

TruSight™ Oncology 500 ctDNA 可为低等位基因频率下的变异检测提供可靠的性能

优化的测序化学技术与高测序深度和强大的分析软件的完美结合。

简介

利用新一代测序 (NGS) 技术检测罕见变异, 例如循环游离 DNA (cfDNA) 中的罕见变异, 需要较高的测序深度以及区分真实低频变异和噪音的能力。使用 TruSight Oncology 500 ctDNA 时, 有多个因素会影响低频变异检出的准确性。本技术说明回顾了影响分析灵敏度和特异性的变量例如错误校正、测序深度以及 cfDNA 起始量。

基于 UMI 的错误校正

TruSight Oncology 500 ctDNA 结合了独特分子标记 (UMI) 和错误校正软件, 可将错误率从 0.5% 降至 $\leq 0.007\%$ 。¹ 基于 UMI 条形码的比对和随后的 read 组装来过滤识别错误的变异, 以此来实现降噪 (图 1)。这个过程从组装的 read 中去除了假阳性, 可以精准的检测低变异等位基因频率 (VAF $\leq 0.5\%$)。

cfDNA 起始量

在一些情况下, 由于样本量不足, 用户必须使用低于最佳起始量的 cfDNA 来创建文库。减少 cfDNA 起始量会导致基因组片段数量减少以及文库多样性降低。Illumina 建议使用 30 ng cfDNA, 这大约代表 9000 个基因组当量, cfDNA 的定量应使用基于电泳的方法而不是测量总 DNA 的方法。将起始量减少至 10 ng 会将基因组当量降至约 3000。这会严重影响准确检测低频变异的能力, 因为 0.5% VAF 的突变在 10 ng 起始量下仅有 15 个起始拷贝, 而在 30 ng 起始量下有 45 个拷贝。

测序深度

分析低频变异时, 增加测序深度能最大限度地提高检出率。为确保准确的变异检出, Illumina 建议测序到 35,000x 的最小原始测序深度。使用 30 ng 起始 DNA 和 400 M read 将实现 2500x 的中位外显子覆盖度 (MEC)。MEC 是覆盖外显子区域的 read 数量的中位数 (图 2)。这意味着在 read 组装后, panel 中所有碱基的中位覆盖度为 2500x, 并且通常 90% 以上的 read 覆盖度 $\geq 1000x$, 这是推荐用于检出频率为 0.5% 的变异的覆盖度。

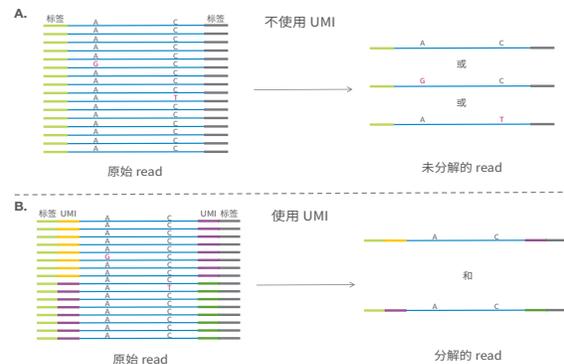


图 1：使用 DRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA 分析软件进行错误校正 - (A) 16 个 read 中包含 2 个变异, 可能是真实的罕见变异, 也可能是引入的错误。没有错误校正就无法区分真实变异和假阳性。(B) 整合了 UMI, 能识别来自同一个起始分子的多条 read, 并将其组合为一条 read。每组 read 各含有一个错误。在进行错误校正后, 获得了唯一的正确序列。

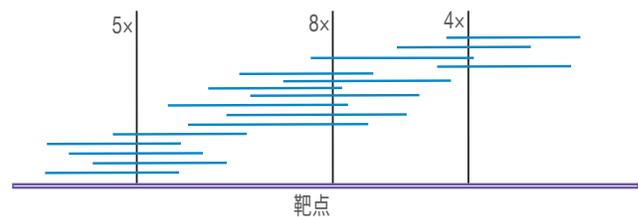


图 2：中位外显子覆盖度 - 水平线代表目标区域的测序 read。垂直线表示哪些 read 覆盖了 3 个特定的碱基。所示的测序深度和位置仅用于演示。考虑了靶点中的每个碱基。显示区域的 MEC 是 5x。错误校正后推荐用于 0.5% LOD 的 MEC 是 $\geq 1000x$ 。

分析性能与 cfDNA 起始量和测序深度的关系

检测性能与不同检测限下的分析灵敏度和特异性直接相关。分析灵敏度的定义为正确识别存在的变异的能力 (真阳性率)。分析特异性的定义为不会检出不存在的变异的能力 (真阴性率)。测序深度降低时, 低频变异检出的准确度也会降低。提高测序深度对检测的分析灵敏度有显著的影响。例如, 使用 30 ng 的起始量和 15,000x 的原始覆盖深度时, 0.2% VAF 下的分析灵敏度是 82.59%。

将原始深度增加到 45,000x 可使分析灵敏度会提高至 88.42%。类似地, 当 LOD 为 0.5% 时, 原始深度从 15,000x 增加到 45,000x 时, 分析灵敏度也会从 99.69% 升高至 99.9% (表 1)。减少每个运行的样本数量

表 1：小热点变异的分析灵敏度和覆盖深度（特异性为 99.99%）

cfDNA 起始量	测序深度	热点变异在所示 LOD 下的分析灵敏度								
		0.20%	0.30%	0.40%	0.50%	0.60%	0.70%	0.80%	0.90%	1.00%
10 ng	15,000x	34.97	55.25	70.67	81.39	88.47	92.99	95.79	97.50	98.53
	25,000x	36.33	56.89	72.22	82.69	89.47	93.71	96.29	97.84	98.76
	35,000x	36.97	57.65	72.93	83.27	89.91	94.03	96.51	97.99	98.85
	45,000x	37.26	57.99	73.25	83.53	90.10	94.16	96.61	98.05	98.89
30 ng	15,000x	82.59	95.11	98.73	99.69	99.93	99.98	100.00	100.00	100.00
	25,000x	86.25	96.66	99.25	99.84	99.97	99.99	100.00	100.00	100.00
	35,000x	87.67	97.20	99.42	99.88	99.98	100.00	100.00	100.00	100.00
	45,000x	88.42	97.47	99.49	99.90	99.98	100.00	100.00	100.00	100.00
50 ng	15,000x	94.12	99.15	99.89	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	25,000x	96.85	99.68	99.97	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	35,000x	97.68	99.81	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	45,000x	98.06	99.85	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
70 ng	15,000x	97.26	99.75	99.98	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	25,000x	99.11	99.96	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	35,000x	99.49	99.98	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	45,000x	99.64	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
100 ng	15,000x	98.54	99.91	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	25,000x	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	35,000x	99.93	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	45,000x	99.96	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

列出的分析灵敏度和特异性值是模拟计算结果，已进行 UMI 错误校正。分析特异性假设了两个支持片段的固定阈值来检出变异。绿色格代表最高的灵敏度，白色格代表良好的灵敏度，不推荐使用粉色格对应的参数。

表 2：LOD 为 0.5%，cfDNA 起始量为 30 ng 时，35,000x 的测序深度可提供最佳灵敏度

cfDNA 起始量	热点变异在所示 LOD 下的分析灵敏度								
	0.20%	0.30%	0.40%	0.50%	0.60%	0.70%	0.80%	0.90%	1.00%
10 ng	36.97	57.65	72.93	83.27	89.91	94.03	96.51	97.99	98.85
30 ng	87.67	97.20	99.42	99.88	99.98	100.00	100.00	100.00	100.00
50 ng	97.68	99.81	99.99	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
70 ng	99.49	99.98	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
100 ng	99.93	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

列出的数值是特异性为 99.99% 时小热点变异的预期分析灵敏度（理论数据）。绿色格代表最高的灵敏度，白色格代表良好的灵敏度，不推荐使用粉色格对应的参数。

可以提高测序深度，但每次 run 的通量会降低。用户能以提供的模拟计算结果作为参考，来评估未使用最佳 DNA 起始量或覆盖度时可能的结果（表 1）。

与分析灵敏度相反，分析特异性会随着覆盖深度的升高而降低，这是因为增加 read 数量也会增加出现假阳性的可能性。但是，与相关的分析灵敏度增加相比，分析特异性降低的速率和范围要低得多。例如，起始量为 30 ng，LOD 为 0.2% 时，将原始覆盖率从 10,000x 增加到 40,000x 后，分析灵敏度会从 54.77% 提高至 80.02%，而分析特异性仅从 99.99% 降低到了 99.98%。对于 TruSight Oncology 500 ctDNA，推荐的最小测序深度是 35,000x，以此来为检测限是 0.5% 的热点变异提供高于 95%（99.88%）的理论灵敏度（表 2）。

总结

准确性是变异检测的重要考虑因素。错误校正方法，例如 TruSight Oncology 500 ctDNA 分析软件使用的方法有助于去除噪声，从而提高检出低 VAF 变异的准确性。分析灵敏度和分析特异性随着 cfDNA 起始量和测序深度等因素而改变。在进行实验设计决策时，可使用本技术说明作为指导，来考虑起始量。

参考文献

1. Illumina (2019) TruSight Oncology 500 ctDNA Data Sheet. (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-1170-2019-006.pdf). Accessed January 23, 2020.

Illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279
 北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855
 技术支持热线 400-066-5835 · techsupport@illumina.com · www.illumina.com.cn



Illumina Academy @illumina

© 2020 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为 Illumina 公司或其各自所有者的财产。关于具体的商标信息，请访问 www.illumina.com/company/legal.html。1170-2017-021-B QB9358

