ng 或 30 ng) 制备 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 文库, 其中 cfDNA 样本加标了 (A) 0.2% VAF 或 (B) 0.5% VAF 的 SNV。4 个文库分别用 80 bp ssDNA 180 kb panel (10 ng、20 ng-A 和 30 ng) 或 80 bp-dsDNA 180 kb panel (20 ng-B) 进行单重 (1 重) 形式的富集。然后, 4 个文库使用相同的 panel 进行多重 (4 重) 形式的重新富集。在 NextSeq 550 基因测序仪上对文库进行测序, 平均读取深度为 33M 双端 read (目标覆盖度 $\geq 30,000\times$ )。在 BaseSpace Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 分析数据和识别变异。

## 在各种因美纳基因测序仪上实现优化的性能

为了证明 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 在因美纳高通量测序仪上的卓越性能，使用来自 Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, 货号 0710-0531) 的 20 ng cfDNA (0.5% VAF) 制备文库，使用 120-bp dsDNA 250-kb panel 进行富集，并在 NextSeq 550 基因测序仪、NextSeq 2000 基因测序仪或 NovaSeq 6000 基因测序仪上测序，每个样本的平均读取深度为 92M read (目标覆盖度约 30,000x)。可靠直观的 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 解决方案可在所有因美纳基因测序仪中产生可靠的结果，提供 >1500x 的 UMI 去冗余覆盖深度和高覆盖均一性 (根据 >1000x 覆盖度的靶点百分比进行评估) (图 7)。

## 整合数据分析

DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 使用快速、全面集成的生物信息学算法来确保理想的分析性能。该软件执行基于 UMI 的错误校正、序列比对，以及小变异、CNV

和基因融合的体细胞变异检出。DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 可在第 4 版 Illumina DRAGEN Server v4.0.3 上本地运行，或在 NovaSeq 6000Dx 基因测序仪上运行 (仅研究模式)。分析流程还可以作为 BaseSpace Sequence Hub 上的云端应用程序运行，或通过 Illumina Connected Analytics (ICA) 进行访问，ICA 是一个安全的云端基因组学平台，无需购置和维护更多本地基础设施即可扩大二级分析的规模。

集成的分析流程使用户能够根据用于靶向富集的 panel 灵活地分析数据，并可选择将测序数据与 hg19 或 hg38 进行比对，并开展特定分析和定制工作流程以满足其研究目标。用户提供的噪声文件可用于过滤特定位点的噪声并改善小变异检测。该软件还允许用户标签克隆性造血变异，从小变异检出中排除指定区域，进行准确的 CNV 检出，并使用自定义体细胞热点文件或使用内置 DRAGEN 体细胞热点区域以出色的分析灵敏度检测体细胞热点。访问云端 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 的用户可以探索更多选项，通过修改 UMI 去冗余和小变异检出的阈值来优化分析。

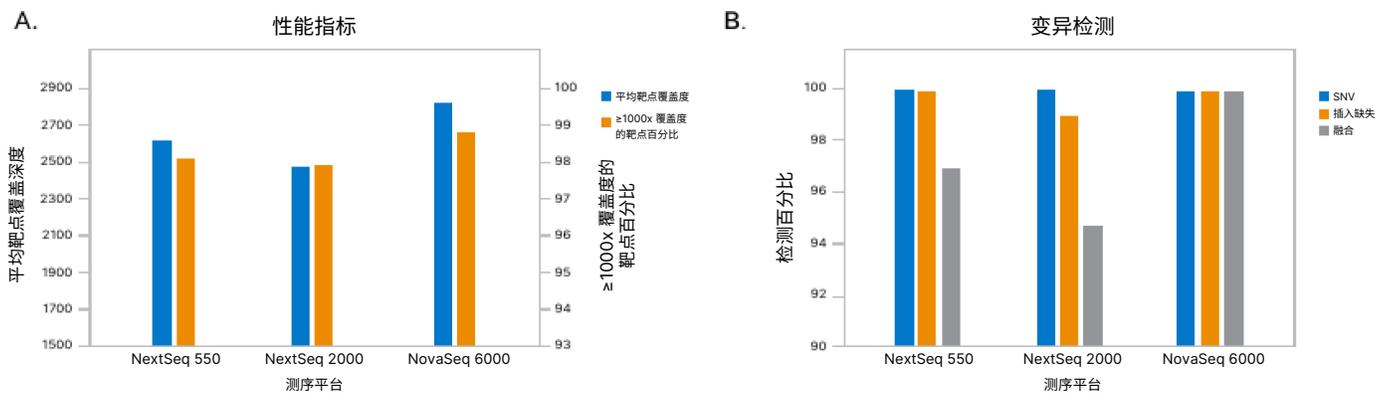


图 7：与因美纳中通量和高通量基因测序仪的兼容性——使用 20 ng cfDNA (已知 VAF 为 0.5%) 制备 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 文库 (用 120 bp dsDNA 250 kb panel 进行富集)。在 NextSeq 550、NextSeq 2000 或 NovaSeq 6000 基因测序仪上对文库进行测序，平均读取深度为 46M 双端 read，目标覆盖度  $\geq 30,000x$ 。使用 NextSeq 550 基因测序仪时混合了 8 个文库，使用 NextSeq 2000 基因测序仪时混合了 25 个文库，NovaSeq 6000 基因测序仪 S4 流动槽的一个通道上混合了 51 个文库。在 BaseSpace Sequence Hub 中使用 DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App 分析数据和识别变异。

## 支持自动化工作流程

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 支持用于实现自动化文库制备的液体处理系统，使实验室能够根据不同的通量需求进行调整。利用自动化工作流程，实验室可以进行高度可重复的样本处理，获得稳定可靠的结果并提高实验效率。自动化还有助于快速扩展通量，且不会增加手动操作时间。通过采用因美纳认证的方法可以进一步提高效率，这些方法经过因美纳审核以确保方法性能和数据质量，可通过我们的自动化合作伙伴获取。

## 总结

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 是一种灵活的文库制备解决方案，经过优化可用于从血浆样品中提取的低起始量 cfDNA。这一用户友好的解决方案支持各种 panel 规格，并与因美纳或第三方富集 panel 兼容，从而实现灵活性。借助 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 解决方案，研究人员能够以卓越的分析灵敏度检测低频体细胞变异。高性能的 Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment 解决方案与强大的因美纳基因测序仪和快速数据分析相结合，为您提供高质量的 cfDNA 测序工作流程，只需单个值得信赖的合作伙伴即可满足从样本处理到数据分析的整个流程需求。

## 了解更多

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

## 订购信息

产品	货号
Illumina Cell-Free DNA Prep, Ligation (16 个样本)	20104105
Illumina Cell-Free DNA Prep, Ligation (96 个样本)	20104106
Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (16 个反应)	20104107
Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 个样本, 4 重)	20104103
Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 个样本, 4 重) 本地	20104104
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 个标签, 96 个样本)	20034701
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 个标签, 96 个样本)	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

## 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](mailto:chinasupport@illumina.com)  
 市场销售热线 400-066-5875 • [china\\_info@illumina.com](mailto:china_info@illumina.com) • [www.illumina.com.cn](http://www.illumina.com.cn)

© 2024 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](http://www.illumina.com.cn/company/legal.html)。  
 M-GL-02096 v1.0



illumina®