

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Resultados rápidos,
versátiles y flexibles
del exoma compatibles
con un aporte reducido
de muestras FFPE

- Detecte variantes raras con frecuencias alélicas bajas a partir de ADN_g extraído de tejido FFPE.
- Prepare librerías listas para la secuenciación en ≤ 10 horas, con solo unas 4 horas de tiempo de participación activa.
- Analice los datos y las variantes de llamada con una alta sensibilidad analítica mediante el análisis secundario DRAGEN™.
- Permita la interpretación definida por el usuario y la generación de informes de investigación con Illumina Connected Insights.



Secuenciación del exoma desde la toma de la muestra hasta la obtención de información con un socio de confianza

En el campo de la investigación oncológica, las muestras de archivo fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, formalin fixed, paraffin-embedded) contienen abundante información valiosa para los estudios sobre el cáncer. Dado que las muestras FFPE suelen producir ADN muy degradado, pueden ser difíciles de analizar con métodos de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing).

ILLUMINA FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment es una solución versátil de preparación de librerías (tabla 1) que utiliza la potencia de la tecnología de NGS para lograr una detección altamente sensible de variantes poco abundantes en muestras FFPE con un aporte reducido. Esta solución de un único proveedor incluye el kit de preparación de librerías, Twist Bioscience for Illumina Exome 2,5 Panel y sistemas de secuenciación de alta y media productividad de Illumina, como NextSeq™ 2.000 System y NovaSeq™ X Series. El análisis de datos se lleva a cabo utilizando procesos DRAGEN disponibles en BaseSpace™ Sequence Hub e Illumina Connected Analytics. Illumina Connected Insights se puede utilizar para permitir el análisis y la interpretación definidos por el usuario.

Flujo de trabajo optimizado

ILLUMINA FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment forma parte de un flujo de trabajo integrado de secuenciación del exoma completo (WES, whole-exome sequencing) en pares de muestras tumorales-normales que ofrece un rendimiento y una calidad de datos excelentes. El flujo de trabajo flexible comienza con ADN genómico (ADNg) extraído de muestras FFPE, seguido de la preparación y el enriquecimiento de librerías. Se secuencian las librerías enriquecidas en los sistemas de media y alta productividad de Illumina y se realiza la llamada de variantes de alta precisión mediante el análisis secundario de DRAGEN (figura 1). Esta solución fácil de usar ofrece un alto rendimiento para la secuenciación del exoma, proporciona volúmenes de llenado fácilmente automatizables y admite el multiplexado de muestras para una adaptación eficiente (tabla 1).

Tabla 1: Resumen de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Parámetro	Especificación
Tipo de ADN	ADNg del tejido FFPE
Aporte de ADN	40 ng de ADN FFPE
Multiplexado de muestras	96-192 índices dobles únicos
Marcado de duplicados	Identificadores moleculares únicos (UMI, unique molecular identifiers) no aleatorios
Plexicidad de enriquecimiento	4 unidades de plexado
Sistemas de secuenciación compatibles	NextSeq 2000 System, celdas de flujo P3 o P4 Celdas de flujo SP, S1 o S2 de NovaSeq 6000 System Celda de flujo 1.5B de NovaSeq X Series
Tiempo total del flujo de trabajo	≤10 h
Tiempo de participación activa total	~4 h

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

Preparación de librerías rápida y flexible

ILLUMINA FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment es un ensayo de ligadura que utiliza un único paso de hibridación para la preparación rápida de librerías (figura 2). Utiliza Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel y permite el análisis de objetivos mitocondriales u otros objetivos cuando se complementa con Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel o Illumina Custom Enrichment Panel v2.

Las librerías listas para la secuenciación se preparan en ≤10 horas, con un tiempo de participación activa de solo unas 4 horas, lo que permite a los investigadores obtener la secuenciación del ADN extraído en un solo día. Para la extracción de ADN de muestras FFPE se recomienda QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 80234).



Figura 1: Desde la obtención de muestras hasta la generación de informes con un único proveedor: Illumina admite un flujo de trabajo optimizado para WES, que abarca la preparación de librerías, la secuenciación y el análisis de datos.

a. La línea de productos Illumina Connected Insights admite el análisis definido por el usuario mediante llamadas basadas en la interfaz de programación de aplicaciones (API, Application Programming Interface) a fuentes de conocimiento de terceros. La integración de Illumina Connected Insights estará disponible con una actualización del software DRAGEN en el segundo trimestre de 2025.

Cobertura flexible y adaptable

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment utiliza un panel de enriquecimiento del exoma específico, completo y actualizado. Esta cobertura específica permite una solución de WES tumoral-normal rentable, con un número óptimo de muestras por experimento de secuenciación (tabla 2). La cobertura del genoma mitocondrial (chrM) se puede añadir fácilmente utilizando Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel como panel de adición en el protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Se pueden añadir regiones de interés específicas con paneles de adición personalizados de hasta 10 000 sondas mediante Illumina Custom Enrichment Panel v2.

Rendimiento de alta calidad

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment cuenta con la misma preparación de librerías y química de enriquecimiento que Illumina Cell-Free DNA with Enrichment para permitir un rendimiento excepcional con muestras FFPE.

 Lea la [hoja de datos de Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#) para obtener más información.

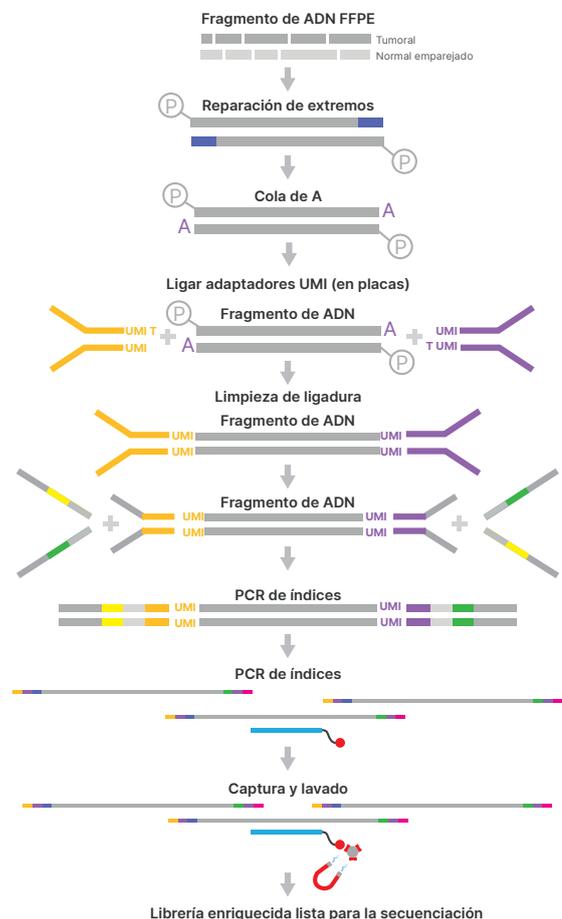


Figura 2: Preparación de librerías centrada en ligadura optimizada con enriquecimiento del exoma: tras el enriquecimiento de captura híbrida, las librerías del exoma están listas para la secuenciación.

Tabla 2: Plexicidad de secuenciación para librerías de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Tipo de muestra	Profundidad de cobertura media deseada ^a	Lecturas individuales recomendadas	Número máximo de librerías por celda de flujo					
			NextSeq 2000 System		NovaSeq 6000 System			NovaSeq X Series
			P3	P4	SP	S1	S2	1,5 B
Tumor	≥130×	≥100 M	8	12	4	12	28	12
Normal	≥30×	≥28 M	8	12	4	12	28	12

a. La cobertura media del objetivo se calculó con el ajuste de no contar por duplicado los pares superpuestos.

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment muestra un rendimiento excepcional del ensayo de enriquecimiento con muestras de tejido FFPE. Las librerías se prepararon a partir de un aporte de 40 ng de ADN FFPE de 12 pares de tejido tumoral-normal con el kit de enriquecimiento Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 y Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. La secuenciación se realizó en NovaSeq 6000 System utilizando la celda de flujo S1 con una profundidad de secuenciación selectiva de ≥100 M de lecturas individuales para el tumor y ≥28 M de lecturas individuales para las muestras normales emparejadas. Las librerías tumorales de muestras FFPE de calidad media a alta muestran una profundidad de cobertura media del objetivo superior a 130× (donde la cobertura media del objetivo se calculó con el ajuste de no contar doblemente parejas superpuestas), y ≥90 % de los objetivos lograron una cobertura ≥50×, con un impacto mínimo en otras métricas de control de calidad de librerías (figura 3).

Detección sensible de variantes de baja frecuencia

La librería de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment detecta variantes pequeñas de ADN con frecuencias alélicas de variantes (VAF, variant allele frequency) bajas. Las librerías se prepararon con 40 ng de Seraseq Tumor Mutation DNA Mix v2 AF10 (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0094) como muestra «tumoral» y 40 ng de Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0137) como muestra «normal» emparejada. La mezcla de mutaciones se diluyó a <10 % de VAF. Se prepararon doce réplicas de librerías «tumorales» y cuatro «normales» por nivel de VAF. Las 13 librerías enriquecidas con 4 unidades de plexado con el panel Twist for Illumina Exome 2.5 se secuenciaron en dos celdas de flujo S2 en NovaSeq 6000 System, con una longitud de lectura de 2 × 151 pb. Para el análisis, las lecturas de secuenciación de las librerías tumorales se submuestrearon a una profundidad de lectura de 100 M, 70 M y 46 M lecturas individuales,

para explorar la relación entre la cobertura en el objetivo contraída por UMI y la detección de variantes. Las lecturas de las librerías normales se submuestrearon a 28 M lecturas individuales. La llamada de variantes se realizó con la aplicación DRAGEN Somatic en BaseSpace Sequence Hub.

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment detecta amplificaciones génicas con un múltiplo de cambio de 2,5. Las réplicas de librerías se prepararon utilizando 40 ng o 20 ng (cuatro réplicas cada una) de Seraseq Solid Tumor CNV Mix +3 copias (SeraCare, n.º de catálogo 0710-2866) como muestra «tumoral» y 40 ng de ADN del material de control de Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) (SeraCare, n.º de catálogo 0710-0137) como muestra «normal» emparejada. Las librerías se secuenciaron en una celda de flujo S1 en el sistema NovaSeq 6.000 con una longitud de lectura de 2 × 151 pb y las lecturas de secuenciación se submuestrearon a 100 M de lecturas individuales para CNV Mix y 28 M lecturas para la muestra de control de ADN de WT. La llamada de variantes en el número de copias (CNV, copy number variant) somáticas se realizó con la aplicación DRAGEN Somatic en BaseSpace Sequence Hub utilizando un archivo de control de un panel de normales construido a partir de 45 muestras de tejido FFPE normales y analizado con el algoritmo de segmentación predeterminado de DRAGEN. Los valores notificados son la media y la desviación estándar de las ocho réplicas de CNV Mix y se comparan con el múltiplo de cambio previsto notificado por SeraCare.

El ensayo logra una detección del 90 % de variantes de nucleótido único (SNV, single nucleotide variants) (figura 4A) e inserciones/deleciones (indels) (figura 4B) a una VAF del 5 % a partir de un aporte de 40 ng con 100 M lecturas individuales. La sensibilidad a una VAF del 6-7 % permanece alta con tan solo 46 M de lecturas por librería tumoral. Se observó una sensibilidad del 100 % para la detección de 12 amplificaciones génicas con un múltiplo de cambio de aproximadamente 25 en una muestra de control con tres copias adicionales por gen (figura 5).

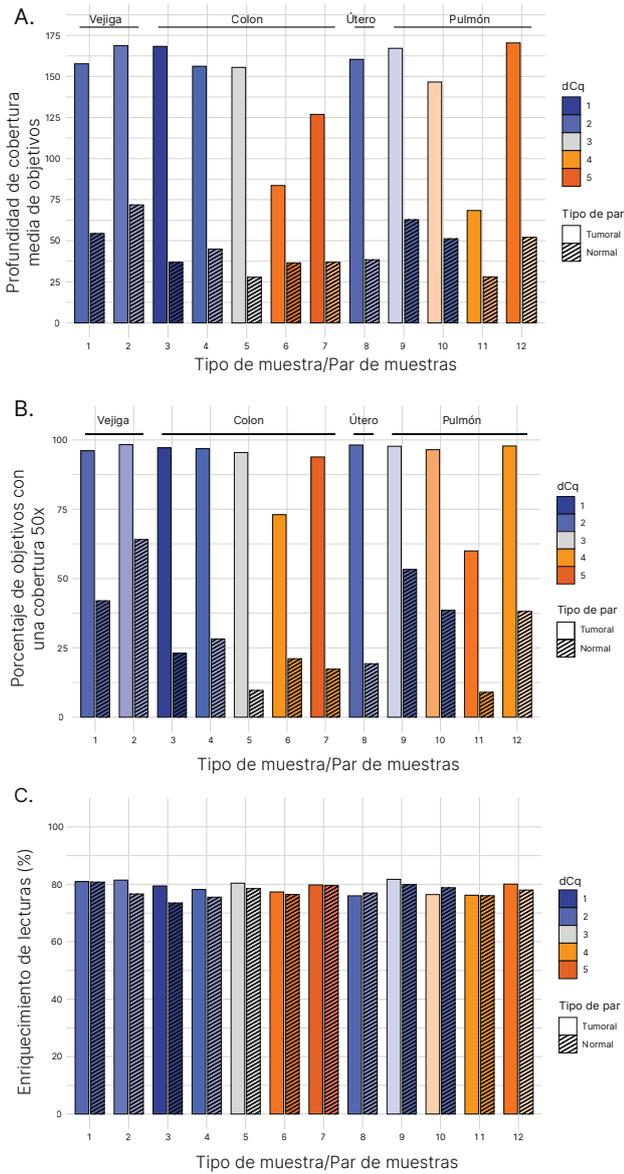


Figura 3: Métricas de rendimiento para muestras de tejido FFPE: las librerías de muestras de tejido FFPE tumoral-normal de calidad media a alta lograron excelentes métricas de enriquecimiento, incluidas superiores al 70 % de enriquecimiento de lectura, profundidad de cobertura media alta del objetivo y más del >90 % de objetivos con $\geq 50\times$ de cobertura.

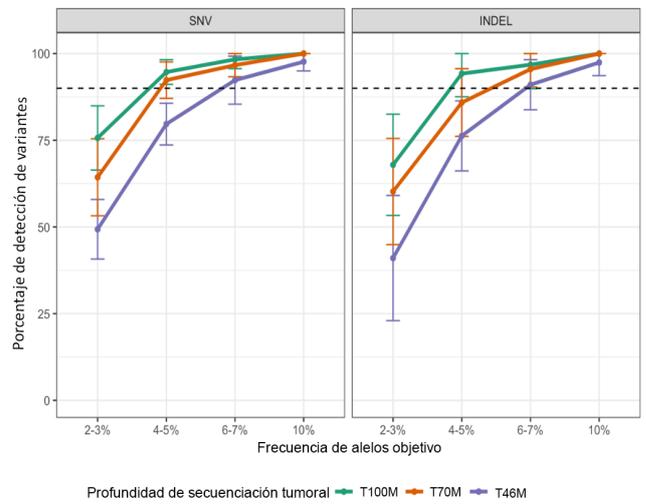


Figura 4: Detección de variantes con baja VAF: los resultados demuestran que Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment logra una detección del 90 % de SNV e indels con una VAF del 5 % a partir de una entrada de 40 ng con 100 M de lecturas individuales (línea verde). Como cabía esperar, la tasa de detección de variantes con una VAF del 4-5 % disminuye con el número de lecturas. Sin embargo, la sensibilidad sigue siendo alta para las variantes con una VAF de alrededor del 6-7 % con tan solo 46 M de lecturas individuales (línea morada) por librería tumoral. La línea discontinua representa un 90 % de detección de variantes.

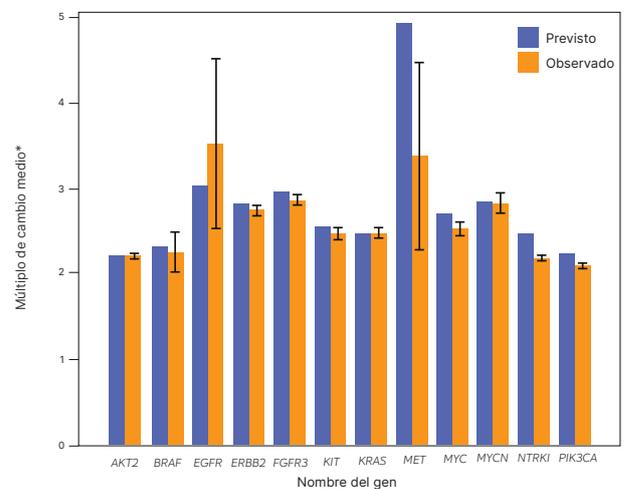


Figura 5: Detección de amplificación génica: se observó una sensibilidad del 100 % con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment para la detección de 12 amplificaciones génicas en una muestra de control con tres copias adicionales por gen. Los valores notificados son la media y la desviación estándar de las ocho réplicas de CNV Mix y se comparan con el múltiplo de cambio previsto notificado por Seracare.
*Seracare informa de que BRAF, EGFR y MET se amplificaron utilizando dos construcciones sintéticas con pequeñas áreas de superposición, por lo que los eventos de CNV que abarcan estas regiones de superposición pueden mostrar un valor de amplificación inflado.

Evaluación precisa de la carga mutacional del tumor (TMB)

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment combina el contenido completo del exoma del Twist for Illumina Exome 2,5 Panel y la sofisticada línea de bioinformática de DRAGEN Somatic para proporcionar estimaciones precisas de la carga mutacional del tumor (TMB, tumor mutational burden). La capacidad de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment para evaluar la TMB se evaluó utilizando los estándares de control de la TMB de SeraCare y el ADN FFPE de muestras de tejido. Las librerías de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment se prepararon con 40 ng de los patrones Seraseq gDNA TMB Mix Score 7 y TMB Mix Score 13 y sus respectivas muestras «normales» (SeraCare, n.º de catálogo 0710-1326 y 0170-1586, respectivamente). Los datos de secuenciación se analizaron con la aplicación DRAGEN Enrichment y los archivos BAM se importaron como pares tumor-normal a la aplicación DRAGEN Somatic. Los resultados muestran que los valores de TMB observados cumplen los valores previstos (tabla 3).

Tabla 3: Evaluación precisa de la TMB con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Seraseq gDNA TMB Mix	Puntuación de TMB prevista	Puntuación de TMB de la aplicación DRAGEN Somatic
TMB alta	13	16,7 (0,1)
TMB baja	7	9,4 (0,1)

Los valores notificados son la media y la desviación estándar de seis réplicas técnicas.

Concordancia con TruSight™ Oncology 500

Las librerías de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment se prepararon con 40 ng de ADN FFPE de muestras tumorales y normales emparejadas. Las librerías se secuenciaron en varias celdas de flujo S2 de NovaSeq 6.000 System con una longitud de lectura de 2 ×151 pb, y las lecturas de secuenciación para las librerías tumorales y normales emparejadas submuestreadas al número recomendado de lecturas (tabla 2). Se analizaron los datos con la aplicación DRAGEN Enrichment, y se importaron los archivos BAM como pares tumoral/normal a la aplicación DRAGEN Somatic en BaseSpace Sequence Hub. En paralelo, se procesaron 40 ng del mismo ADN FFPE de las muestras tumorales con TruSight Oncology 500 y se analizaron los datos con el software de la aplicación local TruSight Oncology 500 v2.2.1.

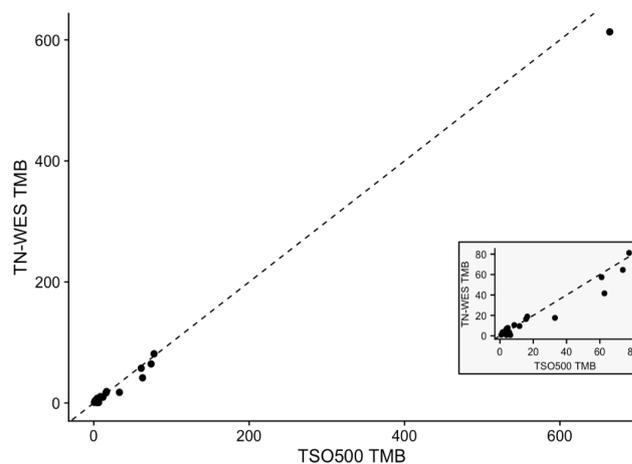


Figura 6: Evaluación precisa de la TMB: la evaluación de la TMB con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment muestra una alta concordancia con las puntuaciones de la TMB obtenidas con TruSight Oncology 500. El gráfico incrustado muestra los valores de TMB ampliados a ≤ 80 .

Los resultados muestran una alta concordancia ($R^2 = 0,999$) con la puntuación de TMB notificada por el flujo de trabajo de TruSight Oncology 500, lo que demuestra un rendimiento excelente de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment para evaluar este biomarcador oncológico clave (figura 6). Se está desarrollando un proceso de análisis para biomarcadores de inestabilidad de microsatélites (MSI, microsatellite instability) y deficiencia de recombinación homóloga (HRD, homologous recombination deficiency); los resultados de la aplicación DRAGEN Somatic deben considerarse preliminares. Póngase en contacto con su especialista de ventas para obtener más información sobre estos biomarcadores.

Versatilidad del contenido con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment es compatible con sondas personalizadas diseñadas para cubrir nuevos objetivos o aumentar la cobertura de regiones de mayor interés. Los paneles están diseñados para una lista personalizada de objetivos y se añaden fácilmente como sondas de adición en el protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Los paneles personalizados v2 de Illumina se diseñan a través de la herramienta de [diseño en línea DesignStudio™](#) o con la ayuda del equipo de Illumina Concierge.

Tabla 4: Compatibilidad de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con contenido complementario

Panel	Twist for Illumina Mitochondrial	Custom Enrichment v2 Panel A	Custom Enrichment v2 Panel B	
Tamaño del panel (bases)	16 659	244 283	1 590 551	
Número de sondas	139	2804	10 353	
Número de genes cubiertos	37	79	1038	
Relación entre el panel de adición y el panel del exoma	0,008 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	
Lecturas de secuenciación ^b	100 M	100 M	100 M	110-220 M ^c
Cobertura media del objetivo en el exoma ^d	136×	137×	111×	151×
Cobertura media del objetivo en la región de adición ^d	1397×	193×	52×	72×
Porcentaje de objetivos de cobertura del exoma $\geq 50\times$	93 %	93 %	85 %	93 %
Porcentaje de cobertura de objetivos en la región de adición $\geq 50\times$	99,70 %	99 %	42 %	57 %

a. 2 μ l de dilución 1:50 de Twist for Illumina Mitochondrial Panel o 2 μ l de Custom Enrichment v2 Panel mezclado con 3 μ l de Twist for Illumina Exome 2,5 Panel.

b. Número de lecturas de secuenciación individual en millones.

c. Indica el intervalo de lecturas de secuenciación observadas para las diferentes muestras tumorales de ADN FFPE.

d. La cobertura media del objetivo se calculó con el ajuste de no contar por duplicado los pares superpuestos.

Para demostrar la compatibilidad de Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment con una amplia gama de tamaños de paneles de adición, el protocolo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment se realizó con Twist for Illumina Mitochondrial Panel o dos Illumina Custom Enrichment Panel v2 (tabla 4). Los resultados demuestran una correlación entre el tamaño del panel de adición y la cobertura de los objetivos de la adición y el exoma. Se consigue una mayor cobertura con el panel mitocondrial pequeño, mientras que se consigue una cobertura excelente tanto para los objetivos de la adición y el exoma cuando se utiliza un panel de adición de tamaño medio (panel A). Para el panel B de adición grande, la cobertura del exoma sigue siendo alta, mientras que la cobertura para la región objetivo del panel de adición es modesta, aunque se puede aumentar con una secuenciación más profunda. En presencia de paneles de adición se observa una cobertura más profunda de las regiones superpuestas (figura 7A) o una cobertura de secuenciación para nuevos objetivos (figura 7B). Además, se observó un aumento de aproximadamente 10 veces en la profundidad media de cobertura del objetivo y el porcentaje de objetivos, con una cobertura ≥ 50 veces en las regiones objetivo del panel B de Custom Enrichment v2, cuando el panel de adición se combinó con Twist for Illumina Exome 2,5 Panel durante la reacción de enriquecimiento (tabla 5).

Tabla 5: La adición de Illumina Custom Enrichment v2 Panel mejora las métricas de enriquecimiento

Parámetro	Twist for Illumina Exome 2.5	Twist for Illumina Exome 2,5 + panel de adición ^a
Profundidad media de cobertura del objetivo para la región de adición ^b	55×	52×
Aumento de uniformidad de cobertura	20 %	89 %
Porcentaje de adición de objetivos con cobertura $\geq 20\times$	5 %	78 %
Porcentaje de adición de objetivos con cobertura $\geq 50\times$	4 %	42 %

a. Custom Enrichment v2 Panel B, consulte la tabla 4 para obtener información detallada sobre el panel.

b. La cobertura media del objetivo se calculó con el ajuste de no contar por duplicados los pares superpuestos.

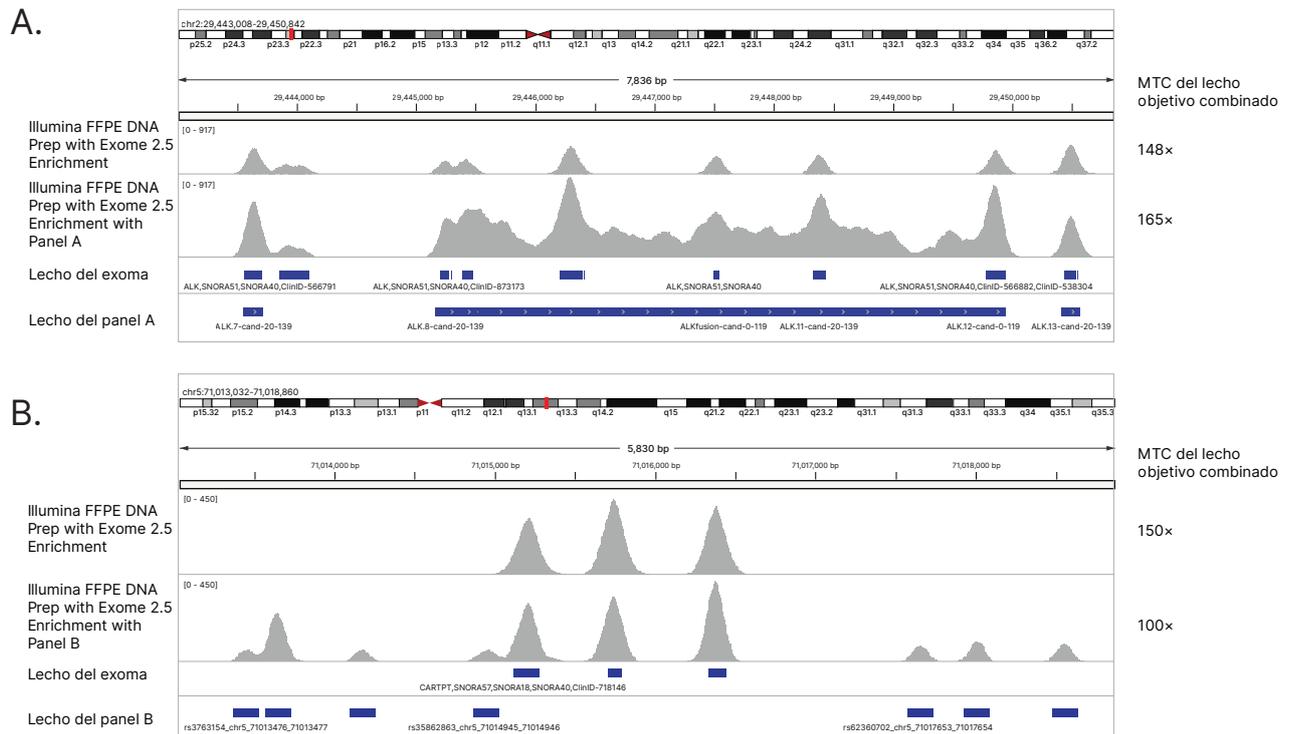


Figura 7: Cobertura de secuenciación más profunda con paneles de adición de Illumina Custom Enrichment v2: (A) La comparación de la cobertura media del objetivo (MTC, mean target coverage; calculado con el ajuste de no contar por duplicado los pares superpuestos) de regiones superpuestas entre Illumina FFPE DNA Prep Exome 2,5 Enrichment Panel y Custom Enrichment v2 Panel A (consulte la tabla 4), con o sin un panel de adición, muestra un aumento de la cobertura de más del doble en presencia del panel A de adición. (B) La comparación de la cobertura de nuevas regiones objetivo por parte de Custom Enrichment v2 Panel B (consulte la tabla 4), con o sin panel de adición, muestra la cobertura en presencia del panel B de adición.

Resumen

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment ofrece una solución de preparación de librerías versátil y de un único proveedor optimizada para su uso con un aporte reducido de ADN de muestras de tejido FFPE. Con la solución Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, los investigadores pueden detectar variaciones somáticas de baja frecuencia con una sensibilidad analítica excepcional. La solución de alto rendimiento Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2,5 Enrichment, junto con la secuenciación en potentes sistemas de secuenciación de Illumina y el análisis de datos acelerado, ofrece un flujo de trabajo de NGS tumoral-normal de alta calidad para el ADN FFPE, que abarca desde el procesamiento de muestras hasta el análisis de datos, a través de un único socio de confianza.

Más información

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

[Análisis secundario de DRAGEN](#)

[Illumina Connected Insights](#)

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de 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), en las instalaciones ^a	20104104
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (16 Samples)	20104105
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (16 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; licencia de servidor DRAGEN de 1 año incluida.



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

© 2025 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-03347 ESP v1.0