

# Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Solution rapide et flexible pour  
détecter les mutations de faible  
abondance dans l'ADNa

- Détectez les variants rares avec des fréquences alléliques aussi basses que 0,2 % à partir de seulement 20 ng d'ADNa extrait du plasma
- Préparez des bibliothèques prêtes pour le séquençage à partir de panels fournis par l'utilisateur en approximativement 8,5 à 9,5 heures avec une durée de manipulation de 2,5 à 3 heures
- Analysez les données et réalisez un appel des variants avec une sensibilité analytique élevée à l'aide de l'analyse secondaire DRAGEN<sup>MC</sup>

## Introduction

L'ADN acellulaire (ADNa) circulant dans le plasma est devenu un biomarqueur non invasif important dans le cancer, les maladies cardiovasculaires et la greffe d'organes. Dans le domaine de la recherche sur le cancer, le séquençage de l'ADNa à partir de biopsies liquides fournit des renseignements précieux sur l'hétérogénéité tumorale, permet le profilage des biomarqueurs et sert de complément ou d'alternative aux échantillons de biopsie tissulaire en cas de tissus difficiles à obtenir. Étant donné que les échantillons de plasma contiennent généralement de faibles quantités d'ADNa provenant de cellules d'intérêt, un test fiable et sensible est nécessaire pour détecter les variants somatiques rares. Les panels de gènes préconçus permettent l'identification des variants, mais ont une utilité limitée dans l'étude de nouvelles cibles et l'adaptation aux changements dans les gènes d'intérêt.

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment est une solution polyvalente de préparation de bibliothèques (tableau 1) qui exploite la puissance de la technologie de séquençage de nouvelle génération (SNG) pour obtenir une détection hautement sensible des variants de faible abondance dans les échantillons d'ADNa. Cette trousse haute performance fait partie d'un flux de travail intégré de l'ADNa aux résultats qui comprend la préparation de bibliothèques avec des panels fournis par l'utilisateur, suivie du séquençage sur les systèmes à débit moyen à élevé d'Illumina. L'analyse des données est effectuée à l'aide de l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment.

## Flux de travail rationalisé

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment fait partie d'un flux de travail de séquençage d'ADNa intégré, offrant une performance et une qualité des données excellentes. Le flux de travail évolutif commence par l'extraction de l'ADNa à partir de sang total ou de plasma, suivie par un séquençage sur les systèmes à débit moyen et élevé d'Illumina, et un appel des variants très précis à l'aide de l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment (figure 1). Cette solution conviviale offre des performances élevées dans une large gamme de tailles de contenu, est compatible avec l'automatisation de la manipulation des liquides et prend en charge le multiplexage des échantillons pour un développement efficace.

Tableau 1 : Présentation d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

| Paramètre                                    | Caractéristique  |
|--|--|
| Type d'ADN                                   | ADNa provenant de sang total ou de plasma              |
| Entrée d'ADN <sup>a</sup>                    | 10 à 30 ng   |
| Multiplexage des échantillons                | 192 index doubles uniques                              |
| Marquage des répétitions                     | Identifiants moléculaires uniques (IMU) non aléatoires |
| Plexité d'enrichissement                     | 1 ou 4 niveaux   |
| Systèmes de séquençage pris en charge        | Systèmes NextSeq et NovaSeq                            |
| Durée totale du flux de travail <sup>b</sup> | ~ 8,5 à 9,5 heures <sup>c</sup>                        |
| Durée de manipulation totale                 | ~ 2,5 à 3 heures                                       |

a. 20 ng d'entrée d'ADNa recommandés.

b. Comprend les étapes de préparation, d'enrichissement et de normalisation de bibliothèques.

c. Durées du flux de travail pour les sondes à simple brin et à double brin, respectivement.

## Préparation de bibliothèques rapide et flexible

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment est un test basé sur la ligation qui utilise une seule étape d'hybridation pour la préparation rapide de bibliothèques (figure 2). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment est compatible avec les oligonucléotides d'enrichissement fournis par l'utilisateur par Illumina ou des fournisseurs tiers, notamment l'ADN simple brin (ADNsb) d'Integrated DNA Technologies (IDT) et l'ADN double brin (ADNdb) de Twist Bioscience, pour un transfert de contenu amélioré. La trousse prend en charge des contenus de panel petits (55 à 200 kb d'ADNsb ou 70 à 200 kb d'ADNdb), moyens (> 200 à 750 kb d'ADNsb) et grands (> 750 à 2 000 kb d'ADNsb), offrant ainsi une conception d'étude modulable. Les bibliothèques prêtes pour le séquençage sont préparées en approximativement 8,5 à 9,5 heures, avec une durée de manipulation de seulement 2,5 à 3 heures environ, ce qui permet aux chercheurs de passer de l'extraction de l'ADNa au séquençage en une seule journée. Pour une efficacité et une flexibilité maximales, la trousse est compatible avec l'ADNa extrait directement du sang périphérique ou du plasma à l'aide de méthodes de purification par colonnes ou billes disponibles sur le marché.

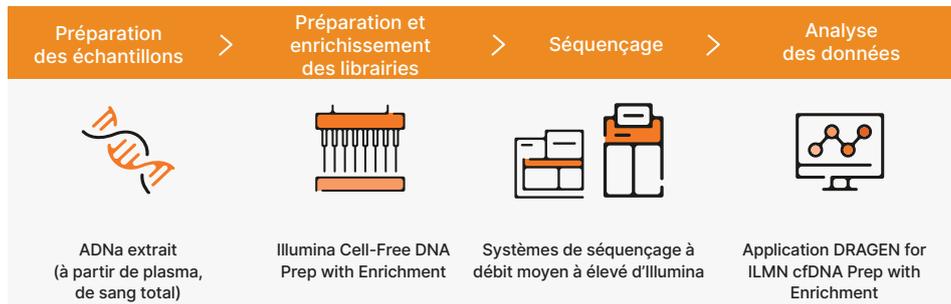


Figure 1 : De l'ADNa aux résultats à partir d'un seul partenaire : Illumina prend en charge un flux de travail rationalisé pour le séquençage de l'ADNa, de la préparation des bibliothèques à l'analyse des données. L'ADNa extrait est entré dans la préparation de bibliothèques à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Les bibliothèques sont séquençées selon l'échelle et les exigences de débit sur un système de séquençage Illumina. Une analyse secondaire précise et rapide et un appel des variants sont effectués avec l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App.

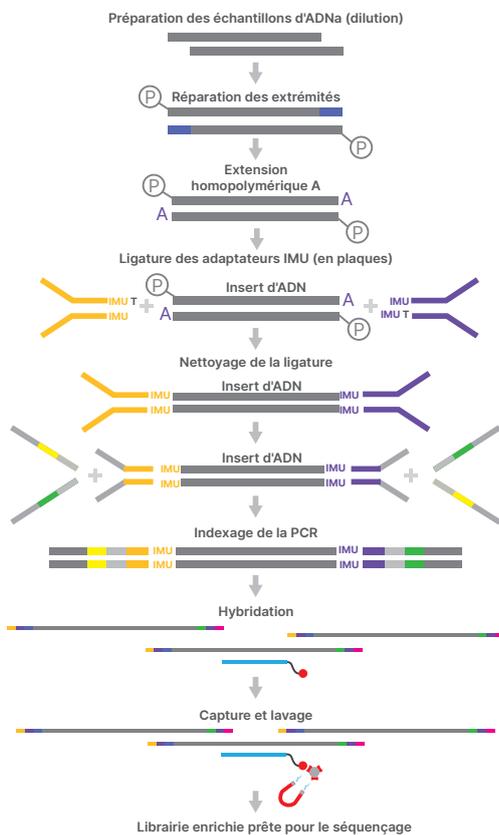


Figure 2 : Chimie Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment : tout d'abord, les fragments d'ADNa sont réparés et ligaturés à des identifiants moléculaires uniques (IMU) non aléatoires. Des index doubles uniques sont incorporés pour le multiplexage pendant l'amplification par PCR. Ensuite, les bibliothèques sont enrichies pour les régions d'intérêt ciblées avec des sondes biotinylées à l'aide d'une seule étape d'hybridation. Les bibliothèques enrichies sont amplifiées et normalisées pour le séquençage sur les systèmes de séquençage à débit moyen ou élevé d'Illumina.

Pour démontrer la compatibilité d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment avec une large gamme de tailles et de formats de panels d'enrichissement, les bibliothèques ont été préparées à partir de 20 ng d'ADNa avec des panels d'enrichissement petit (55 kb, ADNsb), moyen (250 kb) ou grand (2 000 kb) (tableau 2). Les bibliothèques préparées ont été séquençées sur NextSeq<sup>™</sup> 550 System (petit panel à 10 millions de lectures appariées par échantillon) ou sur NovaSeq<sup>™</sup> 6000 System (panels moyen et grand à 46 millions et 450 millions de lectures appariées par échantillon, respectivement). Les données ont été analysées avec l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace<sup>™</sup> Sequence Hub. Les résultats démontrent qu'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment offre une couverture par combinaison des IMU d'une profondeur > 1 500x et une uniformité de couverture élevée, évaluée par le pourcentage de cibles avec une couverture > 1 000x, dans les panels d'enrichissement à tailles et formats variables (figure 3).

Tableau 2 : Paramètres utilisés pour la conception du panel d'enrichissement

| Panel                | Taille   | Format de la sonde | Types de variants         |
|----------------------|----------|--------------------|---------------------------|
| Petit <sup>a</sup>   | 55 kb    | ADNsb 80 pb        | SNV, indels               |
| Moyen-A <sup>b</sup> | 250 kb   | ADNdb 120 pb       | SNV, indels, fusions      |
| Moyen-B <sup>c</sup> | 300 kb   | ADNsb 80 pb        | SNV, indels, fusions, VNC |
| Grand <sup>d</sup>   | 2 000 kb | ADNsb 80 pb        | SNV, indels, fusions, VNC |

- Les sondes ont été mises en plaques avec un chevauchement de 20 pb entre les régions de codage des gènes d'intérêt.
  - Les sondes ont été mises en plaques de bout en bout entre les régions de codage des gènes d'intérêt. Les points de rupture de fusion ont été ciblés avec des sondes qui se chevauchent à une mise en plaques de 2x.
  - Les sondes ont été mises en plaques avec un chevauchement de 20 pb entre les régions de codage des gènes d'intérêt et les points de rupture de fusion. Pour la détection des VNC de gènes avec de petites régions codantes (p. ex. MYC), les sondes ont été complétées à faible densité entre les introns.
  - Conception personnalisée avec optimisation en laboratoire humide.
- SNV (Single Nucleotide Variant) : variant mononucléotidique; indel : insertion/suppression; VNC : variant du nombre de copies.

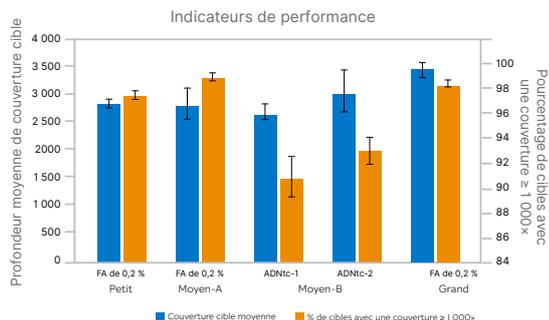


Figure 3 : Compatibilité avec une large gamme de tailles de panels : quatre répliquats de bibliothèques ont été préparés à partir de 20 ng d'ADNa à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment et séquencés sur NextSeq 550 System (pour le petit panel) ou NovaSeq 6000 System (pour les panels moyen et grand) à une profondeur de lecture moyenne de 10 millions, 46 millions ou 450 millions de lectures appariées pour les petit, moyen et grand panels, respectivement. Les données ont été analysées avec l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace Sequence Hub. Les panels petit et moyen ont été séquencés à une couverture exacte d'environ 30 000x et le grand panel à une couverture exacte d'environ 35 000x.

## Détection sensible des variants à faible fréquence

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment comprend des améliorations à la chimie de préparation des bibliothèques pour améliorer l'efficacité de conversion des bibliothèques et détecter les variants de faible abondance avec des fréquences alléliques de variants (FAV) aussi basses que 0,2 %. Pour démontrer les résultats de haute qualité obtenus à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, les scientifiques d'Illumina ont mené des études évaluant la capacité à appeler les variants mononucléotidiques (SNV), les variations du nombre de copies (VNC) et les fusions de gènes (figure 4, figure 5). Les bibliothèques préparées à l'aide d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ont été séquencées sur NextSeq 550 System (10 millions de lectures appariées par échantillon) ou NovaSeq 6000 System à des profondeurs élevées (46 millions et 450 millions de lectures appariées par échantillon pour les panels moyen et grand, respectivement). L'appel des variants a été effectué à l'aide de l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace Sequence Hub. Les résultats démontrent la capacité à détecter des mutations à une FAV de 0,2 % à partir de 20 ng d'ADNa pour les petits variants, avec une sensibilité analytique supérieure à 90 % (tableau 3) et une spécificité analytique de 99,98 %.

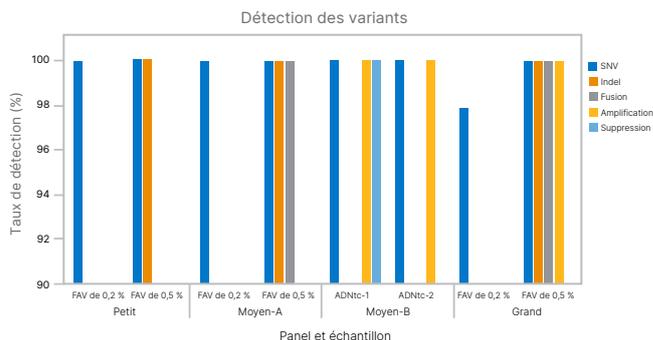


Figure 4 : Détection des variants à fréquence allélique de variants (FAV) basse : les bibliothèques Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ont été préparées à l'aide de 20 ng d'ADNa provenant d'échantillons de sang total enrichis de SNV à une fréquence allélique de variants (FAV) de 0,2 % ou à l'aide de 20 ng d'ADNa provenant de SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n° de référence 0710-0531). Les bibliothèques préparées ont été séquencées sur NextSeq 550 System (petit panel d'ADNsb de 55 kb) ou la plateforme NovaSeq 6000 (panel moyen de 250 kb et grand panel de 2 000 kb) à une profondeur de lecture moyenne de 10 millions, 46 millions ou 450 millions de lectures appariées pour les panels petit, moyen et grand, respectivement. L'appel des variants a été effectué à l'aide de l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace Sequence Hub. Les panels petit et moyen ont été séquencés à une couverture exacte d'environ 30 000x et le grand panel à une couverture exacte d'environ 35 000x.

Tableau 3 : Détection de variants de faible abondance avec une précision élevée

| Type de variant                                       | Sensibilité analytique <sup>a</sup> |
|---|-------------------------------------|
| Petits variants (FAV de 0,2 %)                        | ≥ 90 %                              |
| Indels (FAV de 0,5 %)                                 | ≥ 90 %                              |
| Amplifications géniques (modification de facteur 1,3) | ≥ 95 %                              |
| Suppression des gènes (modification de facteur 0,6)   | ≥ 95 %                              |
| Réarrangements de gènes (FAV de 0,5 %)                | ≥ 95 %                              |

a. La sensibilité analytique est définie comme étant le pourcentage de détection au niveau de variant énoncé.

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment prend en charge le multiplexage des échantillons et fournit un rappel précis des SNV, des insertions/suppressions (indel), des VNC et des fusions de gènes pour les bibliothèques enrichies à 1 et 4 niveaux (figure 5, figure 6).

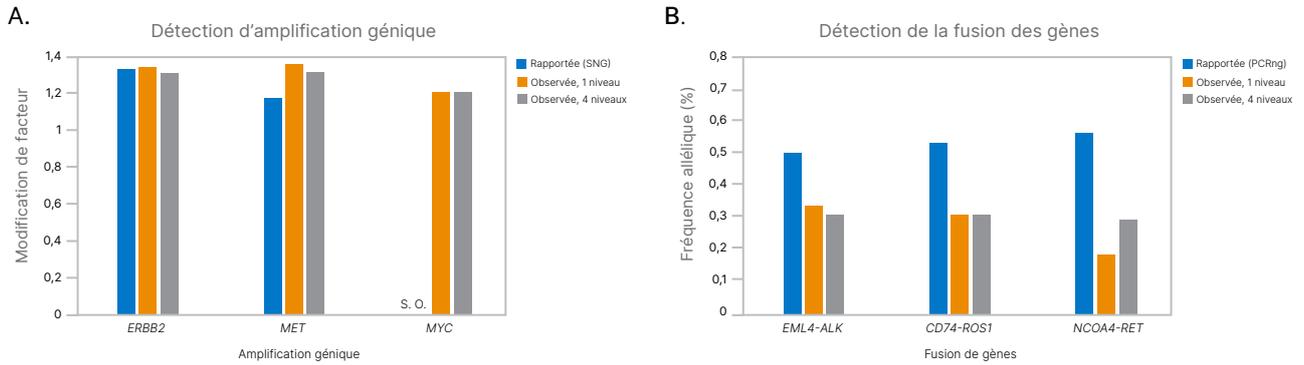


Figure 5 : Détection des amplifications géniques et des fusions de gènes de faible abondance : Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment démontre une excellente performance pour détecter les amplifications géniques (A) et les fusions de gènes (B) à l'aide de bibliothèques enrichies à 1 et 4 niveaux avec un contenu personnalisé. Les bibliothèques ont été préparées à partir de 20 ng d'ADNa provenant de SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0,5% (SeraCare, n° de référence 0710-0531). Quatre bibliothèques ont été enrichies individuellement avec un panel d'ADNsb 80 pb de 2 000 kb (1 niveau) et ces quatre mêmes bibliothèques ont été réenrichies avec le même panel suivant le format multiplex (4 niveaux). Les bibliothèques ont été séquencées sur NovaSeq 6000 System à une profondeur de lecture moyenne de 400 millions de lectures appariées (couverture exacte  $\geq 35\ 000\times$ ). Les données ont été analysées avec l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace Sequence Hub. Les trois amplifications et fusions de gènes dans l'échantillon de référence ont été détectées dans tous les réplicats de bibliothèques enrichies à 1 et 4 niveaux à la modification de facteur et à la fréquence allélique indiquées. Les divergences dans la FAV pour les fusions sont attribuées aux différences entre les méthodes de test. Remarque : SeraCare ne vérifie pas l'amplification génique MYC par les méthodes de SNG.

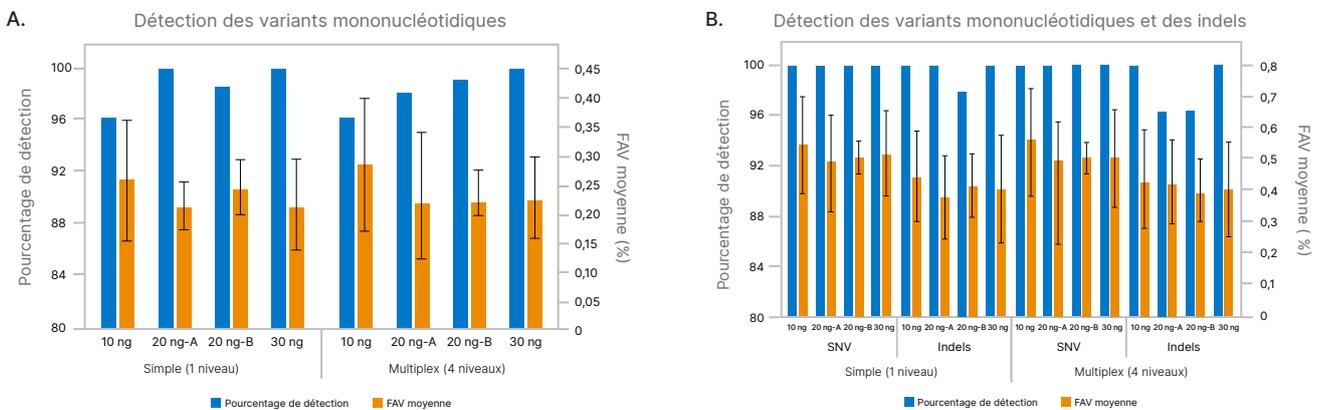


Figure 6 : Détection sensible de variants avec des bibliothèques enrichies à 1 et 4 niveaux : les bibliothèques Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ont été préparées à partir d'échantillons d'ADNa (10 ng, 20 ng ou 30 ng) enrichis de SNV à (A) une FAV de 0,2 % ou (B) une FAV de 0,5 % à l'aide d'ADNa provenant de SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n° de référence 0710-0531). Quatre bibliothèques ont été enrichies individuellement avec un panel d'ADNsb 80 pb de 180 kb (10 ng, 20 ng-A et 30 ng) ou un panel d'ADNdb 80 pb de 180 kb (20 ng-B) pour le format simple (1 niveau). Ces quatre mêmes bibliothèques ont été réenrichies avec le même panel pour le format multiplex (4 niveaux). Les bibliothèques ont été séquencées sur NextSeq 550 System à une profondeur de lecture moyenne de 33 millions de lectures appariées (couverture exacte  $\geq 30\ 000\times$ ). L'analyse des données et l'appel des variants ont été effectués avec l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace Sequence Hub.

## Performance optimisée avec tous les systèmes de séquençage d'Illumina

Pour démontrer l'excellente performance d'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment sur les systèmes à débit moyen et élevé d'Illumina, les bibliothèques ont été préparées à partir de 20 ng d'entrée d'ADNa à une FAV de 0,5 % à partir de SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n° de référence 0710-0531), enrichies avec un panel d'ADNdb 120 pb de 250 kb et séquencées sur NextSeq 550 System, NextSeq 2000 System ou NovaSeq 6000 System à une profondeur de lecture moyenne de 92 millions de lectures par échantillon à une couverture exacte d'environ 30 000×. La solution fiable et simple Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment produit des résultats fiables sur tous les systèmes de séquençage d'Illumina, offrant une couverture par combinaison des IMU d'une profondeur > 1 500× et une uniformité de couverture élevée, évaluée par le pourcentage de cibles avec une couverture > 1 000× (figure 7).

## Analyse intégrée des données

L'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment utilise des algorithmes bioinformatiques accélérés entièrement intégrés pour assurer une performance optimale du test. Le logiciel effectue la correction des erreurs fondée sur les IMU, l'alignement de la séquence

et l'appel des variants somatiques des variants de petite taille, des VNC et des fusions de gènes. L'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment s'exécute localement sur un serveur Illumina DRAGEN Server v4.0.3 de phase 4 ou sur l'instrument NovaSeq 6000Dx System (en mode recherche). Le pipeline d'analyse peut également être exécuté en tant qu'application infonuagique sur BaseSpace Sequence Hub. Il est également accessible via Illumina Connected Analytics (ICA), une plateforme infonuagique de génomique sécurisée permettant d'accroître l'analyse secondaire sans devoir acquérir et entretenir une infrastructure locale supplémentaire.

Le pipeline d'analyse intégré offre aux utilisateurs la flexibilité d'analyser leurs données en fonction des panels utilisés pour l'enrichissement des cibles, avec des options pour aligner leurs données de séquençage aux références hg19 ou hg38, effectuer des analyses spécifiques et personnaliser les flux de travail en fonction de leurs objectifs de recherche. Les fichiers de bruit fournis par l'utilisateur peuvent être utilisés pour filtrer le bruit propre au site et améliorer la détection des petits variants. Le logiciel permet également aux utilisateurs de marquer les variants d'hématopoïèse clonale, d'exclure des régions spécifiques de l'appel des petits variants, d'effectuer un appel précis des VNC et de détecter les points chauds somatiques avec une sensibilité analytique élevée à l'aide d'un fichier des points chauds somatiques personnalisé ou d'utiliser les régions de points chauds somatiques DRAGEN intégrées. Les utilisateurs accédant à l'application infonuagique DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment peuvent explorer encore plus d'options pour optimiser leur analyse en modifiant les seuils pour la combinaison des IMU et l'appel des petits variants.

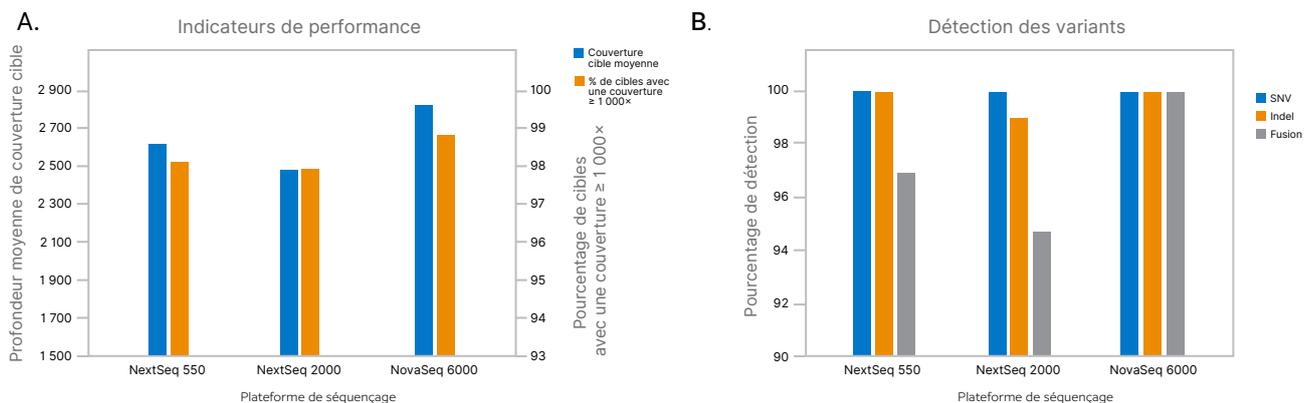


Figure 7 : Compatibilité avec les systèmes à débit moyen et élevé d'Illumina : les bibliothèques Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ont été préparées à partir de 20 ng d'ADNa avec une FAV connue de 0,5 % et enrichies avec un panel d'ADNdb 120 pb de 250 kb. Les bibliothèques ont été séquencées sur les systèmes NextSeq 550, NextSeq 2000 ou NovaSeq 6000 à une profondeur de lecture moyenne de 46 millions de lectures appariées et une couverture exacte ≥ 30 000×. Huit bibliothèques regroupées pour l'analyse à l'aide de NextSeq 550 System, 25 bibliothèques pour l'analyse à l'aide de NextSeq 2000 System et 51 bibliothèques sur une ligne de la Flow Cell S4 pour l'analyse à l'aide de NovaSeq 6000 System. L'analyse des données et l'appel des variants ont été effectués avec l'application DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment dans BaseSpace Sequence Hub.

## Flux de travail basé sur l'automatisation

ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment prend en charge les systèmes de manipulation de liquides pour automatiser la préparation des bibliothèques, permettant ainsi aux laboratoires de s'adapter aux exigences de débit variables. Grâce à un flux de travail automatisé, les laboratoires peuvent obtenir une manipulation d'échantillons hautement reproductibles, maintenir des résultats cohérents et accroître leur efficacité. L'automatisation permet également un ajustement rapide du débit sans augmenter la durée de manipulation. Il est possible d'obtenir une meilleure efficacité en adoptant les méthodes qualifiées d'ILLUMINA, disponibles auprès de nos partenaires en automatisation\* et examinées par ILLUMINA pour garantir la performance des méthodes et la qualité des données.

## Résumé

ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment est une solution polyvalente de préparation de bibliothèques optimisée pour une utilisation avec de l'ADNA à faible entrée extrait d'échantillons de plasma. Cette solution conviviale prend en charge une large gamme de tailles de panels et est compatible avec les panels d'enrichissement d'ILLUMINA ou de tiers, permettant ainsi une souplesse de contenu. Grâce à la solution ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, les chercheurs peuvent détecter les variations somatiques peu fréquentes avec une sensibilité analytique exceptionnelle. La solution ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment haute performance, combinée au séquençage sur les puissants systèmes de séquençage d'ILLUMINA et à l'analyse accélérée des données, fournit un flux de travail de séquençage de l'ADNA de haute qualité, allant du traitement des échantillons à l'analyse des données, à partir d'un seul partenaire de confiance.

\* Méthodes qualifiées d'ILLUMINA disponibles fin 2024.

## En savoir plus

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

## Renseignements relatifs à la commande

| Produit   | N° de référence |
|---|-----------------|
| ILLUMINA Cell-Free DNA Prep, Ligation (16 échantillons)                                       | 20104105        |
| ILLUMINA Cell-Free DNA Prep, Ligation (96 échantillons)                                       | 20104106        |
| ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (16 échantillons)                       | 20104107        |
| ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 échantillons, 4 niveaux)           | 20104103        |
| ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 échantillons, 4 niveaux), sur site | 20104104        |
| IDT for ILLUMINA UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 index, 96 échantillons)           | 20034701        |
| IDT for ILLUMINA UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 index, 96 échantillons)           | 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        |



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566  
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 ILLUMINA, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'ILLUMINA, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
 M-GL-02096 FRA v1.0