

イルミナウェビナー

「イルミナでAmpliSeqパネル解析をはじめよう」シリーズ -カスタムデザイン編-

小寺 啓文

テクニカルアプリケーションサイエンティスト

June 27, 2018



© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

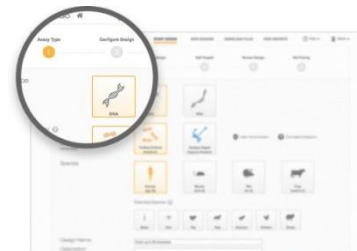
Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDx, MiSeq FGx, NeoPrep, NextBio, Nextera, NextSeq, Powered by Illumina, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the US and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

illumina®

プレゼンテーションを始める前に

- 本資料で紹介しているイルミナ試薬の価格は、2018年4月改定版の試薬消耗品価格表を参照しています。
- 本プレゼンテーションはのちほど録画とスライドをイルミナHPで公表します。
- 本スライドで紹介する試薬は、研究用試薬となります。

イルミナウェビナー「イルミナでAmpliSeqパネル解析をはじめよう」シリーズのご案内



AmpliSeqの製品紹介
ライブラリー調製

4月25日

- AmpliSeq製品群の紹介の他、ライブラリー調製を成功させるためのワークフローと実験時のTipsをお伝えします。

AmpliSeqの
情報解析

5月30日

- AmpliSeqの情報解析の流れから出力結果まで、がんパネルを例に紹介します。

AmpliSeqの
カスタムデザイン

6月27日

- AmpliSeqのカスタムデザインの手順を、実際に遺伝子やホットスポットなどを例に紹介します。

イルミナの過去ウェビナーは以下で動画とスライドを公開しています
<https://jp.illumina.com/events/webinar.html>

今回のセッションの流れ

● DesignStudio概要

- DesignStudioとは
- DesignStudioへのアクセス
- DesignStudioでデザイン可能なカスタムパネル製品
- Ampliconデザイン (HotSpot、Gene design)

● DesignStudio使用手順

- 設計対象生物種
- ゲノム位置情報の変換
- ターゲットの指定
- Target upload file (template) の使用方法
- デザイン完了の通知

● カスタムパネルデザインの評価

- Review Design、Designの評価 (UCSC Genome Browser)、デザインの修正
- コストにかかわる項目
- カスタムパネルのオーダー
- デザインの管理 (コピー、転送、削除、Manifest File)

● AmpliSeqカスタムパネルを用いた実験デザイン

- 常染色体バリエーション検出パネルデザインの例
- 体細胞変異検出パネルデザインの例
- 特定のCosmic IDおよびexon領域の確認方法

DesignStudio概要



DesignStudioとは

Design a custom solution using our interactive tool

Start A New Design

What's new in DesignStudio?

Introducing AmpliSeq for Illumina

DesignStudio has been improved to include new AmpliSeq for Illumina designers to walk you through the steps of personalizing your custom amplicon panels. Designers for the following application types are supported:

- AmpliSeq Gene Design
- AmpliSeq Hotspot Design

[Start a new design](#)

To learn more, please read the [release notes](#)

Learn about the available assays

- [AmpliSeq Custom DNA](#)
- [Nextera Rapid Capture Custom](#)
- [TruSeq RNA Expression](#)

Your Recent Designs

ID	NAME	ASSAY TECHNOLOGY	STATUS
145981	Cystic Fibrosis	AmpliSeq DNA Gene	Created
144161	Cancer Hotspot	AmpliSeq DNA HotSpot	Created

DesignStudioは
誰でも無料でデザイン可能な、カスタムパネル
設計用オンラインツール

AmpliSeq for Illumina Custom Panel では、
サーモフィッシャーサイエンティフィック株式
会社と同じ設計アルゴリズムを使用

DesignStudioへのアクセス

- (1) DesignStudioのwebsite

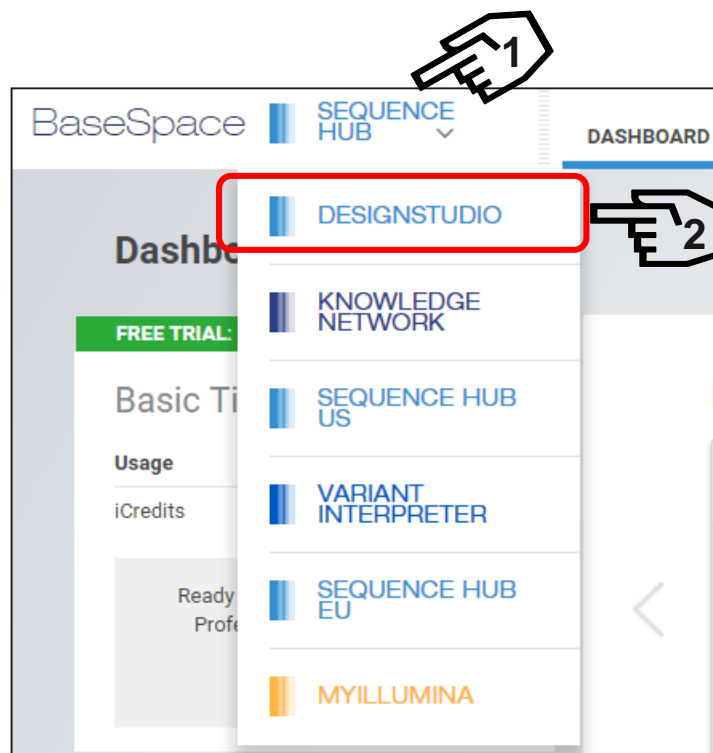
<https://designstudio.illumina.com/>

にアクセスし、Myllumina accountでSign in

- (2) BaseSpace Sequence Hubからアクセス



Myllumina account（無料）をお持ちでない場合は、上記のリンク先から“Don't have an account?”をクリックしていただき、Myllumina account（無料）の作成をお願いいたします。



DesignStudioでデザイン可能なカスタムパネル製品

DNA

AmpliSeq for Illumina HotSpot

- PCRベースのアンプリコンデザイン
- **SNPなどの小さな標的のデザイン**に向いている
- 最大で total 5Mb の領域まで指定可能
- ヒトゲノム参照配列は、hg19 と GRCh38 から選択可能
その他に対応している生物種あり (Extended Species)

AmpliSeq for Illumina Gene

- 遺伝子のコーディング領域全長や、特定のエクソンなど、複数のアンプリコンで領域をカバーするデザインに向いている
- その他の特徴はHotSpotと同様

Nextera Rapid Capture

- ターゲットキャプチャーベースの製品
- 対象領域が広い場合 (500kb-25Mb) に向いている
- 対象生物種はヒト (hg19)

RNA

Coming Soon!

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel

- 2018年の後半販売開始予定

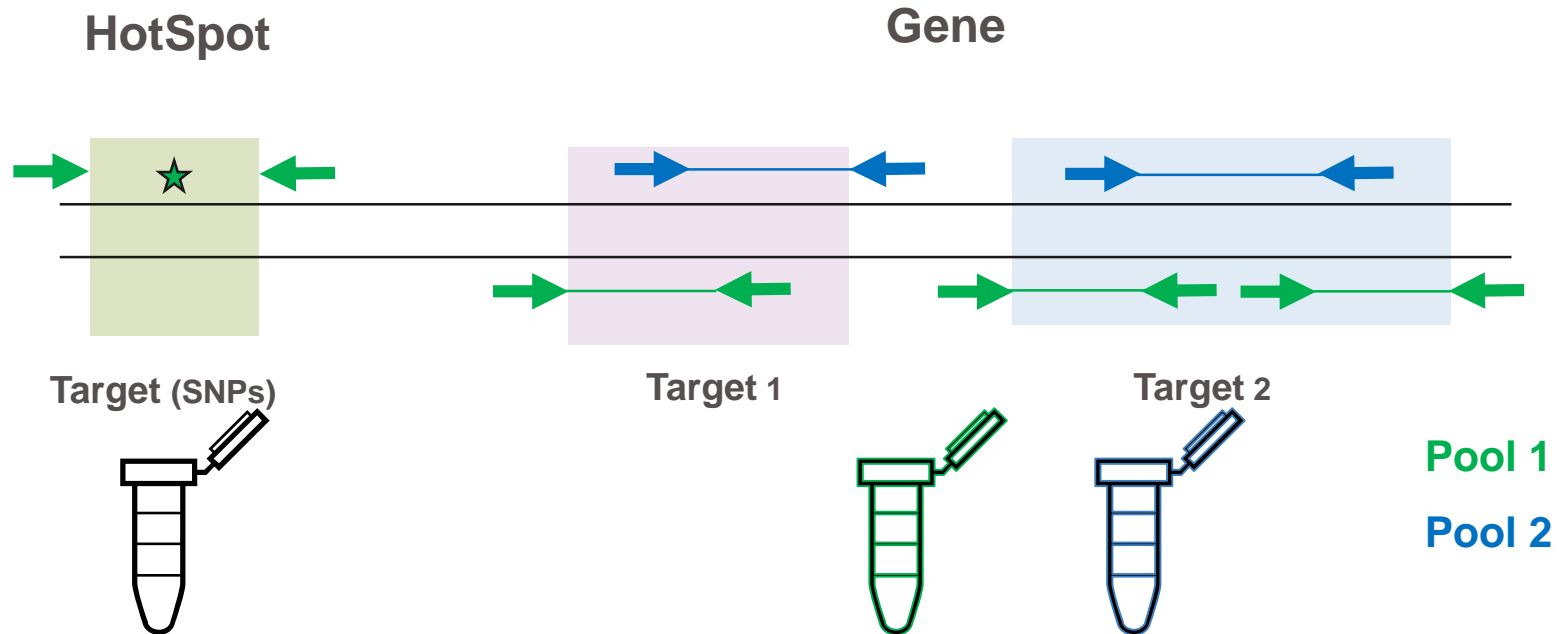
TruSeq Targeted RNA

- Gene expression profiling assay 用のカスタム製品
- 設計済みのProbeから、最大1000ターゲット選択可能
- 対象生物種は、ヒト (hg19)、マウス (mm10)、ラット (m4)

Ampliconのデザイン

HotSpot と Gene の2種類のタイプのパネルデザインが選択可能

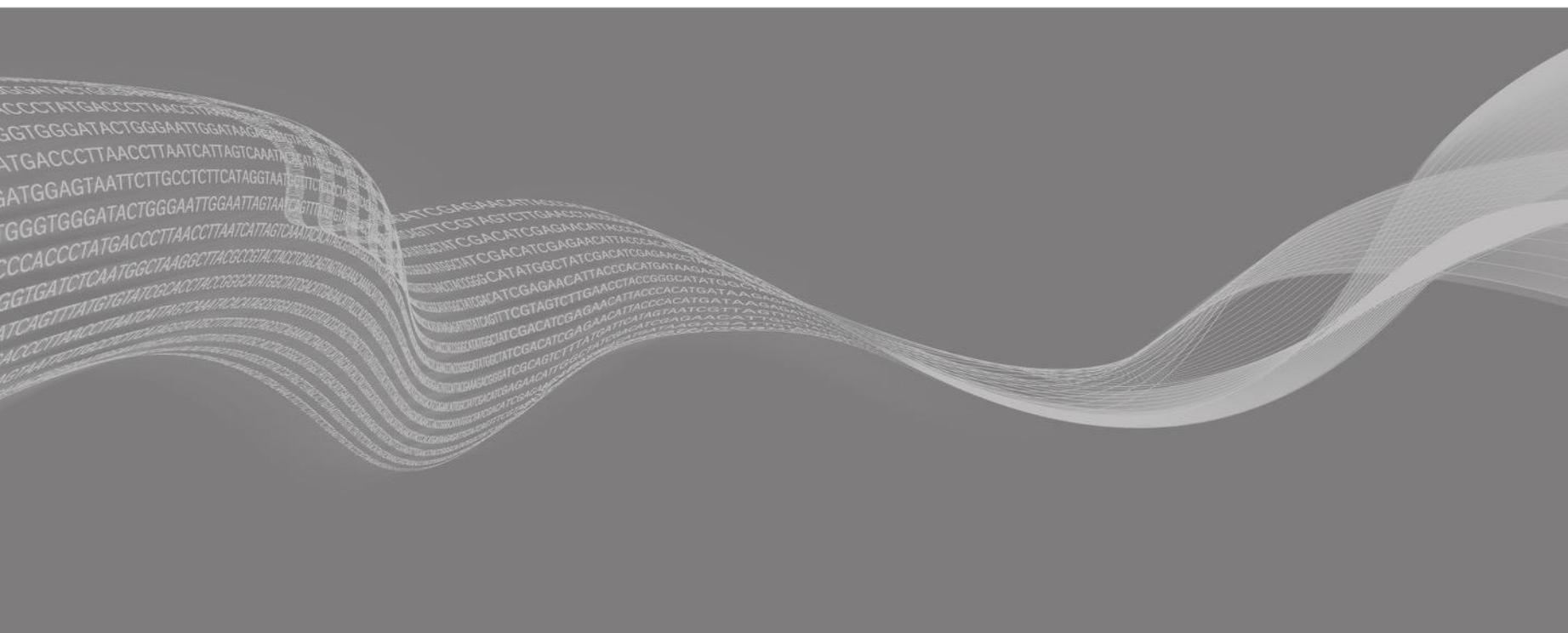
- ・ AmpliSeqでは、PCRでTarget領域の増幅を行う
- ・ サンプルあたり最大12,000 アンプリコンまで設計可能



- **SNPs**といった小さい標的を対象
- アンプリコン同士はオーバーラップしない
- 1 pool design で設計

- **遺伝子全体や、特定のエクソン領域**などを対象
- アンプリコン同士をオーバーラップさせる設計
- 誤ったPCR産物の増幅を防ぐため、オーバーラップさせる領域は、Pool 1とPool 2のようにPrimer mixを分け、別々にPCRにかける
- Default は2 pool design

DesignStudio使用手順



デザインの作成

START DESIGNのタブを選択し、デザインを開始

BaseSpace DESIGNSTUDIO SEQUENCING

START DESIGN NEW DESIGNS VIEW REPORTS

Select Assay 1 Configure Design 2 Manage Targets 3 Submit Design 4 Review Design 5 Get Pricing 6

Assay Type
DNA RNA

Assay Technology
Compare Technologies
AmpliSeq for Illumina Gene AmpliSeq for Illumina Hotspot Nextera Rapid Capture

Species
Human (hg19) Human (grch38.p2) Mouse (mm10)

Extended Species
Cow (bosTau7) Chicken (galGal4) Dog (canFam3) Chinese Hamster (criGri1)
Pig (susScr3) Sheep (oviAri3) Corn (AGPv3) Rice (IRGSP-1.0)
Soybean (Glyma1.1) Tomato (SL2.40)

Design Name
0627-Custom panel-1

Description
New Project Description

Next

Assay Type
DNAかRNAを選択

Assay Technology

GeneかHotSpotを選択

Gene: 特定の遺伝子や領域を対象
2 pool デザイン (default)

HotSpot: 主にSNPsを対象
1 pool デザイン

Species

ヒトゲノム参照配列は
hg19 と **GRCh38** から選択可

その他の生物種も
Extended Species のリストから
選択可能
※対象領域はCoordinateでゲノム上の
位置情報を指定する必要あり

Design Name

20文字の文字数制限あり

Description

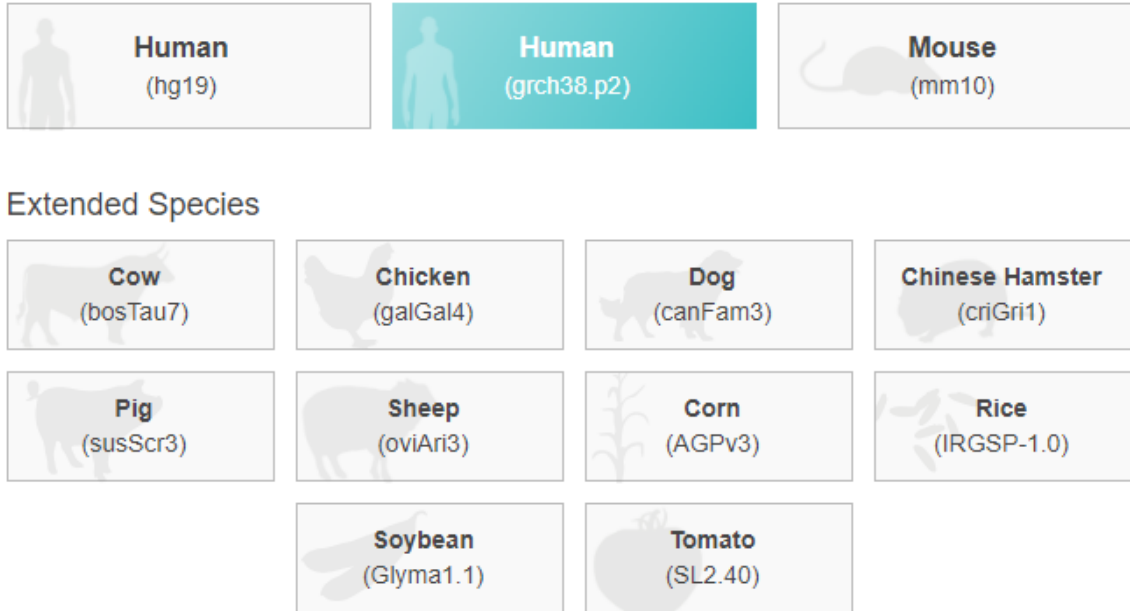
コメントがなければ、記入の必要なし



11

Design Nameは「1806-Custom panel-1」のように
[4桁の日付-パネルの名前-通し番号 (再デザインの度に数字を増やす)] と名付けておくと、
デザインの条件検討の時に便利

設計対象生物種



現在の設計対象生物種（12種）
ヒト、マウス、ウシ、ブタ、ニワトリ、ヒツジ、イヌ、チンパンジー、ダイズ、トウモロコシ、トマト、イネ
上記以外のカスタムゲノムは、
2018年後半から対応予定



ここで選択した参照配列は、この後**変更できません**。
そのため、**後続の情報解析データベースに考慮**してご選択下さい。

ゲノム位置情報の変換

IGV、UCSC Genome Browser、COSMIC等でデータを確認する場合、**ゲノム参照配列のバージョンを合わせる**事が重要

デザイン完成後に、参照配列（hg19/GRCh37とGRCh38）の変更する場合には、BaseSpace Sequence Hubの **CrossMap app**や、UCSC Genome Browser の LiftOver (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>) 等のソフトウェアで位置情報を変換する必要あり



CrossMap
BaseSpace Labs
? Help

hg19 ⇔ hg38 間の位置情報を変換
様々な拡張子のファイルに対応
.bed, .vcf, .bigwig, .gff, .gtf, .wiggle, .bedGraph など

<https://basespace.illumina.com/apps/2047045/CrossMap?preferredversion>



弊社 **VariantStudio v3.0** 変異解析ソフトウェアをご使用いただく場合には、ゲノム参照配列を**hg19**に合わせる必要があります。
VariantStudio の使用方法はウェビナーをご参照下さい。

バージョンアップしたデスクトップ版VariantStudio v3.0変異解析ソフトウェアの徹底活用法【イルミナiSchool 中級】

https://jp.illumina.com/events/webinar/2017/webinar_170524_j.html

アンプリコンサイズの指定

サンプルの種類によって推奨のアンプリコンサイズは異なる
※最少アンプリコンサイズはいずれの設定でも125bp

Regular

Configure Design

Homo sapiens
hg19

Sample Type

Regular FFPE cfDNA

Max Amplicon Length

140 bp 175 bp 275 bp 375 bp
MiSeq Only

FFPE

Sample Type

Regular FFPE cfDNA

Max Amplicon Length

140 bp 175 bp

cfDNA

Sample Type

Regular FFPE cfDNA

Max Amplicon Length

140 bp

最大アンプリコンサイズ

Regular:

品質のよいDNA
140, 175, **275** or 375bp

FFPE:

140 or **175**bp
※FFPE由来のDNAは断片化が進んでいるので、短いアンプリコンを推奨

cfDNA:

140bp
※現状、Unique molecular identifier (UMI) には非対応

Primerの配列特異性 (Stringency)

Stringency で、Primer設計時の配列特異性が指定可能 (defaultはhigh)



Stringency:
HighからLowの間で選択
**On-target率とCoverageは
トレードオフの関係**

“Learn more about stringency”
にカーソルを合わせると、詳細な説明が表示

The stringency setting in **DesignStudio** controls how well amplicons included in the final design solution match their target sequence.

Higher stringency settings yield primer designs that result in highly specific amplicons. The number of on-target sequencing reads is maximized (high specificity) and off-target reads are minimized. High stringency designs may come at the expense of lower target coverage *in silico* and can result in design gaps

Lower stringency settings yield primer designs that result in less specific amplicons. The *in silico* coverage of targets is maximized but low stringency designs may come at the expense of a lower number of on-target reads (low specificity) by generating more off-target reads.

The default recommended stringency is **High**.

	On Target	Coverage	
	High Stringency	Medium Stringency	Low Stringency
	 Only high stringency primers	Slight reduction in primer stringency that will increase coverage and may increase off-target	More relaxed primer stringency that will increase coverage with greater off-target risk
	If the <i>in silico</i> coverage is sufficient, this design is the best option	For better coverage of GC-rich regions	For more coverage of GC-rich regions, and tolerance for higher off-target

**Stringencyを下げると
Coverageは向上するが、
オフターゲットが増加する可能性あり**

最初のデザインでは、
“high”での設計がお勧め
デザイン完成後、条件検討時に
Stringencyを変更してデザイン
内容を検討すると良い

ターゲットの指定 (Gene & HotSpot)

Gene Design

Webinar (145990) - Created [Edit](#)

Select Assay 1 Configure Design 2 Manage Targets 3 Submit Design 4 Review Design 5 Get Pricing 6

Manage Targets

Design Type AmpliSeq DNA Gene
Species hg19 (Homo sapiens)
Amplicon Size 275
Stringency High

Add Targets

Gene Coordinate File

Gene Name: [Add Gene](#) For full region design including introns, use Coordinate input.

Options: CDS Only Exon Only What is CDS?: 5' UTR Coding DNA Sequence (CDS) 3' UTR

Exon Padding: 25 bp (applies only to targets specified by Gene name) [Download Targets](#)

No targets detected

[Submit Design](#)

Gene Design

Add Targetsの
Gene、Coordinate、File
のいずれかのタブから、
ターゲットの指定方法を選択

HotSpot Design

Webinar-2 (146334) - Created [Edit](#)

Select Assay 1 Configure Design 2 Manage Targets 3 Submit Design 4 Review Design 5 Get Pricing 6

Manage Targets

Design Type AmpliSeq DNA Hotspot
Species hg19 (Homo sapiens)
Amplicon Size 275
Stringency High

Add Targets

Variant Coordinate File

Variant Source: dbSNP_138, COSM_82 Variant: [Add Variant](#)

No targets detected

[Submit Design](#)

HotSpot Design

Add Targetsの
Variant、Coordinate、File
のいずれかのタブから、
ターゲットの指定方法を選択

ターゲットの指定 – Gene Design

Add Target

Gene Coordinate File

Gene Name:

Options: CDS Only Exon Only

Exon Padding: (applies only to targets specified by Gene name)

No targets detected

Download Targets

①

②

③

①

Gene Name の指定には **gene symbol** を使用

“Target entered contains errors. Please correct and submit again. Gene not found”
のエラーが出た場合には、以下の3点をお試し下さい

- 1) alternate gene symbol を使用
- 2) HGNC (<http://www.genenames.org/>) で gene symbol を確認
- 3) Coordinateでゲノム上の位置情報を指定（後述）

②

Gene Nameに遺伝子名を入力する際には、**Options**で

CDS Onlyか**Exon Only**のどちらか（defaultはCDS）にチェックを入れてからAdd Geneをクリック
Exon = CDS + 5'UTR + 3'UTR

5' UTR

Coding DNA Sequence (CDS)

3' UTR

③

Exon Paddingは、CDS OnlyまたはExon Only選択時のみ反映される項目

Exon領域の上流と下流を追加で何塩基ターゲットに含めるかを指定

Splice site mutation の検出を目的とする場合には、Padding 25 bpでの設定をお勧め

ターゲットの指定 – Gene Design

Coordinateタブでは、coordinateでゲノム上の特定の領域を指定可能

Add Targets

Gene **Coordinate** File

Chromosome: chr12 Start: 25398279 Stop: 25398289 Name: KRAS G12D [Add Target](#)



Coordinateでゲノムの位置情報を指定すれば
特定のゲノム領域や、**Hot spot**や**SNP**などの小さな領域を加える事が可能
※Gene Designでは、**COSMIC ID**や**rsID**で直接領域を指定できないことに注意

Fileタブでは、templateを使用することでターゲットを一括で指定可能
templateの使用方法については後のスライドで説明

Add Targets

Gene Coordinate **File**

Submit an Import File
 .csv .bed
Download file templates: .csv .bed [Select a File](#) [Upload File](#)

ターゲットの指定 – Hotspot Design

Variantタブでは、SNPやCOSMICを、rsIDおよびCOSMICの mutation IDを用いて指定可能

Add Targets

Variant Coordinate File

Variant Source
dbSNP_138, COSM_82

Variant: COSM521

Add Variant

Coordinateタブでは、Coordinateでゲノム上の特定の領域を指定可能

Add Targets

Variant Coordinate File

Chromosome: chr12 Start: 25398279 Stop: 25398289 Name: KRAS G12D

Add Target



TargetをCoordinateで入力する際には、目的の塩基の位置から上流下流5bpずつ加えた領域で指定するのがお勧め

Fileタブでは、templateを使用することでターゲットを一括で指定可能

Add Targets

Variant Coordinate File

Submit an Import File

.csv .bed

Download file templates: .csv .bed

Select a File Upload File

Target upload file (template) の使用方法

Webinar (145990) - Created [Edit](#)

Copy Transfer Delete

Select Assay 1 Configure Design 2 **Manage Targets 3** Submit Design 4 Review Design 5 Get Pricing 6

Manage Targets

Design Type AmpliSeq DNA Gene
Species hg19 (Homo sapiens)
Amplicon Size 275
Stringency High

Add Targets

Gene Coordinate **File**

Submit an Import File
 .csv .bed

Download file templates: **.csv .bed**

Example chromosome formats ⓘ

template の入手

upload

1 2 3

Select a File Upload File 180614_webinar.csv

Templateの入手方法

Template (.csvまたは.bed) は、”**Download file templates: .csv .bed**”から拡張子名をクリックする事で入手可 (CDSやExonを指定できる**csv形式がお勧め**)

Templateのupload方法

Select a File (雲のアイコン) をクリックし、作成したtemplateを選択
“Upload File”の右にファイル名が反映されたら、”**Upload File**”をクリック

Target upload file (csv形式) の例

CDS Only

Type: GENE_CDS
Name: 遺伝子名

Exon Only

Type: GENE_EXONS
Name: 遺伝子名

Coordinate

Type: REGION
+ゲノム上の位置

COSMIC

Type: Snp
Name: COSMIC ID

SNP

Type: Snp
Name: rs number

Coordinate

Type: REGION
+ゲノム上の位置

Gene Design

ゲノム上での位置情報

	A	B	C	D	E	
1	Type	Name	Chromosome	Start	End	
2	GENE_CDS	TP53				
3	GENE_EXONS	WAC				
4	REGION	target test	chr1	151400519	151400619	
5	REGION	Target-123.f c_d	chr10	94390130	94397140	
6	REGION		chr10	94390144	94397164	
7						
8						

Hotspot

ゲノム上での位置情報

	A	B	C	D	E	F
1	Type	Name	Chromosome	Start	End	
2	Snp	COSM911918				
3	Snp	Rs12				
4	REGION	Target-123.f c_d	chr10	94390130	94390140	
5	REGION		chr10	94390126	94390128	
6						
7						

製品の使用

必ず.csv形式で保存する必要あり

illumina®

デザインのSubmit

Webinar (145990) - Targeted [Edit](#)

Select Assay 1 Configure Design 2 Manage Targets 3 **Submit Design 4** Review Design 5 Get Pricing 6

Manage Targets

Design Type AmpliSeq DNA Gene
Species hg19 (Homo sapiens)
Amplicon Size 275
Stringency High

Add Targets

Gene Coordinate File

Submit an Import File
 .csv .bed
Download file templates: .csv .bed [Select a File](#) [Upload File](#)
[Example chromosome formats](#)

Exon Padding 25 bp (applies only to targets specified by Gene name) [Download Targets](#)

Target Type	Name	Chr	Start	Stop	Added
Gene (CDS)	TP53	chr17	7571719	7578811	
06/13/2018					
Gene (Exon)	CDKN2A	chr9	21967750	21975132	
06/13/2018					
Coordinate	EGFR Ex18	chr7	55241589	55241761	
06/13/2018					
Coordinate	EGFR Ex19	chr7	55242382	55242538	

1 - 11 of 11 items

[Delete ALL Targets](#) [Delete Selected Targets](#)

[Submit Design](#)

目的のターゲットが下のリストに反映されたら
“Submit Design”をクリック

Submit Design

Important Note: After submission, your design will no longer be editable

Notify me when the design is complete
Email Address:

I agree to these [Terms and Conditions](#)

[Submit Design](#) [Cancel](#)

その後の画面で、
Emailアドレスを入力し、
Terms and Conditionsにチェックを入れ
“Submit Design”をクリック

デザインが完了しますと
こちらで入力したEmailアドレス宛てに
通知が届きます。

デザイン完了までにかかる時間は、
おおよそ数十分から（最大）48時間で
す

**※ブラウザは閉じていただいて問題ござ
いませぬ（サーバー上で設計）**

デザイン完了の通知

Go to DesignStudio | www.illumina.com

illumina® Your AmpliSeq for Illumina design is completed.

DesignStudio

Dear Illumina Customer,

Your **AmpliSeq for Illumina** design, **Webinar**, is completed. To review this design, visit [DesignStudio](#),

[View Design](#)

◆ **Design Summary**

Design ID:	145990
Solution ID:	IAA6791_182
Design Name:	Webinar
Number of Amplicons:	39

Coverage
90.05 %

If you have any questions, contact [Illumina Customer Service](#)

Thank you for using Illumina DesignStudio!

Sent by Illumina | [5200 Illumina Way, | San Diego, CA, 92122](#)
[www.illumina.com](#) | [Update Profile](#)

[t](#) [YouTube](#) [f](#)

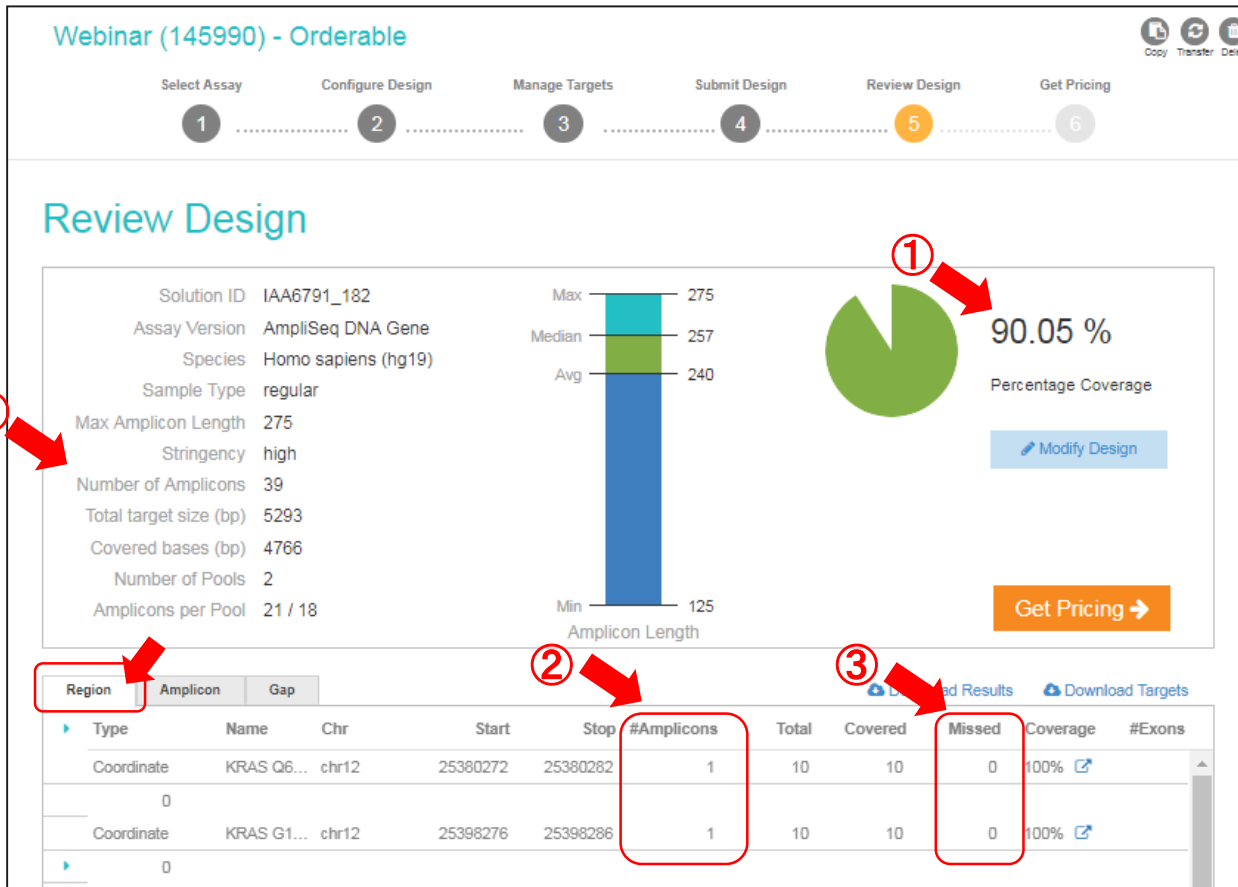
DesignStudio上でデザインが完了いたしますと、ご指定いただいたEmailアドレス宛てに、このようなEmailの通知が届きます。

Email中の”**View Design**”をクリックしていただきますと、該当のデザインに移動します。

カスタムパネルデザインの評価



Review Design



Review Designの画面、およびTableの**Region**タブでは、デザインの詳細が確認可能

- **Type**
ターゲット指定時の形式 (Gene/Variant/Coordinate)
- **Name**
遺伝子名、またはuploadファイルで指定した名前
- **Chr, Start, Stop**
ゲノム上の位置情報
- **#Amplicons**
各Regionのアンプリコン数
- **Total**
ターゲットの総塩基数
- **Covered**
ターゲットの中でカバーできた塩基数
- **Missed**
ターゲットの中でカバーできなかった塩基数
- **Coverage**
各ターゲットに対するカバー率

確認していただきたい項目

① **Coverage** (in silico) でどのくらいカバーできたかを確認

② **Total**、および各遺伝子 (region) における**アンプリコン数**

※アンプリコン数で、カスタムパネルの価格が決まる

アンプリコン数が多すぎる場合には、領域を削るのも有効

③ **設計できなかった領域**

※遺伝子によっては、特定のExon等が設計出来にくい事がある事に注意

Review Design

Ampliconタブ

ゲノム上での位置情報

Region	Amplicon	Gap	Amplicon ID	Chr	Start	Stop	Name	#Pool
			5226976	chr7	55241428	55241654	EGFR Ex18	1
			5226977	chr7	55241643	55241801	EGFR Ex18	2
			5226978	chr7	55242350	55242564	EGFR Ex19	1
			5226979	chr7	55248899	55249123	EGFR Ex20	2
			5226980	chr7	55249120	55249200	EGFR Ex20	1
			5226981	chr7	55259264	55259492	EGFR Ex21	2
			5226982	chr7	55259481	55259624	EGFR Ex21	1
			5226983	chr7	55260387	55260608	EGFR Ex22	2
			5226984	chr7	55266381	55266607	EGFR Ex23	1
			5226985	chr9	21967713	21967941	CDKN2A	1
			5226986	chr9	21967930	21968104	CDKN2A	2
			5226987	chr9	21968093	21968266	CDKN2A	1
			5226988	chr9	21968544	21968757	CDKN2A	2

Tableの**Amplicon**タブでは、**アンプリコンの設計された位置**や、各アンプリコンの増幅に用いるPrimerセットがどのPoolに割り当てられているか確認可能

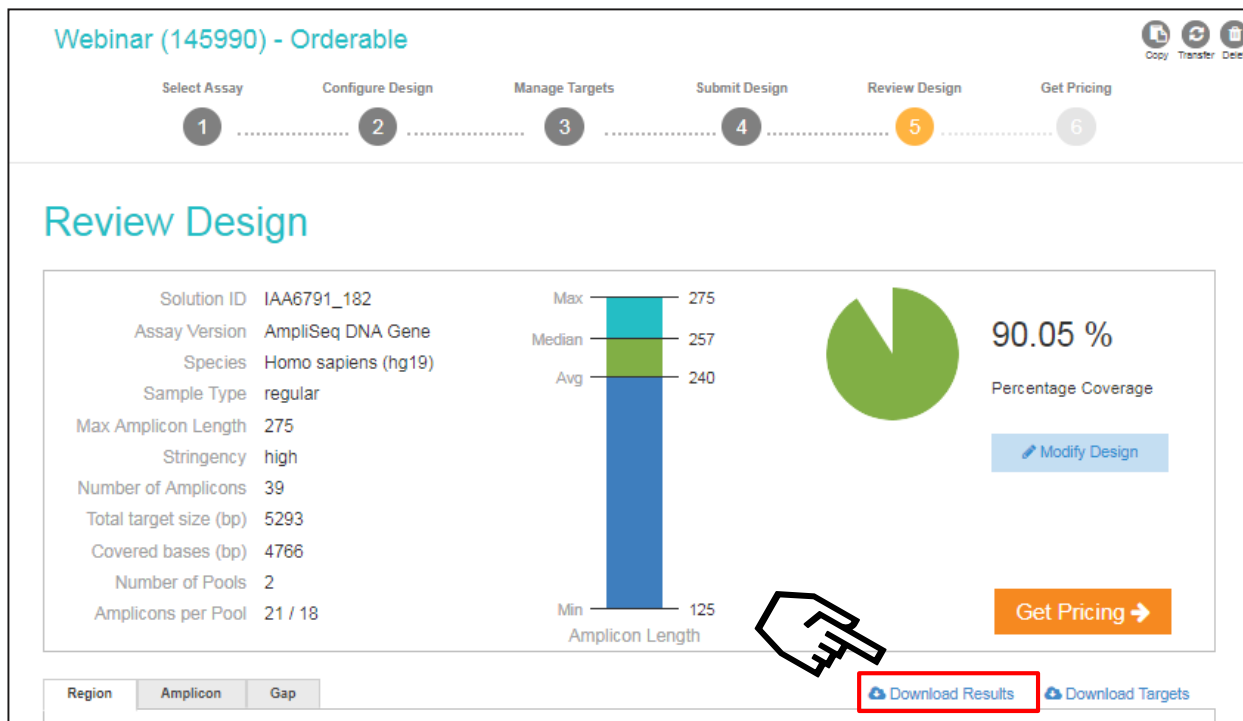
Gapタブ

ゲノム上での位置情報

Region	Amplicon	Gap	Name	Chr	Start	Stop
			CDKN2A	chr9	21970975	21970984
			CDKN2A	chr9	21974699	21974851
			CDKN2A	chr9	21974699	21975007
			CDKN2A	chr9	21994411	21994515
			TP53	chr17	7577617	7577633
			TP53	chr17	7579519	7579594
			TP53	chr17	7579519	7579609

Gapタブでは、ターゲットの中で**カバーできなかった領域**を確認する事が可能

レポート



名前	種類	サイズ
IAA6791_182_coverage_details.csv	Microsoft Excel ...	2 KB
IAA6791_182_coverage_summary.csv	Microsoft Excel ...	2 KB
IAA6791_182_Designed.bed	BED ファイル	3 KB
IAA6791_182_manifest.txt	TXT ファイル	12 KB
IAA6791_182_Missed.bed	BED ファイル	1 KB
IAA6791_182_Submitted.bed	BED ファイル	2 KB

Tableで表示された情報は、
Download Resultsから
入手できるファイルからも確認可能

デザインの評価 (UCSC Genome Browser)

Webinar (145990) - Orderable

Copy Transfer Delete

Select Assay 1 Configure Design 2 Manage Targets 3 Submit Design 4 Review Design 5 Get Pricing 6

Review Design

Solution ID IAA6791_182
Assay Version AmpliSeq DNA Gene
Species Homo sapiens (hg19)
Sample Type regular
Max Amplicon Length 275
Stringency high
Number of Amplicons 39
Total target size (bp) 5293
Covered bases (bp) 4766
Number of Pools 2
Amplicons per Pool 21 / 18

Max 275
Median 257
Avg 240
Min 125
Amplicon Length

90.05 %
Percentage Coverage

Modify Design

Get Pricing →

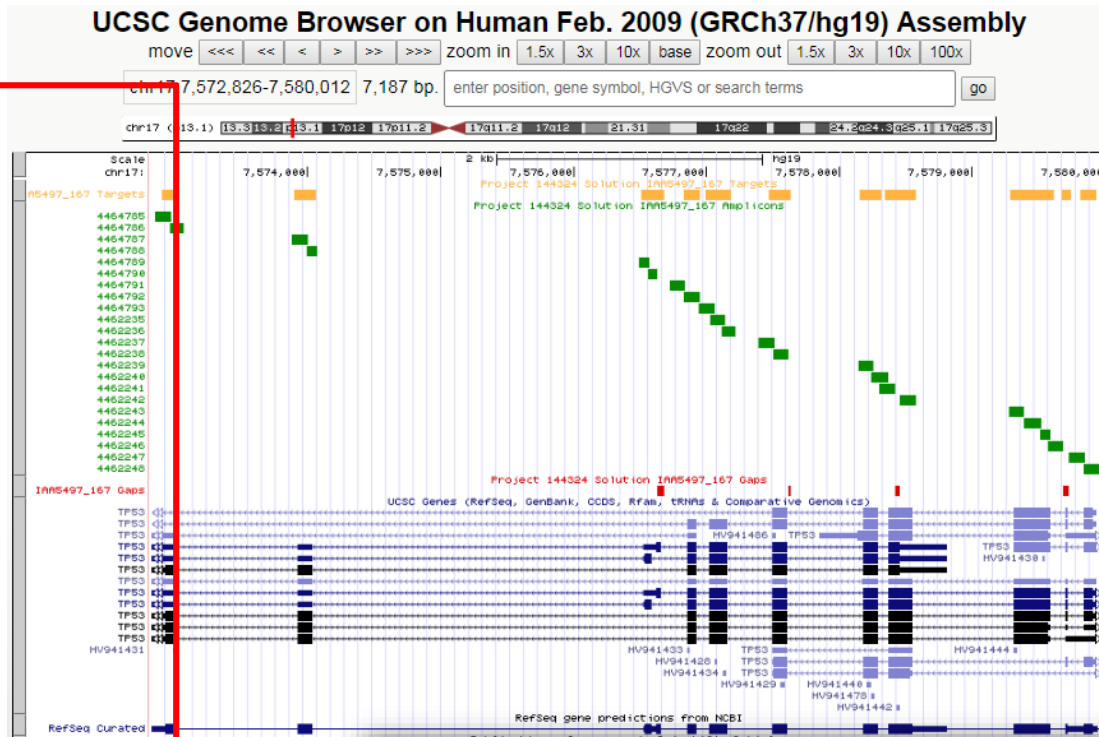
Region	Amplicon	Gap	Type	Name	Chr	Start	Stop	#Amplicons	Total	Covered	Mis	Coverage	#Exons
			Coordinate	KRAS Q6...	chr12	25380272	25380282	1	10	10	0	100%	
			Coordinate	KRAS G1...	chr12	25398276	25398286	1	10	10	0	100%	
			Coordinate	KRAS G1...	chr12	25398279	25398289	1	10	10	0	100%	
			Gene	TP53	chr17			15	1853	1747	106	94.3%	
			Coordinate	EGFR Ex18	chr7	55241589	55241761	2	172	172	0	100%	
			Coordinate	EGFR Ex19	chr7	55242392	55242538	1	146	146	0	100%	

1 - 11 of 11 items

Coverage横のアイコンをクリックすると
UCSC Genome Browser
へ移動し、
アンプリコンの位置を具体的に
目視で確認する事が可能

デザインの評価 (UCSC Genome Browser)

Annotation Tracks



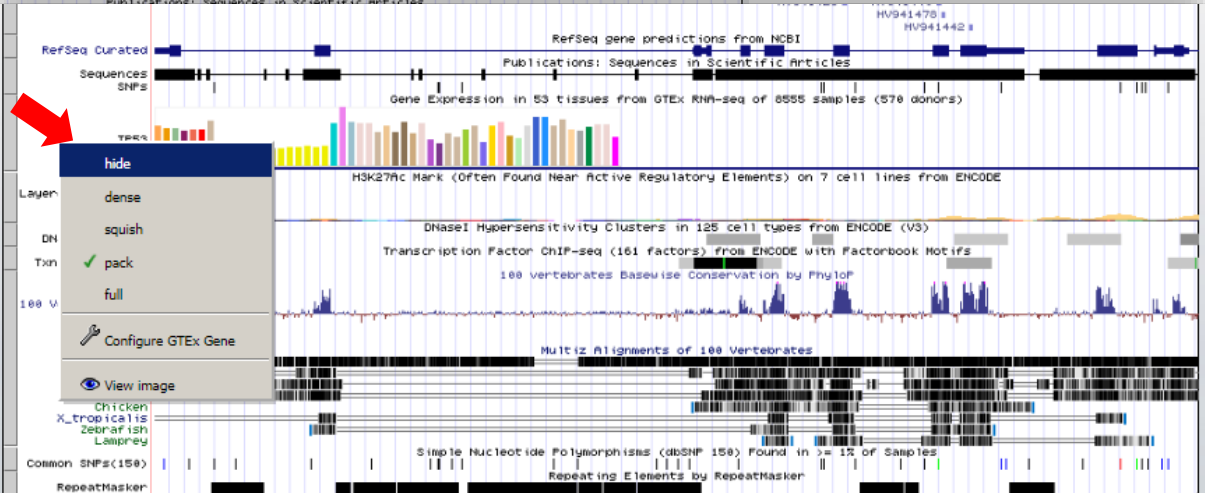
標的領域

アンプリコン

Gap

遺伝子情報

Trackが多くて見辛い場合
不要なTrackは
Track上で右クリックし
hideを選択で
除外する事が可能

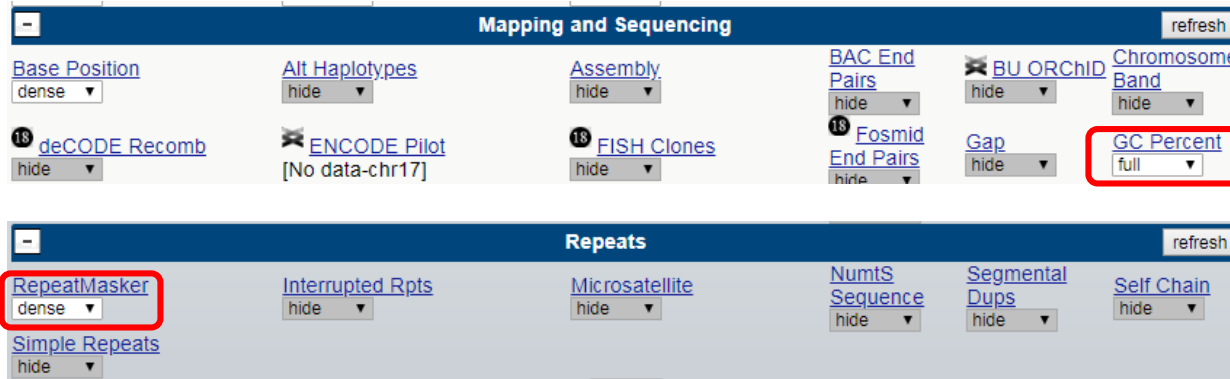


製品の

デザインの評価 (UCSC Genome Browser)

Annotation Tracksには、**GC Percent**、**COSMIC Regions**、**RepeatMasker** の追加がお勧め
各項目にチェックを入れ、**refresh**をクリックすると、Genome Browser上に反映される

設計が難しいと考えられる領域



Mapping and Sequencing

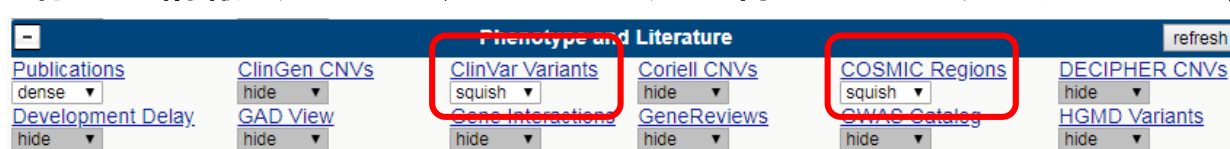
Base Position: dense
Alt Haplotypes: hide
Assembly: hide
BAC End Pairs: hide
BU ORChID: hide
Chromosome Band: hide
deCODE Recomb: hide
ENCODE Pilot: [No data-chr17]
FISH Clones: hide
Fosmid End Pairs: hide
Gap: hide
GC Percent: full

Repeats

RepeatMasker: dense
Interrupted Rpts: hide
Microsatellite: hide
NumtS Sequence: hide
Segmental Dups: hide
Self Chain: hide

GC%が極端に高いまたは低い（20%-80%を外れる）領域や、繰り返し配列上では、Primerの設計が難しい

有益な情報 (ClinVar、COSMIC) が得られるトラック



Phenotype and Literature

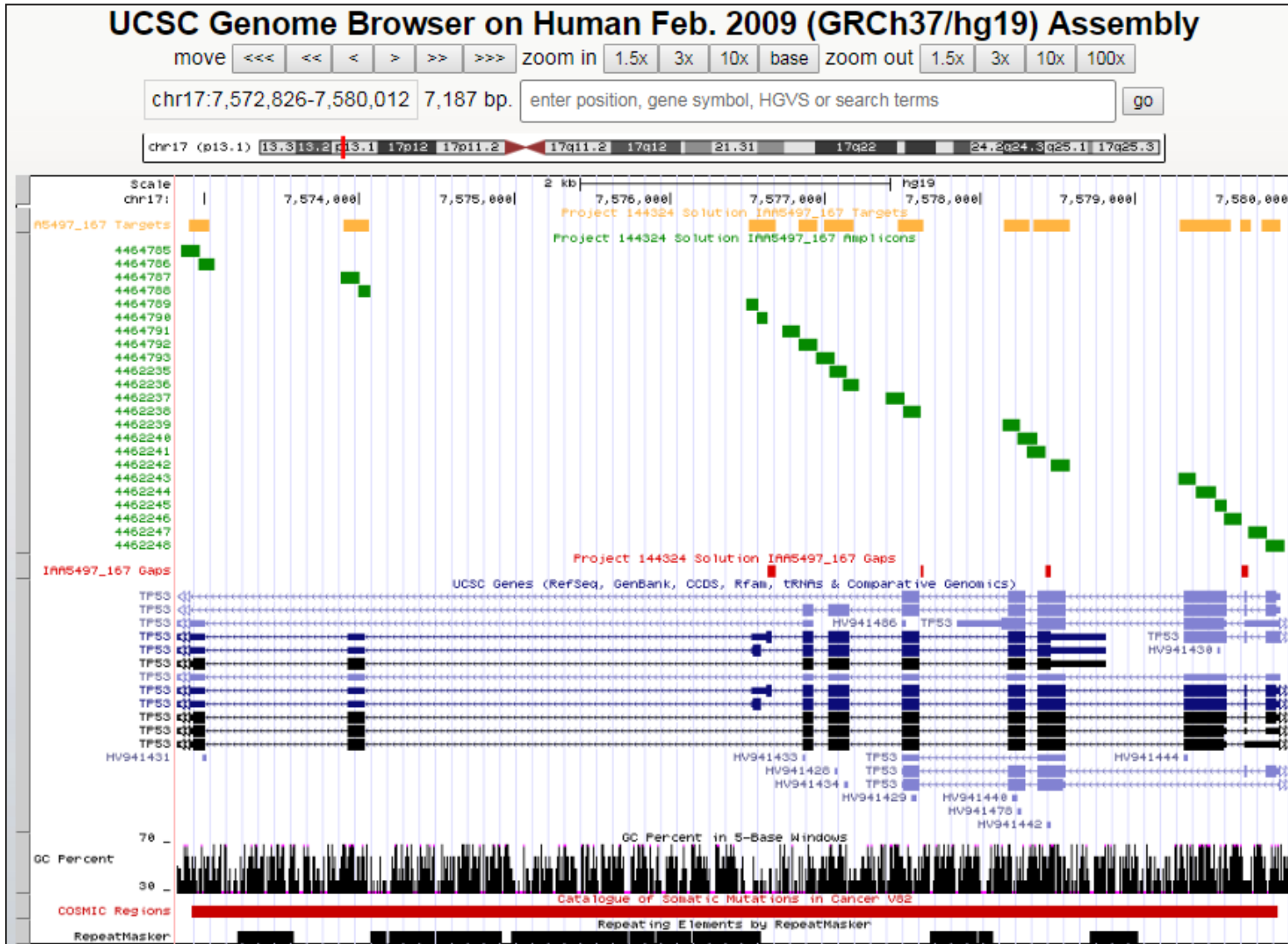
Publications: dense
ClinGen CNVs: hide
ClinVar Variants: squish
Coriell CNVs: hide
COSMIC Regions: squish
DECIPHER CNVs: hide
Development Delay: hide
GAD View: hide
Gene Interactions: hide
GeneReviews: hide
GWAS Catalog: hide
HGMD Variants: hide

ClinVarやCOSMICのアノテーション情報を表示させることも可能

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。

デザインの評価 (UCSC Genome Browser)

デザイン結果を視覚的に確認することが可能



標的領域

アンプリコン

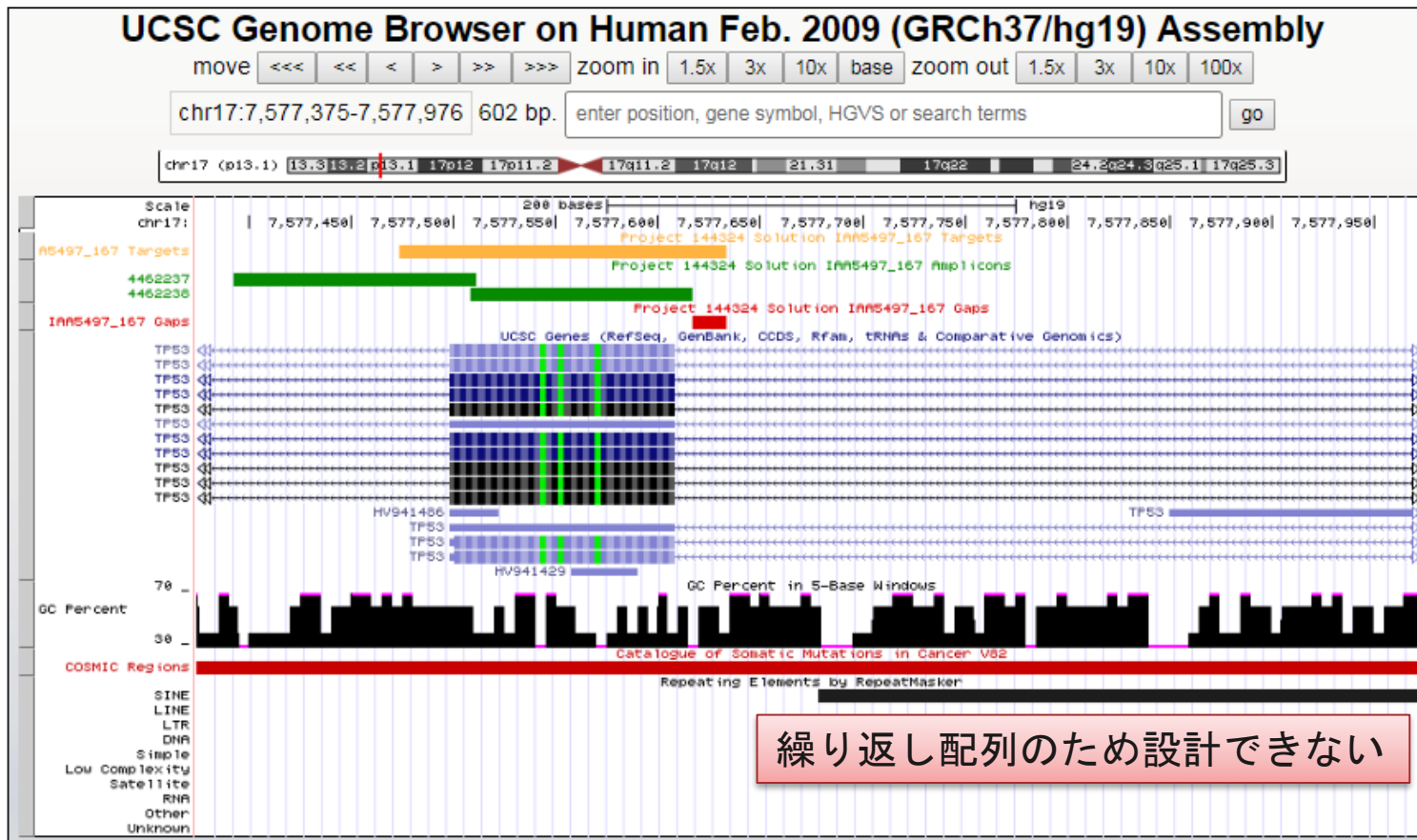
Gap

遺伝子情報

GC %
COSMIC
RepeatMasker

デザインの評価 (UCSC Genome Browser)

デザインが出来なかった場所 (Gap) の確認も可能



標的領域

アンプリコン

Gap

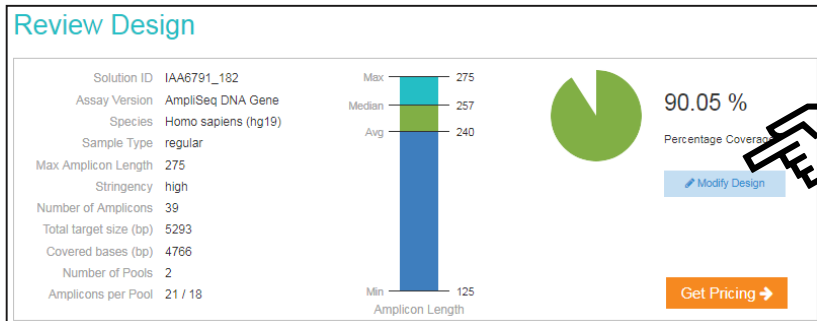
遺伝子情報

GC %
COSMIC
RepeatMasker

近隣に繰り返し配列がある場合、GC%が極端に高いまたは低い（20%-80%を外れる）場合、また、配列の特異性が低い領域では、Primerの設計が困難になります。

デザインの修正

Designに問題がある場合には、Modify Designから再デザインが可能



Modify Designでは、以下の修正が可能

- ① **Project Nameの変更** (必須)
※後から修正の条件が分かるように、通し番号を付けていただくのがお勧め
- ② **Stringencyの変更** (配列特異性の調節)
- ③ **Pool数の変更**
- ④ Paddingの塩基数の変更
- ⑤ Targetの追加、削除

Modify Design

Modify design will create a new project with settings and targets from this project as the starting point.

Project Name

① Webinar-3

Project Description

New Project Description

Design Stringency

② high [Learn more about stringency](#)

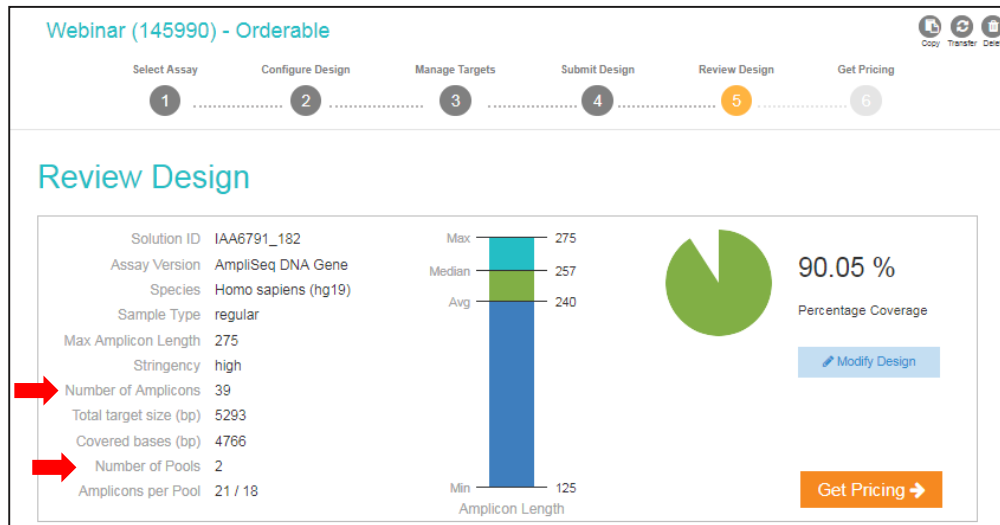
③ Maximize number of design pools for best coverage [?](#)

Cancel Modify Design

Modify Designの画面では、

Maximize number of design pools for best coverage に**チェック**をいれて Modify Design に進んだ場合、デザインに応じて自動的に**Pool数**が調整され、再デザインが行われます。多くの場合、4 pool 以内で増加します。

コストにかかわる項目



特にチェックしていただきたい項目（アンプリコン数とPool数がコストを増加させる要因となる）

- **Number of Amplicons:** 1アンプリコンあたり 1,080円
- **Number of Pools:**
1-2 poolでは、AmpliSeq Library PLUS for Illumina を1 reaction分使用: サンプルあたり15,500円
3 poolでは、1.5 reaction分使用: サンプルあたり 23,250円
4 poolでは、2 reaction分使用: サンプルあたり 31,000円
※ Cat# 20019101 AmpliSeq Library PLUS for illumina (24 Reactions) キットを使用した場合



コストを抑えるためには、不要な遺伝子を除いたり、HotSpotに絞ってデザインする事が有効

カスタムパネルのオーダー

Review Design

Solution ID	IAA6791_182
Assay Version	AmpliSeq DNA Gene
Species	Homo sapiens (hg19)
Sample Type	regular
Max Amplicon Length	275
Stringency	high
Number of Amplicons	39
Total target size (bp)	5293
Covered bases (bp)	4766
Number of Pools	2
Amplicons per Pool	21 / 18

90.05 %
Percentage Coverage

Modify Design

Get Pricing →

デザイン完了後、
Get Pricingをクリック

Finalize Design & Get Pricing

Please review your design details below. To get the most accurate pricing for you, we'll need to finalize your design which means that you can no longer alter it.

Design Details

Design Name	Webinar	Species	Homo sapiens (hg19)
Design Id	IAA6791	Amplicons	39
Solution Id	IAA6791_182	Pools	2
Design Type	AmpliSeq DNA Gene	Amplicons per Pool	21 / 18
		Coverage	90.05%

Finalize Design & Get Pricing Cancel

” Finalize Design & Get Pricing”をクリック
デザインステータスがFinalizedに変わる

Webinar (145990) - Finalized

Select Assay Configure Design Manage Targets

1 2 3

デザインステータスがFinalizedになりましたら、
見積り依頼が可能となります
以下の項目を弊社担当営業または販売店までご連絡下さい

1. **アカウント名** (MylluminaへのログインID)
2. **デザイン名** (今回の例では Webinar)
3. **Project ID** (今回の例では 145990)
4. 最終的に確定した**アンプリコンの数** (今回の例では 39)

デザインの管理（コピー、転送、削除）

作成したデザインは、コピー、他のアカウントへの転送、および削除が可能

Copy

新しい名前を付けて、デザインを複製

Delete

デザインの削除

Transfer

自分のMyilluminaアカウントにあるデザインを、**他のMyilluminaアカウントにTransfer**した場合には、相手に「DesignStudio Project Transfer Confirmation」という件名のメールが届く。相手がメール中のAccept Transferをクリックした時点で、転送が完了



※Transfer後、Acceptが完了するまでに24時間の時間制限あり。24時間を過ぎた場合は、再度Transferが必要
※**Transferした場合には、手元からデザインがなくなる**ため、Transferするデザインはあらかじめコピーして手元に保存しておくことを推奨

カスタムパネルのManifest Fileは DesignStudioよりダウンロードが可能

BaseSpace DESIGNSTUDIO SEQUENCING

START DESIGN VIEW DESIGNS VIEW REPORTS ? Help Shinji

View Designs Project Id: [] Customer Email: [] Clear Q Search: []

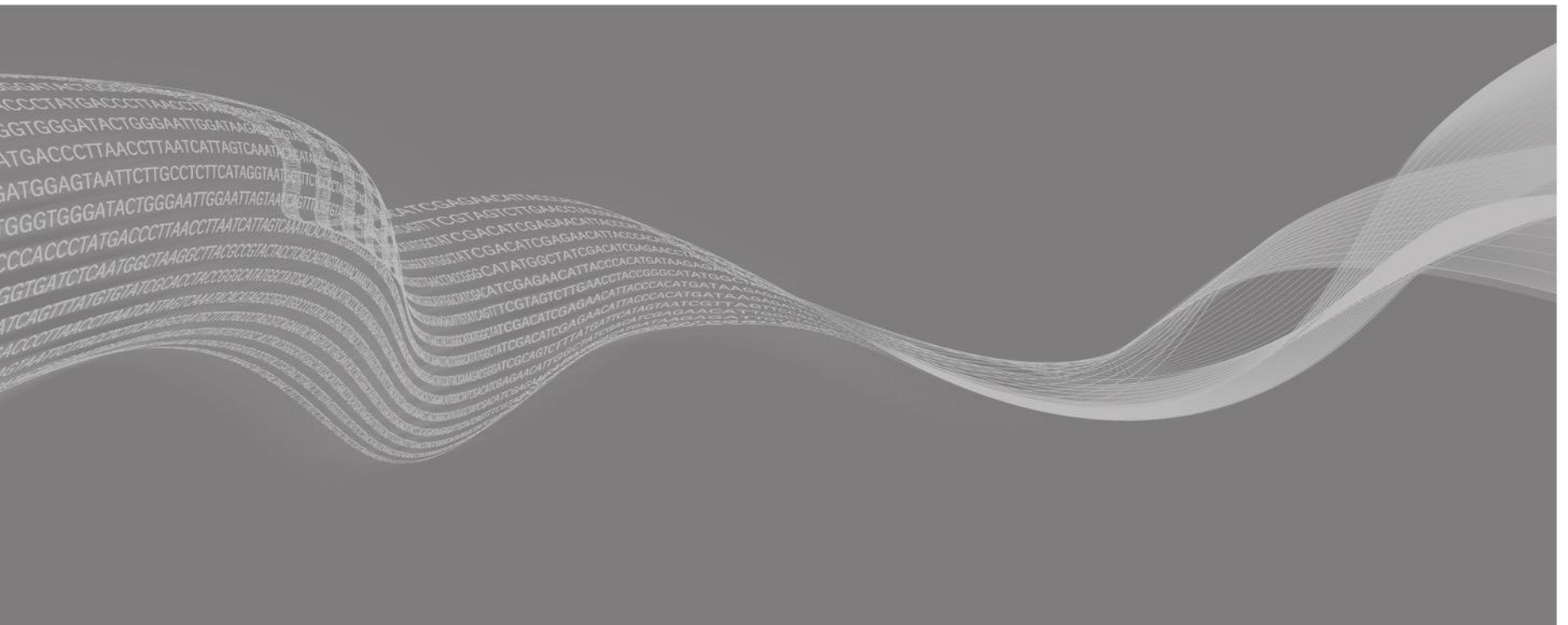
Legend: Dual Pool

AmpliSeq DNA	Nextera Rapid Capture	TruSeq Custom Amplicon	TruSeq Targeted RNA	All States			Added	Actions
Type	Design ID	Solution ID	Design Name	Amplicon Size	Amplicon Count	Coverage		
Gene	[]	[]	[]	175	1277 Amplicons	99%	04/30/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	175	1190 Amplicons	95%	04/30/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	175	1255 Amplicons	96%	04/28/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	175	1161 Amplicons	92%	04/27/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	275	16 Amplicons	99%	04/24/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	275	15 Amplicons	94%	04/24/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	275	15 Amplicons	94%	04/18/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	275	524 Amplicons	99%	03/28/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	275	414 Amplicons	98%	Orderable grch38.p2 03/27/2018	Select
Gene	[]	[]	[]	275	632 Amplicons	98%	Orderable grch38.p2 03/27/2018	Select

Select

- Copy
- Transfer
- Delete
- Download
- Manifest**

AmpliSeqカスタムパネルを用いた実験デザイン



常染色体バリエーション検出パネルデザインの例

常染色体潜性遺伝性疾患である
嚢胞性線維症（Cystic Fibrosis）を例としてカスタムパネルをデザイン

デザイン条件

対象遺伝子

CFTR, SPINK1, PRSS1, PRSS2, CTRC, CASR
の6遺伝子*の **coding region** を対象

* Tomaiuolo, A.C., Sofia, V.M., Surace, C., Majo, F., Genovese, S., Petrocchi, S., Grotta, S., Alghisi, F., Lucidi, V. and Angioni, A. (2015). Relationship between CFTR and CTRC variants and the clinical phenotype in late-onset cystic fibrosis disease with chronic pancreatitis. *J Mol Diagn* 17, 171-178.

Configure Design

- ✓ Species: Human **GRCh38** (hg19, GRCh38.p2から選択)
- ✓ Amplicon Size: **275 bp** (140, 175, 275, 375 bpから選択、FFPEでは140, 175 bpを推奨)
※末梢血由来等の品質の良いgDNAが得られると想定
- ✓ Stringency: **High** (High, Medium High, Medium, Medium Low, Lowから選択)
- ✓ Padding は**25 bp** で指定（splice site mutationも確認）

Target の指定手順

1. ゲノム参照配列に **GRCh38** を指定
※後続の解析パイプラインにあわせてご指定下さい
2. Max Amplicon Lengthでは **275bp** を指定
※品質の良いgDNAをご使用の場合には、アンプリコンの数を抑えるため275bp以上がお勧め
3. Stringencyは **high** を指定
※条件検討の最初のデザインでは、配列特異性の高いデザインをお勧めします
4. **Gene Name**の項目で、**ターゲットの遺伝子を指定**（CDS OnlyかExon Onlyかも選択）
※ターゲットが遺伝子全体の場合には、upload fileを用意するよりも直接入力の方が簡単
5. Splice site mutationを検出するため、**Padding**を**25bp**で指定

Cystic Fibrosis (146303)- Targeted [Edit](#)

Select Assay Configure Design **Manage Targets** Submit Design Review Design Get Pricing

1 2 **3** 4 5 6

Manage Targets

Design Type AmpliSeq DNA Gene
Species grch38_p2 (Homo sapiens)
Amplicon Size 275
Stringency High

遺伝子名で直接指定

Add Targets

Gene Coordinate File

Gene Name: [Add Gene](#) For full region design including introns, use Coordinate input.

Options: CDS Only Exon Only What is CDS ? : 5' UTR Coding DNA Sequence (CDS) 3' UTR

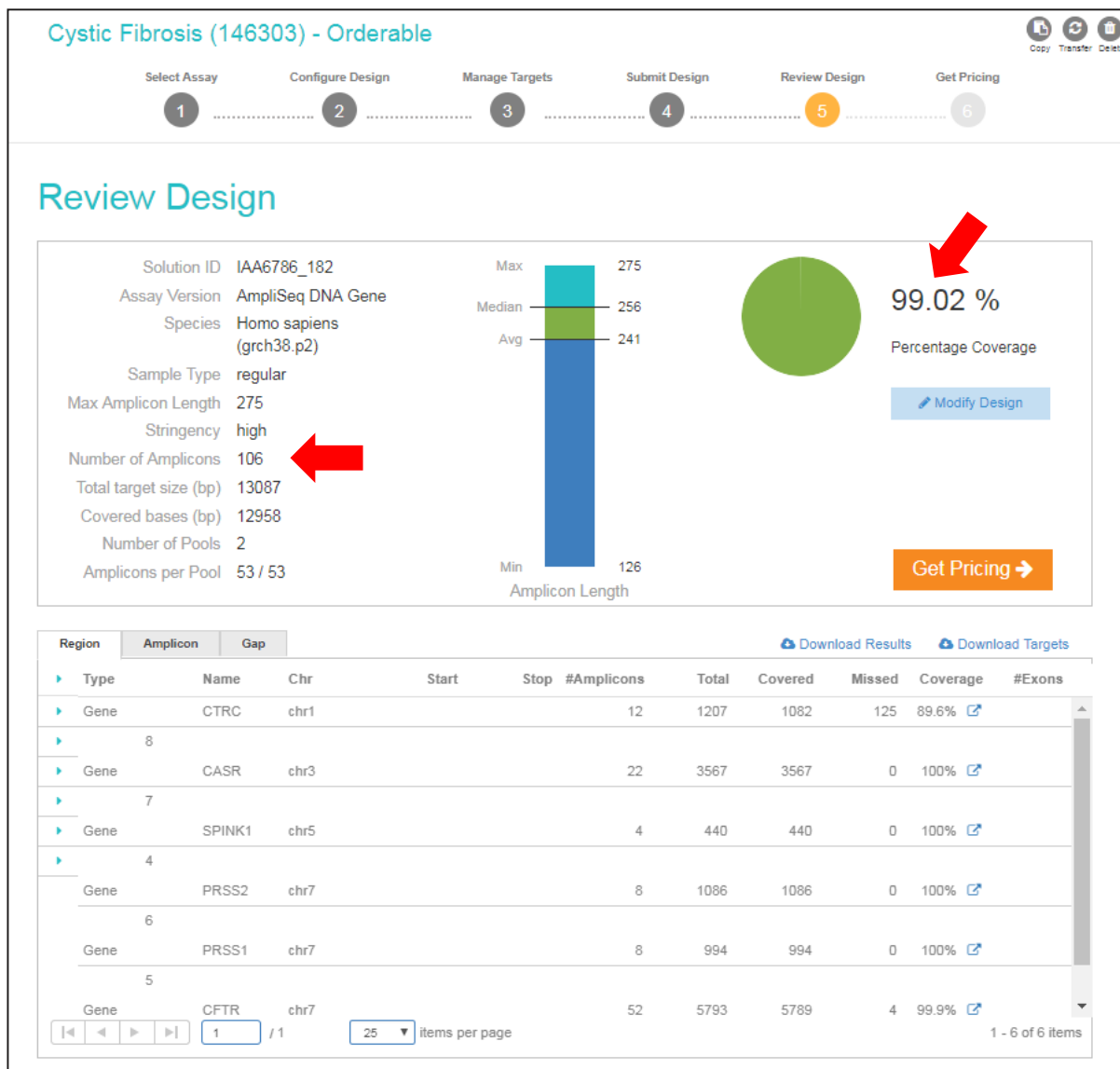
Exon Padding: (applies only to targets specified by Gene name) [Download Targets](#)

Target Type	Name	Chr	Start	Stop	Added
Gene (CDS)	CFTR	chr7	117479962	117668664	06/14/2018
Gene (CDS)	SPINK1	chr5	147824579	147839231	06/14/2018
Gene (CDS)	PRSS1	chr7	142749467	142753076	06/14/2018
Gene (CDS)	PRSS2	chr7	142770942	142774564	06/14/2018
Gene (CDS)	CTRC	chr1	15438441	15446658	06/14/2018
Gene (CDS)	CASR	chr3	122183682	122286497	06/14/2018

入力を終えたら **Submit Design** をクリック

ます。診断での使用はできません。

デザイン結果



このデザインでは
Coverage 99.02%
アンプリコン数: **106**
Pool数: 2

デザイン完成までに
かかった時間はおよそ40分

コスト試算例（24サンプル）

AmpliSeq Panel	プロトコル		
	プール / サンプル	Library PLUS 試薬反応数 / サンプル	Panel 1 kitあたりのサンプル数
AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina (Cystic Fibrosis 2 pool design)	2	1	750 (<96 amplicons) 3000 (>96 amplicons)

常染色体バリエーションの場合は、x250のカバレッジで読むと仮定

カタログ番号	製品名	希望販売価格 (円)	24サンプル実施に必要なキット数	サンプルあたりの価格 (円)
20020495	AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina ※106 アンプリコン x 1,080円	114,480	1	39
20019101	AmpliSeq Library PLUS for Illumina (24 Reactions)	372,000	1	15,500
20019105	AmpliSeq CD Indexes Set A for Illumina (96 Indexes, 96 Samples)	80,700	1	841
MS-103-1001	MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 Cycles) ※サンプルあたりx250で読むと仮定	52,200	1	2,175

キットの総額 619,380円
サンプルあたりの価格 (合計) 18,555円

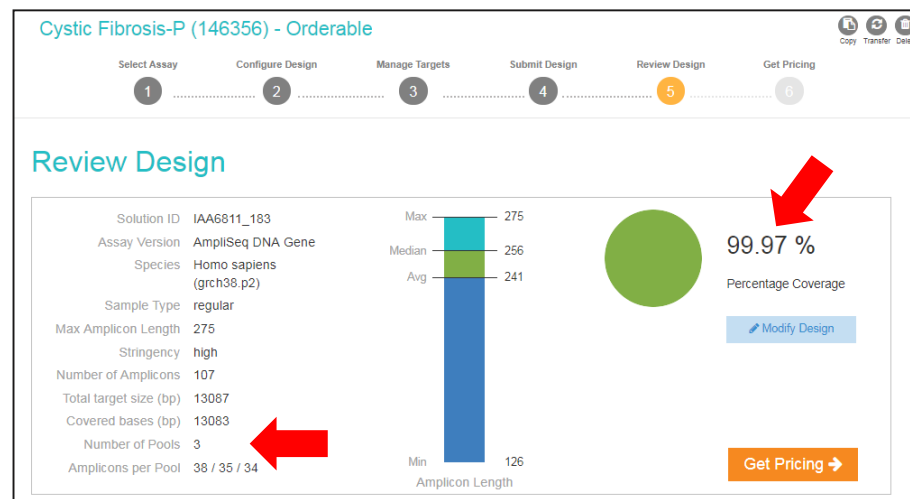
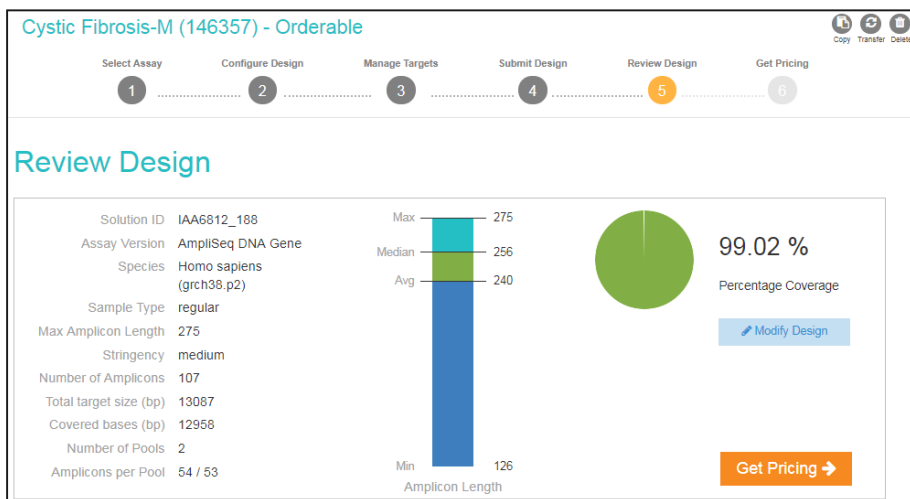
製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

デザイン改善例

オリジナルのデザインでは
Coverage **99.02%**、アンプリコン数: **106**、Pool数: **2**
サンプルあたりの価格（合計） **18,555 円**

配列特異性を緩和したデザイン
(Stringency を high から Medium に変更)

Pool数増加デザイン



Coverage: 99.02% (カバー率向上せず)
Amplicon数: **107** (コスト増加)
Pool数: **2**
サンプルあたり、18,555 円

Coverage: **99.97%** (カバー率増加)
Amplicon数: **107** (コスト増加)
Pool数: **3** (コスト増加)
サンプルあたり、**26,305 円**

体細胞変異検出パネルデザインの例

がんを対象としてカスタムパネルをデザイン

デザイン条件

標的遺伝子・領域

- *TP53* (All Coding Exon)
- *EGFR* (Exon 18 - 23)
- *KRAS* (G12D, G13D & Q61K)
- *PIK3CA* (E542K, E545K & H1047L)
- *BRAF* (G469A, Y472C, L597V & V600E))
- *NRAS* (G12D & Q61K)
- *PTEN* (R233*)

このデザインでは、
特定の領域を多く指定するため
Upload file を使用する

Configure Design

- ✓ Species: Human **hg19** (hg19, GRCh38.p2から選択)
- ✓ Amplicon Size: **175 bp** (140, 175, 275,375 bpから選択、FFPEでは140, 175 bpを推奨)
※断片化の進んだFFPE由来の gDNA を想定
- ✓ Stringency: **High** (High, Medium High, Medium, Medium Low, Lowから選択)
- ✓ Padding は**0 bp** で指定 (splice site mutation は考慮しない)

Target の指定手順

1. ゲノム参照配列に **hg19** を指定
※後続の解析パイプラインにあわせてご指定下さい
2. Max Amplicon Lengthでは **175bp** を指定
※分解の進んだgDNAをご使用の場合には、175bp以下がお勧め
3. Stringencyは **high** を指定
※条件検討の最初のデザインでは、配列特異性の高いデザインをお勧めします
4. **Upload file**を使用して、**ターゲットの遺伝子を指定**
※特定の領域やCOSMIC mutation IDを指定する場合には、upload fileを使用する方が簡単
5. Splice site mutation はターゲットとしないため、**Padding**を**0bp**で指定

Webinar-cancer (146994) - Created [Edit](#)

Copy Transfer Delete

1 Select Assay 2 Configure Design 3 Manage Targets 4 Submit Design 5 Review Design 6 Get Pricing

Manage Targets

Design Type: AmpliSeq DNA Gene
Species: hg19 (Homo sapiens)
Amplicon Size: 175
Stringency: High

Add Targets

Gene Coordinate File

Submit an Import File
 .csv .bed
Download file template: [.csv .bed](#)

Example chromosome formats

Exon Padding: 25 bp (applies only to targets specified by Gene name) [Download Targets](#)

No targets detected

Submit Design

Upload fileのtemplateは
ここから入手

このデザインでは、
.csv形式の **upload file**を使用

入力を終わったら
Submit Designをクリック

Upload file (.csv) の中身

Upload fileには、以下のファイルを用意
Hotspot designではないため、COSMIC IDで直接指定することはできない

ゲノム上での位置情報

TP53では
CDS領域全体を指定
Type: GENE_CDS
Name: 遺伝子名

EGFRでは
特定のExon領域に絞って指定
Type: REGION
+ターゲット名 (オプション)
+ゲノム上の位置

特定のHotSpotを指定
Type: REGION
+ターゲット名 (オプション)
+ゲノム上の位置

	A	B	C	D	E	F
1	Type	Name	Chromosome	Start	End	
	GENE_CDS	TP53				
3	REGION	EGFR Ex18	chr7	55241589	55241761	
4	REGION	EGFR Ex19	chr7	55242392	55242538	
5	REGION	EGFR Ex20	chr7	55248961	55249196	
6	REGION	EGFR Ex21	chr7	55259387	55259592	
7	REGION	EGFR Ex22	chr7	55260433	55260560	
8	REGION	EGFR Ex23	chr7	55266384	55266581	
9	REGION	KRAS G12D	chr12	25398279	25398289	
10	REGION	KRAS G13D	chr12	25398276	25398286	
11	REGION	KRAS Q61K	chr12	25380272	25380282	
12	REGION	PIK3CA E542K	chr3	178936077	178936087	
13	REGION	PIK3CA E545K	chr3	178936086	178936096	
14	REGION	PIK3CA H1047L	chr3	178952080	178952090	
15	REGION	BRAF G469A	chr7	140481397	140481407	
16	REGION	BRAF Y472C	chr7	140481388	140481398	
17	REGION	BRAF L597V	chr7	140453141	140453151	
18	REGION	BRAF V600E	chr7	140453131	140453141	
19	REGION	NRAS G12D	chr1	115258742	115258752	
20	REGION	NRAS Q61K	chr1	115256525	115256535	
21	REGION	PTEN R233	chr10	89717667	89717677	
22						

COSMIC IDや特定のExon領域のゲノム上の位置の確認方法は次のスライドで説明

Cosmic IDの確認方法

COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer)

https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic

The screenshot shows the COSMIC website interface. At the top, there is a navigation bar with a 'Genome Version' dropdown menu. A red box highlights this menu, with a hand-drawn arrow labeled '1' pointing to it. The dropdown shows 'GRCh37 ✓' and 'GRCh38'. Below the navigation bar, there is a search bar containing the text 'KRAS G12D', highlighted with a red box and a hand-drawn arrow labeled '2'. To the right of the search bar is a red 'SEARCH' button, with a hand-drawn arrow labeled '3' pointing to it. The main content area includes a 'COSMIC v85, released 08-MAY-18' announcement, a 'COSMIC News' section with various updates, and a 'Projects' section listing different COSMIC projects. At the bottom, there is a cookie consent banner with 'Accept' and 'Cookie Preferences' buttons.

Genome Versionから
GRCh37か38を選択

目的のHotSpot
例) KRAS G12D
(またはKRAS G12)
などを入力し
Search をクリック

Cosmic IDの確認方法

COSMIC
Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

GRCh 37

Projects ▾ Data ▾ Tools ▾ News ▾ Help ▾ About ▾ Genome Version ▾ Search COSMIC... **SEARCH** Login ▾

COSMIC search results

Your search term "**KRAS G12D**" returned results in **2** sections of the database. [More...](#)

Genes (0 hits) **Mutations (3)** SNPs (0) Cancer (0) Tumour Site (0) Samples (0) Pubmed (2) Studies (0)

Show 10 ▾ entries

Gene	Mutation	Alternate IDs	Recurrence
KRAS	c.35G>A	KRAS c.35G>A...	14624
KRAS	c.?	KRAS c.?.?	84
KRAS	c.35_36GT>AC	KRAS c.35_36GT>AC...	2

Showing 1 to 3 of 3 entries

First Previous **1** Next Last

Hand icon pointing to c.35G>A

Cosmic IDの確認方法

COSMIC
Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

GRCh 37

Projects ▾ Data ▾ Tools ▾ News ▾ Help ▾ About ▾ Genome Version ▾ Search COSMIC... **SEARCH** Login ▾

Mutation
COSM521

GRCh37 · COSMIC v85

Overview

This section shows a general overview of the selected mutation. It describes the source of the mutation i.e gene name/sample name/tissue name with unique ID, and also shows the mutation syntax at the amino acid and nucleotide sequence level. You can see more information on our [help pages](#).

Mutation ID COSM521 **ID**

Gene name [KRAS](#)

AA mutation p.G12D (Substitution - Missense, position 12, G→D)

CDS mutation c.35G>A (Substitution, position 35, G→A)

Nucleotides inserted n/a

Genomic coordinates GRCh37, 12:25398284..25398284, view [Ensembl contig](#)

CDD [NP_203524.1](#) **位置情報**

HomoloGene n/a

Ever confirmed somatic? Yes

FATHMM prediction Pathogenic (score 0.98)

Remark n/a

Recurrent n/a

Drug resistance n/a

[Reset page](#)

- Overview
- Tissue distribution
- Samples
- Pathways affected
- References

特定のexon領域の確認方法

UCSC Genome Brower

https://genome.ucsc.edu/index.html



Genomes Tab をクリックし
目的の**ゲノム参照配列**を選択

特定のexon領域の確認方法

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x 100x

chr7:123,478,452-126,536,741 3,058,290 bp. EGFR go

chr7 (p11.1-q11) 1031.1 1012 1041 1043.44

Scale chr7: 124,000,000 124,500,000 125,000,000 125,500,000 126,000,000 126,500,000 hg19

INMS497_167 Targets
Project 144324 Solution INMS497_167 Targets
Project 144324 Solution INMS497_167 Amplicons
Project 144324 Solution INMS497_167 Gaps

UCSC Genes (RefSeq, GenBank, CCDS, Rfam, tRNAs & Comparative Genomics)
GC Percent in 5-Base Windows

Catalogue of Somatic Mutations in Cancer V82
Repeating Elements by RepeatMasker

UCSC annotations of RefSeq RNAs (mRNAs and ncRNAs)

move start < 2.0 > Click on a feature for details. Click or drag in the base position track to zoom in. Click side bars for track options. Drag side bars or labels up or down to reorder tracks. Drag tracks left or right to new position. Press "?" for keyboard shortcuts. move end < 2.0 >

目的の遺伝子の位置に移動

遺伝子名を入れ、goをクリック

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x 100x

chr7:55,177,510-55,275,773 98,264 bp. enter position, gene symbol, HGVS or search terms go

chr7 (p11.2) 21.3 14.3 14.1 21.11 22.1 q31.1 7033 q34 q35

Scale chr7: 55,190,000 55,200,000 55,210,000 55,220,000 55,230,000 55,240,000 55,250,000 55,260,000 55,270,000 hg19

UCSC Genes (RefSeq, GenBank, CCDS, Rfam, tRNAs & Comparative Genomics)
EGFR-AS1
EGFR

EGFR
EGFR
EGFR
EGFR
EGFR
EGFR

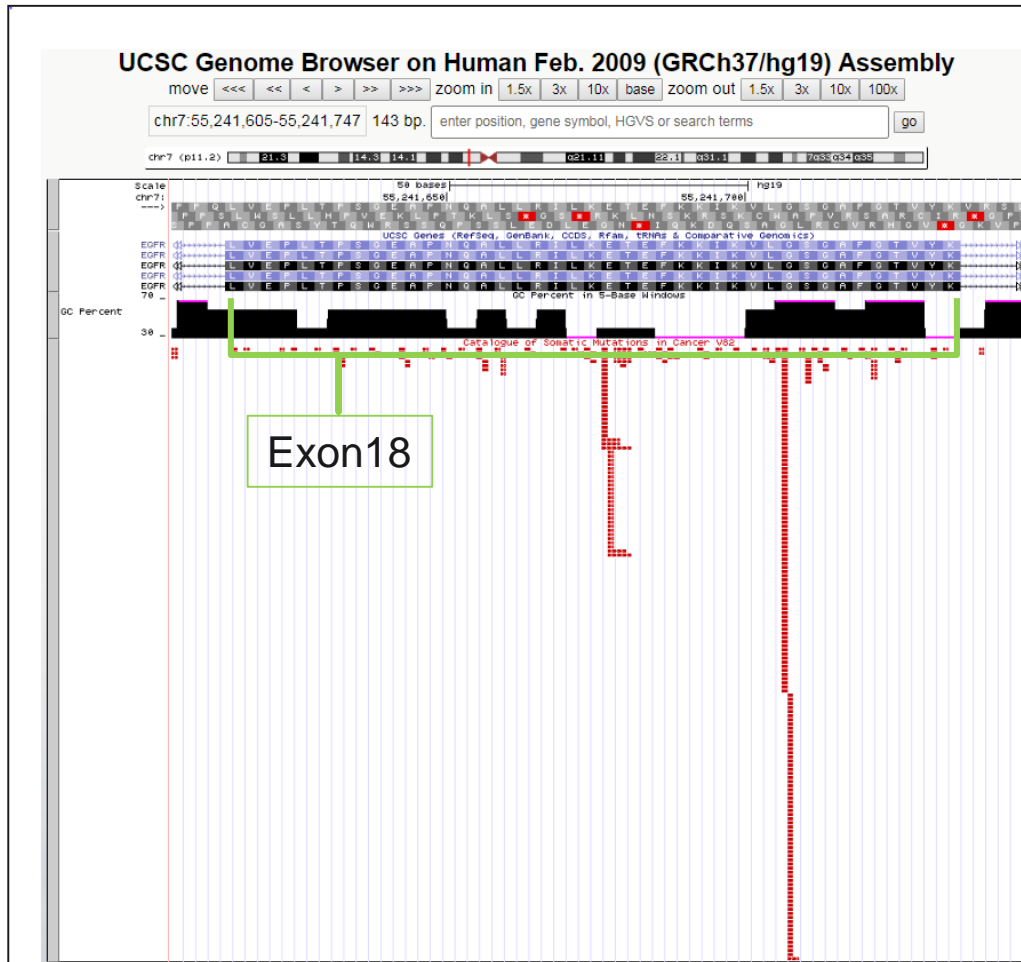
GC Percent
70
30
GC Percent in 5-Base Windows

COSMIC Regions
Catalogue of Somatic Mutations in Cancer V82

興味のある領域を拡大

- ①上部（網掛け部）を左クリックしたままドラッグ
 - ②Shiftキーを押しながら範囲選択
- で目的の領域（Exon）を拡大

特定のexon領域の確認方法



EGFR Exon18を拡大した時の例

遺伝子情報
(transcript variants)

HotSpot (COSMIC)

特定のexon領域の確認方法

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

chr7:55,241,612-55,241,738 127 bp.

UCSC Genes (RefSeq, GenBank, CCDS, Rfam, tRNAs & Comparative Genomics)

GO Percent in 5-Base Windows

Drag-and-select

- Hold **Shift+drag** to show this dialog
- Hold **Alt+drag** to add a highlight
- Hold **Ctrl+drag** (Windows) or **Cmd+drag** (Mac) to zoom
- To cancel, press **esc** anytime or drag mouse outside image
- Highlight the current position with **h** then **m**
- Clear all highlights with **View - Clear Highlights** or **h** then **c**

Highlight color: #aaedff [Reset](#)

Don't show this again and always zoom with shift.
Re-enable via 'View - Configure Browser' (c then f)

Selected chromosome position: chr7:55241612-55241738

[Zoom In](#) [Single Highlight](#) [Add Highlight](#) [Cancel](#)

ゲノム上の位置の確認
さらに目的の領域を絞り込む事
で、目的の領域の具体的な位置
の確認が可能



Coordinate形式でターゲットを
指定する場合には、paddingの
設定が反映されないため、
CDSの両端に余裕を持って指定
する事をお勧めします

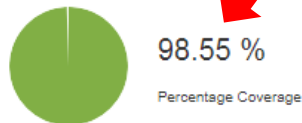
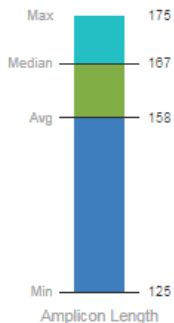
デザイン結果

Webinar-cancer (146994) - Orderable

Select Assay 1 Configure Design 2 Manage Targets 3 Submit Design 4 Review Design 5 Get Pricing 6

Review Design

Solution ID IAA7258_167
Assay Version AmpliSeq DNA Gene
Species Homo sapiens (hg19)
Sample Type regular
Max Amplicon Length 175
Stringency high
Number of Amplicons 46
Total target size (bp) 2475
Covered bases (bp) 2439
Number of Pools 2
Amplicons per Pool 24 / 22



98.55 %

Percentage Coverage

[Modify Design](#)

[Get Pricing](#)

Region Amplicon Gap [Download Results](#) [Download Targets](#)

Type	Name	Chr	Start	Stop	#Amplicons	Total	Covered	Missed	Coverage	#Exons
Coordinate	NRAS Q6...	chr1	115258625	115258635	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	NRAS G1...	chr1	115258742	115258752	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	PTEN R233	chr10	89717667	89717677	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	KRAS Q6...	chr12	25380272	25380282	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	KRAS G1...	chr12	25398276	25398286	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	KRAS G1...	chr12	25398279	25398289	1	10	10	0	100%	0
Gene	TP53	chr17			21	1263	1263	0	100%	15
Coordinate	PIK3CA ...	chr3	178938077	178938087	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	PIK3CA ...	chr3	178938086	178938096	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	PIK3CA ...	chr3	178952080	178952090	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	EGFR Ex18	chr7	55241589	55241761	3	172	172	0	100%	0
Coordinate	EGFR Ex19	chr7	55242392	55242538	2	146	146	0	100%	0
Coordinate	EGFR Ex20	chr7	55248961	55249196	3	235	199	36	84.7%	0
Coordinate	EGFR Ex21	chr7	55259387	55259592	3	205	205	0	100%	0
Coordinate	EGFR Ex22	chr7	55260433	55260580	2	127	127	0	100%	0
Coordinate	EGFR Ex23	chr7	55268384	55268581	3	197	197	0	100%	0
Coordinate	BRAF V6...	chr7	140453131	140453141	1	10	10	0	100%	0
Coordinate	BRAF L5...	chr7	140453141	140453151	1	10	10	0	100%	0

このデザインでは
Coverage 98.55%
アンプリコン数: **46**
Pool数: 2

デザイン完成までに
かかった時間はおよそ10分

はできません。

illumina®

コスト試算例 (24サンプル)

AmpliSeq Panel	プロトコル		
	プール / サンプル	Library PLUS 試薬反応数 / サンプル	Panel 1 kitあたりのサンプル数
AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina (Webinar-cancer 2 pool design)	2	1	750 (<96 amplicons) 3000 (>96 amplicons)

体細胞変異の場合は、x2500のカバレッジで読むと仮定

カタログ番号	製品名	希望販売価格 (円)	24サンプル実施に必要なキット数	サンプルあたりの価格 (円)
20020495	AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina ※46 アンプリコン x 1,080円	49,680	1	67
20019101	AmpliSeq Library PLUS for Illumina (24 Reactions)	372,000	1	15,500
20019105	AmpliSeq CD Indexes Set A for Illumina (96 Indexes, 96 Samples)	80,700	1	841
MS-103-1002	MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 Cycles) ※サンプルあたりx2500で読むと仮定	78,700	1	3,280

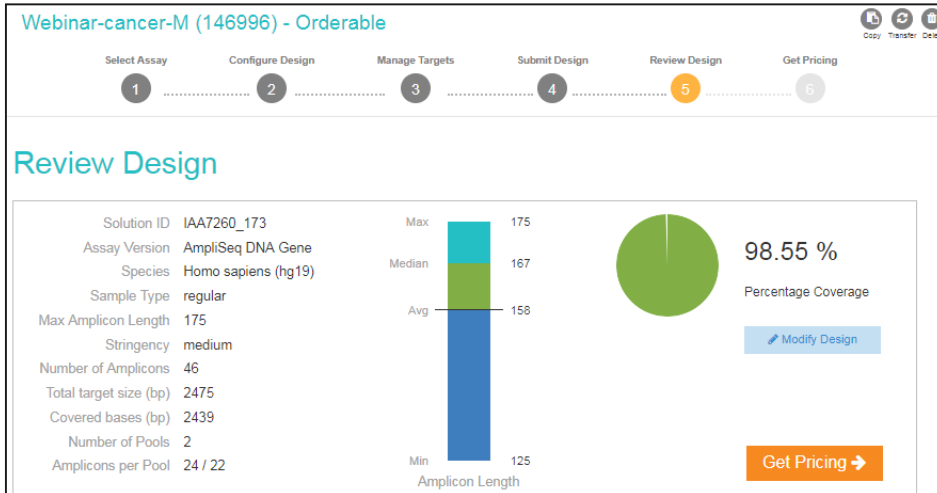
キットの総額 581,080円
サンプルあたりの価格 (合計) 19,688円

デザイン改善例

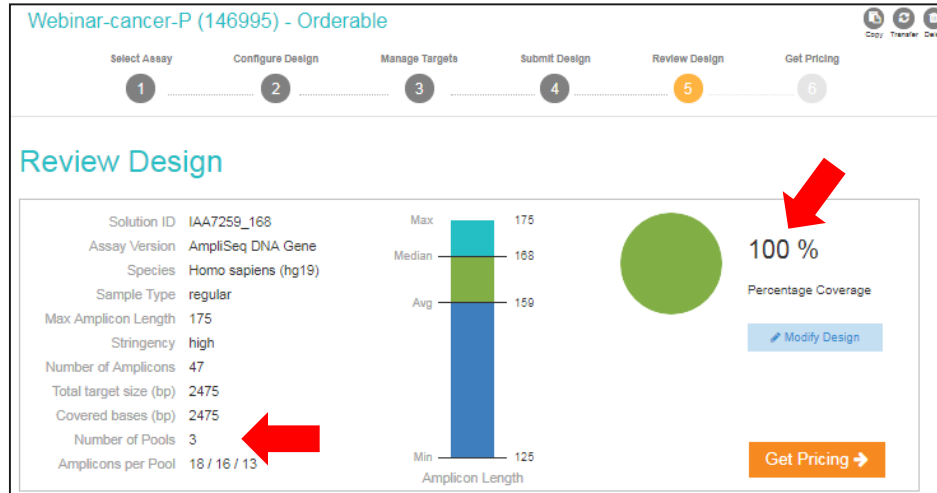
オリジナルのデザインでは
Coverage **98.55%**、アンプリコン数: **46**、Pool数: **2**
サンプルあたりの価格（合計） **19,688 円**

配列特異性を緩和したデザイン
(Stringency を high から Medium に変更)

Pool数増加デザイン



Coverage: **99.55%** (カバー率向上せず)
Amplicon数: **46**
Pool数: **2**
サンプルあたり、**19,688 円**



Coverage: **100%** (カバー率増加)
Amplicon数: **47** (コスト増加)
Pool数: **3** (コスト増加)
サンプルあたり、**27,439 円** (コスト増加)

まとめ

- カスタムパネル設計用オンラインツールDesignStudioを用いて、AmpliSeq カスタムパネルのカスタムパネルデザインが可能
- AmpliSeqカスタムパネルを用いることにより、標的遺伝子全域、特定のSNPや機能ドメイン、ホットスポット（COSMIC）など、興味のある領域を効率よくシーケンスすることが可能
- UCSC Genome Browserを用いることにより、視覚的にデザインの内容を確認する事が可能
- カスタムパネルのデザインを改善するためには、Primerの配列特異性（Stringency）の調節や、Pool数の増加が有効。
しかしながら、オフターゲットの増加やコスト増加のデメリットもあることに注意
- Coverageはあくまでもin silico上での数値。実際にPrimerがワークするかはシーケンスしなければわからないことに注意