

TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx

Ein validiertes, von der FDA reguliertes, CE-IVD-markiertes Kit, das es klinischen Labors ermöglicht, anwendungsspezifische Assays für MiSeq™Dx- und NextSeq™ 550Dx-Sequenzierungsgeräte zu entwickeln.

Vorteile

- Flexibles Assay-Design**
Für die Erfüllung individueller, benutzerdefinierter Anforderungen konzipiert
- Validiertes Kit**
Validierte Leistungsdaten für die Bibliotheksvorbereitung bei Verwendung mit Dx-Sequenzierungsgeräten und -Reagenzien von Illumina
- Für eine Vielfalt von Probentypen geeignet**
Optimierte Bibliotheksvorbereitung für die Sequenzierung von DNA, die aus FFPE-Gewebe (formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe) und Vollblutproben extrahiert wurde
- Hohe Assay-Reproduzierbarkeit**
Einheitliche Ergebnisse bei mehreren Bedienern und Systemen

Einleitung

Das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (Abbildung 1) ist ein validiertes, von der Food and Drug Administration (FDA) reguliertes und der Conformité-Européene-Richtlinie für *In-vitro-Diagnostika* entsprechendes (CE-IVD-markiertes) Amplicon-Sequenzierungs-Kit, das es klinischen Labors ermöglicht, anwendungsspezifische NGS-Assays (Next Generation Sequencing) zu entwickeln. Diese Sequenzierungs-Assays können mit den FDA-regulierten, CE-IVD-markierten MiSeqDx- und NextSeq 550Dx-Geräten verwendet werden. Zusammen bieten das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und die Illumina Dx-Sequenzierungsgeräte eine umfassende DNA-zu-Daten-Lösung mit der Genauigkeit und Zuverlässigkeit, die in einem regulierten Umfeld benötigt werden. Mit der Leistungsfähigkeit von NGS können klinische Labors ihren Kunden ein ständig wachsendes Angebot an diagnostischen Anwendungen zur Verfügung stellen.

Validierte Lösung zur Bibliotheksvorbereitung

Das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bietet eine validierte Lösung zur Bibliotheksvorbereitung, die hochwertige Reagenzien und einen optimierten Workflow beinhaltet. Die Validierung von Reagenzien für die Bibliotheksvorbereitung gewährleistet eine konsistente Leistung von Charge zu Charge, ermöglicht die langfristige Verwendung von entwickelten Assays und erleichtert das Change Management. Die Verwendung validierter Reagenzien macht es überflüssig, wertvolle Laborressourcen für die erneute Validierung von Reagenzien oder Assays für zukünftige Läufe aufzuwenden. Der schnelle, effiziente Workflow benötigt nur 50 ng genomische DNA (gDNA) oder 10 µl von qualifizierter FFPE-DNA, um in weniger als 2 Tagen qualitativ hochwertige Sequenzierungsbibliotheken zu erzeugen.

Für *In-vitro-Diagnostik*. Informationen zur Verfügbarkeit in Ihrer Region erhalten Sie von einem Illumina-Vertreter.



Abbildung 1: TruSeq Custom Amplicon Kit Dx – Das FDA-konforme, CE-IVD-markierte TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bietet Reagenzien für die Bibliotheksvorbereitung, die es klinischen Labors ermöglichen, eigene Diagnosetests zu entwickeln, die für die Verwendung auf Illumina Dx-Sequenzierungsgeräten vorgesehen sind.

Benutzerdefiniertes Assay-Design

Mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx entwickeln klinische Labors Assays unter Verwendung selbst entworfener Oligonukleotidsonden. Diese Anpassungsmöglichkeit bietet Benutzern die Flexibilität, auf bestimmte Regionen von Interesse

Tabelle 1: Erkennungsfähigkeit von TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

Parameter	Keimbahn	Somatisch
Genomischer Kontext		
GC-Inhalt	19–78 %	19–73 % ^a
PolyA-Länge	≤ 8	≤ 8
PolyT-Länge	≤ 10	≤ 10
PolyG-Länge	≤ 7	≤ 6
PolyC-Länge	≤ 6	≤ 6
Länge von Dinukleotid-Wiederholungen	≤ 11-fach	≤ 4-fach
Länge von Trinukleotid-Wiederholungen	≤ 5-fach	≤ 5-fach
Varianten		
Einzelnukleotid-Polymorphismen	Ja	Ja, Nachweisgrenze bei 5 %
Insertionslänge	≤ 24 bp	≤ 24 bp
Deletionslänge	≤ 25 bp	≤ 25 bp

a. Bis zu 78 % mit dem NextSeq 550Dx-Gerät.

abzielen zu können. Target-Spezifikationen (Tabelle 1) unterstützen die Sequenzierung von über 90 % der Exons in RefSeq,¹ abhängig vom Assay-Design. Die Anpassung der Kit-Konfiguration bietet zudem Flexibilität beim Probendurchsatz.

Bibliotheksvorbereitungs-Workflow

Das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx generiert sequenzierfähige Bibliotheken, die auf ein Illumina Dx-Sequenzierungsgerät geladen werden können, um in weniger als 2 Tagen zuverlässige Sequenzierungsdaten zu erzeugen.



Abbildung 2: Optimierter Workflow für anwendungsspezifische Assays – Der TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-Workflow liefert in einem optimierten sechsstufigen Prozess DNA-zu-Daten-Ergebnisse.

Optimierter Workflow

Der TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-Workflow besteht aus sechs grundlegenden Schritten (Abbildung 2). Während der Bibliotheksvorbereitung werden Oligonukleotidsonden, die auf Regionen von Interesse abzielen, mit der DNA-Probe vermischt. Die Bibliotheken werden in einem Pool zusammengefasst und dann auf einem Illumina Dx-Sequenzierungsgerät sequenziert. Daten werden in Echtzeit erfasst und mithilfe der Local Run Manager-Software analysiert.

gDNA- oder FFPE-DNA-Zugabe

Das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ist für die Verwendung mit 50 ng gDNA oder 10 µl qualifizierter, aus FFPE-Gewebe gewonnener DNA optimiert. FFPE-DNA kann mit dem TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-Kit qualifiziert werden, das die Qualität der FFPE-DNA über eine einfache qPCR-Reaktion bestimmt. Die Ergebnisse des FFPE QC-Kits dienen als Anhaltspunkt für die Qualität und Menge der zugegebenen FFPE-DNA.

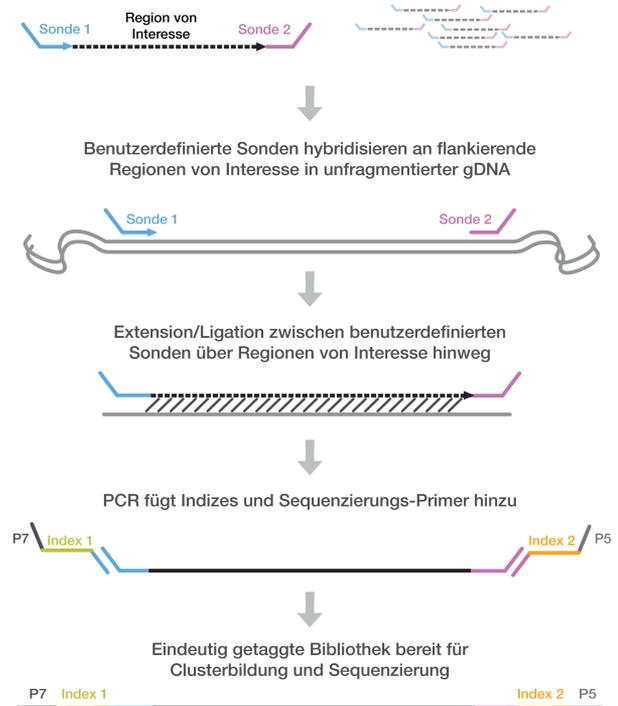


Abbildung 3: Bibliotheksvorbereitungs-Chemie des TruSeq Custom Amplicon Kit Dx – Das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx verwendet selbst entworfene Oligonukleotidsonden zur Erfassung und Sequenzierung definierter Ziele von Interesse.

Assay-Chemie

In Kombination mit der bewährten SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis) ermöglicht das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx die ausschließliche Erfassung und Sequenzierung der relevanten Regionen (Abbildung 3). Die gDNA bzw. die FFPE-DNA wird mit einem Pool von benutzerdefinierten Oligonukleotidsonden gemischt. Jede Sonde enthält Sequenzen zum Erfassen von Regionen von Interesse sowie eine Adaptersequenz, die in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion verwendet wird. Die Sonden hybridisieren an die DNA, eine vor und eine hinter der Target-DNA-Sequenz. Eine proprietäre Extension-Ligation-Reaktion erstreckt sich über die Region von Interesse, gefolgt von Ligation, um die beiden Sonden zu vereinigen. Diese Reaktion erzeugt einen Matrizenstrang und bietet eine hervorragende Assay-Spezifität.

Um die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben innerhalb eines einzelnen Sequenzierungslaufs (Multiplexing) zu ermöglichen, werden einzelne Bibliotheken mit einem eindeutigen Bezeichner bzw. Index „getaggt“. Diese eindeutigen probenspezifischen Indizes werden während des PCR-Amplifikationsschritts im Bibliotheksvorbereitungsprotokoll hinzugefügt. Das endgültige Produkt enthält die benutzerdefinierten Regionen, die Adapter und die Indizes, die für die Sequenzierung auf einem Illumina Dx-Sequenzierungsgerät erforderlich sind.

Tabelle 2: Varianten-Calling-Studie zeigt hohe Assay-Reproduzierbarkeit²

Analyse	Kennzahl	Variantentyp	MiSeqDx (8 Läufe)	NextSeq 550Dx (9 Läufe)
Calling von Keimbahn-Varianten	PPA	SNV	99,8 %	> 99,9 %
	PPA	Insertion	98,1 %	98,9 %
	PPA	Deletion	99,8 %	100 %
	NPA		100 %	100 %
Calling somatischer Varianten	PPA	SNV	100 %	99,9 %
	PPA	Insertion	100 %	99,9 %
	PPA	Deletion	100 %	99,9 %
	NPA		> 99,9 %	> 99,9 %

Die Prozentwerte repräsentieren den niedrigsten Wert über alle Läufe hinweg. Abkürzungen: positive prozentuale Übereinstimmung (positive percent agreement, PPA), negative prozentuale Übereinstimmung (negative percent agreement, NPA), Einzelnukleotid-Variante (single nucleotide variant, SNV).

Weit verbreitete NGS-Technologie

Die Illumina SBS-Chemie ist die am weitesten verbreitete NGS-Technologie in der Sequenzierungsbranche.³ Durch die massiv-parallele Sequenzierung mithilfe einer eigens entwickelten Methode auf der Basis reversibler Terminatoren werden einzelne Basen erkannt, wenn sie in wachsende DNA-Stränge inkorporiert werden. Ein mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierter Terminator wird dargestellt, während jedes dNTP (dATP, dCTP, dGTP oder dTTP) hinzugefügt und anschließend gespalten wird, um die Inkorporation der nächsten Base zu ermöglichen. Da alle vier mit einem reversiblen Terminator gebundenen dNTPs in jedem Sequenzierungszyklus vorhanden sind, werden Integrationsfehler durch natürliche Mechanismen minimiert. Das Ergebnis ist eine Base-für-Base-Sequenzierung, die sehr genaue Daten erzeugt.⁴

Hohe Reproduzierbarkeit von Daten

Um die hohe Reproduzierbarkeit der mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und SBS-Chemie erzeugten Daten zu demonstrieren, wurde eine Varianten-Calling-Präzisionsstudie mit einem repräsentativen Assay durchgeführt. Die Studie umfasste mehrere Bediener, Geräte und Chargen über acht bis neun Läufe (Tabelle 2).

Zusammenfassung

Das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bietet eine validierte, von der FDA regulierte Lösung für das Design von NGS-Assays, die auf benutzerdefinierte genomische Regionen von Interesse abzielen. Dieses Kit ermöglicht es klinischen Labors, die Geschwindigkeit und Genauigkeit von NGS zu nutzen und ihren Kunden ein wachsendes Spektrum diagnostischer Dienstleistungen anzubieten.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx finden Sie unter www.illumina.com/TSCAKitDx.

Weitere Informationen über das MiSeqDx-Gerät finden Sie unter www.illumina.com/MiSeqDx.

Weitere Informationen über das NextSeq 550Dx-Gerät finden Sie unter www.illumina.com/nextseq550dx.

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ^a	20005718
TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-Kit ^a	20006259
MiSeqDx-Gerät	DX-410-1001
MiSeqDx Reagent Kit v3 (MiSeqDx-Reagenzien-Kit v3) ^a	20012552
NextSeq 550Dx-Gerät	20005715
NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2 (NextSeq 550Dx-Hochleistungs-Reagenzien-Kit v2, 300 Zyklen) ^a	20019554
TruSeq Index Plate Fixture Kit (TruSeq-Indexplattenvorrichtungskit)	DX-130-1005
TruSeq Index Plate Fixture and Collar Kit (TruSeq-Indexplattenvorrichtungs- und -Kranz-Kit)	DX-130-1007

a. Für die Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien der Klasse I gibt es Einzelchargenlieferungen, Kit-Chargen-Tests, Vorabänderungsbenachrichtigungen sowie für jede Charge erhältliche Analysezertifikate. Die Reagenzien werden nach den Prinzipien der Designkontrolle entwickelt und unter Einhaltung der aktuellen Richtlinien für gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practices, cGMP) hergestellt und verifiziert, um die Einhaltung der Spezifikationen zu gewährleisten.

Quellen

1. NCBI Reference Sequence Database (RefSeq). www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/. Aufgerufen am 10. Oktober 2017.
2. Archivdaten. Illumina, Inc. 2017.
3. Archivierte Datenberechnungen. Illumina, Inc. 2015.
4. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. (2008) *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature* 456(7218): 53-9.

Erklärungen zur bestimmungsgemäßen Verwendung

Bestimmungsgemäße Verwendung des TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx

Das Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx besteht aus einem Satz Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus DNA verwendet werden, die aus peripherem Vollblut und formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe gewonnen wurde. Vom Benutzer bereitgestellte Analyt-spezifische Reagenzien werden für die Vorbereitung von Bibliotheken benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Hochdurchsatz-DNA-Sequenzanalysegeräten von Illumina vorgesehen.

Bestimmungsgemäße Verwendung des TruSeq™ Custom Amplicon Dx – FFPE QC-Kits

Das Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-Kit besteht aus einem Satz Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Bestimmung des Amplifikationspotenzials von genomischer DNA (gDNA), die aus peripherem Vollblut und formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe gewonnen wurde.

Bestimmungsgemäße Verwendung des MiSeq™Dx-Geräts

Das MiSeqDx-Gerät ist für die zielgerichtete Sequenzierung von DNA-Bibliotheken aus humangenomischer DNA bestimmt, wenn sie für *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD) auf dem Gerät verwendet werden. Die genomische DNA wird aus peripherem Vollblut oder aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe gewonnen. Das MiSeqDx-Gerät ist nicht für die Gesamtgenom- oder *De-novo*-Sequenzierung vorgesehen. Auf dem MiSeqDx-Gerät dürfen nur registrierte und gelistete, freigegebene oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden.

Bestimmungsgemäße Verwendung des MiSeq™Dx-Reagenzien-Kits v3

Das MiSeqDx-Reagenzien-Kit v3 von Illumina ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung von Probenbibliotheken bei Verwendung von validierten Assays. Das MiSeqDx-Reagenzien-Kit v3 ist zur Verwendung mit dem MiSeqDx-Gerät und Analysesoftware vorgesehen.

Bestimmungsgemäße Verwendung des NextSeq™ 550Dx-Geräts (Europäische Union)

Das NextSeq Dx-Gerät ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnostik-Assays (IVD-Assays) vorgesehen, die auf dem Gerät durchgeführt werden. Auf dem NextSeq 550Dx-Gerät dürfen nur spezielle registrierte, zertifizierte oder zugelassene IVD-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden.

Bestimmungsgemäße Verwendung des NextSeq™ 550Dx-Hochleistungs-Reagenzien-Kits v2 (300 Zyklen)

Das NextSeq 550Dx-Hochleistungs-Reagenzien-Kit v2 (300 Zyklen) von Illumina ist ein Satz von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung von Probenbibliotheken bei Verwendung von validierten Assays. Das Kit ist zur Verwendung mit dem NextSeq 550Dx-Gerät und Analysesoftware vorgesehen.

Illumina, Inc. • Tel. USA (gebührenfrei) 1.800.809.4566 • Tel. außerhalb Nordamerikas +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2017 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Illumina, MiSeq, NextSeq, TruSeq und die kürbisorange Farbe sind Marken von Illumina, Inc. und/oder ihren Partner-/Tochtergesellschaften in den USA und/oder anderen Ländern. Alle anderen Namen, Logos und Marken sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer. Dokument-Nr. 100000046944 v00 DEU QB 5257

