

# illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

cfDNAの微量変異を検出する  
高速かつ柔軟なソリューション

- 血漿から抽出されたわずか20 ngのcfDNAから0.2%の低アレル頻度バリエントを検出
- 2.5～3時間のハンズオンタイムを含む約8.5～9.5時間で、任意のパネルからシーケンス用ライブラリーを調製
- DRAGEN™ 二次解析を用いたデータ解析、高い分析感度でバリエントをコール

illumina®

## はじめに

血漿中の循環セルフリーDNA (cfDNA) は、がん、心血管疾患、臓器移植における重要な非侵襲性疾患バイオマーカーとして浮上しています。がん研究の分野では、リキッドバイオプシーからのcfDNAのシーケンスにより、腫瘍の不均一性に関する貴重な洞察が得られ、バイオマーカープロファイリングが可能になり、組織が容易に入手できない場合には組織生検サンプルの補完または代替として機能します。通常、血漿サンプルには目的の細胞から少量しかcfDNAが含まれないため、まれな体細胞バリエーションを検出するにはロバストで高感度なアッセイが必要です。固定遺伝子パネルはバリエーションの同定は可能ですが、新しいターゲットを研究に加える、目的の遺伝子を変更するなどの場合には有用性が限られています。

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、多用途のライブラリー調製ソリューション (表1) であり、次世代シーケンス (NGS) テクノロジーの力を活用して、cfDNAサンプル中の微量バリエーションを高感度に検出します。この高性能キットは、cfDNAから結果までの統合されたワークフローの一部であり、任意のパネルを使用してライブラリーを調製した後、イルミナのミッド/ハイスルーputシステムでシーケンスを行います。データ解析は、DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して実施します。

## 効率化されたワークフロー

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、統合されたcfDNAシーケンスワークフローの一部であり、優れた性能とデータ品質をもたらします。スケーラブルなワークフローは、全血または血漿から抽出されたcfDNAから始まり、イルミナのミッド/ハイスルーputシステムでのシーケンス、およびDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用した高精度のバリエーションコールへと続きます (図1)。この使いやすいソリューションは、幅広いコンテンツサイズにわたって高い性能を発揮し、自動分注機と互換性があり、サンプルマルチプレックスに対応しているので効率的な拡張が可能になります。

表1: Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentの概要

パラメーター	仕様
DNAの種類	全血または血漿からのcfDNA
DNAインプット量 <sup>a</sup>	10~30 ng
サンプルマルチプレックス	192種類のユニークデュアルインデックス
重複マーキング	非ランダムな分子バーコード (UMI)
濃縮プレキシティ	1プレックスまたは4プレックス
対応するシーケンスシステム	NextSeqおよびNovaSeqシステム
合計ワークフロー時間 <sup>b</sup>	約8.5~9.5時間 <sup>c</sup>
合計ハンズオンタイム	約2.5~3時間

a. 20 ngのcfDNAインプットが推奨されます。

b. ライブラリー調製、濃縮、ノーマライゼーションステップが含まれます。

c. 一本鎖プローブと二本鎖プローブそれぞれのワークフロー時間。

## 高速かつ柔軟なライブラリー調製の概要

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、1回のハイブリダイゼーションステップで迅速なライブラリー調製を行うライゲーションベースのアッセイです (図2)。Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、Integrated DNA Technologies (IDT) の一本鎖DNA (ssDNA) やTwist Bioscienceの二本鎖DNA (dsDNA) など、イルミナまたはサードパーティベンダーからの任意の濃縮オリゴヌクレオチドと互換性があり、コンテンツのポータビリティを向上させます。本キットは、小型 (55~200 kb ssDNAまたは70~200 kb dsDNA)、中型 (>200~750 kb ssDNA)、および大型 (>750~2,000 kb ssDNA) のパネルコンテンツに対応し、柔軟な研究デザインを可能にします。シーケンス用ライブラリーは約2.5~3時間のハンズオンタイムを含む約8.5~9.5時間で調製でき、cfDNAの抽出からシーケンスまでを1日で行うことができます。本キットは、一般的に使用されるカラムまたはビーズベースの精製方法を使用して末梢血または血漿から直接抽出されたcfDNAに適合し、最大限の効率と柔軟性を実現します。

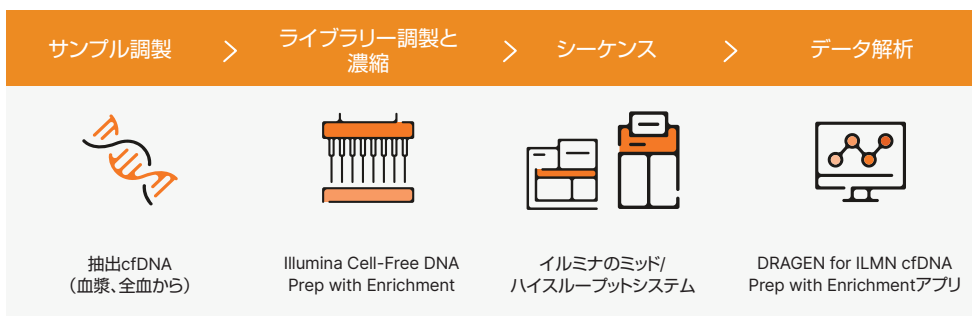


図1: 単一パートナーからのcfDNAから結果まで: イルミナは、ライブラリー調製からデータ解析まで、cfDNAシーケンスの効率的なワークフローをサポートします。抽出されたcfDNAをインプットとして使用し、Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentを使用してライブラリーを調製します。ライブラリーは、イルミナシーケンスシステムでスケールとスループットのニーズに応じてシーケンスします。DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して、正確かつ迅速な二次解析とバリエーションコールが実施できます。

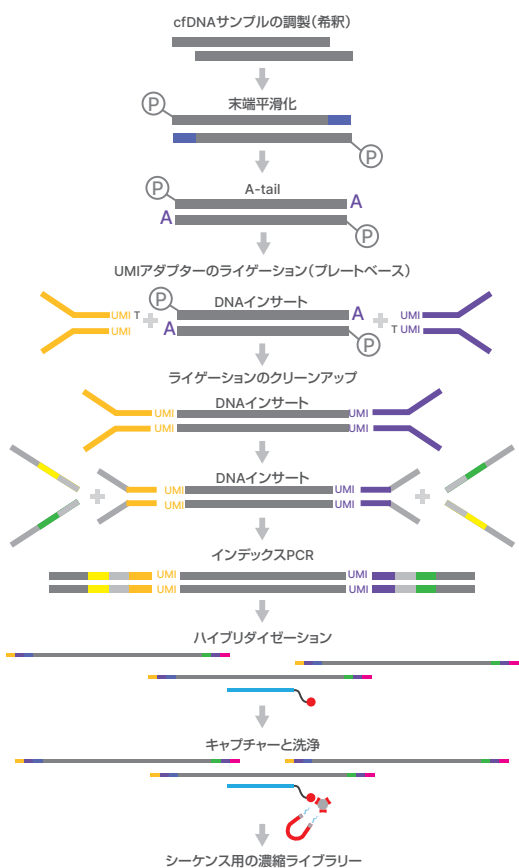


図2: Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentケミストリー: はじめに、cfDNAフラグメントを修復し、非ランダムな分子バrcode (UMI) を連結します。マルチプレックス用のユニークデュアルインデックスがPCR増幅中に組み込まれます。次に、1回のハイブリダイゼーションステップで、ビオチン化プローブを用いてターゲットの対象領域のライブラリーを濃縮します。濃縮したライブラリーを増幅し、ノーマライズし、イルミナのミッド/ハイスループットのシーケンスシステムでシーケンスします。

さまざまな濃縮パネルのサイズとフォーマットでIllumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentの互換性を実証するために、小型 (55 kb, ssDNA)、中型 (250 kb)、大型 (2,000 kb) 濃縮パネルを用いて20 ngのcfDNAからライブラリーを調製しました (表2)。調製したライブラリーをNextSeq™ 550システム (サンプルあたり1,000万ペアエンドリードの小型パネル) またはNovaSeq™ 6000システム (サンプルあたりそれぞれ4,600万ペアエンドリードの中型パネル、4億5,000万ペアエンドリードの大型パネル) でシーケンスしました。データ解析は、BaseSpace™ Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して実施しました。結果より、Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、さまざまなサイズとフォーマットの濃縮パネル全体で、1,500×以上のUMI Collapsingカバレッジ深度およびカバレッジの高い均一性 (1,000×以上のカバレッジのあるターゲットの割合で評価) が実現することが示されました (図3)。

表2: 濃縮パネルデザインに使用したパラメーター

パネル	サイズ	プローブフォーマット	バリエーションタイプ
小型 <sup>a</sup>	55 kb	80 bp ssDNA	SNV, Indel
中型-A <sup>b</sup>	250 kb	120 bp dsDNA	SNV, Indel, 融合遺伝子
中型-B <sup>c</sup>	300 kb	80 bp ssDNA	SNV, Indel, 融合遺伝子, CNV
大型 <sup>d</sup>	2,000 kb	80 bp ssDNA	SNV, Indel, 融合遺伝子, CNV

- a. プローブは、目的の遺伝子のコード領域全体にわたって20 bp重複してタイリングしました。
  - b. プローブは、目的の遺伝子のコード領域全体にわたって端から端までタイリングしました。融合ブレイクポイントは、2×のタイリングで重複するプローブでターゲットしました。
  - c. プローブは、目的の遺伝子のコード領域全体および融合ブレイクポイント全体にわたって20 bp重複してタイリングしました。小さなCDS領域 (MYCなど) を持つ遺伝子のCNV検出では、イントロン全体にわたって低密度でプローブを補充しました。
  - d. ウェットラボ最適化によるカスタム設計。
- SNV: 1塩基変異, Indel: 挿入/欠失, CNV: コピー数バリエーション

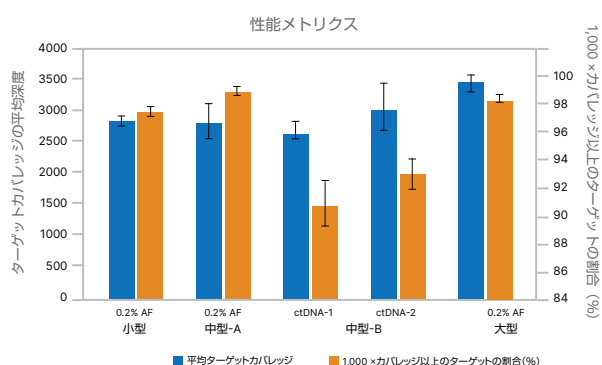


図3：幅広いパネルサイズに対応：Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentを使用して20 ngのcfDNAから4つのライブラリーレプリケートを調製し、NextSeq 550システム（小型パネル用）またはNovaSeq 6000システム（中型および大型パネル用）を使って小型、中型、大型パネルに対してそれぞれ1,000万、4,600万、4億5,000万のペアエンドリードの平均リード深度でシーケンスしました。データ解析は、BaseSpace Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して実施しました。小型および中型パネルは約30,000×でシーケンスし、大型パネルは約35,000×のオンターゲットカバレッジでシーケンスしました。

## 高感度の低頻度バリエーション検出

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、ライブラリー調製ケミストリーの改善が特徴であり、ライブラリー変換効率が向上し、バリエーションアレル頻度（VAF）がわずか0.2%の微量バリエーションを検出します。Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentで達成された高品質の結果を実証するために、イルミナのサイエンティストが、1塩基変異（SNV）、コピー数バリエーション（CNV）、および融合遺伝子をコールする能力を評価する試験を実施しました（図4、図5）。Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentを使用して調製したライブラリーは、NextSeq 550システム（サンプルあたり10,000万ペアエンドリード）またはNovaSeq 6000システムでは高深度（中型および大型パネルに対してサンプルあたりそれぞれ4,600万および4億5,000万ペアエンドリード）でシーケンスしました。バリエーションコールは、BaseSpace Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して実施しました。この結果より、スモールバリエーションの場合、わずか20 ngのcfDNAから0.2%のVAFで変異を検出でき、90%以上の分析感度（表3）および99.98%の分析特異度を備えていることが実証されました。

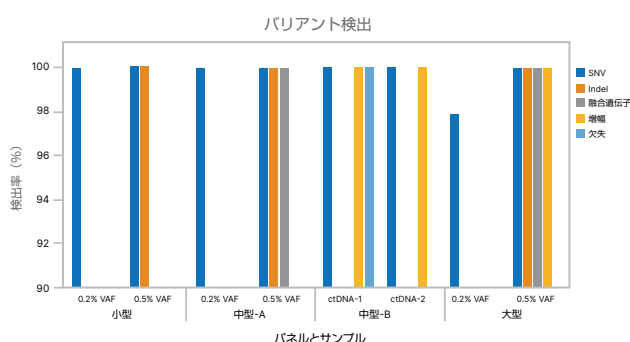


図4：低バリエーションアレル頻度（VAF）でのバリエーション検出：Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentライブラリーはバリエーションアレル頻度（VAF）0.2%のSNVを添加した全血サンプルからの20 ng cfDNAまたは、SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5%（SeraCare、カタログ番号：0710-0531）からの20 ng cfDNAを使用して調製しました。調製したライブラリーは、小型、中型、大型パネルに対してそれぞれ1,000万、4,600万、4億5,000万のペアエンドリードの平均リード深度でNextSeq 550システム（55 kb ssDNA小型パネル）またはNovaSeq 6000システム（250 kb中型パネルおよび2,000 kb大型パネル）でシーケンスしました。バリエーションコールは、BaseSpace Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して実施しました。小型および中型パネルは約30,000×でシーケンスし、大型パネルは約35,000×のオンターゲットカバレッジでシーケンスしました。

表3：高精度での微量バリエーションの検出

バリエーションタイプ	分析感度 <sup>a</sup>
スモールバリエーション（0.2% VAF）	≥ 90%
Indel（0.5% VAF）	≥ 90%
遺伝子増幅（1.3倍変化）	≥ 95%
遺伝子検出（0.6倍変化）	≥ 95%
遺伝子再構成（0.5% VAF）	≥ 95%

a. 分析感度は、指定されたバリエーションレベルでの検出割合（%）として定義されます。

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentはサンプルのマルチプレックスに対応し、1プレックスおよび4プレックスの濃縮ライブラリーに対して正確なSNV、挿入/欠失（Indel）、CNV、および遺伝子融合コール率を提供することが実証されています。（図5、図6）。

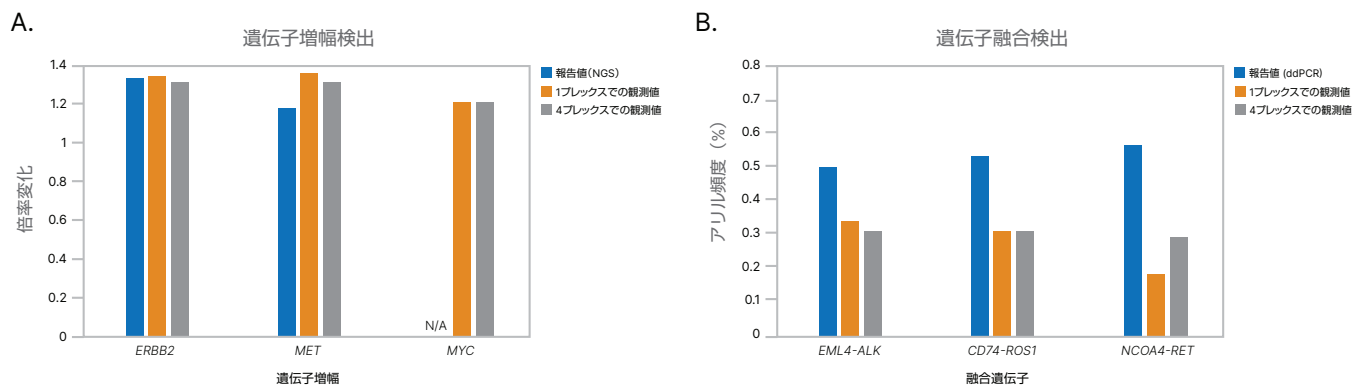


図5：微量の遺伝子増幅と融合遺伝子の検出：Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、カスタムコンテンツを含む1プレックスおよび4プレックス濃縮ライブラリーの両方を使用して、(A) 遺伝子増幅および (B) 遺伝子融合の検出に優れた性能を示します。ライブラリーはSeraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare、カタログ番号：0710-0531) の20 ng cfDNAから調製しました。4つのライブラリーを80bp ssDNA 2,000 kbサイズのパネル (1プレックス) で個別に濃縮し、同じ4つのライブラリーをマルチプレックス (4プレックス) フォーマットで同じパネルで再度濃縮しました。ライブラリーは、NovaSeq 6000システムでペアエンドリード4億の平均リード深度 (オンターゲットカバレッジ35,000×以上) でシーケンスしました。データ解析は、BaseSpace Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用して実施しました。リファレンスサンプル中の3つの遺伝子増幅および融合遺伝子は、示した倍率変化およびアリル頻度で、1プレックスおよび4プレックスの濃縮ライブラリーすべてのレプリケートで検出されました。融合遺伝子に関するVAFの不一致は、試験方法間の違いに起因するものです。注意：SeraCareはNGS法でMYC遺伝子増幅を検証しません。

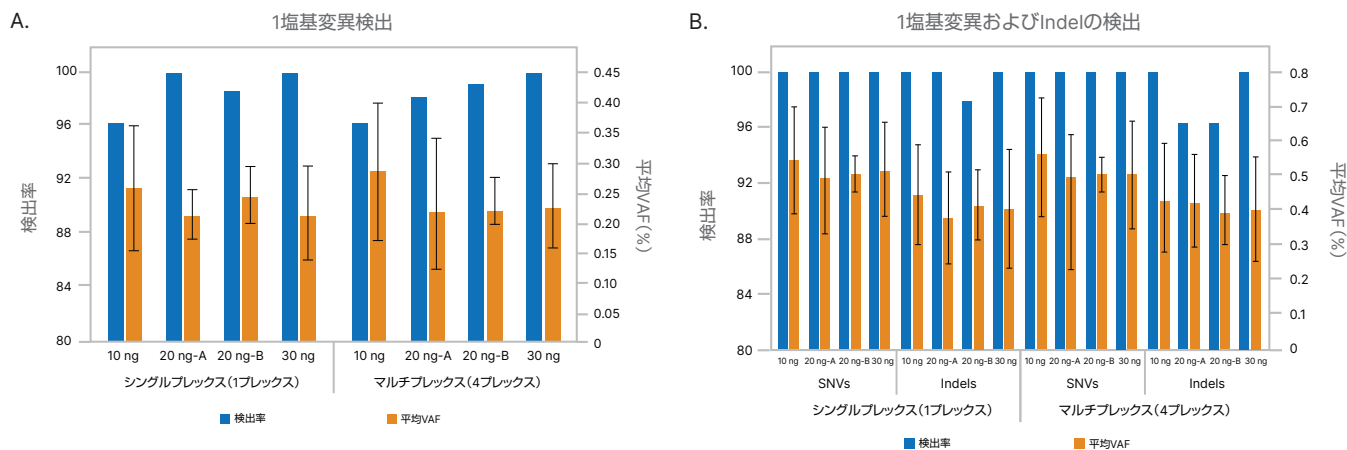


図6：1プレックスおよび4プレックスの濃縮ライブラリーを用いた高感度バリエーション検出：Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentライブラリーは、Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare、カタログ番号：0710-0531) のcfDNAを使用し、(A) 0.2% VAFまたは (B) 0.5% VAFでSNVを添加したcfDNAサンプル (10 ng、20 ng、30 ng) から調製しました。4つのライブラリーを、シングルプレックス (1プレックス) フォーマットの80 bp ssDNA 180 kbパネル (10 ng、20 ng-A、30 ng) または80 bp-dsDNA 180 kbパネル (20 ng-B) で個別に濃縮しました。同じ4つのライブラリーを、マルチプレックス (4プレックス) フォーマットで同じパネルで再度濃縮しました。ライブラリーは、NextSeq 550システムでペアエンドリード3,300万の平均リード深度 (オンターゲットカバレッジ30,000 ×以上) でシーケンスしました。BaseSpace Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用してデータ解析とバリエーションコールを実施しました。

## イルミナシーケンスシステムすべてにわたる最適化性能

イルミナのミッドスルーブットおよびハイスルーブットシステムでの Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentの優れた性能を実証するために、ライブラリーを120-bp dsDNA 250-kbパネルで濃縮したSeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare、カタログ番号: 0710-0531) からの0.5% VAFのある20 ngのインプットcfDNAから調製し、NextSeq 550システム、NextSeq 2000システム、またはNovaSeq 6000システムでサンプルあたり9,200万の平均リード深度リード、オンターゲットカバレッジ約30,000×でシーケンスしました。ロバスタかつ簡単なIllumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentソリューションは、すべてのイルミナシーケンスシステムにわたって信頼性の高い結果を生み出し、1,500×以上のUMI Collapsingカバレッジ深度およびカバレッジの高い均一性 (1,000×以上のカバレッジのあるターゲットの割合で評価) を提供します (図7)。

## 統合されたデータ解析

DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリは、高速な統合パイオインフォマティクスアルゴリズムを使用して、最適なアッセイ性能を提供します。このソフトウェアは、UMIベースのエラー補正、配列アライメント、およびスモールバリエーション、CNV、および融合遺伝子の体細胞バリエーションを実行します。DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリは、第4フェーズ

のIllumina DRAGEN Server v4.0.3上でローカルに実行するか、NovaSeq 6000Dx システム上 (研究モード) で実行します。解析パイプラインは、BaseSpace Sequence Hub上のクラウドアプリケーションとして実行することも、安全なクラウドベースのゲノミクスプラットフォームであるIllumina Connected Analytics (ICA) で実行することもでき、ローカルのインフラストラクチャーの導入や維持が不要で二次解析を拡張できます。

統合された解析パイプラインにより、ターゲット濃縮に使用するパネルに合わせてデータを解析したり、オプションでシーケンスデータをhg19またはhg38にアライメントしたり、研究目的に合わせて特化した解析を実行してワークフローをカスタマイズしたりといった柔軟性が得られます。ユーザーが提供するノイズファイルを使用して、サイト固有のノイズを除去し、スモールバリエーション検出を改善します。また、このソフトウェアを使用すると、ユーザーはクローン性造血バリエーションをマークしたり、スモールバリエーションコールから指定した領域を除外したり、正確なCNVコールを実行したり、カスタムの体細胞ホットスポットファイルを使用するか、または搭載されたDRAGEN体細胞ホットスポット領域を代わりに使用して、高い分析感度で体細胞ホットスポットを検出したりすることができます。クラウドベースのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリにアクセスするユーザーは、UMI Collapsingとスモールバリエーションコールの閾値を変更することで、解析を最適化するためのさらに多くのオプションを検討できます。

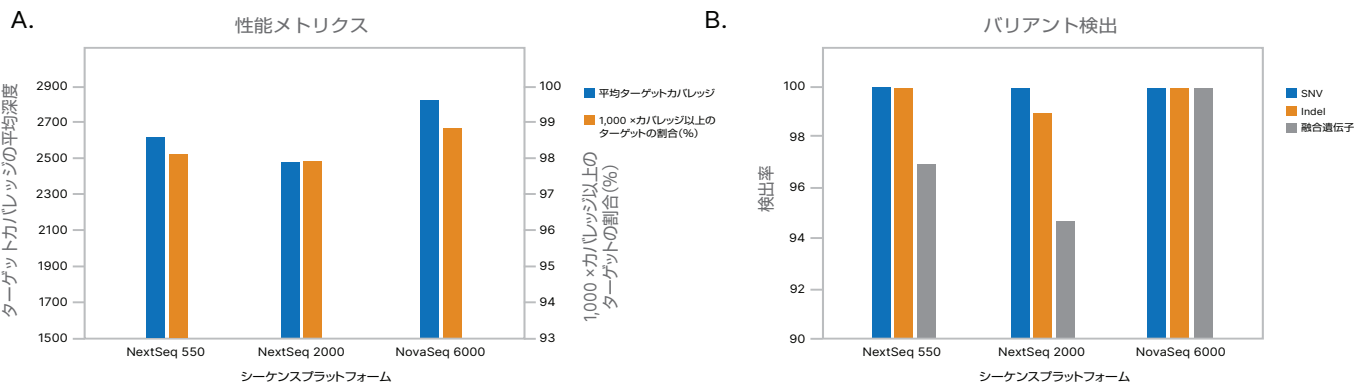


図7: イルミナのミッドおよびハイスルーブットシステムに対応: Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentライブラリーは、既知のVAF 0.5%を含む20 ngのcfDNAから調製し、120 bp dsDNA 250 kbパネルで濃縮しました。ライブラリーは、NextSeq 550システム、NextSeq 2000システム、またはNovaSeq 6000システムでペアエンドリード4,600万の平均リード深度およびオンターゲットカバレッジ30,000×以上でシーケンスしました。NextSeq 550システムのランでは8つのライブラリー、NextSeq 2000システムのランでは25のライブラリー、NovaSeq 6000システムのランではS4フローセルの1つのレーンに51のライブラリーをプルしました。BaseSpace Sequence HubのDRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichmentアプリを使用してデータ解析とバリエーションコールを実施しました。

## 自動化対応のワークフロー

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、ライブラリー調製を自動化するための分注システムに対応しており、さまざまなスループットのニーズに合わせて調整することができます。自動化されたワークフローにより、再現性の高いサンプル処理を実現し、一貫した結果を維持し、効率を高めることができます。自動化により、追加のハンズオンタイムを必要とせずにスループットを迅速に拡張することもできます。メソッドの性能とデータ品質を保証するためにイルミナが審査し、イルミナの自動化パートナーから提供されるIllumina Qualified Method<sup>\*</sup>を採用することで、効率のさらなる向上が実現します。

## まとめ

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentは、血漿サンプルから抽出された少量cfDNAでの使用に最適化された、多用途のライブラリー調製ソリューションです。この使いやすいソリューションは、さまざまなパネルサイズをサポートし、イルミナまたはサードパーティの濃縮パネルに対応しているため、コンテンツの柔軟性が可能になります。Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentソリューションを使用することで、優れた分析感度で低頻度の体細胞バリエーションを検出できます。高性能のIllumina Cell-Free DNA Prep with Enrichmentソリューションは、パワフルなイルミナシーケンスシステムでのシーケンスおよび高速データ解析との組み合わせで、サンプル処理からデータ解析に至る高品質のcfDNAシーケンスワークフローを単一の信頼できるパートナーから提供します。

\* Illumina Qualified Methodは2024年後半にご利用いただけます。

## 詳細はこちら

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

## 製品情報

製品	カタログ番号
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

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
jp.illumina.com

[www.facebook.com/illuminakk](https://www.facebook.com/illuminakk)

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : [jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。  
商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。  
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。