illumina®

TruSeq® Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット

アンプリコンシーケンスのための自在なカスタムソリューションで、少量インプットおよび FFPE 由来 DNA サンプルから高精度で詳細な結果を取得

特長

- **少量の DNA インプットと FFPE サンプルに対応**
  わずか 10 ng のゲノム DNA インプット量で、難しい FFPE サンプルから精確に変異を検出
- **信頼の高品質データ**
  最適化されたプロトコールにより高い均一性と特異性を実現
- **迅速なワークフロー**
  わずか 3 時間のハンズオンタイムでライブラリー調製を 6.5 時間で完了でき、自動化しやすいワークフロー
- **シームレスなワークフローソリューション**
  簡潔なデータ解析を含む、フルサポートの最適化されたワークフローソリューション

はじめに

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、10ng のゲノム DNA（gDNA）を使ったターゲットリシーケンス用に完全なカスタマイズが可能なアンプリコンベースのアッセイです。この拡張性があるアッセイにより、一回の反応で、対象となる複数のターゲットを同時にキャプチャーして、1 つのプールで 1536 までのアンプリコンをシーケンスすることが可能です。TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、保存された腫瘍組織などのホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルに柔軟に対応します。MiSeq® システムや NextSeq® システム での使用に最適化されたこのアッセイにより、低頻度の体細胞変異の検出に必要な高精度と高いカバレッジ均一性が得られます。一貫した結果が得られる統合されたワークフローにより、TruSeqCustom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、ターゲットリシーケンスの実施に信頼性の高い、迅速で使いやすいソリューションを提供しています。

包括的なソリューション

イルミナが提供するアンプリコンシーケンス用に統合されたワークフローでは、デザインから解析までフルサポートのソリューションがご利用いただけます（図 1）。TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、イルミナのシーケンサーでお使いいただくようデザインされ最適化されているため、他の装置での追加作業は必要ありません。ライブラリー調製からシーケンス、さらにデータ解析までの技術スペシャリストおよびフィールドスペシャリストによる一貫したサポートに加え、イルミナサポートチームの総合的な専門知識により、迅速な問題解決やラボでのダウンタイムの低減が保証されています。イルミナのコンシェルジュサービスをご利用いただけば、カスタムパネル作成時のプローブデザインや機能評価など、追加のサポートもお受けいただけます。†

* NextSeq® システムや HiSeq® システムにも対応しています。

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。

少量の DNA インプット

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、わずか 10ng の gDNA からさまざまな DNA インプット量に対応しているため、極度に制限のあるサンプルからも確実にデータを取得できます。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルにも対応し、DNA の品質に応じて 10ng~50ng の FFPE 由来 DNA でスタートすることができます。この優れた一貫性のあるパフォーマンスを誇るアッセイにより、DNA スタート量の多少を問わず、安定した結果を得ることができます（図 2）。

確かなアッセイデザイン

TruSeq Custom Amplicon Low Inputオリゴヌクレオチドプローブは、最適化されたカバレッジを提供する、無料で使いやすいオンラインツールの Illumina DesignStudio™ ソフトウェアでデザインされています（図 3）。DesignStudio は、あらゆる遺伝子を平均 94% 以上の *in silico* カバレッジで網羅しながら TruSeq Custom Amplicon Low-Input をデザインしています。最も一般的な 20 の遺伝子で、DesignStudio は、平均 97% 以上の *in silico* カバレッジを実現しています。イルミナのコンシェルジュサービスでは、ターゲットカバレッジ率を上げるための追加のサポートを提供しています。

† イルミナのコンシェルジュサービスでは、in silico デザインでの最適化から機能および性能の評価や改良、出荷に至るまで、専門的な支援を提供しています。詳細につきましては、弊社担当営業までお問い合わせください。

‡ 最良の結果を得るために、イルミナでは、10ng の DNA インプットを推奨しています。

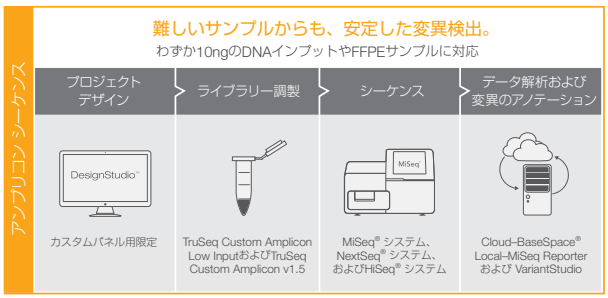


図1:アンプリコンシーケンスのシームレスなワークフロー TruSeq Custom Amplicon Low Inputライブラリー調製キットは、デザインからデータ解析まで、統合されたフルサポートのアンプリコンシーケンス用ワークフローを提供しています。

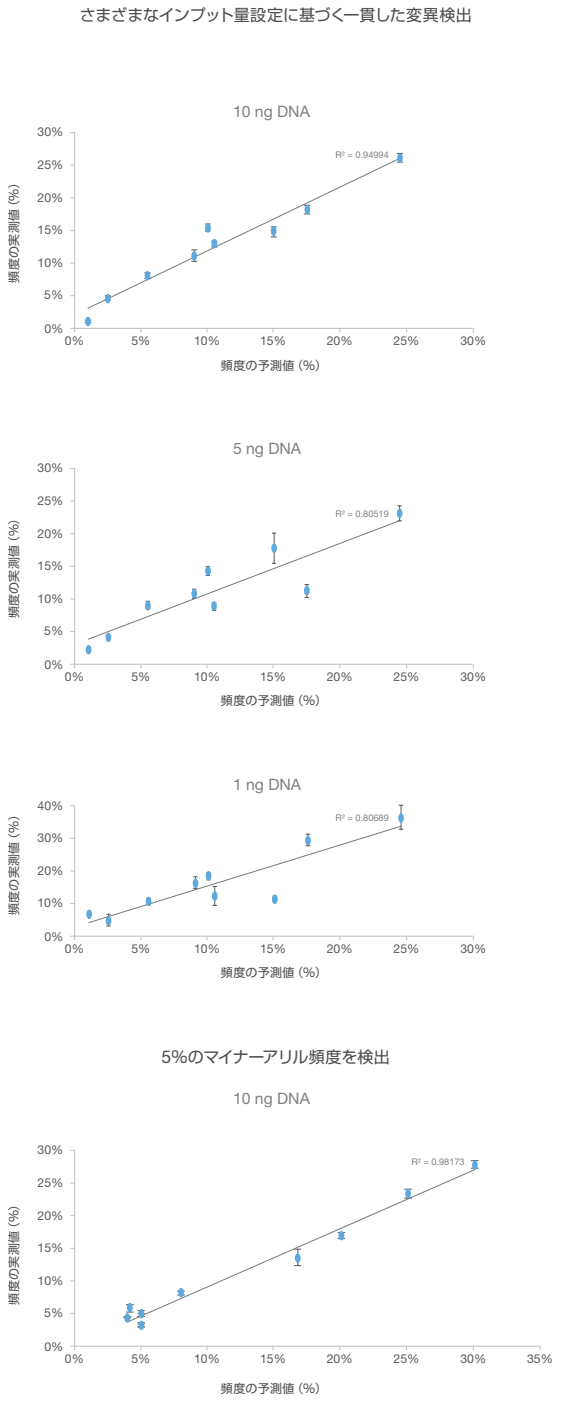


図2:(A)さまざまなインプット量設定に基づく一貫した変異検出 TruSeq Custom Amplicon Low Inputライブラリー調製キットを使用した10ng、5ng、および1ngの高品質なFFPE由来DNAの変異頻度は、その予測値と測定値に非常に高い一致がみられます。Horizon Diagnostics HD200から得たDNAの参照サンプルを、レプリケート4でTruSeq Custom Amplicon Low Inputワークフローに従ってTruSeq Amplicon-Cancer Panelプライマープールで調製し、MiSeqシステムでシーケンスを行いました。MiSeq Reporterソフトウェアによりバリアントコールを行いました。R^2 値を表示しています。**(B)5%のマイナーアリル頻度を検出** TruSeq Custom Amplicon Low Inputライブラリー調製キットは、変異アリルの安定した再現性ある検出を行います。10ngのインプット量でHorizon Diagnostics FFPEサンプルHD729のわずか5%頻度の6つのSNPをいずれも検出できました。

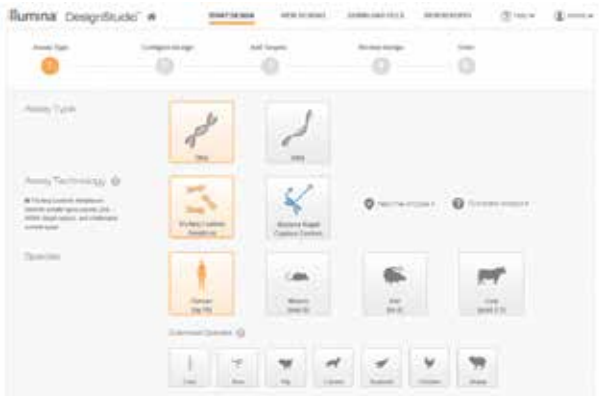
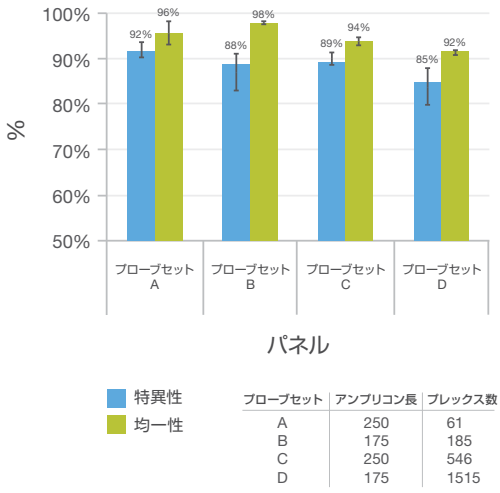


図3:カスタムのプローブデザイン DesignStudioを使ってターゲットゲノム領域と試行したアンプリコンを可視化して、デザインのカバレッジとスコアを評価します。

業界をリードするデータ品質

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットは、最も広く利用されているシーケンステクノロジーである 1 塩基合成（SBS）ケミストリーを採用した MiSeq システム、Next-Seq システム、および HiSeq システムで利用いただけます。イルミナのシーケンサーは、ほとんどの塩基配列を Q30[§] 以上の精度でサポートしています。[1–5] イルミナのシーケンサーと併用すれば、TruSeq Custom Amplicon Low-Input ライブラリー調製キットは、アンプリコン長やプールプレックス数に左右されない高いカバレッジ均一性と特異性を実現します（図 4）。質の高い結果が一貫して得られることで、繰り返し領域や GC リッチコンテンツなど難しいとされるターゲットを対象とする場合でも、データの精確性を信頼することができます。6 バリアントコールの信頼性を向上させるために、3 つのレプリケートのランが並列的に行えます。



プローブセット	アンプリコン長	プレックス数
A	250	61
B	175	185
C	250	546
D	175	1515

図4:(A)10ngのインプット量でサイズの異なるパネルでも一貫したパフォーマンス アンプリコンの長さやプレックス数に左右されない高い特異性と均一性。Coriellサンプルから参照DNAを抽出しました。

§ Q30 = 1000 ベースコールあたり 1 エラー、あるいは 99.9% の精度

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。

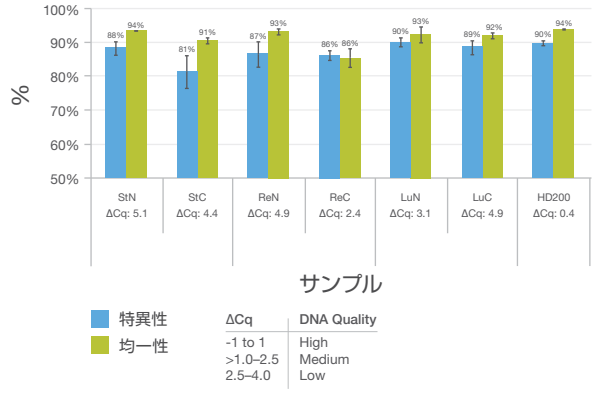


図4:(B)胃、直腸、肺の3つの腫瘍/正常組織から抽出した分解の進んだFFPEサンプル50ngのインプット量で、低いプレックス数(125)でも頑健なパフォーマンス あらゆる低品質の腫瘍/正常FFPEサンプルペアで、ユーザーAのパネルがレプリケート3で示した高い特異性と均一性。

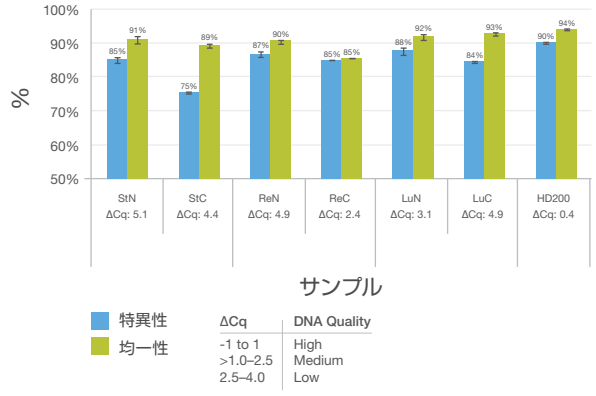


図4:(C)分解の進んだFFPEサンプル50ngのインプット量で、中程度のプレックス数(577)でも頑健なパフォーマンス あらゆる低品質の腫瘍/正常FFPEサンプルペアで、ユーザーBのパネルが示した高い特異性と均一性。

FFPE の品質評価

イルミナでは、FFPE サンプルに対応した TruSeq FFPE DNA ライブラリー調製 QC キットをご用意しています。簡単な qPCR 反応により DNA 品質を評価し、シーケンスパラメーターに関する情報を提供します。このステップで、シーケンスの要件を満たすサンプルのみを選択して調製するため、低品質のサンプルや分解の進んだサンプルによって生じる無駄なリソースを確実に抑えられます。QC ステップで得られた結果を基に、DNA の推奨インプット量が確定します。TruSeq FFPE DNA ライブラリー調製 QC キットを TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットと併用することで、ラボの予算を最大限に有効利用することができます。

イルミナのコンシェルジュを利用して機能を拡大

イルミナのコンシェルジュサービスでは、TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットのデザインや機能拡大のための追加的サポートを提供しています。このキットには、アリル検出を増進し精度を向上させるため、独自に分子識別子を組み込むことが可能です。[7] 独自の分子識別子によって PCR デュプリケートを除去することで、個々の分子を検出することが可能になります。TruSeq Custom Amplicon Low Input アッセイは、二本鎖のシーケンスに対応しており、ホルマリン固定中の脱アミノ化に起因しうる偽陽性率を除くことができます。イルミナのコンシェルジュでは、100bp 以下のより小さなアンプリコンのデザインを可能にするサービスも提供しており、断片化された DNA への対応を強化しています。イルミナのコンシェルジュサービスの利用につきましては、弊社担当営業までお問い合わせください。

迅速なワークフロー

効率化された簡便な TruSeq Custom Amplicon Low Input のワークフローでは、いくつかの利点を享受いただけます。自動化しやすいシンプルなビーズベースの精製法を採用しているため（図 5）、TruSeq Custom Amplicon Low Input のアッセイは、わずか 3 時間のハンズオンタイムにより 6.5 時間で完了できます。

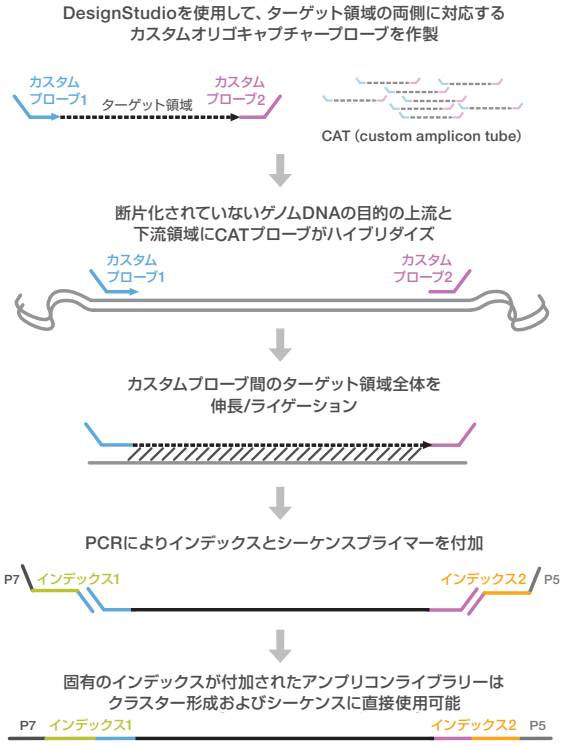


図5:TruSeq Custom Amplicon Low Inputのワークフロー TruSeq Custom Amplicon Low Inputのワークフローは1日足らずで完了。

簡便化された解析

得られたデータは、イルミナのシーケンサーシステムからゲノムコンピューター環境である BaseSpace® に直接転送することができます。このプラットフォームでは、専門家が好んで利用する解析パイプラインを 1 つにまとめて使いやすい 1 つのインターフェースに表示するため、タッチパネル操作の BaseSpace アプリを使ったデータ解析が簡単に行えます。TruSeq Amplicon App がカスタムパネルの解析を効率化し、読みやすいフォーマットで結果を表示します（図 6）。VariantStudio App が、シーケンスデータから得られた疾患に関連する変異の迅速なフィルタリング、同定、分類を行います。BaseSpace でデータ例が閲覧できるため、ソリューションを実行する前に、イルミナのキットやシステムを使って作成したデータを検索し、評価することができます。

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。

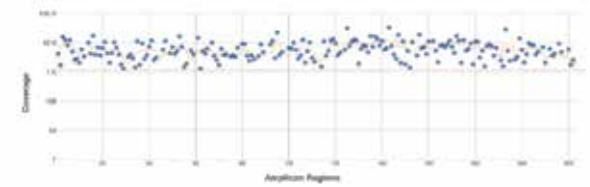


図6:TruSeq Amplicon App TruSeq Amplicon Appはデータ解析を簡便化して、直感的なフォーマットで結果を表示します。TruSeq Amplicon-Cancer PanelによるMiSeqシステムでの代表的なランが示すアンプリコンカバレッジ。

表 1 : TruSeq Custom Amplicon Low Input アッセイ仕様

パラメーター	仕様
搭載された参照ゲノム	ヒト マウス ラット ウシ
その他の生物種	トウモロコシ、イネ、ブタ、イヌ、ダイズ、ニワトリ、ヒツジ
カスタムの参照ゲノム	イルミナのコンシェルジュが提供する専門知識を利用して、あらゆる生物種でのカスタムパネルがデザインできます。
アンプリコンサイズ	150bp、175bp、および 250bp
FFPE 由来 DNA に推奨されるアンプリコンサイズ	150bp または 175bp
パネルあたりのオリゴプール数	● 標準デザイン : 1 ● 二本鎖デザイン : 2
アンプリコンプレックス数（1 プール）	● 16~1536
標準 gDNA のインプット必要量	10ng
FFPE 由来 DNA のインプット必要量	QC 結果に応じて 10ng~50ng
シーケンスデータの品質	90% 以上の塩基配列が Q30 以上
二本鎖シーケンス	DesignStudio でデザイン可
カバレッジ均一性	80% 以上の塩基配列を平均カバレッジの 20% 以上でカバー
特異性	オンターゲットアライメントリード数 70% 以上

まとめ

TruSeq Custom Amplicon Low-Input ライブラリー調製キットは、アンプリコンシーケンス用にシームレスなワークフローソリューションを提供しています。TruSeq Custom Amplicon Low-Input ライブラリー調製キットは、わずかな DNA インプット必要量で高品質なデータを産出するため、極度に難しいとされるサンプルでも安定したシーケンスが行えます。

製品情報

製品名	カタログ番号
TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット（96 サンプル）	FC-134-2001
TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キット（16 サンプル）	FC-134-2002
TruSeq FFPE DNA ライブラリー調製 QC キット	FC-121-9999

参考文献

1. Perkins TT, Tay CY, Thirriot F, Marshall B. Choosing a benchtop sequencing machine to characterize *Helicobacter pylori* genomes. *PLoS One*. 2013;8:e67539.
2. Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.
3. Ross MG, Russ C, Costello M, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol*. 2013;14:R51.
4. Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, et al.Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol*. 2013;31:294-296.
5. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012;30:434-439.
6. Wong SQ, Fellowes A, Doig K, et al.Assessing the clinical value of targeted massively parallel sequencing in a longitudinal, prospective population-based study of cancer patients. *Br J Cancer*. 2015;112:1411-1420.
7. Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, et al.Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2011;9:72-74.

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

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, Design Studio, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。
その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。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。

Pub. No. 770-2015-J012 11DEC2015

illumina®