

illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

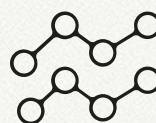
Resultados de exoma rápidos, flexíveis e escaláveis com suporte para amostras FFPE de baixa entrada

Detecte variantes raras com baixas frequências de alelos do gDNA extraído do tecido FFPE

Prepare bibliotecas prontas para sequenciamento em ≤ 10 horas com aprox. 4 horas de trabalho prático

Analise dados e identifique variantes com alta sensibilidade analítica usando o DRAGEN™ secondary analysis

Habilite a interpretação definida pelo usuário e a geração de relatórios de pesquisa com o Illumina Connected Insights



Sequenciamento de exoma de amostra para insights com um parceiro confiável

No campo da pesquisa de câncer, amostras fixadas em formalina e embocadas em parafina (FFPE) contêm uma abundância de informações valiosas para estudos de câncer. Como as amostras FFPE geralmente produzem DNA altamente degradado, elas podem ser difíceis de analisar com métodos de sequenciamento de última geração (NGS).

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment é uma solução versátil de preparação de bibliotecas (Tabela 1) que aproveita o poder da tecnologia NGS para obter detecção altamente sensível de variantes de baixa abundância em amostras FFPE de baixa entrada. Esta solução de fornecedor único abrange o kit de preparação da biblioteca, o Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e os sistemas de sequenciamento de médio a alto rendimento da Illumina, incluindo o NextSeq™ 2000 System e o NovaSeq™ X Series. A análise de dados é realizada usando pipelines DRAGEN disponíveis no BaseSpace™ Sequence Hub e no Illumina Connected Analytics. O Illumina Connected Insights pode ser usado para possibilitar a análise e a interpretação definidas pelo usuário.

Fluxo de trabalho simplificado

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment faz parte de um fluxo de trabalho integrado tumoral-normal de sequenciamento completo de exoma (WES) que oferece excelente desempenho e qualidade dos dados. O fluxo de trabalho escalável começa com DNA genômico extraído (gDNA) de amostras FFPE, seguido pela preparação e enriquecimento da biblioteca. As bibliotecas enriquecidas são sequenciadas nos sistemas de médio e alto rendimento da Illumina e a identificação de variantes altamente precisa é realizada usando o DRAGEN secondary analysis (Figura 1). Essa solução fácil de usar oferece alto desempenho para sequenciamento de exoma, fornece volumes de preenchimento fáceis de automação e acomoda multiplexação de amostras para dimensionamento eficiente (Tabela 1).

Preparação rápida e flexível da biblioteca

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment é um ensaio baseado em ligação que usa uma única etapa de hibridização para preparação rápida da biblioteca (Figura 2). Ele usa o Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e permite a interrogação de alvos

Tabela 1: Visão geral do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Parâmetro	Especificação
Tipo de DNA	gDNA do tecido FFPE
Entrada de DNA	DNA FFPE de 40 ng
Multiplexação de amostra	96 a 192 indexes duplos exclusivos
Marcação duplicada	Identificadores moleculares únicos (UMIs) não aleatórios
Plexação de enriquecimento	4-plex
Sistemas de sequenciamento compatíveis	NextSeq 2000 System, lâminas de fluxo P3 ou P4 NovaSeq 6000 System, lâminas de fluxo SP, S1 ou S2 NovaSeq X Series, lâmina de fluxo 1,5B
Tempo total do fluxo de trabalho ^a	≤ 10 horas
Tempo total de trabalho prático	Aprox. 4 horas
a. Inclui etapas de preparação, enriquecimento e normalização da biblioteca.	

mitocondriais ou adicionais quando complementado com o Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel ou o Illumina Custom Enrichment Panel v2.

As bibliotecas prontas para sequenciamento são preparadas em ≤ 10 horas, com apenas aproximadamente 4 horas de trabalho prático, permitindo que os pesquisadores passem do DNA extraído para o sequenciamento em um único dia. O QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, N.º do catálogo 80234) é recomendado para extração de DNA de amostras FFPE.

Cobertura flexível e escalável

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment usa um painel de enriquecimento de exoma focado, abrangente e atualizado. Essa cobertura focada proporciona uma solução tumoral-normal WES econômica em um número ideal de amostras por corrida de sequenciamento (Tabela 2). A cobertura do genoma mitocondrial (chrM) pode ser adicionada facilmente usando o Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel como um painel de spike-in no protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Regiões específicas de interesse podem ser adicionadas com painéis de spike-in personalizados de até 10 mil sondas usando o Illumina Custom Enrichment Panel v2.

Figura 1: Fluxo de trabalho do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

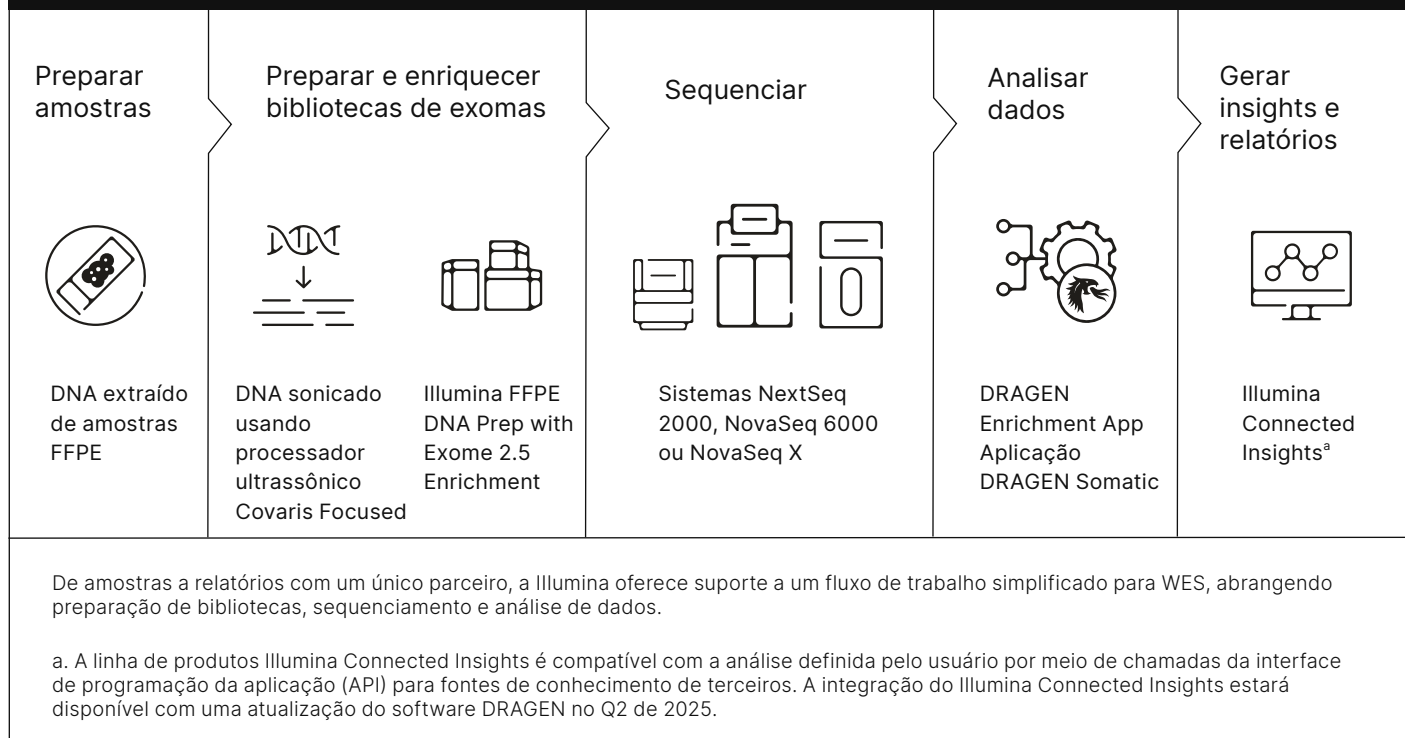
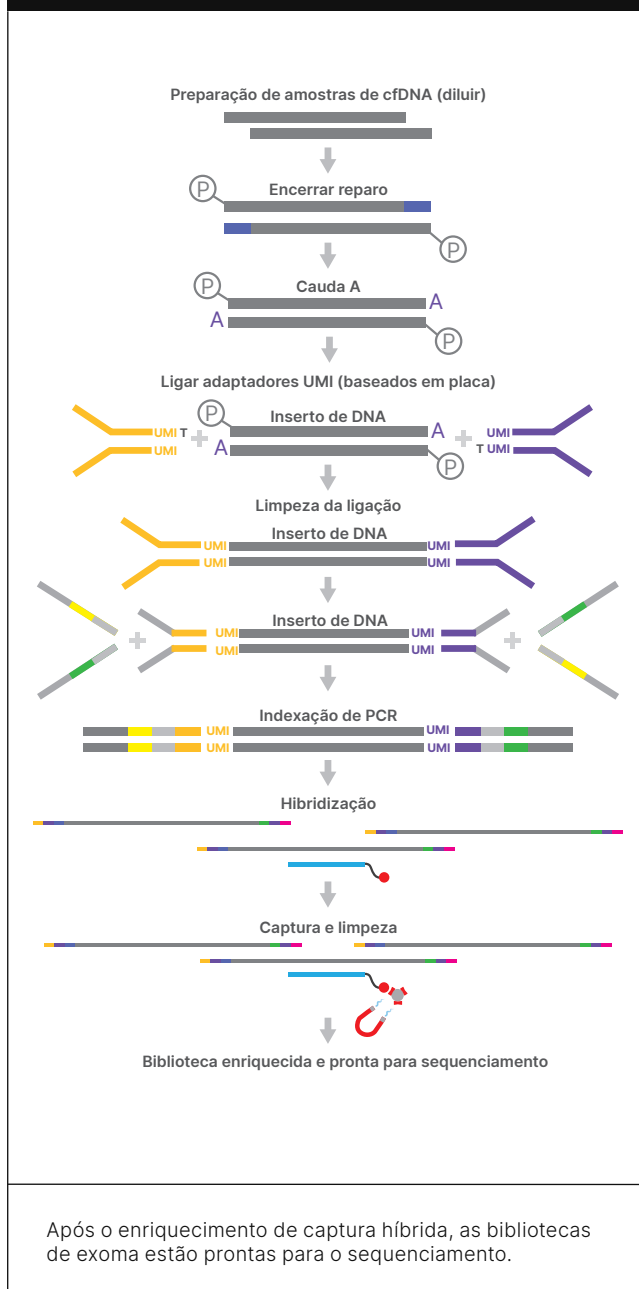


Tabela 2: Plexidade de sequenciamento para bibliotecas do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Tipo de amostra	Profundidade desejada da cobertura-alvo média ^a	Leituras single-end recomendadas	Número máximo de bibliotecas por lâmina de fluxo					
			NextSeq 2000 System		NovaSeq 6000 System		NovaSeq X Series	
			P3	P4	SP	S1	S2	1.5B
Tumor	≥ 130×	≥ 100M	8	12	4	12	28	12
Normal	≥ 30×	≥ 28M	8	12	4	12	28	12

a. A cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos.

Figura 2: Preparação simplificada da biblioteca baseada em ligação com enriquecimento do exoma



Desempenho de alta qualidade

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment apresenta a mesma química de preparação e enriquecimento de bibliotecas que o Illumina Cell-Free DNA with Enrichment para permitir um desempenho excepcional com amostras FFPE.

 Leia a [ficha de dados do Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#) para saber mais.

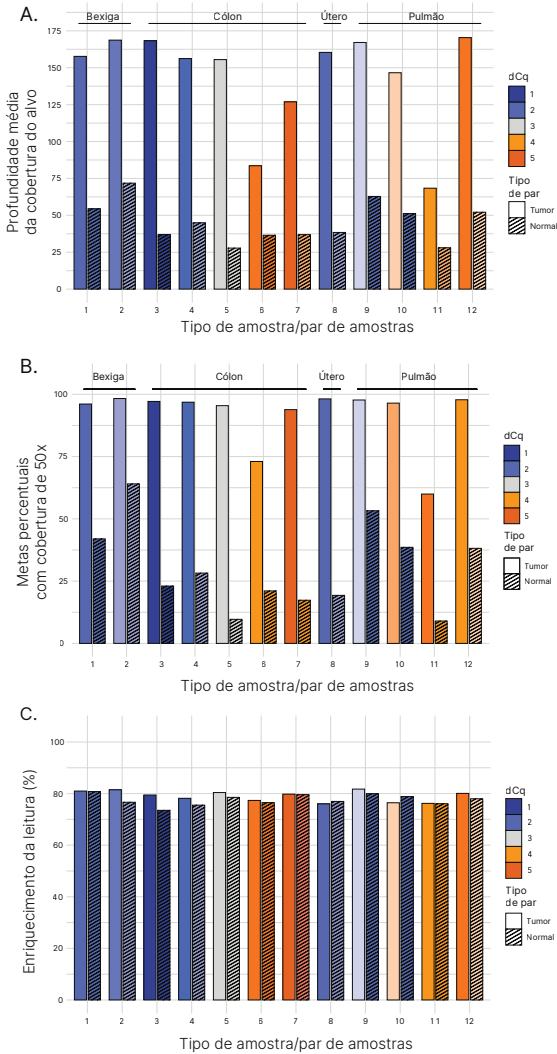
O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra excelente desempenho do ensaio de enriquecimento com amostras de tecido FFPE. As bibliotecas foram preparadas a partir de 40 ng de DNA FFPE de entrada de 12 pares tumor-normais usando o kit Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment e o Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. O sequenciamento foi realizado no NovaSeq 6000 System usando a lâmina de fluxo S1 com uma profundidade de sequenciamento direcionada ≥ 100 milhões de leituras single-end para tumor e ≥ 28 milhões de leituras single-end para amostras normais correspondentes. As bibliotecas tumorais de amostras FFPE de média a alta qualidade mostram uma profundidade de cobertura-alvo média acima de $130\times$ (onde a cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos) e $\geq 90\%$ dos alvos atingiram cobertura $\geq 50\times$, com impacto mínimo em outras métricas de controle de qualidade (CQ) da biblioteca ([Figura 3](#)).

Detecção sensível de variantes de baixa frequência

A biblioteca Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment detecta variantes pequenas de DNA em baixas frequências de alelos variantes (VAF). As bibliotecas foram preparadas usando 40 ng de Seraseq Tumor Mutation DNA Mix v2 AF10 (Seracare, N.º do catálogo 0710-0094) como amostra "tumoral" e 40 ng de Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (Seracare, N.º do catálogo 0710-0137) como amostra "normal" pareada. A mistura de mutação foi diluída para $< 10\%$ de VAF. Doze réplicas de biblioteca "tumorais" e quatro "normais" por nível de VAF foram preparadas. As 13 bibliotecas enriquecidas de 4-plex com o painel Twist for Illumina Exome 2.5 foram sequenciadas em duas lâminas de fluxo S2 no NovaSeq 6000 System com comprimento da leitura de 2×151 bp.

Para análise, as leituras de sequenciamento das bibliotecas de tumor foram subamostradas para uma profundidade de leitura de 100M, 70M e 46M single-end para explorar a relação entre cobertura no alvo colapsada por UMI e detecção de variantes.

Figura 3: Métricas de desempenho para amostras de tecido FFPE



Bibliotecas tumorais-normais de amostras de tecido FFPE de média a alta qualidade alcançaram excelentes métricas de enriquecimento, incluindo > 70% de enriquecimento de leitura, alta profundidade de cobertura-alvo média e > 90% de alvos com cobertura ≥ 50x.

As leituras para bibliotecas normais foram subamostradas para 28M de leituras single-end. A identificação de variantes foi realizada usando a aplicação DRAGEN Somatic no BaseSpace Sequence Hub.

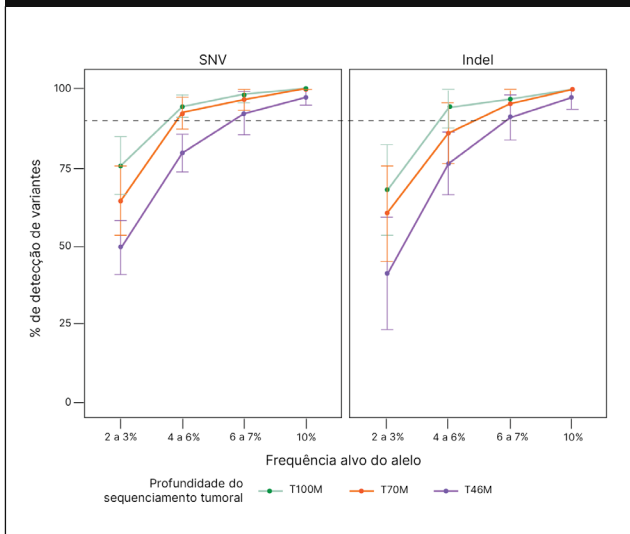
O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment detecta ampliações de genes com uma alteração de dobra de 2,5 vezes. As réplicas da biblioteca foram preparadas usando 40 ng ou 20 ng (quatro réplicas cada) de SeraSeq Solid Tumor CNV Mix +três cópias (SeraCare, N.º do catálogo 0710-2866) como amostra "tumoral" e 40 ng de DNA do SeraSeq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (SeraCare, Catálogo número 0710-0137) como amostra "normal" pareada. As bibliotecas foram sequenciadas em uma lâmina de fluxo S1 no NovaSeq 6000 System com comprimento da leitura de 2x151 bp e as leituras de sequenciamento foram subamostradas para 100 milhões de leituras single-end para CNV Mix e 28 milhões de leituras para a amostra de WT DNA Reference. A identificação somática de CNV foi realizada com a aplicação DRAGEN Somatic no BaseSpace Sequence Hub usando um arquivo de linha de base de um painel de normais construído a partir de 45 amostras de tecido FFPE normais e analisado com o algoritmo de segmentação padrão do DRAGEN. Os valores apresentados correspondem à média e ao desvio padrão das oito réplicas de CNV Mix e são comparados com a alteração de dobra prevista informada pela SeraCare.

O ensaio atinge 90% de detecção de variantes de nucleotídeo único (SNVs) e inserções/deleções (indels) com VAF de 5%, utilizando 40 ng de entrada e 100 milhões de leituras de extremidade única. (Figura 4). A sensibilidade para variantes com VAF de 6-7% permanece alta mesmo com apenas 46 milhões de leituras por biblioteca de tumor. Foi registrada sensibilidade de 100% na detecção de 12 ampliações genéticas, com aumento aproximado de alteração de dobra de 2,5 vezes, em uma amostra controle contendo três cópias extras por gene. (Figura 5).

Avaliação precisa da carga mutacional tumoral (TMB)

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment combina o conteúdo abrangente do exoma do Twist for Illumina Exome 2.5 Panel e o sofisticado pipeline de bioinformática somática do DRAGEN para fornecer estimativas precisas de TMB. A capacidade do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment de avaliar a TMB foi avaliada usando padrões de referência SeraCare TMB e DNA FFPE de amostras de tecido. As bibliotecas Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment foram preparadas com 40 ng de padrões SeraSeq gDNA TMB Mix Score 7 e TMB Mix Score 13 e suas respectivas amostras "normais" (SeraCare, N.º do catálogo 0710-1326 e 0170-1586, respectivamente).

Figura 4: Identificação de variantes com VAF baixo



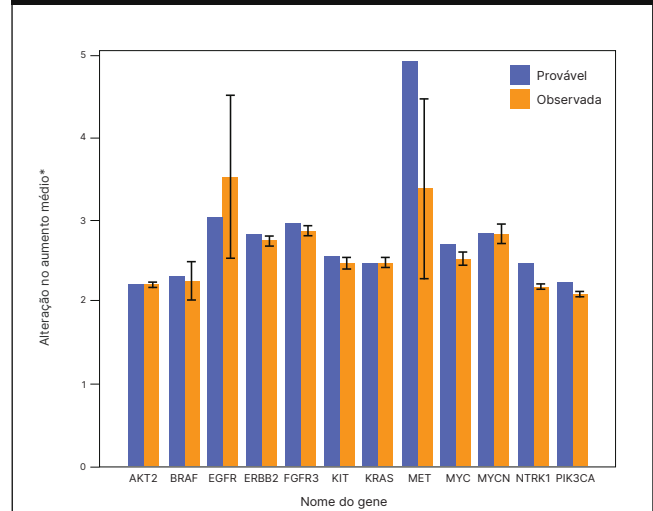
Os resultados mostram que o Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment atinge 90% de detecção de SNVs e indels com VAF de 5%, a partir de 40 ng de entrada e 100 milhões de leituras single-end (linha verde). Como esperado, a taxa de detecção para variantes com VAF de 4 a 5% diminui conforme o número de leituras. No entanto, a sensibilidade continua alta para variantes com VAF em torno de 6 a 7%, mesmo com apenas 46 milhões de leituras single-end (linha roxa) por biblioteca de tumor. A linha tracejada representa 90% de detecção de variantes.

Os dados de sequenciamento foram analisados com a aplicação DRAGEN Enrichment e os arquivos BAM importados como pares tumorais-normais para a aplicação DRAGEN Somatic. Os resultados mostram que os valores observados de TMB atendem aos valores esperados (Tabela 3).

Concordância com o TruSight™ Oncology 500

As bibliotecas Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment foram preparadas com 40 ng de DNA FFPE do tumor e amostras normais correspondentes. As bibliotecas foram sequenciadas em várias lâminas de fluxo S2 do NovaSeq 6000 System com comprimento da leitura de 2 × 151 bp e leituras de sequenciamento para bibliotecas normais tumorais e correspondentes subamostradas para o número recomendado de leituras (Tabela 2). Os dados foram analisados com a aplicação DRAGEN Enrichment e os arquivos BAM importados como pares tumor/normal para a aplicação DRAGEN Somatic no BaseSpace Sequence Hub.

Figura 5: Detecção de amplificação de gene



Foi registrada sensibilidade de 100% na detecção de 12 amplificações gênicas em uma amostra de controle com três cópias extras por gene, utilizando o Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Os valores apresentados correspondem à média e ao desvio padrão das oito réplicas de CNV Mix e são comparados com a alteração de dobra prevista informada pela SeraCare.

a. A Seracare relata que *BRAF*, *EGFR* e *MET* foram amplificados usando dois construtos sintéticos com pequenas áreas de sobreposição; portanto, eventos de CNV abrangendo essas regiões de sobreposição podem mostrar valor de amplificação inflado.

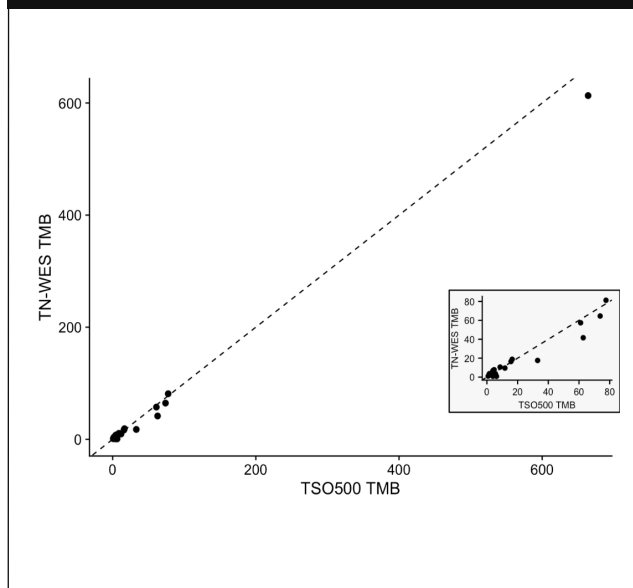
Em paralelo, 40 ng do mesmo DNA FFPE das amostras tumorais foram processados com TruSight Oncology 500 e os dados analisados usando o software local TruSight Oncology 500 v2.2.1. Os resultados mostram alta concordância ($R^2 = 0,999$) com a pontuação de TMB relatada pelo fluxo de trabalho do TruSight Oncology 500, demonstrando excelente desempenho do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment para avaliar esse biomarcador oncológico importante (Figura 6). Um pipeline de análise para biomarcadores de instabilidade de microssatélites (MSI) e deficiência de recombinação homóloga (HRD) está em desenvolvimento; os resultados da aplicação DRAGEN Somatic devem ser considerados preliminares. Entre em contato com seu especialista em vendas para saber mais sobre esses biomarcadores.

Tabela 3: Avaliação precisa de TMB com Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Mistura de TMB de gDNA Seraseq	Pontuação TMB prevista ^a	Pontuação TMB não sincronizada da aplicação DRAGEN Somatic ^{a,b}
TMB - alto	13	12,3 (0,4)
TMB - baixo	7	7,3 (0,1)

a. Os valores relatados são a média e o desvio padrão de oito réplicas técnicas.
b. As pontuações TMB não sincronizadas são relatadas como correspondentes aos critérios de variante usados pelo Seracare.

Figura 6: Avaliação precisa de TMB



A avaliação de TMB com o Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra alta concordância com as pontuações de TMB obtidas com TruSight Oncology 500. O gráfico de inserção mostra os valores de TMB com zoom ≤ 80 .

Flexibilidade de conteúdo com Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment é compatível com sondas personalizadas projetadas para cobrir novos alvos ou aumentar a cobertura de regiões de maior interesse. Os painéis são projetados para uma lista personalizada de alvos e adicionados facilmente como sondas de spike-in no protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Os painéis personalizados v2 da Illumina são projetados por meio da [ferramenta de design on-line DesignStudio™](#), ou com a ajuda da equipe do Illumina Concierge.

Para demonstrar a compatibilidade do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment com uma ampla variedade de tamanhos de painel de spike-in, o protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment foi realizado com o Twist for Illumina Mitochondrial Panel ou dois Illumina Custom Enrichment Panels v2 (Tabela 4). Os resultados demonstram uma correlação entre o tamanho do painel de spike-in e a cobertura de alvos de exoma e spike-in. Uma cobertura mais alta é obtida com o painel mitocondrial pequeno, enquanto uma cobertura excelente é obtida para os alvos do exoma e do spike-in ao usar um painel de spike-in de tamanho médio (Painel A). Para o grande painel de spike-in B, a cobertura do exoma permanece alta, enquanto a cobertura para a região visada pelo painel de spike-in é modesta, mas pode ser aumentada com sequenciamento mais profundo. Uma cobertura mais profunda de regiões sobrepostas (Figura 7A) ou cobertura de sequenciamento para novos alvos (Figura 7B) é observada na presença de painéis de spike-in. Além disso, foi observado um aumento de aprox. 10 vezes na profundidade da cobertura-alvo média e na porcentagem de alvos com cobertura $\geq 50\times$ nas regiões visadas pelo Custom Enrichment v2 Panel B quando o painel de spike-in foi combinado com o Twist for Illumina Exome 2.5 Panel durante a reação de enriquecimento (Tabela 5).

Tabela 4: Compatibilidade do Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment com conteúdo suplementar

Painel	Twist for Illumina Mitochondrial	Custom Enrichment v2 Panel A	Custom Enrichment v2 Panel B	
Tamanho do painel (bases)	16.659	244.283	1.590.551	
Número de sondas	139	2804	10.353	
Número de genes cobertos	37	79	1038	
Relação entre painel de spike-in/painel de exoma	0,008 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	
Leituras de sequenciamento ^b	100 milhões	100 milhões	100 milhões	110M–220M ^c
Exoma da cobertura-alvo média	136×	137×	111×	151×
Região de spike-in da cobertura-alvo média ^d	1397×	193×	52×	72×
Percentual de cobertura-alvo do exoma $\geq 50\times$	93%	93%	85%	93%
Percentual de cobertura-alvo de spike-in $\geq 50\times$	99,70%	99%	42%	57%

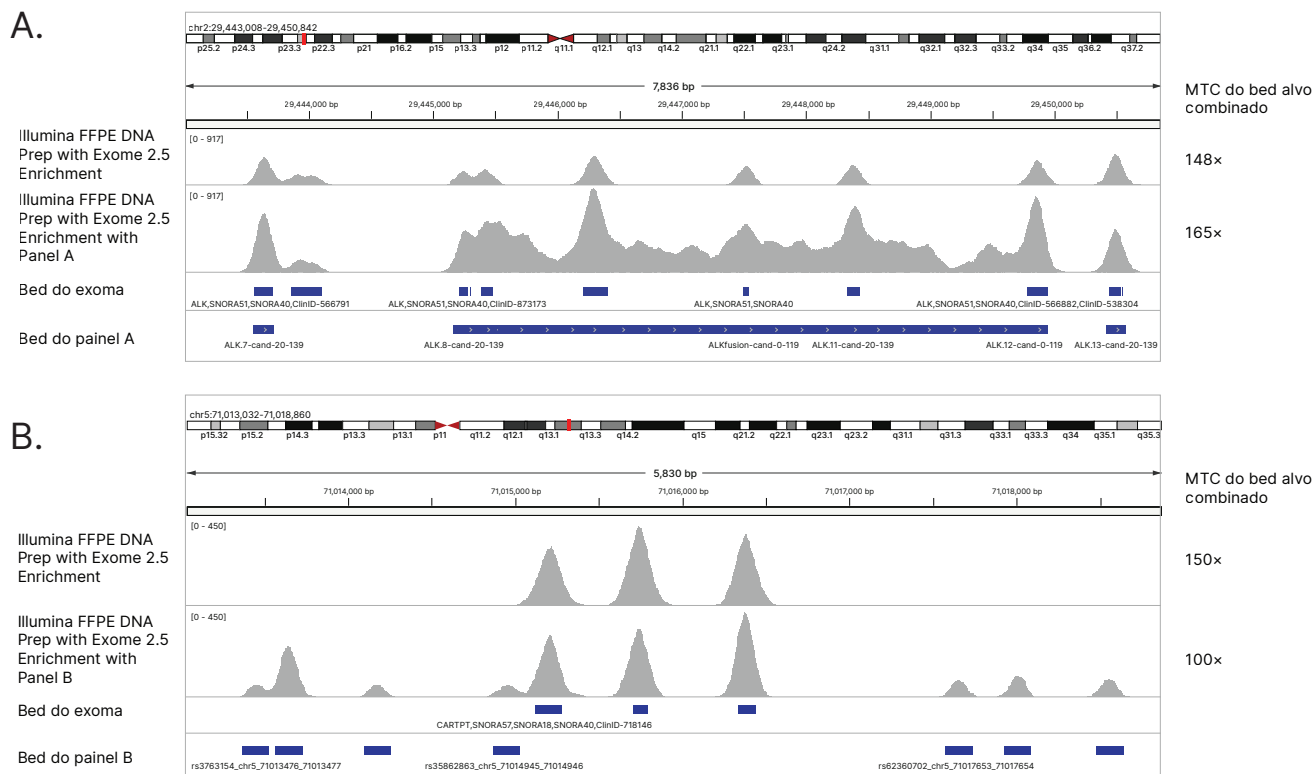
a. 2 μ l de diluição 1:50 do Twist for Illumina Mitochondrial Panel, ou 2 μ l do Custom Enrichment v2 Panel misturados com 3 μ l do Twist for Illumina Exome 2.5 Panel.
b. Número de leituras de sequenciamento single-end em milhões.
c. Indica a faixa de leituras de sequenciamento observadas para as diferentes amostras tumorais de DNA FFPE.
d. A cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos.

Tabela 5: O spike-in do Illumina Custom Enrichment v2 Panel melhora as métricas de enriquecimento

Parâmetro	Twist for Illumina Exome 2.5	Twist for Illumina Exome 2.5 + spike-in Panel ^a
Profundidade de cobertura-alvo média para a região de spike-in ^b	5,5×	52×
Spike-in da uniformidade de cobertura	20%	89%
Alvos de porcentagem de spike-in com cobertura $\geq 20\times$	5%	78%
Alvos de porcentagem de spike-in com cobertura $\geq 50\times$	4%	42%

a. Custom Enrichment v2 Panel B, consulte na [Tabela 4](#) os detalhes do painel.
b. A cobertura-alvo média foi calculada com a configuração de não fazer contagem repetida de pares sobrepostos.

Figura 7: Cobertura de sequenciamento mais profunda com Illumina Custom Enrichment v2 spike-in panels



(A) A comparação da cobertura-alvo média (MTC, calculada com a configuração de não fazer contagem repetida dos pares sobrepostos) de regiões sobrepostas entre o Illumina FFPE DNA Prep Exome 2.5 Enrichment Panel e o Custom Enrichment v2 Panel A (consulte a Tabela 4) com ou sem um painel de spike-in mostra um aumento de mais de duas vezes na cobertura na presença do Painel A de spike-in. (B) A comparação da cobertura de novas regiões direcionadas pelo Custom Enrichment v2 Panel B (consulte a Tabela 4) com ou sem painel de spike-in mostra a cobertura na presença do Painel B de spike-in.

Resumo

O Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment oferece uma solução versátil de preparação de bibliotecas otimizada e de fornecedor único para uso com DNA de baixa entrada extraído de amostras de tecido FFPE. Com a solução Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, os pesquisadores podem detectar variação somática de baixa frequência com sensibilidade analítica excepcional. A solução Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment de alto desempenho, combinada com sequenciamento em poderosos sistemas de sequenciamento Illumina e análise acelerada de dados, oferece um fluxo de trabalho normal de tumor NGS de alta qualidade para DNA FFPE, abrangendo desde o processamento de amostras até a análise de dados, de um único parceiro confiável.

Saiba mais →

[Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment](#)

[DRAGEN secondary analysis](#)

[Illumina Connected Insights](#)

Informações para pedidos	
Produto	N.º do catálogo
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex)	20104103
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex), on-premises ^a	20104104
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (16 Samples)	20104105
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (96 Samples)	20104106
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Enrichment (16 Reactions)	20104107
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
Illumina UMI DNA/RNA UD v3 Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20126235
Illumina UMI DNA/RNA UD v3 Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20126237
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
Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel	20076914
Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel	20093180
a. 10.000 Gb; licença de 1 ano do DRAGEN Server incluída.	



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-03347 PTB v3.0