

# TruSeq™ カスタムアンプリコン

高速・高マルチプレックス解析を加速化するアンプリコンシーケンスソリューション

## 特長

- アッセイのカスタマイズが最も簡単**  
 オンラインのユーザフレンドリーなDesignStudio™ソフトウェアを使用してプロジェクトを作成・管理
- 最速のサンプル処理**  
 標準的な実験装置を使用して1プレートあたり最大96サンプル、サンプルあたり最大384個のアンプリコンを同時に調製・濃縮
- プロジェクト完了までの時間が最短**  
 ゲノムDNAから解析データが得られるまでの所要時間は2日以内
- 最も簡単な解析**  
 MiSeqシステム内蔵のソフトウェアにより自動変異検出/データ解析

## はじめに

TruSeq カスタムアンプリコン (TSCA) は数百カ所 (最大で合計96kb) のゲノム領域のシーケンスを可能にします。このターゲット特異的なアプローチにより、変異の検出、検証、スクリーニングのための幅広いアプリケーションを迅速かつ効率的に行うことができます。

TSCAに必要なスタートゲノムDNA量はわずか250ngのため、希少なサンプルを含む幅広いサンプルにもお使いいただけます。サンプルあたり384個のアンプリコンを作製可能で、独自のインデックスによりMiSeq™の1回のランあたり96サンプルに対応し、これまでにないレベルでのマルチプレックス解析を行うことができます。プロジェクト全体はわずか数日で完了し、MiSeqシステムの長いペアエンドリード数、スピードと高いデータ品質によりさらに強力なツールとなります。

TSCAはDNAからデータまでが一体化されたソリューションで、簡単なオンラインでのプローブデザイン、シンプルなプロトコール、自動化されたデータ解析からなります。Illumina Amplicon Viewerソフトウェアにより、複数のMiSeqランで検出された変異などのプロジェクトデータを簡単に検証することができます。

## TruSeq カスタムアンプリコンのワークフロー概要

TSCAプロセス全体の所要時間はDNAからデータまでわずか2日間で、DesignStudioソフトウェア上でゲノムターゲット領域を選択することからプロジェクトが開始されます (図1)。カスタムデザインに従いオリゴヌクレオチドプローブが合成され、反応あたり最大384個のアンプリコンを可能にするCustom Amplicon Tube (CAT) としてプールされます。サンプル固有のインデックスはTruSeq アンプリコンインデックスキットのプライマーを用いたPCR時にライブラリーに付加されます。ビーズベースの標準化手順により、シーケンス前の簡単な容量に基づくライブラリープーリングを可能にし、面倒な定量の手間はありません。プーリングされたライブラリーはMiSeqにより自動的にクラスター形成、シーケンスおよびデータ解析 (変異検出を含む) が行われます。シーケンスを

図1: TruSeq カスタムアンプリコンのワークフロー



TruSeq カスタムアンプリコンはオンラインでのプローブデザイン、またアッセイ、シーケンス、自動データ解析と結果を検討するためのオフラインソフトウェアを含むEnd-to-Endの完成されたアンプリコンシーケンスソリューションです。

行った複数サンプルのプロジェクトデータはIllumina Amplicon Viewerにより視覚化されます。

## 簡単なプローブデザイン

使いやすい無料のオンラインソフトウェアツールであるDesignStudio上で、ユーザーのターゲット領域を最適なカバレッジで増幅するオリゴヌクレオチドプローブをデザインすることができます (図2)。個別アカウントにログインしてプロジェクト名を決定後、目的のゲノムターゲット領域を選択します。プローブデザインはGC含量、特異性、プローブの向きやカバレッジなどの幅広い要素を考慮したアルゴリズムにより自動的に行われます。候補アンプリコンは算出されたサクセススコアにより視覚化ならびに評価されます。デザインされたプローブは、ユーザーの好みに合わせてフィルターをかけることによりデザインから除いたり、追加したりすることができます。

カスタムで選択された内容によって異なりますが、一般的なデザイン成功率は希望される塩基に対して90%以上です (表1)。配列の内容 (例、相同領域やGC含量 (%)) によっては、成功率がこれよりも高くなったり、低くなったりする場合もあります。DesignStudioをご利用いただくにはイリミナ eコマースシステムのアカウントが必要です。

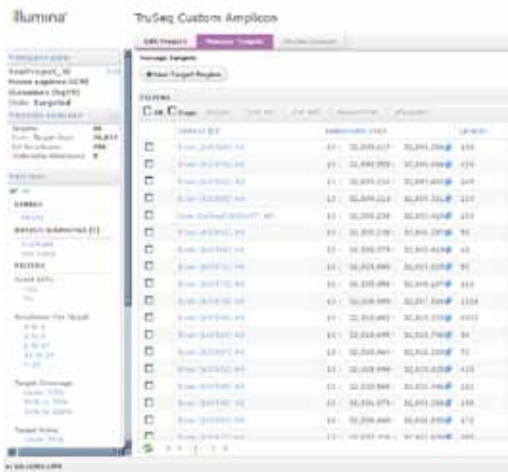
<http://icom.illumina.com/Account/Register>でアカウントをリクエストしてください。

表1 : カスタムアンプリコンのためのDesignStudioのパラメータ

パラメータ	プロジェクトA	プロジェクトB	プロジェクトC	プロジェクトD
シーケンスインプット合計 (bp)	34,767	69,423	20,984	4,572
アンプリコン数合計	293	264	315	114
デザインナビリティスコア (ベースカバレッジ (%))	98.3	97.0	91.1	91.3

\* 各アンプリコンのデザインナビリティスコアはTm、GC含量 (%)、長さ、二次構造などの要素に基づいています。詳細についてはDesignStudio オンラインヘルプをご参照ください。

図2 : DesignStudioによるカスタムプローブデザイン



Manage TargetsスクリーンではDesignStudioソフトウェアのTarget Region Viewを表示します。ターゲットのゲノム領域と目的のアンプリコンを簡単に視覚化し、デザインのカバレッジとスコアにより評価できます。デザイン段階でデータをソートしやすいうように、プロジェクト全体の結果の概要がプロジェクト情報およびユーザーが選択したラベルと共に左サイドバーに表示されます。

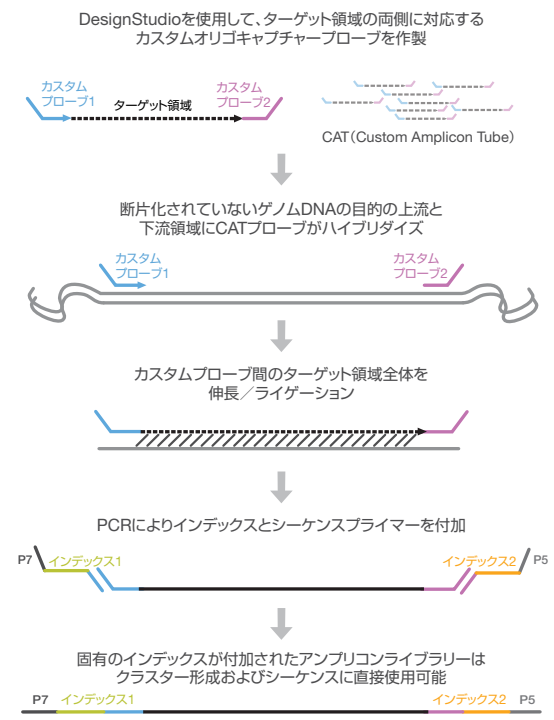
### 革新的なアッセイケミストリー

TSCA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(図3)。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。イルミナが特許を保有する伸長・ライゲーション反応によってターゲット領域全体を伸長後、2つ個のプローブを結合させるためにライゲーションを行います。このようにして新しいテンプレート鎖を製作するため、アッセイの特異性が向上します。伸長・ライゲーションテンプレートはその後PCRで増幅され、各サンプルに2つの独自のインデックスが取り込まれます。最終的に得られる反応産物には目的のアンプリコンの他、MiSeqシステムでのシーケンスに必要なシーケンス用アダプターとインデックスが含まれます。TruSeq カスタムアンプリコンライブラリーは追加のプロセッシングなしに、そのままMiSeqシステムによる自動化プロセスに進むことができます。

### 優れたデータ品質

TSCAアッセイはこれまでないマルチプレックスをサポートし、優れた特異性と均一性をもたらします。図1に記載されたワークフローに従い、TSCAの評価実験を実施しました。MiSeqシステムでTSCAアッセイを5サンプル行ったときのカバレッジ均一性、平均シーケンス深度0.1x以上の塩基の割合を示しています(図4A)。各サンプルの特異性データ(シーケンスされた塩基のうち、目的とするターゲット領域にアライメントされたパスフィルター塩基の割合)を図4Bに示しています。カバレッジ均一性と特異性は優れており、85%以上の塩基が平均シーケンスカバレッジ0.2x以上で、ターゲット上のリードは90%以上でした。これらのデータはMiSeqシステムで高マルチプレックスアンプリコンを行うときの指標となります。

図3 : TruSeqカスタムアンプリコンのワークフロー



TruSeq カスタムアンプリコンアッセイは、目的とするターゲット領域をキャプチャー・増幅するためのシンプルで一体化された方法です。



