illumina®

TruSight™ Oneシーケンスパネル

4,800を越える遺伝子をターゲットとする最も包括的なパネルで、ラボにおけるシーケンスポートフォーリオの拡大と効率化

特　長

- **比類ないコンテンツとパフォーマンス**
  ヒト疾患に関与する4,800以上の遺伝子をターゲット
- **複数アッセイに取って代わる1つのパネル**
  1つのアッセイ、1つのワークフローで、シーケンスポートフォリオの拡大と効率化
- **柔軟なレポート作成**
  VariantStudioソフトウェアにより、クリックでゲノム変異データを簡単に検索できる遺伝子フィルタリングが可能

はじめに

TruSight Oneシーケンスパネルは、疾患に関与する4,800を超える遺伝子を包括的にカバーしています。また、パネル中のすべての遺伝子を解析するか、あるいは特定のサブセットだけを解析するかの選択ができます。これにより、他にある複数のシーケンスパネルをたった1つのパネルで代用できるようになりました。バイオインフォマティクス解析用には、解析や分類、そしてゲノム変異レポート作成の操作が簡単かつ効率よく行えるVariantStudioソフトウェアをご利用いただけます。このツールにより、解析を1つのワークフローで、そしてゲノムサンプル処理を1つのプロセスで行うことが可能になりました。その結果、サンプルからレポートまでのプロセスが1つにまとめられ、次世代シーケンサーポートフォリオ全体をサポートします（図1）。

包括的なアッセイ

TruSight Oneシーケンスパネルは、臨床的な表現型に関与する4,813遺伝子を含む12Mbのゲノムコンテンツをカバーしています。このため、すでに重要性が確認されている遺伝子にフォーカスを絞った研究ができるので、臨床的な価値に直結するかまだわからない膨大なデータに埋もれてしまうことなく解析を進めることができます。このパネルはMiSeq®を使ったトリオのシーケンス解析、もしくはHiSeq® 2500/1500 Rapidランでの36サンプルマルチプレックス解析を念頭にキット化されており、ターゲットの95%以上の領域において、20x以上のカバレッジ深度を実現しています*。

コンテンツデザインの戦略

イルミナのTruSight Oneシーケンスパネルは、疾病の原因となる変異が潜んでいるエクソン領域をターゲットとするようにデザインされています。特によく使用されている分子アッセイをカバーするようにデザインされており、1研究室で、そしてたった1つのパネルだけですべての解析が可能になりました。ゲノム上のターゲットは、ヒト遺伝子変異データベース（HGMD）[1]、オンライン・ヒトメンデル遺伝形質（OMIM）カタログ[2]、GeneTests.org[3]、イルミナTruSight疾患パネル製品[4]、そして他の市販されているシーケンスパネルに基づいて同定されました。TruSight Oneパネルは、これらのデータベースを組み合わせることで、現在臨床研究の場で検討されているすべての遺伝子を網羅し、真の意味で包括的なアッセイを実現します。

優れたカバレッジ

TruSight Oneシーケンスパネルは、数多くの変異解析をサポートするために、高度に最適化されたプローブセットを特長としています。高純度DNAのスタート量がわずか50ngでも、ターゲットとしたエクソン配列を包括的なカバレッジで得ることができます。このパネルには、ヒトNCBI37/hg19を参照配列とした、12万5,395を超える80merのプローブセットで構成されています。このプローブセットは、対象とする4,813遺伝子をカバーするため、約6.2万にわたるエクソンの濃縮を可能にするようデザインされています（表1）。TruSight Oneのプローブセットは、デザインと機能テストのプロセスを繰り返して作成されているため、最高レベルでのパフォーマンスや均一性、シーケンス能の最適化、そして比類ないマルチ

図1：サンプルからレポートまでの一連のワークフロー

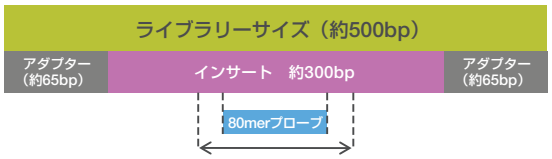
イルミナのTruSight OneシーケンスパネルとVariantStudioソフトウェアにより、わずか4日で、DNAサンプルからレポート作成までのプロセスが完了します*。

*ターゲットとした遺伝子パネルにおける平均時間です。使用パネルによってかかる時間が変わることがあります。

表1：カバレッジの詳細

累積ターゲット領域サイズ	12Mb
ターゲット遺伝子数	4,813
ターゲットエクソン数	約 6.2 万
プローブ長	80mer
プローブ数	12 万 5,395
ターゲットの最小カバレッジ	20 倍

図2：プローブデザインの詳細



全リードの60%以上がターゲット領域にマッピング

約500bpのDNAライブラリー（インサート長は300bp）の場合、プローブはその中心の周辺350～650bpを濃縮

プレックス化が保証されます。これにより、ターゲットの95%以上の領域において、20x以上のカバレッジ深度を実現しています。

TruSight Oneシーケンスパネルは、ヒトゲノムのうち12Mbをターゲットとします。80merのプローブは約500bpのライブラリー（インサート長は300bp）をターゲットとし、プローブの中心の周辺350～650塩基が左右対称に濃縮されます（図2）[5]。つまりこのパネルを用いることで、主要エクソン領域を包括的にカバーするだけでなく、エクソンに隣接する領域をもカバーすることができるのです（スプライス部位）。また遺伝疾患への関与が知られているエクソームのサブセットに注目することで（HGMD、OMIM、GeneTests.orgなどに基づく）、全ゲノムや全エクソームシーケンスに比べて効率よく遺伝子機能に影響を及ぼす変異を検出することが可能です[6]。

柔軟性高くカスタム化が可能なデータの取り扱い

VariantStudioソフトウェアにより、変異データを簡単に探索し、迅速な生物学的に意義のある変異同定、および生物学的な背景を含むデータの選択が可能になりました。VariantStudioとTruSight Oneシーケンスパネルを組み合わせることで、研究対象である疾病に関与した情報のみをすばやく、そして正確に抽出し、レポート作成に結びつけることができます。またソフトウェアのインターフェースは直感的で使いやすく、TruSight Oneシーケンスパネルから効率よく複数のサブパネルを作成して解析することができます。

解析のながれ

TruSight Oneシーケンスパネルでは、Nextera®ライブラリー調製のスピードを活用して、サンプル調製と濃縮を統合し、たった1.5日で完了するワークフローを実現しました（図3）。

図3：シンプルで統合されたワークフロー

1つのワークフロー

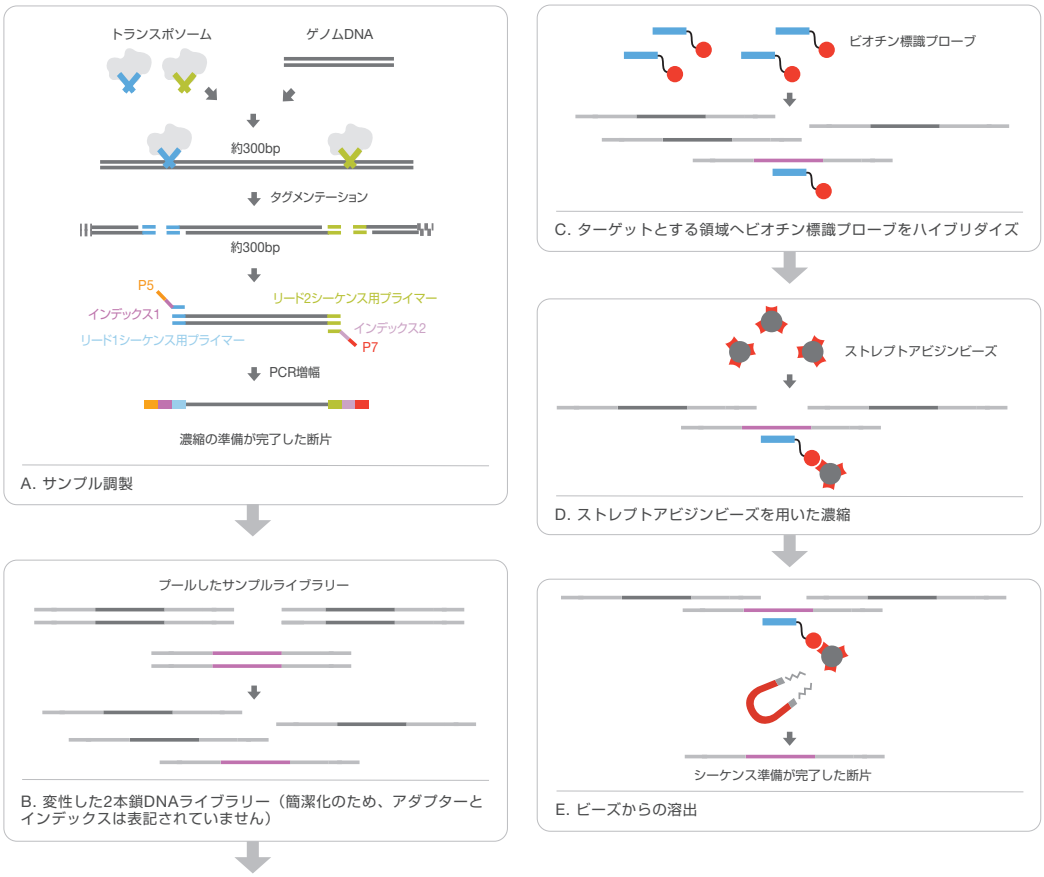
TruSight Oneシーケンスパネルは、独自のマルチプレックス法による濃縮前のサンプルプール方式を採用することで、機械的なDNAの断片化を必要とせず、高品質のライブラリーを作成するための濃縮ステップの効率化を実現しました。この手法は、ハンズオン時間の短縮により高スループットを可能とし、現在利用可能なあらゆる濃縮ワークフローと比較しても、少なくとも丸一日を節約できます。さらに、マスターミックス試薬とプレートベースのプロトコールを利用することにより、複数の濃縮反応を同時に処理することができます。

TruSight Oneシーケンスパネルのサンプル調製プロセスでは、まずNexteraによるタグメンテーションを行います。このプロセスでは、ゲノムDNAからアダプターの付加されたライブラリーを調製します。この際、DNAの機械的な断片化を必要としません（図4A）。この手法では、スタート量として必要なDNAはわずか50ngで、3～12サンプル用のプレート1枚を使い、3時間で調製します。組み込まれたサンプルバーコードを用いることで、3～12サンプルをプールし、1度の濃縮反応を行うことができます。次にライブラリーを変性し（図4B）、ターゲット領域に特異的なビオチン標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行います（図4C）。そしてビオチン標識プローブに結合するストレプトアビジンビーズを加えて、目的とする領域が濃縮されます（図4D）。ストレプトアビジンでコーティングしたビーズに結合したビオチン標識DNA断片は、磁気で溶液中からプルダウンします（図4E）。濃縮されたDNA断片をビーズから溶出し、ハイブリダイゼーションにより2度目のキャプチャーを実施します。この全プロセスにかかる時間はわずか1.5日で、1人の技術者が1度に36サンプルまで自動化なしで処理することができます。

シーケンス反応

調製したライブラリーは、MiSeqもしくはHiSeqシステムのフローセルにアプライします。その後、フローセルをセットし、シーケンス反応を開始するだけです。シーケンスデータは.vcfファイルでエクスポートされ、VariantStudioソフトウェアでの解析に簡単にインポートすることができます。

図4：TruSight Rapidキャプチャーによる一連のワークフロー



TruSight Oneシーケンスパネルでは、速やかなNexteraライブラリー構築のテクノロジーを活かして、ターゲットとする遺伝子群をより迅速に、そして簡単に分離します。効率化したワークフローでは、ライブラリー調製とエクソーム濃縮のステップを組み合わせており、最低限のハンズオンタイムを含めてわずか1.5日でワークフローが終了します。

フィルター機能を用いた解析

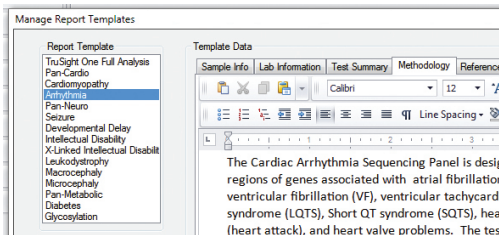
TruSight Oneシーケンスパネルでは、フィルタリングによりある特定の遺伝子セットや領域のみを抽出して解析とレポート作成を実施することができ、これにより1アッセイで複数アッセイと同等の解析を行うことができます。このステップは、まず遺伝子リストを作成しておき、MiSeqもしくはHiSeqシステムからの.vcfファイルをVariantStudioへインポートする際に、その遺伝子リストを選択するだけで実施できます。さらに使いやすくするために、VariantStudioソフトウェアでは、変異のクオリティや集団における頻度、機能の重要性や既知の疾病との関与といった、よく用いられるフィルターも提供しています。

VariantStudioソフトウェアでは1サンプルのフィルタリングに加え、疾病の原因となる変異の特定を迅速に行うための複数サンプルの比較も可能です。トリオもしくは家系フィルタリングをサポートするために、特定の遺伝様式や疾病の進行パターンと合致する変異の同定に使用できる、さまざまなフィルタリングオプションを備えています。

カスタム化が可能なレポート作成

VariantStudioソフトウェアでは、対象とする疾病やシーケンスパネルの必要条件に合うように、ユーザーがレポートをカスタム化できるようになっています。複数のレポートテンプレートを作成することができ、また保存して後で使用することもできます。テンプレートをサンプルに適用するときの操作は簡単で、サンプルに特異的な情報をLIMSから入力、もしくはインポートし、手法や結果の概要、そしてVariantStudioですでに報告されている変異カテゴリなどと組み合わせるだけです（図5）。レポートは、インポートしたサンプル情報とリンクされており、PDFもしくはリッチテキスト形式でエクスポートされ、下流の工程で使用できます。

図5：レポートのカスタム化のためのテンプレート



VariantStudioでは、手順に従うだけでテンプレートの作成が可能です。サンプルに特異的な情報を加えることで、異なる臨床研究の分野で使用できるようにレポートをカスタム化します。

高精度なデータ

MiSeqもしくはHiSeqシーケンスシステムのどちらのシステムを用いても、TruSight Oneシーケンスパネルは比類ない均一性やカバレッジ深度を実現します（表2）。MiSeqシステム1台でのトリオシーケンスを行った場合、ターゲットの95%以上の領域において、20x以上のカバレッジ深度が得られます。

まとめ

TruSight OneシーケンスパネルとVariantStudioソフトウェアを組み合わせることで、スムーズな一連のワークフローを実現しました。この包括的なパネルを使用すれば、臨床的な表現型に関連する4,800を超える遺伝子を速やかにシーケンスすることができます。さらに得られた結果をVariantStudioでフィルタリングすることで、研究者の要求にすばやく対応できるサブパネルを作成し、科学的な知見を深める上でも役に立ちます。

詳しい情報

TruSight Oneシーケンスパネルの詳細については、www.illuminakk.co.jp/trusightone をご覧ください。

参考文献

1. Human Gene Mutation Database (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)
2. Online Mendelian Inheritance in Man (omim.org)
3. GeneTests (www.genetests.org)
4. Illumina TruSight Products (www.illumina.com/trusight)
5. Optimizing Coverage for Targeted Resequencing Technical Note.
6. www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_optimizing_coverage_for_targeted_resequencing.pdf
7. Bainbridge MN, Wang M, Wu YQ, Newsham I, Muzny DM, et al. (2011) Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals higher variant densities. Genome Biol. 12: R68.

表2：TruSight Oneシーケンスパネルのパフォーマンス†

シーケンスキット	フィルターパスのリード数	リード長	データ出力（Gb）	サンプル数／ラン	12xカバレッジ以上のターゲット領域（%）	20xカバレッジ以上のターゲット領域（%）
MiSeq 試薬キット v3	2200-2500 万	2x 150bp	7.5	3	97	95
NextSeq 中出力モード	1.3 億	2x 150bp	40	12	98	97
HiSeq Rapidランモード（フローセル 1 枚）	～3 億	2x 150bp	90	36	97	95
HiSeq Rapidランモード（フローセル 2 枚）	～6 億	2x 150bp	180	72	97	95

†パフォーマンスは、濃縮が50%超のサンプルのみレポートされます。これは、MiSeqシステムを用いた場合、1,200～1,400 K/mm²のリード密度にあたります。

製品情報

製品名	カタログ番号
TruSight One Sequencing Panel（9 Samples）	FC-141-1006
TruSight One Sequencing Panel（36 Samples）	FC-141-1007

*パーセント表示は、各塩基ではなく、各エクソンの平均カバレッジの平均値です。

バイオマーカーの特許、またその他製品の使用に関する特許についての注意点

塩基配列を含むゲノム変異の一部、および特定アプリケーションにおける使用は特許により保護されている場合があります。特定アプリケーションにおける製品の使用の際は、特許の所有者あるいは管理者からライセンスの取得が求められる場合がありますのでご注意ください。

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。

© 2014 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. 0670-2013-J015 30JUN2014