

illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Solución rápida y flexible
para detectar mutaciones de
baja abundancia en ADNec

- Detecte variantes raras con frecuencias alélicas de hasta el 0,2 % a partir de tan solo 20 ng de ADNec extraído del plasma.
- Prepare librerías listas para el secuenciador a partir de paneles suministrados por el usuario en unas 8,5 o 9,5 horas con un tiempo de participación activa de 2,5 a 3 horas.
- Analice los datos y las variantes de llamada con una alta sensibilidad analítica mediante el análisis secundario DRAGEN™.

illumina®

Introducción

El ADN extracelular circulante (ADNec) en plasma ha surgido como un importante biomarcador no invasivo de enfermedad en el cáncer, la enfermedad cardiovascular y el trasplante de órganos. En el campo de la investigación oncológica, la secuenciación del ADNec a partir de biopsias líquidas proporciona una valiosa información sobre la heterogeneidad del tumor, permite la creación de perfiles de biomarcadores y sirve como complemento o alternativa a las muestras de biopsia de tejido cuando el tejido no está fácilmente disponible. Dado que las muestras de plasma suelen contener cantidades bajas de ADNec de las células de interés, resulta necesario un ensayo sólido y sensible para detectar variantes somáticas raras. Los paneles de genes fijos permiten la identificación de variantes, pero su utilidad es limitada para estudiar nuevos objetivos y adaptar los cambios en los genes de interés.

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment es una solución de preparación de librerías versátil (tabla 1) que aprovecha la capacidad de la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) para lograr una detección muy sensible de variantes de baja abundancia en muestras de ADNec. Este kit de alto rendimiento forma parte de un flujo de trabajo integrado, que permite pasar del ADNec a los resultados e incluye la preparación de librerías con paneles proporcionados por el usuario, seguido de la secuenciación en sistemas de productividad media a alta de Illumina. El análisis de datos se realiza con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App.

Flujo de trabajo optimizado

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment forma parte de un flujo de trabajo integrado de secuenciación de ADNec, que ofrece un rendimiento y una calidad de los datos excelentes. El flujo de trabajo flexible comienza con ADNec extraído de sangre completa o plasma, seguido de la secuenciación en los sistemas con una productividad media y alta de Illumina y la llamada de variantes de alta precisión con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App (figura 1). Esta solución fácil de usar ofrece un alto rendimiento en una amplia gama de tamaños de contenido, es compatible con la automatización de la manipulación de líquidos y admite el multiplexado de muestras para un escalado eficiente.

Tabla 1: Descripción general de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Parámetro	Especificación
Tipo de ADN	ADNec de sangre completa o plasma
Entrada de ADN ^a	10-30 ng
Multiplexado de muestras	192 índices dobles únicos
Marcado de duplicados	Identificadores moleculares únicos (UMI, unique molecular identifiers) no aleatorios
Plexicidad de enriquecimiento	1 unidad de plexado o 4 unidades de plexado
Sistemas de secuenciación compatibles	NextSeq System y NovaSeq System
Tiempo total de flujo de trabajo ^b	~8,5-9,5 horas ^c
Tiempo de participación activa total	~2,5-3 horas

a. Se recomienda una entrada de 20 ng de ADNec.

b. Incluye los pasos de preparación de librerías, enriquecimiento y normalización.

c. Tiempos de flujo de trabajo para sondas de una sola cadena y de cadena doble, respectivamente.

Preparación de librerías rápida y flexible

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment es un ensayo basado en la ligadura que utiliza un paso de hibridación única para la preparación rápida de librerías (figura 2). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment es compatible con los oligonucleótidos de enriquecimiento proporcionados por el usuario de Illumina o de proveedores terceros, incluido el ADN de una sola cadena (ssDNA, single-stranded DNA) de Integrated DNA Technologies (IDT) y ADN de cadena doble (dsDNA, double-stranded DNA) de Twist Bioscience, para mejorar la portabilidad de contenido. El kit admite contenido de panel pequeño (ssDNA de 55-200 kb o dsDNA de 70-200 kb), mediano (ssDNA de más de 200-750 kb) y grande (ssDNA de más de 750-2000 kb), lo que permite un diseño flexible del estudio. Las librerías listas para el secuenciador se preparan en aproximadamente 8,5 a 9,5 horas, con un tiempo de participación activa de solo unas 2,5 a 3 horas, lo que permite a los investigadores obtener la secuenciación del ADNec extraído en un solo día. Para conseguir la máxima eficiencia y flexibilidad, el kit es compatible con ADNec extraído directamente de sangre periférica o plasma utilizando métodos de purificación basados en columnas o bolas comerciales disponibles.

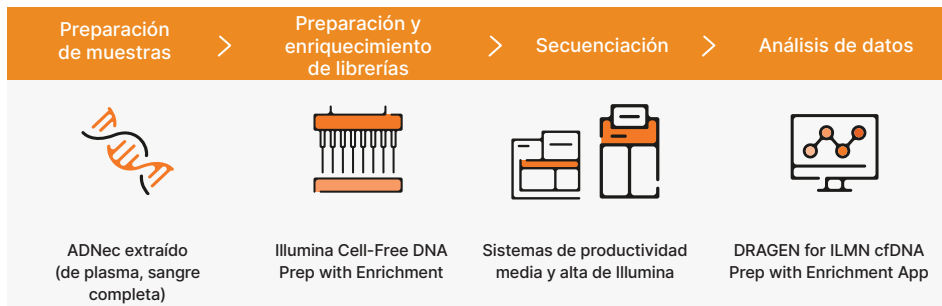


Figura 1: paso del ADNec a los resultados con un único socio. Illumina admite un flujo de trabajo optimizado para la secuenciación del ADNec, desde la preparación de librerías hasta el análisis de datos. El ADNec extraído se introduce en la preparación de librerías mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Las librerías se secuencian según las necesidades de escala y productividad en un sistema de secuenciación de Illumina. Con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App se realizan un análisis secundario y una llamada de variantes rápidos y precisos.

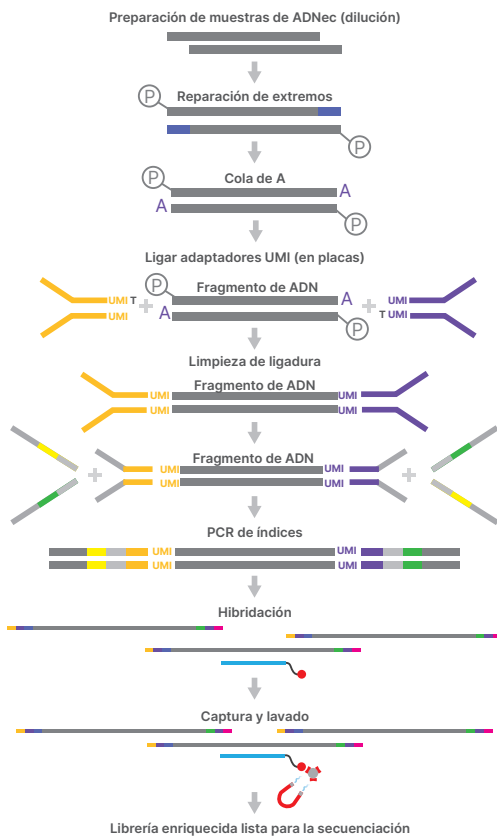


Figura 2: química de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. En primer lugar, los fragmentos de ADNec se reparan y ligan a identificadores moleculares únicos (UMI) no aleatorios. Se incorporan índices dobles únicos para el multiplexado durante la amplificación PCR. A continuación, las librerías se enriquecen para regiones objetivo de interés con sondas biotiniladas mediante un paso de hibridación única. Las librerías enriquecidas se amplifican y normalizan para la secuenciación en sistemas de secuenciación de productividad media o alta de Illumina.

A fin de demostrar la compatibilidad de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment con una gama de tamaños y formatos de paneles de enriquecimiento, se prepararon librerías a partir de 20 ng de ADNec con paneles de enriquecimiento pequeños (ssDNA de 55 kb), medianos (250 kb) o grandes (2000 kb) (tabla 2). Las librerías preparadas se secuenciaron en NextSeq™ 550 System (panel pequeño con 10 millones de lecturas «paired-end» por muestra) o en NovaSeq™ 6000 System (paneles medianos con 46 millones y grandes con 450 millones de lecturas «paired-end» por muestra). Los datos se analizaron con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace™ Sequence Hub. Los resultados demuestran que Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment ofrece una profundidad de cobertura colapsada por UMI >1500x y una alta uniformidad de cobertura, evaluada por el porcentaje de objetivos con una cobertura >1000x, en paneles de enriquecimiento con diferentes tamaños y formatos (figura 3).

Tabla 2: Parámetros utilizados para el diseño del panel de enriquecimiento

Panel	Tamaño	Formato de sonda	Tipos de variante
Pequeño ^a	55 kb	ssDNA de 80 pb	SNV e indels
Mediano-A ^b	250 kb	dsDNA de 120 pb	SNV, indels y fusiones
Mediano-B ^c	300 kb	ssDNA de 80 pb	SNV, indels, fusiones y CNV
Grande ^d	2000 kb	ssDNA de 80 pb	SNV, indels, fusiones y CNV

- Las sondas se colocaron en placas con un solapamiento de 20 pb entre regiones de codificación para genes de interés.
- Las sondas se colocaron en placas de extremo a extremo entre regiones de codificación para genes de interés. Los puntos de ruptura de la fusión objetivo se seleccionaron con sondas solapadas en placas de 2x.
- Las sondas se colocaron en placas con un solapamiento de 20 pb entre regiones de codificación para genes de interés y entre puntos de ruptura de la fusión. En la detección de CNV de genes con regiones de CDS pequeñas (p. ej., MYC), las sondas se complementaron a baja densidad en los intrones.
- Diseño personalizado con optimización en laboratorio. SNV, variante de nucleótido único; indel, variante de inserción y delección; CNV, variante en el número de copias.

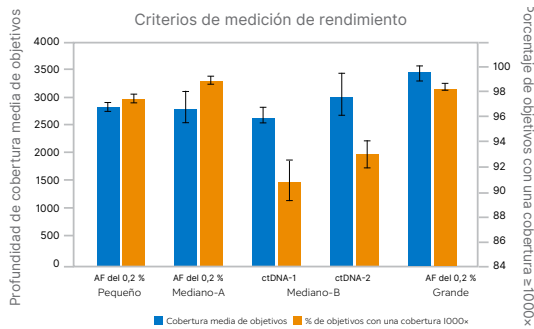


Figura 3: compatibilidad con diversos tamaños de panel.

Se prepararon cuatro réplicas de librerías a partir de 20 ng de ADNec con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment y se secuenciaron en NextSeq 550 System (en el caso de los paneles pequeños) o NovaSeq 6000 System (en el caso de los paneles medianos y grandes) con una profundidad de lectura promedio de 10 millones, 46 millones o 450 millones de lecturas «paired-end» de los paneles pequeños, medianos y grandes, respectivamente. Los datos se analizaron con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace Sequence Hub. Los paneles pequeños y medianos se secuenciaron a aproximadamente 30 000 \times y el panel grande se secuenció a aproximadamente 35 000 \times de cobertura en el objetivo.

Detección sensible de variantes de baja frecuencia

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment incluye mejoras en la química de preparación de librerías para mejorar la eficiencia de conversión de librerías y detectar variantes de baja abundancia con frecuencias alélicas de variantes (VAF, variant allele frequency) de hasta el 0,2 %. A fin de demostrar los resultados de alta calidad obtenidos con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, los científicos de Illumina realizaron estudios en los que se evaluó la capacidad de llamada de variantes de nucleótido único (SNV, single nucleotide variants), variantes en el número de copias (CNV, copy-number variants) y fusiones génicas (figura 4, figura 5). Las librerías preparadas con Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment se secuenciaron en NextSeq 550 System (10 millones de lecturas «paired-end» por muestra) o en NovaSeq 6000 System (paneles medianos con 46 millones y grandes con 450 millones de lecturas «paired-end» por muestra). La llamada de variantes se realizó con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace Sequence Hub. Los resultados demuestran la capacidad de detectar mutaciones con una VAF del 0,2 % a partir de tan solo 20 ng de ADNec en el caso de las variantes pequeñas, con más del 90 % de sensibilidad analítica (tabla 3) y el 99,98 % de especificidad analítica.

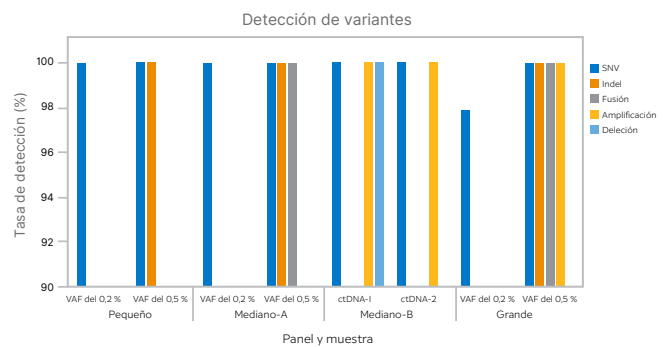


Figura 4: detección de variantes con baja frecuencia alélica de variantes (VAF). Las librerías de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment se prepararon con 20 ng de ADNec a partir de muestras de sangre completa a las que se añadieron SNV con una frecuencia alélica de variantes (VAF) del 0,2 % o con 20 ng de ADNec de SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0,5 % (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0531). Las librerías preparadas se secuenciaron en la plataforma NextSeq 550 System (panel pequeño de ssDNA de 55 kb) o NovaSeq 6000 (paneles medianos de 250 kb y grandes de 2000 kb) con una profundidad de lectura promedio de 10 millones, 46 millones o 450 millones de lecturas «paired-end» en el caso de los paneles pequeños, medianos y grandes, respectivamente. La llamada de variantes se realizó con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace Sequence Hub. Los paneles pequeños y medianos se secuenciaron a aproximadamente 30 000 \times y el panel grande a aproximadamente 35 000 \times de cobertura en el objetivo.

Tabla 3: Detección de variantes de baja abundancia con alta precisión

Tipo de variante	Sensibilidad del análisis ^a
Variantes pequeñas (VAF del 0,2 %)	≥ 90 %
Indels (VAF del 0,5 %)	≥ 90 %
Amplificaciones génicas (múltiplo de cambio de 1,3)	≥ 95 %
Deleciones génicas (múltiplo de cambio de 0,6)	≥ 95 %
Reordenaciones génicas (VAF del 0,5 %)	≥ 95 %

a. La sensibilidad del análisis se define como el porcentaje de detección en el nivel de variante indicado.

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment admite el multiplexado de muestras y se ha verificado que proporciona SNV, inserciones-deleciones (indels), CNV y recuperación de fusiones génicas precisas en el caso de las librerías enriquecidas de 1 y 4 unidades de plexado (figura 5, figura 6).

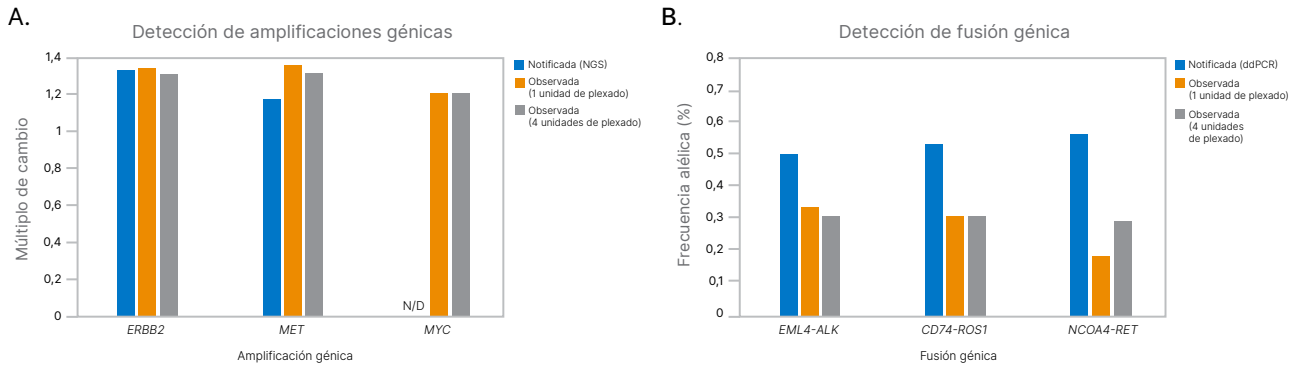


Figura 5: detección de amplificaciones génicas y fusiones génicas de baja abundancia. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment demuestra un rendimiento excelente para detectar (A) amplificaciones génicas y (B) fusiones génicas utilizando librerías enriquecidas de 1 y 4 unidades de plexado con contenido personalizado. Las librerías se prepararon a partir de 20 ng de ADNec de Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0,5 % (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0531). Cuatro librerías se enriquecieron individualmente con un panel de ssDNA de 80 pb de 2000 kb (1 unidad de plexado) y las mismas cuatro librerías se volvieron a enriquecer con el mismo panel siguiendo el formato de multiplexado (4 unidades de plexado). Las librerías se secuenciaron en NovaSeq 6000 System con una profundidad de lectura promedio de 400 millones de lecturas «paired-end» ($\geq 35\ 000\times$ de cobertura en el objetivo). Los datos se analizaron con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace Sequence Hub. Las tres amplificaciones y fusiones génicas de la muestra de referencia se detectaron en todas las réplicas de librerías enriquecidas de 1 y 4 unidades de plexado con el múltiplo de cambio y la frecuencia alélica indicados. Las discrepancias en la VAF de las fusiones se atribuyen a las diferencias entre los métodos analíticos. Nota: SeraCare no verifica la amplificación génica de MYC mediante métodos de NGS.

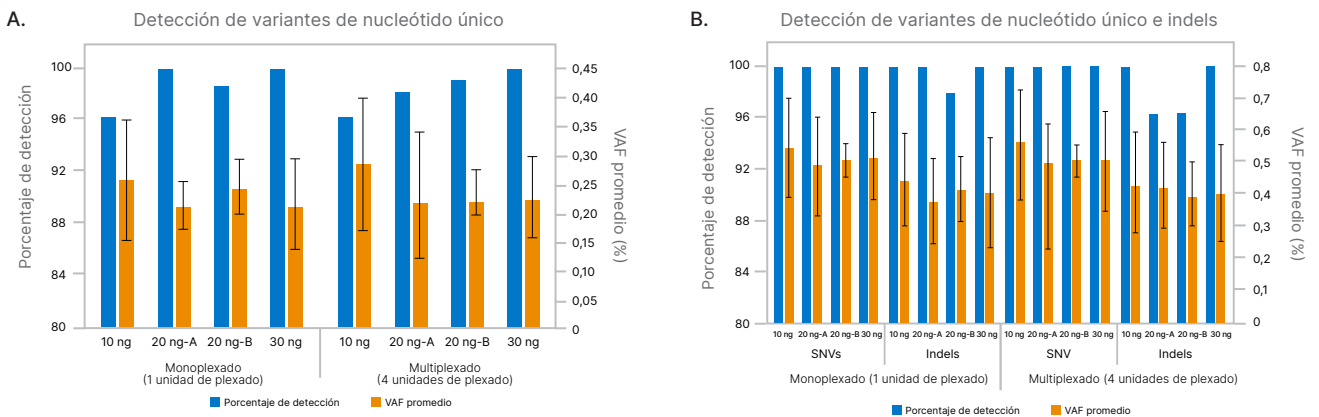


Figura 6: detección sensible de variantes con librerías enriquecidas de 1 y 4 unidades de plexado. Se prepararon librerías Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment a partir de muestras de ADNec (10 ng, 20 ng o 30 ng) a las que se añadió SNV con una (A) VAF del 0,2 % o (B) VAF del 0,5 % utilizando ADNec de Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0,5 % (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0531). Se enriquecieron individualmente cuatro librerías con un panel de ssDNA de 80 pb de 180 kb (10 ng, 20 ng-A y 30 ng) o un panel de dsDNA de 80 pb de 180 kb (20 ng-B) en el caso del formato de monoplexado (1 unidad de plexado). Las mismas cuatro librerías se volvieron a enriquecer con el mismo panel del formato de multiplexado (4 unidades de plexado). Las librerías se secuenciaron en NovaSeq 550 System con una profundidad de lectura promedio de 33 millones de lecturas «paired-end» ($\geq 30\ 000\times$ de cobertura en el objetivo). A fin de analizar los datos y las variantes de llamada, se utilizó DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace Sequence Hub.

Rendimiento optimizado en los sistemas de secuenciación de Illumina

A fin de demostrar el excelente rendimiento de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment en los sistemas de productividad media y alta de Illumina, se prepararon librerías a partir de entradas de 20 ng de ADNec con una VAF del 0,5 % de Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0,5 % (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0531) enriquecidas con un panel de dsDNA de 120 pb de 250 kb y secuenciadas en NextSeq 550 System, NextSeq 2000 System o NovaSeq 6000 System, con una profundidad de lectura promedio de 92 millones de lecturas por muestra a aproximadamente 30 000× de cobertura en el objetivo. La sólida y sencilla solución Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment produce resultados fiables en todos los sistemas de secuenciación de Illumina, proporcionando una profundidad de cobertura colapsada por UMI >1500× y una alta uniformidad de cobertura, evaluada por el porcentaje de objetivos con una cobertura >1000× (figura 7).

Análisis de datos integrado

DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App utiliza algoritmos bioinformáticos acelerados y totalmente integrados para garantizar un rendimiento óptimo del ensayo. El software realiza la corrección de errores basada en UMI, la alineación de secuencias y la llamada de

variantes somáticas de variantes pequeñas, CNV y fusiones génicas. DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App se ejecuta localmente en Illumina DRAGEN Server v4.0.3 de fase 4 o integrado en NovaSeq 6000Dx System (en modo de investigación). El proceso de análisis también se puede ejecutar como una aplicación en la nube en BaseSpace Sequence Hub o a la que se puede acceder a través de Illumina Connected Analytics (ICA), una plataforma genómica segura basada en la nube para ampliar el análisis secundario sin necesidad de adquirir y mantener más infraestructura local.

El proceso de análisis integrado ofrece a los usuarios la flexibilidad de analizar sus datos en función de los paneles utilizados para el enriquecimiento de objetivos, con opciones para alinear sus datos de secuenciación con hg19 o hg38, y realizar análisis específicos y personalizar los flujos de trabajo para adaptarse a sus objetivos de investigación. Los archivos de ruido proporcionados por el usuario se pueden utilizar para filtrar el ruido específico del centro y mejorar la detección de variantes pequeñas. El software también permite a los usuarios marcar variantes de hematopoyesis clonal, excluir regiones específicas de llamadas de variantes pequeñas, realizar llamadas precisas de CNV y detectar puntos de interés somáticos con alta sensibilidad analítica utilizando un archivo de puntos de interés somáticos personalizado o, como alternativa, utilizar las regiones de puntos de interés somáticos integradas en DRAGEN. Los usuarios que acceden a DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App basada en la nube pueden explorar aún más opciones para optimizar su análisis modificando los umbrales para el colapso por UMI y la llamada de variantes pequeñas.

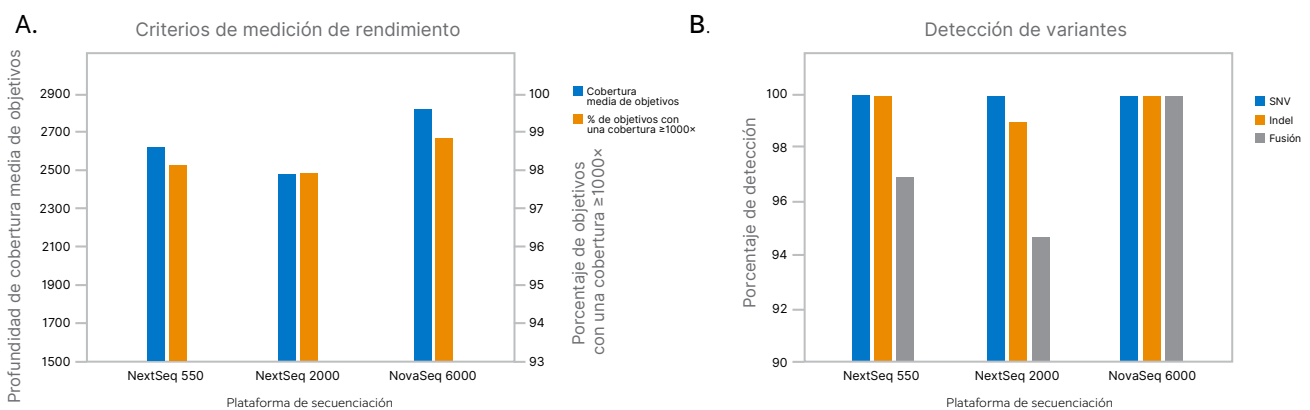


Figura 7: compatibilidad con los sistemas de productividad media y alta de Illumina. Las librerías de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment se prepararon a partir de 20 ng de ADNec con una VAF conocida del 0,5 % y se enriquecieron con un panel de dsDNA de 120 pb de 250 kb. Las librerías se secuenciaron en NextSeq 550 System, NextSeq 2000 System o NovaSeq 6000 System con una profundidad de lectura promedio de 46 millones de lecturas «paired-end» y $\geq 30\ 000\times$ de cobertura en el objetivo. Se agruparon ocho librerías en el experimento de NextSeq 550 System, 25 librerías en el experimento de NextSeq 2000 System y 51 librerías en un carril de la celda de flujo S4 en el experimento de NovaSeq 6000 System. A fin de analizar los datos y las variantes de llamada, se utilizó DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App en BaseSpace Sequence Hub.

Flujo de trabajo con capacidad de automatización

ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment es compatible con sistemas de manipulación de líquidos para automatizar la preparación de librerías, lo que permite a los laboratorios ajustarse a las necesidades de productividad variables. Con un flujo de trabajo automatizado, los laboratorios pueden lograr una manipulación de muestras de gran reproducibilidad, mantener resultados uniformes e impulsar la eficiencia. La automatización también permite el rápido escalado de la productividad sin necesidad de tiempo de participación activa adicional. Se pueden lograr mejoras adicionales en la eficiencia adoptando los métodos acreditados por Illumina, disponibles a través de nuestros socios en el campo de la automatización* y revisados por Illumina para garantizar el rendimiento y la calidad de los datos del método.

Resumen

ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment es una solución versátil de preparación de librerías optimizada para su uso con una entrada reducida de ADNec extraído de muestras de plasma. La solución fácil de usar admite una amplia gama de tamaños de panel y es compatible con paneles de enriquecimiento de Illumina o de terceros, lo que permite flexibilidad de contenido. Con la solución ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, los investigadores pueden detectar variaciones somáticas de baja frecuencia con una sensibilidad analítica excepcional. La solución de alto rendimiento ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, junto con la secuenciación en potentes sistemas de secuenciación de Illumina y el análisis de datos acelerado, ofrece un flujo de trabajo de secuenciación de ADNec de alta calidad, que abarca desde el procesamiento de muestras hasta el análisis de datos, a través de un único socio de confianza.

*Métodos acreditados por Illumina disponibles a finales de 2024.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02096 ESP v1.0

Información adicional

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

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
ILLUMINA Cell-Free DNA Prep, Ligation (16 samples)	20104105
ILLUMINA Cell-Free DNA Prep, Ligation (96 samples)	20104106
ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (16 samples)	20104107
ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex)	20104103
ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex) On-premises	20104104
IDT for ILLUMINA UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034701
IDT for ILLUMINA UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	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