

Rilevamento di varianti somatiche rare in campioni di tumore FFPE mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

- Gli identificatori molecolari univoci per la correzione degli errori consentono una maggiore accuratezza durante il sequenziamento
- Il kit è compatibile con i pannelli di arricchimento forniti dall'utente per una progettazione sperimentale flessibile
- Il flusso di lavoro scalabile ospita il DNA estratto sia da campioni di biopsia liquida sia da campioni di tessuto FFPE



Introduzione

I campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) sono un'importante fonte di materiali disponibili per la caratterizzazione molecolare del tumore. Sfortunatamente, il processo di fissazione e inclusione in paraffina dei campioni di tessuto può causare frammentazione, crosslinking o modifiche chimiche degli acidi nucleici.¹ Ciò porta a una qualità di acido nucleico bassa o variabile che può rendere difficile l'analisi genetica del tumore, specialmente per il rilevamento di mutazioni rare. Di conseguenza, sono necessari flussi di lavoro di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) solidi e sensibili per elaborare i materiali di input dai campioni FFPE per l'analisi a valle.

La combinazione dei risultati dell'analisi genomica della biopsia tissutale con i dati complementari della biopsia liquida fornisce informazioni esaustive sulla biologia del tumore. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment è un kit versatile utilizzabile per preparare librerie pronte per il sequenziamento sia da DNA libero circolante (cfDNA, cell-free DNA) sia da DNA genomico (gDNA, genomic DNA) estratto da campioni di tessuto FFPE (Figura 1). Il flusso di lavoro include gli identificatori molecolari univoci (UMI, unique molecular identifier) per la correzione degli errori e la riduzione dei falsi positivi, consentendo un rilevamento accurato e sensibile delle mutazioni a bassa frequenza nei campioni di tumore FFPE. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment è compatibile con le sonde o i pannelli di arricchimento Illumina e di terze parti per supportare una progettazione sperimentale flessibile. Questa nota sull'applicazione dimostra le eccellenti prestazioni di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment nella generazione di librerie NGS di alta qualità e nell'identificazione di varianti somatiche a bassa frequenza utilizzando campioni FFPE.

Metodi

Campioni

Le librerie sono state preparate da una combinazione di campioni di tessuto umano FFPE e linee cellulari in FFPE (Tabella 1). Le linee cellulari FFPE testate provenivano da Horizon Discovery (n. di catalogo HD301 e HD653) e SeraCare Life Sciences* (FFPE TST Custom DNAv2). I campioni di tessuto umano FFPE sono stati forniti da Illumina Biological Specimen Inventory System. Il DNA FFPE è stato estratto utilizzando il kit FFPE AllPrep DNA/RNA (QIAGEN, n. di catalogo 80234), quantificato con il kit Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo Q32850) e qualificato utilizzando il TruSeq Custom Amplicon Dx-FFPE QC kit (Illumina, n. di catalogo 20006259).

Frammentazione del DNA

La frammentazione (shearing) meccanica è stata utilizzata per la frammentazione del DNA. Il DNA estratto da campioni FFPE è stato diluito in tampone Tris-EDTA (TE) a 0,23 ng/μl per input di 10 ng, 0,45 ng/μl per input di 20 ng o 0,90 ng/μl per input di 40 ng. Successivamente, 52 μl di ciascun campione diluito sono stati sottoposti a sonicazione in un pozzetto di una striscia da otto provette microTUBE (Covaris, n. di catalogo 520053) utilizzando il Covaris LE220 Focused-ultrasonicator (Tabella 2).

*SeraCare Life Sciences ora fa parte della diagnosi LCG.



Figura 1: flusso di lavoro dell'Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment per l'elaborazione di campioni FFPE.

Tabella 1: campioni analizzati mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

ID campione	Tipo di campione	Origine del campione	Valore ΔCq
8752	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del polmone non a piccole cellule	5,7
315	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del polmone non a piccole cellule	5,5
4075	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del colon-retto	4,2
679	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del seno	4,1
11883	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del colon-retto	2,9
3952	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del seno	2,2
448	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del polmone non a piccole cellule	2,1
449	Tessuto FFPE (umano)	Cancro del polmone non a piccole cellule	1,5
FFPE TST Custom DNAv2	Linea cellulare FFPE	N/A	0,87
HD653	Linea cellulare FFPE	N/A	-1,23
HD301	Linea cellulare FFPE	N/A	-1,87

Tabella 2: impostazioni di frammentazione (shearing) raccomandate per i Covaris ultrasonicator

Impostazione	Covaris LE220	Covaris E220	Covaris ME220
Potenza momento di picco	450 watt	175 watt	50 watt
Fattore di utilizzazione	30%	10%	30%
Cicli per pulsazioni	200	200	1.000
Durata del trattamento	250 s	280 s	10 s
Temperatura	7 °C	7 °C	12 °C
Ripetizioni impulsi	N/A	N/A	20
Potenza media	N/A	N/A	15 watt
Altro	N/A	Intensificatore	Guida onde

I dati per questo studio sono stati generati utilizzando Covaris LE220 Focused-ultrasonicator.

Preparazione delle librerie e arricchimento

Dopo la sonicazione, le librerie sono state preparate a partire da DNA frammentato secondo le istruzioni dettagliate fornite nella guida per l'utente di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Sono stati utilizzati protocolli di arricchimento specifici a seconda del tipo di pannello e del formato di arricchimento. Per questo studio, sono stati utilizzati due pannelli di arricchimento: un pannello personalizzato da 80 bp di DNA a singolo filamento (ssDNA, single-stranded DNA) da 2.000 kb e un pannello di arricchimento da 120 bp di DNA a doppio filamento (dsDNA, double-stranded DNA) da 37,5 Mb di Illumina Exome 2.5. L'arricchimento è stato eseguito attenendosi al flusso di lavoro di arricchimento di 1 plex o di 4 plex descritto nella [guida per l'utente di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#).

Sequenziamento

Le librerie arricchite utilizzando l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel sono state sequenziate[†] sul NovaSeq™ 6000 System a una lunghezza di lettura di 2 × 151 bp. Tutte le altre librerie sono state sequenziate sul NextSeq™ 550 System a una lunghezza di lettura di 2 × 149 bp.

[†] Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment è compatibile con tutti i sistemi Illumina a media e alta processività. Tuttavia, le prestazioni delle librerie ottenute utilizzando campioni FFPE sono state dimostrate solo sul NovaSeq 6000 System e sul NextSeq 550 System.

Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati basata sul cloud, i dati di sequenziamento non elaborati (file BCL) sono stati messi in demultiplex e convertiti in file FASTQ in BaseSpace™ Sequence Hub. L'analisi secondaria a valle è stata eseguita con DRAGEN™ Enrichment App v4.0.3 abilitando Somatic Small Variant Caller con le impostazioni predefinite. UCSC hg 19 Alt-Aware è stato utilizzato come genoma umano di riferimento. Le impostazioni UMI sono state attivate, con l'identificazione di varianti compatibili con UMI impostata su "Low Depth" (Bassa profondità). Il numero minimo di letture di supporto per UMI è stato impostato su 1. È stata abilitata l'annotazione delle varianti mediante Illumina Connected Annotation (precedentemente noto con il nome di Nirvana) per la marcatura della linea germinale, con ulteriori argomenti della riga di comando DRAGEN.† Le varianti di passaggio sono state filtrate utilizzando bcftools 1.17 e confrontate con le varianti empiriche vere utilizzando rtg vcfeval 3.12.1.

Risultati

Per dimostrare le eccellenti prestazioni di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment nella generazione di librerie di sequenziamento di alta qualità da DNA FFPE, sono state valutate le metriche delle prestazioni chiave per il DNA estratto da linee cellulari FFPE e campioni di tumore FFPE.

Eccellenti metriche delle prestazioni delle librerie per campioni FFPE

La copertura media del target è stata valutata a due profondità di sequenziamento, 10 milioni e 20 milioni di cluster, per assicurarsi che le librerie preparate avessero la profondità di copertura necessaria nelle regioni target per consentire il rilevamento di varianti a bassa abbondanza. I risultati dimostrano che il DNA FFPE di alta qualità ($\Delta Cq \leq 2$) genera librerie che raggiungono una profondità di copertura target media superiore a 100× anche a input di DNA di appena 10 ng (Figura 2). La copertura diminuisce con una scarsa qualità del campione (ΔCq più elevato), ma può essere migliorata con un sequenziamento più profondo o un input maggiore (Figura 2B). Il kit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment produce librerie con lunghezza del frammento superiore a 110 bp e fornisce dati di sequenziamento di alta qualità, valutati come arricchimento della lettura e percentuale di target con copertura di almeno 50× per i campioni FFPE con $\Delta Cq \leq 4$ (Figura 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

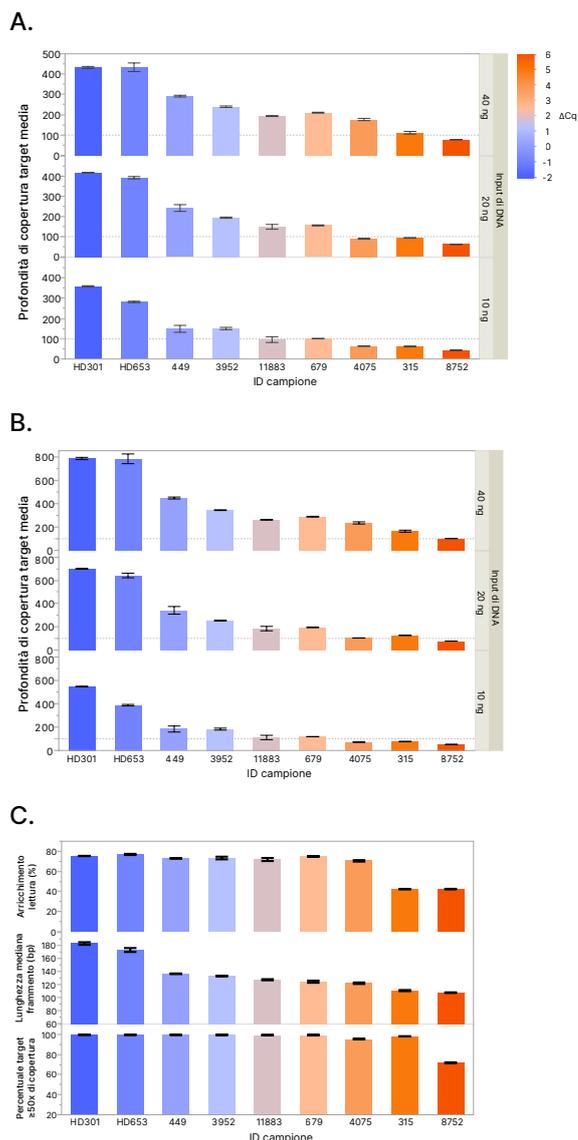


Figura 2: metriche delle prestazioni per le librerie preparate da campioni FFPE utilizzando Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Le librerie triplicate sono state preparate utilizzando DNA estratto da linee cellulari FFPE (HD301 e HD653) e tessuti FFPE da tumori del seno, del colon e del polmone di qualità e quantità di input variabili (10 ng, 20 ng e 40 ng). I campioni sono rappresentati graficamente da sinistra a destra in ordine decrescente di qualità, come indicato dal valore ΔCq , dove il blu è rappresentato da campioni di massima qualità e il rosso indica quelli di qualità minima. Le librerie sono state arricchite con un pannello di ssDNA 2.000 kb da 80 bp e sequenziate sul NextSeq 550 System a 2×149 bp. La copertura target media è stata valutata a due profondità di lettura, (A) 10 milioni e (B) 20 milioni di cluster. (C) Altre metriche delle prestazioni delle librerie per campioni FFPE. I dati mostrati si riferiscono a DNA di input da 20 ng e 20 milioni di cluster.

Rilevamento sensibile delle varianti a bassa frequenza

La sensibilità del kit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment per il rilevamento delle varianti di singolo nucleotide (SNV, single nucleotide variant) e delle mutazioni di inserzione e delezione (indel) è stata determinata utilizzando una linea cellulare FFPE personalizzata che trasporta le varianti associate al cancro (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ha dimostrato un'elevata sensibilità analitica, con la capacità di rilevare circa il 90% delle SNV tra l'1% e il 2% della frequenza allelica delle varianti (VAF, variant allele frequency) (Figura 3, Tabella 3). La sensibilità per il rilevamento di indel superiori al 2% di VAF era maggiore dell'80% (Figura 3, Tabella 3).

Compatibilità con i formati di arricchimento 1 plex e 4 plex

Sono state ottenute metriche delle prestazioni comparabili, tra cui la profondità media della copertura target, la percentuale di target con copertura di almeno 50x e la percentuale di arricchimento della lettura per i formati di arricchimento sia 1 plex sia 4 plex su campioni di qualità compresa tra ΔCq 1,5 e 4,2 (Figura 4).

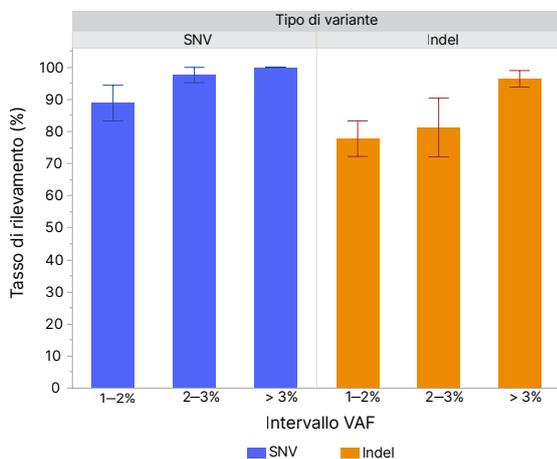
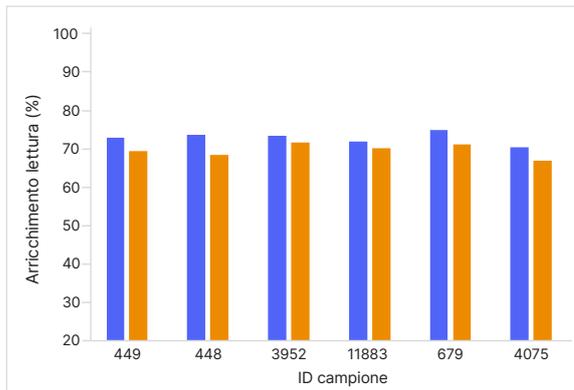
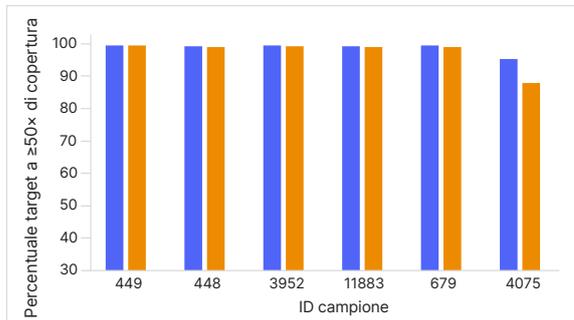
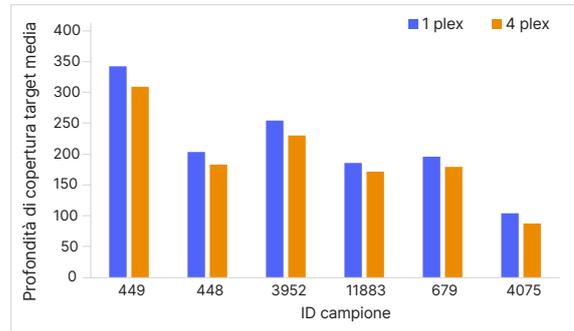


Figura 3: rilevamento delle varianti a basse frequenze alleliche. Le varianti sono state diluite ad almeno tre livelli di frequenza allelica target con DNA FFPE da un campione di linea cellulare wild-type (GM24385). Sei replicati delle librerie sono stati preparati con 10 ng di DNA di input per livello di frequenza allelica e arricchiti con un pannello di ssDNA 2.000 kb da 80 bp seguendo il flusso di lavoro di arricchimento 1 plex. Le librerie sono state sequenziate sul NextSeq 550 System a 2×149 bp. Le letture di sequenziamento sono state sottocampionate in 20 milioni di cluster. È stato valutato il tasso di rilevamento (n/6) per ciascun tipo di variante a diversi intervalli VAF.



Qualità del campione (ΔCq)

1,5

2,9

4,2

Figura 4: metriche delle prestazioni nei formati di arricchimento 1 plex e 4 plex. Le librerie di campioni di tessuto di DNA FFPE selezionati (DNA di input da 20 ng) di diversi ΔCq sono state arricchite singolarmente con un pannello di ssDNA 2.000 kb da 80 bp (barre blu 1 plex). Le stesse librerie sono state nuovamente arricchite con lo stesso pannello seguendo il formato di arricchimento multiplex (barre arancioni 4 plex). Le librerie sono state sequenziate sul NextSeq 550 System a 2×149 bp e le letture di sequenziamento sono state sottocampionate a 20 milioni di cluster.

Tabella 3: riepilogo delle singole varianti somatiche rilevate mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

COSMIC ID	Gene	Tipo di variante	Modifica dell'amminoacido	VAF rilevata (%) ^a	N. di replicati rilevati ^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. Media dei replicati rilevati.
b. Su 6 replicati totali.

Eccellenti prestazioni delle librerie con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

Il kit Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel ha generato in modo coerente librerie di lunghezza superiore a 150 bp da linee cellulari FFPE (Figura 5). Sono state ottenute metriche ad alte prestazioni per tutte le librerie preparate con input maggiori di 20 ng, inclusi arricchimento delle letture, percentuale di letture allineate e uniformità della copertura. Le metriche delle prestazioni erano paragonabili tra le librerie arricchite con 1 plex e 4 plex.

Rilevamento sensibile delle varianti con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel

L'impatto della profondità di sequenziamento sulla copertura target media e sul rilevamento delle varianti è stato valutato per le librerie arricchite utilizzando l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. I risultati dimostrano che è stata raggiunta una copertura target media fino a 500× quando otto librerie di esomi sono state sequenziate in una corsia di celle a flusso NovaSeq 6000 S4 (Figura 6). Quando le letture di sequenziamento sono state sottocampionate a 200 milioni e 400 milioni di letture totali che attraversano il filtro, le librerie hanno raggiunto una copertura target media rispettivamente di circa 150× e circa 300×, indipendentemente dalle quantità di input e dal numero di plex di arricchimento.

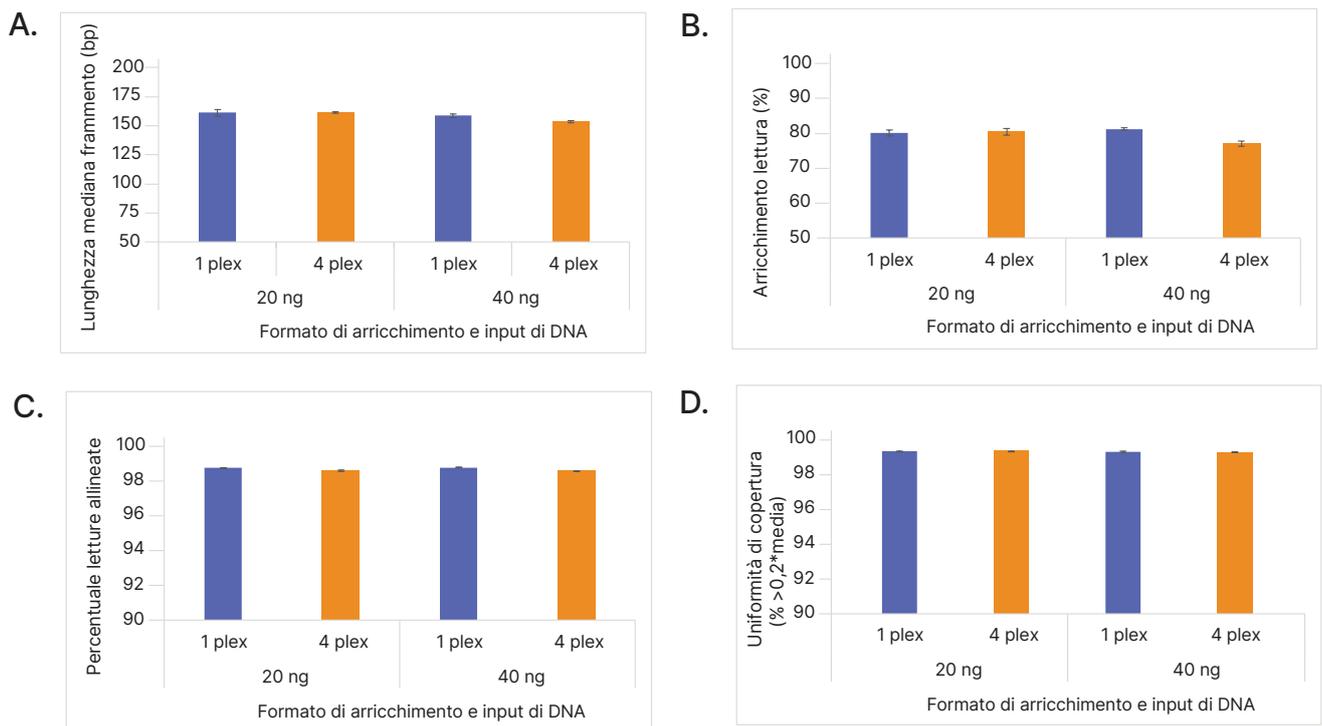


Figura 5: metriche delle prestazioni delle librerie con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Quattro replicati delle librerie sono stati preparati mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment da una linea cellulare FFPE personalizzata che trasporta varianti associate al cancro (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Le varianti sono state diluite a una frequenza allelica target di circa il 2% e le librerie sono state preparate con DNA di input di 20 ng o 40 ng. L'arricchimento è stato eseguito con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel seguendo il flusso di lavoro di arricchimento 1 plex o 4 plex per le sonde dsDNA nella guida per l'utente di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Otto librerie arricchite con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel sono state sequenziate in base alla corsia S4 sul NovaSeq 6000 System a 2 × 151 bp. I dati di sequenziamento sono stati sottocampionati in 200 milioni di cluster (o 400 milioni di letture totali che attraversano il filtro) e le metriche delle prestazioni delle librerie sono state confrontate tra i due input.

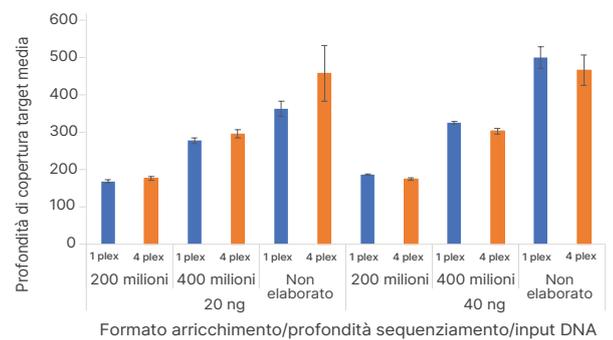
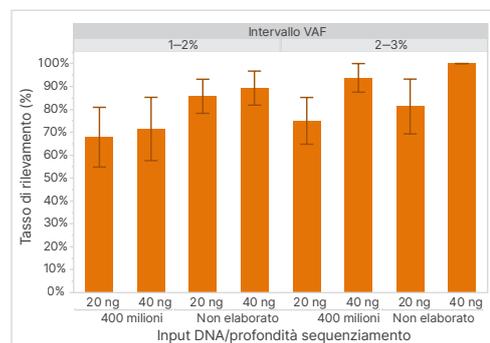


Figura 6: copertura target media ottenuta con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Quattro replicati delle librerie sono stati preparati mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment da 20 ng o 40 ng di DNA derivato da una linea cellulare FFPE personalizzata che trasporta varianti associate al cancro (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Le varianti sono state diluite a una frequenza allelica mirata di circa il 2%. L'arricchimento è stato eseguito con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel seguendo il flusso di lavoro di arricchimento 1 plex (barre blu) o 4 plex (barre arancioni) per le sonde dsDNA. Otto librerie sono state sequenziate in base alla corsia S4 sul NovaSeq 6000 System a 2×151 bp. I dati di sequenziamento sono stati sottocampionati in 100 milioni o 200 milioni di cluster (200 milioni o 400 milioni di letture totali che attraversano il filtro) e sono state valutate le metriche delle prestazioni delle librerie. Le letture non elaborate variavano da 296 milioni a 417 milioni di cluster (da 592 milioni a 834 milioni di letture totali che attraversano il filtro) per 1 plex o da 319 milioni a 544 milioni di cluster (da 638 milioni a 1,08 miliardi di letture totali che attraversano il filtro) per le librerie arricchite 4 plex.

Le librerie in multiplex (4 plex) preparate mediante l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel hanno ottenuto una sensibilità dell'80% per le SNV tra il 2% e il 3% di VAF quando le letture per le librerie da 20 ng sono state sottocampionate a 200 milioni di cluster. Il tasso di rilevamento delle SNV è migliorato con un input di 40 ng o con un sequenziamento più profondo, in particolare per le varianti comprese nell'intervallo VAF 1%-2% (Figura 7A). Le librerie in multiplex preparate utilizzando l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel hanno dimostrato una sensibilità dell'80%-90% per indel tra il 2% e il 3% di VAF, a seconda della quantità di input e della profondità di sequenziamento. Oltre il 3% di VAF, il 100% degli indel è stato rilevato a 20 ng e 40 ng di quantità di input (Figura 7B).

A. Rilevamento SNV



B. Rilevamento indel

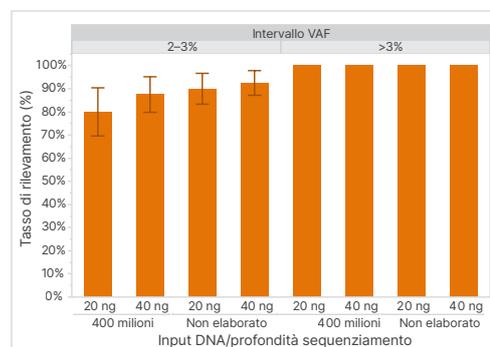


Figura 7: rilevamento delle varianti somatiche ottenuto con l'Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel. Quattro replicati delle librerie sono stati preparati mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment da 20 ng o 40 ng di DNA derivato da una linea cellulare FFPE personalizzata che trasporta varianti associate al cancro (FFPE TST Custom DNAv2, SeraCare). Le varianti sono state diluite a una frequenza allelica mirata di circa il 2%. L'arricchimento è stato eseguito con Illumina Exome 2.5 Enrichment Panel seguendo il flusso di lavoro di arricchimento 4 plex per le sonde dsDNA. Otto librerie sono state sequenziate in base alla corsia S4 sul NovaSeq 6000 System a 2×151 bp. I dati di sequenziamento sono stati sottocampionati in 200 milioni di cluster (400 milioni di letture totali che attraversano il filtro) e sono state valutate le metriche delle prestazioni delle librerie. Le letture non elaborate variavano da 319 milioni a 544 milioni di cluster (da 638 milioni a 1,08 miliardi di letture totali che attraversano il filtro) per le librerie arricchite.

Riepilogo

La preparazione di librerie di alta qualità da DNA FFPE è un fattore chiave nelle prestazioni della caratterizzazione molecolare del tumore basata su NGS. Questa nota sull'applicazione dimostra le eccellenti prestazioni di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment nella preparazione di librerie pronte per il sequenziamento da DNA estratto da campioni FFPE, che forniscono dati accurati per l'identificazione delle varianti somatiche e l'analisi a valle. Questo versatile kit di preparazione delle librerie è compatibile con i pannelli di arricchimento forniti dall'utente fino alle dimensioni dell'esoma e fornisce la portabilità dei contenuti, consentendo ai laboratori di personalizzare il proprio progetto sperimentale in base alle proprie esigenze di ricerca.

Maggiori informazioni

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

[DRAGEN Enrichment App](#)

[DRAGEN recipe for analyzing FFPE sample libraries prepared using Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#)

Bibliografia

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.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.
Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02524 ITA v1.0