

# illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Soluzione rapida e flessibile per  
il rilevamento delle mutazioni  
a bassa abbondanza nel cfDNA

- Rilevamento delle varianti rare con frequenze alleliche ridotte fino allo 0,2% da soli 20 ng di cfDNA estratto dal plasma
- Preparazione delle librerie pronte per il sequenziamento da pannelli forniti dall'utente in circa 8,5-9,5 ore con 2,5-3 ore di interventi manuali
- Analisi dei dati e identificazione delle varianti con elevata sensibilità analitica utilizzando l'analisi secondaria DRAGEN™

**illumina**®

## Introduzione

È emerso che il DNA libero circolante (cfDNA, circulating cell-free DNA) nel plasma è un importante biomarcatore non invasivo della malattia nel cancro, nelle malattie cardiovascolari e nel trapianto di organi. Nel campo della ricerca sul cancro, il sequenziamento del cfDNA da biopsie liquide fornisce preziose informazioni sull'eterogeneità del tumore, consente la mappatura dei biomarcatori e funge da integrazione o da alternativa ai campioni di biopsia tissutale quando il tessuto non è prontamente disponibile. Poiché i campioni di plasma generalmente contengono ridotte quantità di cfDNA dalle cellule di interesse, per rilevare varianti somatiche rare occorre un saggio robusto e sensibile. I pannelli genici fissi consentono l'identificazione delle varianti, ma sono di utilità limitata per lo studio di nuovi target e l'adattamento di variazioni nei geni di interesse.

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment è una soluzione versatile per la preparazione delle librerie (Tabella 1) che si avvale delle potenzialità della tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) per ottenere un rilevamento altamente sensibile delle varianti a bassa abbondanza nei campioni di cfDNA. Questo kit ad alte prestazioni fa parte di un flusso di lavoro integrato dal cfDNA ai risultati che include la preparazione delle librerie con pannelli forniti dall'utente con successivo sequenziamento su sistemi Illumina a media e alta processività. L'analisi dei dati viene eseguita utilizzando DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App.

## Flusso di lavoro ottimizzato

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment fa parte di un flusso di lavoro integrato per il sequenziamento del cfDNA e fornisce eccellenti prestazioni e qualità dei dati. Il flusso di lavoro scalabile inizia con il cfDNA estratto da sangue intero o plasma, prosegue poi con il sequenziamento su sistemi Illumina a media e alta processività e con l'identificazione di varianti altamente accurata utilizzando la DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App (Figura 1). Questa soluzione di facile utilizzo offre prestazioni elevate su un'ampia gamma di dimensioni di contenuto, è compatibile con l'automazione della gestione dei liquidi e si adatta al multiplex campioni per una scalabilità efficiente.

Tabella 1: panoramica di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment

Parametro	Specifica
Tipo di DNA	cfDNA da sangue intero o plasma
Input di DNA <sup>a</sup>	10-30 ng
Multiplex campioni	192 indici doppi univoci
Indicazione dei duplicati	Identificatori molecolari univoci (UMI, unique molecular identifier) non casuali
Numero di plex di arricchimento	1 plex o 4 plex
Sistemi di sequenziamento supportati	Sistemi NextSeq e NovaSeq
Durata totale del flusso di lavoro <sup>b</sup>	Circa 8,5-9,5 ore <sup>c</sup>
Interventi manuali totali	Circa 2,5-3 ore

a. Consigliati 20 ng di input di cfDNA.

b. Include le fasi di preparazione, arricchimento e normalizzazione delle librerie.

c. Tempistiche del flusso di lavoro per le sonde rispettivamente a singolo filamento e a doppio filamento.

## Preparazione rapida e flessibile delle librerie

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment è un saggio basato sulla ligazione che utilizza una singola fase di ibridazione per la preparazione rapida delle librerie (Figura 2). Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment è compatibile con gli oligonucleotidi di arricchimento forniti dall'utente provenienti da Illumina o da fornitori terzi, inclusi il DNA a singolo filamento (ssDNA, single-stranded DNA) di Integrated DNA Technologies (IDT) e il DNA a doppio filamento (dsDNA, double-stranded DNA) di Twist Bioscience, per una maggiore portabilità del contenuto. Il kit è compatibile con pannelli di dimensioni ridotte (55-200 kb di ssDNA o 70-200 kb di dsDNA), medie (superiori a 200-750 kb di ssDNA) ed elevate (superiori a 750-2.000 kb di ssDNA), il che consente la progettazione flessibile dello studio. Le librerie pronte per il sequenziamento vengono preparate in circa 8,5-9,5 ore, con solo circa 2,5-3 ore di interventi manuali. Ciò consente ai ricercatori di passare dal cfDNA estratto al sequenziamento in un solo giorno. Per la massima efficienza e flessibilità, il kit è compatibile con il cfDNA estratto direttamente dal sangue periferico o dal plasma utilizzando metodi di purificazione a base di colonne o microsferi disponibili in commercio.

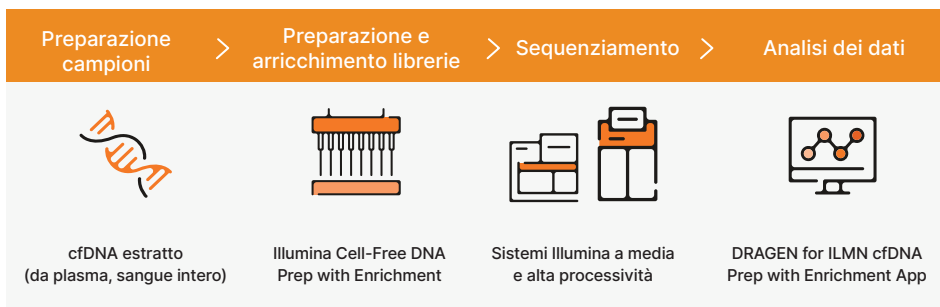


Figura 1: flusso di lavoro completo dal cfDNA ai risultati con un solo partner. Illumina supporta un flusso di lavoro ottimizzato per il sequenziamento del cfDNA, dalla preparazione delle librerie all'analisi dei dati. Il cfDNA estratto viene inserito nella preparazione delle librerie utilizzando Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Le librerie sono sequenziate in base alle esigenze di capacità e processività su un sistema di sequenziamento Illumina. L'analisi secondaria e l'identificazione di varianti accurate e rapide vengono eseguite con la DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App.

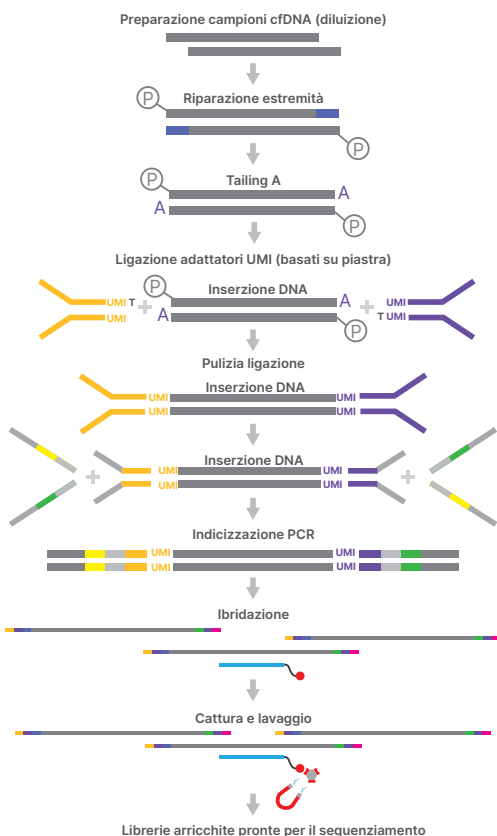


Figura 2: chimica di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment. Per prima cosa, i frammenti di cfDNA vengono riparati e legati a identificatori molecolari univoci (UMI) non casuali. Gli indici doppi univoci sono incorporati per il multiplex durante l'amplificazione della PCR. Successivamente, le librerie vengono arricchite per regioni di interesse mirate con sonde biotilate, utilizzando una singola fase di ibridazione. Le librerie arricchite vengono amplificate e normalizzate per il sequenziamento su sistemi di sequenziamento Illumina a media o alta processività.

Per dimostrare la compatibilità di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment con una gamma di formati e dimensioni del pannello di arricchimento, le librerie sono state preparate da 20 ng di cfDNA con pannelli di arricchimento piccoli (55 kb, ssDNA), medi (250 kb) o grandi (2.000 kb) (Tabella 2). Le librerie preparate sono state sequenziate sul NextSeq™ 550 System (pannello piccolo con 10 milioni di letture paired-end per campione) o sul NovaSeq™ 6000 System (pannelli medi e grandi rispettivamente con 46 milioni e 450 milioni di letture paired-end per campione). I dati sono stati analizzati con DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace™ Sequence Hub. I risultati dimostrano che Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment fornisce una profondità superiore a 1.500× di copertura compressa in base agli identificatori UMI e un'elevata uniformità di copertura, valutate in base alla percentuale di target con copertura superiore a 1.000×, su pannelli di arricchimento di dimensioni e formati diversi (Figura 3).

Tabella 2: parametri utilizzati per la progettazione del pannello di arricchimento

Pannello	Dimensioni	Formato sonda	Tipi di varianti
Piccolo <sup>a</sup>	55 kb	80 bp di ssDNA	SNV, indel
Medio-A <sup>b</sup>	250 kb	120 bp di dsDNA	SNV, indel, fusioni
Medio-B <sup>c</sup>	300 kb	80 bp di ssDNA	SNV, indel, fusioni, CNV
Grande <sup>d</sup>	2.000 kb	80 bp di ssDNA	SNV, indel, fusioni, CNV

- Le sonde sono state affiancate con una sovrapposizione di 20 bp tra le regioni codificanti per i geni di interesse.
- Le sonde sono state affiancate end-to-end tra le regioni codificanti per i geni di interesse. I breakpoint di fusione sono stati mirati con sonde sovrapposte a un affiancamento a 2×.
- Le sonde sono state affiancate con una sovrapposizione di 20 bp tra le regioni codificanti per i geni di interesse e attraverso i breakpoint di fusione. Per il rilevamento di CNV di geni con regioni CDS piccole (ad es. MYC), le sonde sono state integrate a bassa densità tra gli introni.
- Progettazione personalizzata con ottimizzazione dei laboratori umidi (wet-lab). SNV, variante di singolo nucleotide; indel, inserzione-delezione; CNV, variante del numero di copie.

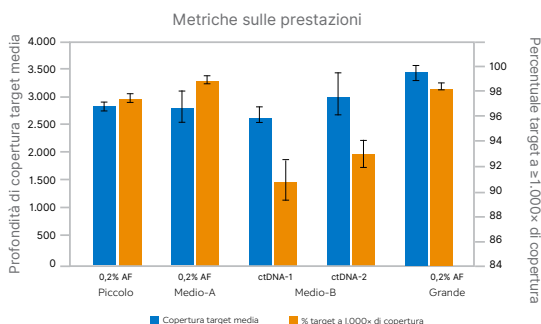


Figura 3: compatibilità con pannelli di varie dimensioni. Quattro replicati delle librerie sono stati preparati con 20 ng di cfDNA utilizzando Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment e sequenziati sul NextSeq 550 System (per i pannelli piccoli) o sul NovaSeq 6000 System (per i pannelli medi e grandi) a una profondità di lettura media di 10 milioni, 46 milioni o 450 milioni di letture paired-end rispettivamente per pannelli piccoli, medi e grandi. I dati sono stati analizzati con la DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace Sequence Hub. I pannelli piccoli e medi sono stati sequenziati a circa 30.000x e il pannello grande a circa 35.000x di copertura sul target.

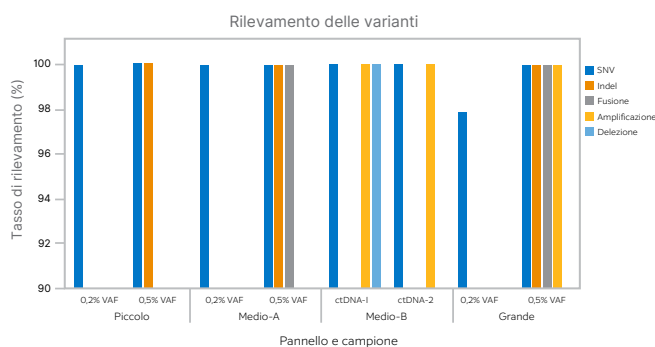


Figura 4: rilevamento delle varianti a bassa frequenza allelica (VAF). Le librerie Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment sono state preparate utilizzando 20 ng di cfDNA da campioni di sangue intero a cui sono state aggiunte SNV a frequenza allelica delle varianti (VAF) pari allo 0,2% o utilizzando 20 ng di cfDNA di SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n. di catalogo 0710-0531). Le librerie preparate sono state sequenziate sulla piattaforma NextSeq 550 System (55 kb di ssDNA per pannello piccolo) o NovaSeq 6000 (250 kb per pannello medio e 2.000 kb per pannello grande) a una profondità di lettura media di 10 milioni, 46 milioni o 450 milioni di letture paired-end rispettivamente per pannelli piccoli, medi e grandi. L'identificazione di varianti è stata eseguita utilizzando DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace Sequence Hub. I pannelli piccoli e medi sono stati sequenziati a circa 30.000x e il pannello grande a circa 35.000x di copertura sul target.

## Rilevamento sensibile delle varianti a bassa frequenza

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment consente di migliorare la chimica di preparazione delle librerie per aumentare l'efficienza di conversione delle librerie e rilevare varianti a bassa abbondanza con minime frequenze alleliche delle varianti (VAF, variant allele frequency) fino allo 0,2%. Per dimostrare i risultati di alta qualità ottenuti tramite Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment, gli scienziati Illumina hanno svolto alcuni studi per valutare la capacità di identificare le varianti di singolo nucleotide (SNV, single nucleotide variant), le variazioni del numero di copie (CNV, copy number variation) e le fusioni geniche (Figura 4, Figura 5). Le librerie preparate mediante Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment sono state sequenziate sul NextSeq 550 System (10 milioni di letture paired-end per campione) o sul NovaSeq 6000 System (46 milioni e 450 milioni di letture paired-end per campione rispettivamente per i pannelli medi e grandi). L'identificazione di varianti è stata eseguita utilizzando DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace Sequence Hub. I risultati dimostrano la capacità di rilevare mutazioni allo 0,2% di VAF da appena 20 ng di cfDNA per varianti piccole, con oltre il 90% di sensibilità analitica (Tabella 3) e il 99,98% di specificità analitica.

Tabella 3: rilevamento di varianti a bassa abbondanza con elevata accuratezza

Tipo di variante	Sensibilità analitica <sup>a</sup>
Piccole varianti (0,2% VAF)	≥90%
Indel (0,5% VAF)	≥90%
Amplificazioni geniche (variazione 1,3 volte)	≥95%
Delezioni geniche (variazione 0,6 volte)	≥95%
Riarrangiamenti genici (0,5% VAF)	≥95%

a. La sensibilità analitica è definita come percentuale di rilevamento al livello di variante dichiarato.

Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment supporta il multiplex campioni ed è stato verificato che fornisce valori accurati di SNV, inserzione-delezione (indel), CNV e richiamo della fusione genica per librerie arricchite con 1 plex e 4 plex (Figura 5, Figura 6).

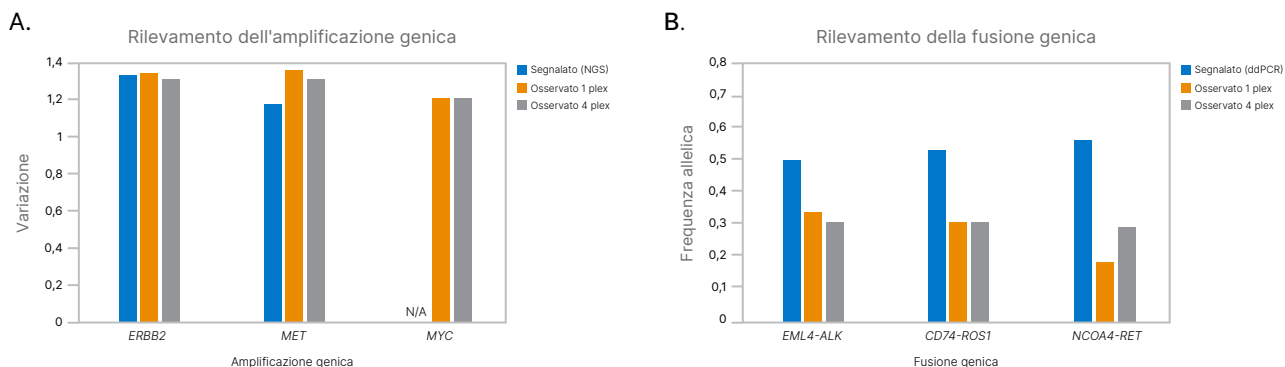


Figura 5: rilevamento di fusioni geniche e amplificazioni geniche a bassa abbondanza. Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment dimostra prestazioni eccellenti per il rilevamento di (A) amplificazioni geniche e (B) fusioni geniche utilizzando librerie arricchite sia con 1 plex sia con 4 plex con contenuti personalizzati. Le librerie sono state preparate con 20 ng di cfDNA di SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n. di catalogo 0710-0531). Quattro librerie sono state arricchite singolarmente con un pannello di 2.000 kb per 80 bp di ssDNA (1 plex) e le stesse quattro librerie sono state nuovamente arricchite con lo stesso pannello seguendo il formato multiplex (4 plex). Le librerie sono state sequenziate sul NovaSeq 6000 System a una profondità di lettura media di 400 milioni di letture paired-end (pari o superiore a 35.000× di copertura sul target). I dati sono stati analizzati con la DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace Sequence Hub. Le tre amplificazioni e fusioni geniche nel campione di riferimento sono state rilevate in tutti i replicati di librerie arricchite con 1 plex e 4 plex alla variazione e alla frequenza allelica indicate. Le discrepanze della VAF per le fusioni sono attribuite alle differenze tra i metodi di test. Nota: SeraCare non verifica l'amplificazione genica MYC mediante metodi NGS.

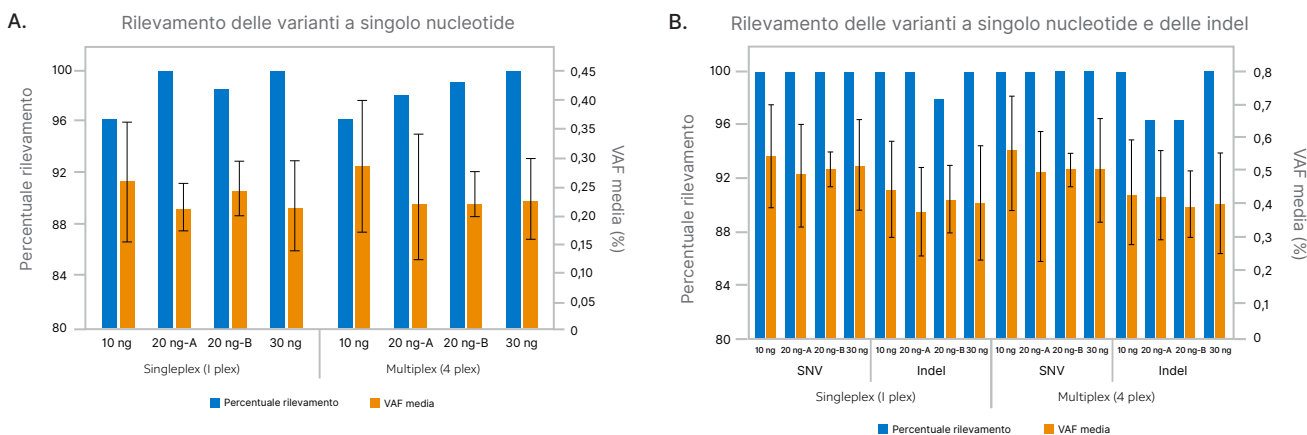


Figura 6: rilevamento sensibile delle varianti con librerie arricchite con 1 plex e 4 plex. Le librerie Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment sono state preparate con campioni di cfDNA (10 ng, 20 ng o 30 ng) a cui sono state aggiunte delle SNV a (A) 0,2% VAF o (B) 0,5% VAF utilizzando cfDNA di SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n. di catalogo 0710-0531). Quattro librerie sono state arricchite singolarmente con un pannello da 180 kb per 80 bp di ssDNA (10 ng, 20 ng-A e 30 ng) o un pannello da 180 kb per 80 bp di dsDNA (20 ng-B) per il formato singleplex (1 plex). Le stesse quattro librerie sono state nuovamente arricchite con lo stesso pannello per il formato multiplex (4 plex). Le librerie sono state sequenziate sul NextSeq 550 System a una profondità di lettura media di 33 milioni di letture paired-end (pari o superiore a 30.000× di copertura sul target). La DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace Sequence Hub è stata utilizzata per analizzare i dati e identificare le varianti.

## Prestazioni ottimizzate sui sistemi di sequenziamento Illumina

Per dimostrare le eccellenti prestazioni di Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment sui sistemi Illumina a media e alta processività, le librerie sono state preparate con 20 ng di cfDNA di input allo 0,5% VAF di Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF-0.5% (SeraCare, n. di catalogo 0710-0531) arricchito con un pannello da 250 kb per 120 bp di dsDNA e sequenziato sul NextSeq 550 System, NextSeq 2000 System o NovaSeq 6000 System a una profondità di lettura media di 92 milioni di letture per campione a circa 30.000× di copertura sul target. La semplice ma robusta soluzione Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment fornisce risultati affidabili su tutti i sistemi di sequenziamento Illumina, fornendo una profondità maggiore di 1.500× di copertura compressa in base agli identificatori UMI e un'elevata uniformità di copertura, secondo quanto valutato dalla percentuale di target con più di 1.000× di copertura (Figura 7).

## Analisi integrata dei dati

La DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App utilizza algoritmi di bioinformatica accelerati e completamente integrati per garantire prestazioni ottimali del saggio. Il software esegue la correzione degli

errori basata sugli identificatori UMI, l'allineamento delle sequenze e l'identificazione delle varianti somatiche di varianti piccole, CNV e fusioni geniche. La DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App funziona in locale su un Illumina DRAGEN Server v4.0.3 di fase 4 o integrata sul NovaSeq 6000Dx System (in modalità di ricerca). La pipeline di analisi può anche essere eseguita come applicazione cloud su BaseSpace Sequence Hub o è possibile accedervi tramite Illumina Connected Analytics (ICA), una piattaforma genomica sicura basata su cloud per ampliare l'analisi secondaria senza la necessità di acquistare e gestire un'infrastruttura locale più estesa.

La pipeline di analisi integrata offre agli utenti la flessibilità di analizzare i dati in base ai pannelli utilizzati per l'arricchimento del target, con opzioni per allineare i dati di sequenziamento a hg19 o hg38, eseguire analisi specifiche e personalizzare i flussi di lavoro in base agli obiettivi di ricerca. I file di rumore forniti dall'utente possono essere utilizzati per filtrare il rumore specifico del sito e migliorare il rilevamento delle varianti piccole. Il software consente inoltre agli utenti di contrassegnare le varianti dell'ematopoiesi clonale, escludere regioni specificate dall'identificazione di varianti piccole, di eseguire un'identificazione accurata delle CNV e rilevare hotspot somatici con elevata sensibilità analitica, utilizzando un file personalizzato di hotspot somatici, o in alternativa di utilizzare le regioni integrate di hotspot somatici DRAGEN. Gli utenti che accedono alla DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App basata sul cloud possono esplorare ancora più opzioni per ottimizzare la loro analisi modificando le soglie per il raggruppamento UMI e l'identificazione di varianti piccole.

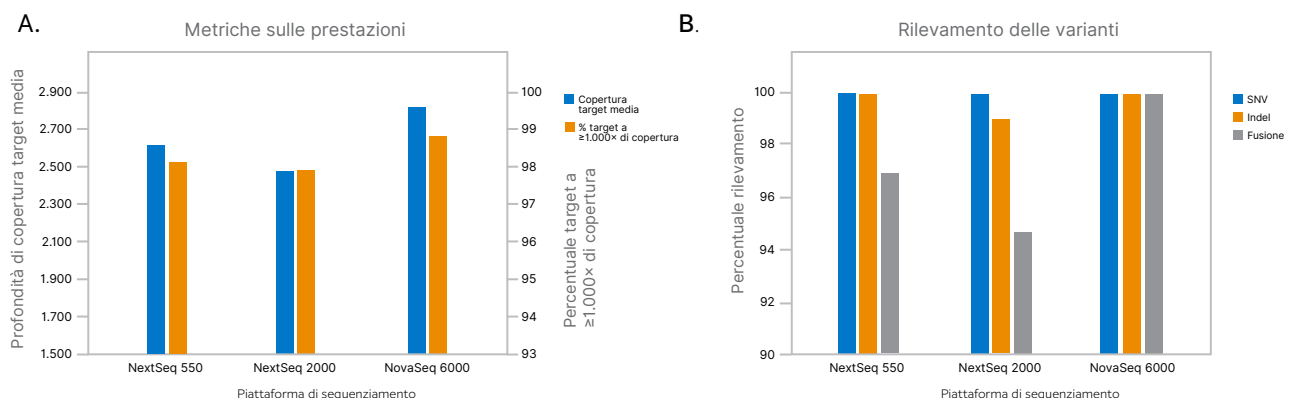


Figura 7: compatibilità con i sistemi Illumina a media e alta processività. Le librerie Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment sono state preparate con 20 ng di cfDNA con VAF noto allo 0,5% e arricchite con un pannello da 250 kb per 120 bp di dsDNA. Le librerie sono state sequenziate sul NextSeq 550 System, sul NextSeq 2000 System o sul NovaSeq 6000 System a una profondità di lettura media di 46 milioni di letture paired-end e pari o superiore a 30.000× di copertura sul target. Otto librerie sono state raggruppate in pool per la corsa con il NextSeq 550 System, 25 librerie per la corsa con il NextSeq 2000 System e 51 librerie su una corsia della cella a flusso S4 per la corsa con il NovaSeq 6000 System. La DRAGEN for ILMN cfDNA Prep with Enrichment App in BaseSpace Sequence Hub è stata utilizzata per analizzare i dati e identificare le varianti.

## Flusso di lavoro compatibile con l'automazione

ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment è compatibile con i sistemi di gestione dei liquidi per automatizzare la preparazione delle librerie, il che permette ai laboratori di adattarsi al mutare delle esigenze di processività. Grazie a un flusso di lavoro automatizzato, i laboratori possono affidarsi a una gestione dei campioni altamente riproducibile, mantenere risultati coerenti e aumentare l'efficienza. L'automazione consente inoltre una processività rapidamente scalabile senza la necessità di altri interventi manuali. Ulteriori miglioramenti in termini di efficienza sono raggiungibili adottando i metodi qualificati ILLUMINA, disponibili presso i nostri partner di automazione\* ed esaminati da ILLUMINA al fine di garantirne le prestazioni e la qualità dei dati.

## Riepilogo

ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment è una soluzione versatile per la preparazione delle librerie, ottimizzata per l'uso con cfDNA a basso input estratto da campioni di plasma. La soluzione di facile utilizzo supporta pannelli di varie dimensioni ed è compatibile con i pannelli di arricchimento di ILLUMINA o di terze parti, il che permette la flessibilità dei contenuti. Grazie alla soluzione ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment, i ricercatori possono rilevare variazioni somatiche a bassa frequenza con un'eccezionale sensibilità analitica. La soluzione ILLUMINA Cell-Free DNA Prep with Enrichment ad alte prestazioni, insieme al sequenziamento sui potenti sistemi di sequenziamento ILLUMINA e all'analisi accelerata dei dati, fornisce un flusso di lavoro di sequenziamento del cfDNA di alta qualità, che comprende l'intero processo, dall'elaborazione dei campioni all'analisi dei dati, il tutto fornito da un solo partner affidabile.

\*I metodi qualificati ILLUMINA saranno disponibili alla fine del 2024.



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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02096 ITA v1.0

## Maggiori informazioni

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

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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