illumina®

TruSeq® Amplicon - Cancer Panel

MiSeq® システムと組み合わせることにより、多サンプルでの数百の重要な癌変異を迅速かつ容易に検出

特　長

- **重要な癌関連領域を網羅したパネルアッセイ**
  BRAF、KRAS、およびEGFRなどの遺伝子から、数百の癌関連ホットスポット領域をシーケンス
- **短時間でプロジェクトを完了**
  2日以内にゲノムDNAから変異解析結果を取得
- **独自のアンプリコン増幅とサンプルマルチプレックステクノロジー**
  高品質データにより5%以下の低頻度の変異も精度高く検出

はじめに

TruSeq Amplicon - Cancer Panel(TSACP)は、癌ゲノム中の数百の変異スポットを包括的かつマルチプレックスなターゲットリシーケンスを可能にし、体細胞変異の検出に最適なアッセイとなります。効率的なTSACPのワークフローには、ホルマリン固定パラフィン包理(FFPE)サンプル由来のDNAのためのQCチェック、簡単なビーズベースのサンプルノーマライゼーション、MiSeqシステム内で自動化されクラスター形成およびペアエンドシーケンス、さらに装置上でのデータ解析が含まれます(図1)。MiSeqシステムの長いペアエンドのリード能力、スピード、高品質データと組み合わせることにより、これまで数ヶ月かかったプロジェクトを数日で終了することが可能となります。TSACPはBRAF、KRAS、およびEGFRなどの重要な遺伝子中の変異を、高感度に検出することを可能にします。これらの遺伝子変異は、メラノーマ、結腸直腸癌、卵巣癌および肺癌など多くの癌に関連しています。このアッセイでは極めて微量のFFPEサンプルからも、これらの重要な変異のスクリーニングができるため、様々な腫瘍タイプからの貴重なゲノム情報を明らかにすることができます。

FFPEサンプルの包括的なスクリーニング

TruSeq Amplicon - Cancer Panelには、35kbを超えるターゲットゲノム配列中の変異ホットスポットをシーケンスするためにデザインされたオリゴヌクレオチドプローブが含まれます。1本のチューブ内で行われる、高マルチプレックスな反応により、48遺伝子中の212アンプリコンがターゲットとなります。パネル中に含まれるすべての癌関連遺伝子のリストを表1に示します。

TSACPは、FFPEサンプル中の体細胞変異の検出に最適なアッセイです。アンプリコン調製前に、簡単なqPCRによるDNAのQCステップにより、事前にアッセイに適したサンプルのスクリーニングを行うことができます。このようなサンプルのQCチェックを先に行うことにより、断片化されたDNAでのパフォーマンスを正確に予測することが可能となり、無駄な時間と消耗試薬コストの軽減につながります(図2)。

表1：TSACP癌関連遺伝子

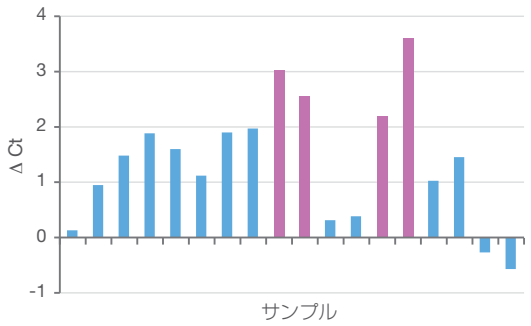
ABL1	*EGFR*	*GNAS*	*MLH1*	*RET*
AKT1	*ERBB2*	*HNF1A*	*MPL*	*SMAD4*
ALK	*ERBB4*	*HRAS*	*NOTCH1*	*SMARCB1*
APC	*FBXW7*	*IDH1*	*NPM1*	*SMO*
ATM	*FGFR1*	*JAK2*	*NRAS*	*SRC*
BRAF	*FGFR2*	*JAK3*	*PDGFRA*	*STK11*
CDH1	*FGFR3*	*KDR*	*PIK3CA*	*TP53*
CDKN2A	*FLT3*	*KIT*	*PTEN*	*VHL*
CSF1R	*GNA11*	*KRAS*	*PTPN11*	
CTNNB1	*GNAQ*	*MET*	*RB1*	

TSACPのターゲットの癌関連遺伝子。ターゲット領域の完全なリストに関しては、Manifest File[1](MyIlluminaへのログインが必要です)を参照ください。

図1：TSACPワークフロー

TruSeq Amplicon - Cancer Panelは、最も重要な癌変異を、解析が困難であるFFPEサンプルでも検出することのできる、包括的なアッセイです。プロジェクト完了に要する時間は、極めて短く、ゲノムDNAからデータ解析結果取得までMiSeqシステムを用いて2日以内に完了します。

図2：FFPEスクリーニングにより、高いパフォーマンスを実現



アンプリコン調製前に、18のFFPEサンプルから抽出したDNAをQCキットによりチェック。ΔCtは各サンプルのCt値とコントロールDNA（図には示してありません）のCt値の差から算出。アンプリコンシーケンスに成功したサンプルを青色のバーで示し、それ以外のものは紫色のバーで示してあります。カットオフ値2を使用した場合、この調製サンプルのアッセイ結果取得は100%となります。

表2：特異性およびサンプル間の均一性

サンプル	特異性（%）	均一性（%）	変異タイプ	アレル頻度（%）
コントロール	93.5	94.0	NA	NA
1	91.2	94.4	Indel	29.2
2	93.9	91.5	SNV	2.95
3	93.5	91.5	SNV	2.90
4	91.6	94.9	Indel	18.9
5	93.1	91.2	SNV	8.70
6	93.9	91.6	SNV	40.8
7	92.3	92.6	SNV	37.1
8	90.3	93.5	SNV	39.5
9	93.5	92.1	SNV	7.80

様々な癌タイプのFFPEからの9サンプルをTruSeq Amplicon - Cancer Panelによりスクリーニング。挿入欠失（indel）および1塩基変異（SNV）が、高い特異性と均一性でコールされました。

TruSeqアンプリコンアッセイは、デザインされた2つのカスタムプローブがターゲット領域の上流と下流にハイブリダイゼーションすることから始まります。各プローブには、ターゲット領域をキャプチャーするように設計された配列とその後の増幅反応に使用するアダプター配列が含まれています。これによって新たなテンプレート鎖が生成され、アッセイに優れた特異性を提供します。伸長、ライゲーションされたテンプレートは、PCR増幅され、各サンプルに特異的な異なる2つのインデックスが組み込まれます。こうして最終反応産物として、シーケンスに使用可能なアンプリコンが調製されます。ビーズベースのノーマライゼーション過程を取り入れることにより、煩雑なqPCRベースの定量を行う必要がありません。プールしたアンプリコンのライブラリーは、追加処理を行うことなく、MiSeqシステムにセットしランすることができます。

独自のマルチプレックスと優れたデータ品質

TSACPは、1サンプルあたり何百ものアンプリコンを増幅するパネルと、これまでにないレベルのマルチプレックスにより1ランで最大96サンプルまで解析できるMiSeqシステムを組み合わせることで、優れた特異性と均一性を実現します。例として、図1に示されたワークフローに従い、MiSeqによる2x15bpリード長のランを用いてTSACP実験を行いました。癌からの9サンプルおよびコントロールの1サンプルを解析したときの、データの均一性を平均カバレッジ0.2x 以上でカバーされた塩基の割合により示されています（表2）。シーケンスされた塩基の内、フィルターを通過し、目的とするターゲット領域にアラインされた塩基の割合を表す特異性の値も表2に示しています。91%以上の塩基が平均カバレッジの0.2x 以上でカバーされており、さらに90%以上のリードがターゲットに合致していることから、優れたカバレッジ均一性および特異性が得られていることが示されています。

TSACPは、高いリードカバレッジにおいても、優れたカバレッジを保持しています。20個のプールサンプルを用いて、2度のランを行った別の実験においても（図3A）、90%を超える均一性と特異性が得られています。単一サンプルの27,000x 以上でのシーケンスからも同様の結果が得られ、極めて高いリードカバレッジにおいても一貫して高い特異性と均一性が得られることが示されています。図3Bに示されたように、ラン1の20サンプルのプールの中から選ばれた1つのサンプルは、500x カバレッジで95%を超える塩基がカバーされており、低頻度の変異の検出が可能であることが示されています。特異性の高いアンプリコンによるターゲットの認識と最も精度の高いTruSeqシーケンシングケミストリーの組み合わせにより、TSACPは、頻度が5%に満たない変異を精度高く検出することを可能としています（図4）。

まとめ

TruSeq Amplicon - Cancer Panelの使用により、1度の実験で、BRAF、KRAS、およびEGFRなどの重要な癌関連遺伝子を含め、あらゆる市販のアンプリコン癌パネルに含まれる癌関連遺伝子の大部分をカバーすることが可能です。TruSeq Amplicon - Cancer Panelは、比類ない特異性と均一性によって高い確実性と簡便性を実現します。

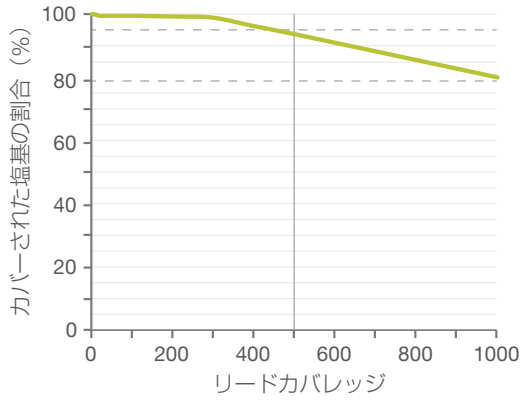
図3：高い特異性および均一性

A

パラメータ	ラン 1	ラン 2	ラン 3
サンプル数	20	20	1
MiSeqアウトプット（Gb）	1.8	2.0	1.9
平均カバレッジ	1,366	1,410	27,019
特異性（%）	93.7	94.5	90.7
均一性（%）	96.2	96.2	94.4
ドロップアウトアンプリコン*	0	0	0

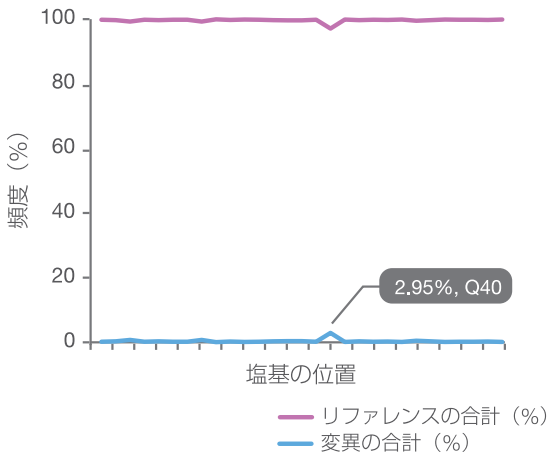
* ドロップアウトアンプリコンとは、サンプルを1,000x 以上の平均シーケンスカバレッジでシーケンスしたときに、シーケンスカバレッジがゼロのアンプリコンを指します。

B



A. 20サンプルをプールして行った2種類の実験、および1サンプルを用いた1種類の実験の合計3種類のTSACP実験結果を示します。ラン1およびラン2においては、90%を超える特異性および均一性を達成し、さらにドロップアウトが存在しないことから、優れたアッセイパフォーマンスが示されています。極めて高いカバレッジでシーケンスを行った単一サンプルのラン（ラン3）においても、同様のアウトプット、特異性および均一性が得られています。
B. ラン1中の1サンプルのカバレッジプロットを示しています。カバーされた塩基の割合をリードカバレッジに対してプロットした結果、1,000x のリードカバレッジで80%を超える塩基がカバーされ、500x のリードカバレッジでは約95%がカバーされていることが示されています。

図4：低頻度変異の検出



TSACPは、大腸癌サンプルからのBRAF遺伝子において、2.95%の変異（AからTへの一塩基多型）をQ40の変異スコア、すなわち99.99% 信頼度で検出しています（6,048x カバレッジ）。

参考文献

1. TruSeq Amplicon Cancer Panel Manifest File at MyIllumina.com

TruSeqカスタム濃縮の詳細

パラメータ	詳　細
パネルサイズ	35kb
内容	212 個のアンプリコン
アンプリコンのサイズ	170 ～ 190bp
DNA インプット	250ng
アッセイ時間	7 時間未満、 ハンズオン 2.5 時間
濃縮特異性	> 85%
カバレッジ均一性	平均カバレッジ 0.2x で、 85% 以上の均一性
ドロップアウトアンプリコン *	0

*ドロップアウトアンプリコンとは、サンプルが1,000x を超える平均シーケンシングカバレッジを達成したときに、シーケンシングカバレッジを示さないアンプリコンを指します。

製品情報

キット	カタログ番号
Illumina FFPE QC Kit	WG-321-1001
TruSeq Amplicon-Cancer Panel （96 Samples）	FC-130-1008-PRE
TruSeq Custom Amplicon Index Kit （96 Indices、384 Samples）	FC-130-1003
MiSeq Reagent Kit （300 - cycles - PE）	MS-102-1001
Optional：TruSeq Index Plate Fixture and Collar Kit（2 Each）	FC-130-1007

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
www.illuminakk.co.jp

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, 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。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 770-2012-J009 13APR12