



# TruSeq Amplicon Cancer Panel

48の癌関連遺伝子をターゲット  
とするディープシーケンス

2012年4月  
イリミナ株式会社

© 2010 Illumina, Inc. All rights reserved.  
Illumina, illuminaDx, Solexa, Making Sense Out of Life, Oligator, Sentrix, GoldenGate, GoldenGate Indexing, DASL, BeadArray, Array of Arrays, Infinium, BeadXpress, VeraCode, IntelliHyb, iSelect, CSPro, GenomeStudio, Genetic Energy, HiSeq, and HiScan are registered trademarks or trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.

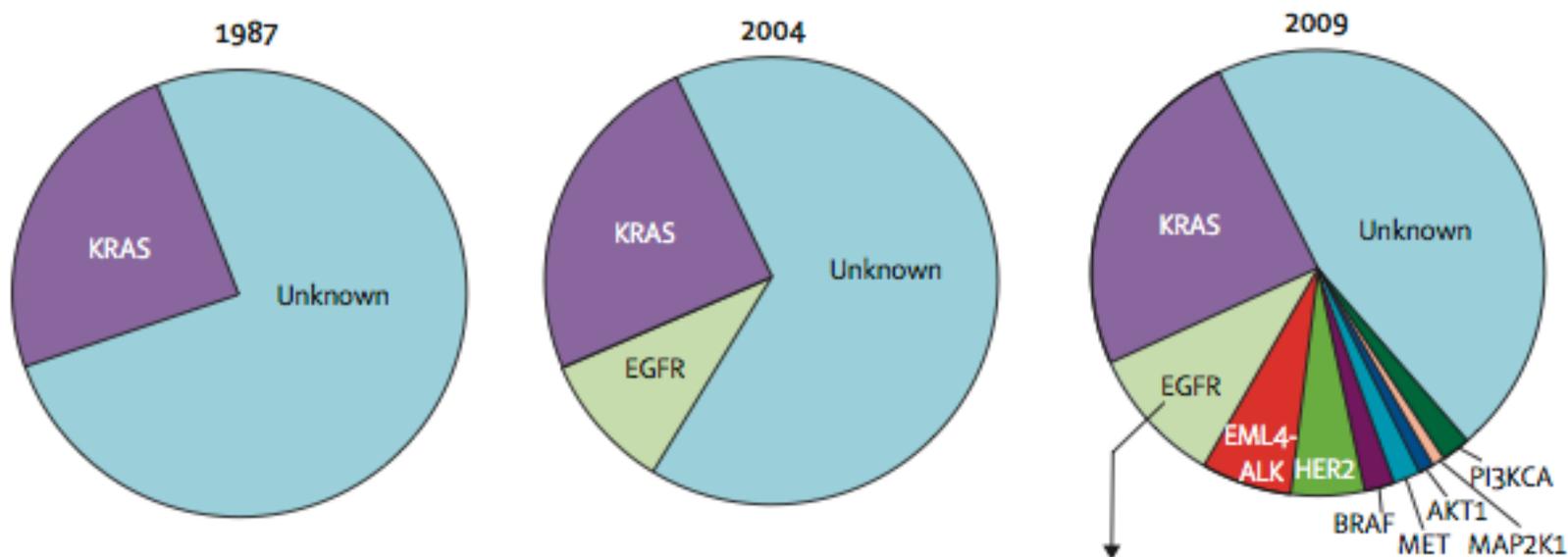


# 本日の内容

- ▶ 癌研究と次世代シーケンサー
- ▶ TruSeq Amplicon Cancer Panel



# 癌におけるDriver Mutation(変異)は年々明らかになっている

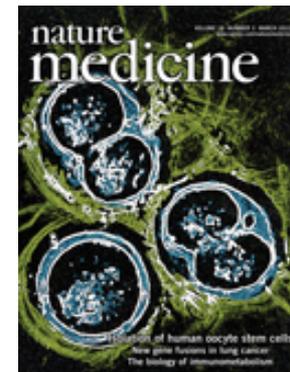


非小細胞肺癌における driver mutations  
のレビュー

- **Mutations associated with drug sensitivity**  
EGFR Gly719X, exon 19 deletion, Leu858Arg, Leu861Gln
- **Mutations associated with primary drug resistance**  
EGFR exon 20 insertions
- **Mutations associated with acquired drug resistance**  
EGFR Thr790Met, Asp761Tyr, Leu747Ser, Thr854Ala

Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12(2):175-. 180. 51.

# 次世代シーケンサーがこの流れをさらに加速



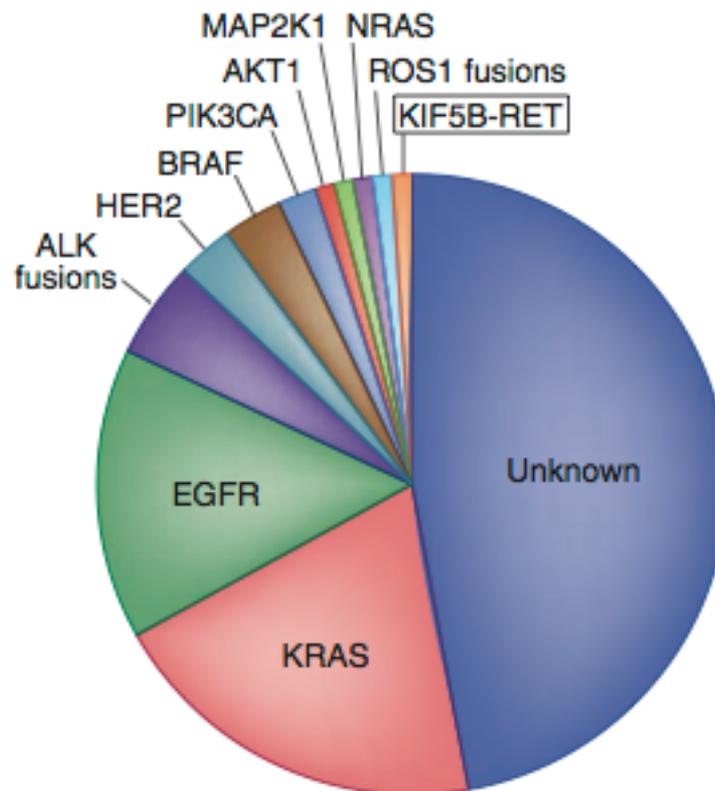
- ▶ 更に明らかになる肺がんの分子メカニズム  
*Nature Medicine* 2012年3月号

## ▶ News and Views

- Chipping away at the lung cancer genome - pp349 – 351

## ▶ Brief Communications

- KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma - pp375 – 377
- RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer - pp378 – 381
- Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies - pp382 - 384



# 癌研究における次世代シーケンサーの使い分け

大型  
次世代シーケンサー



デスクトップ型  
次世代シーケンサー



スループット



解析時間



癌の原因変異 & マーカー探索

- 融合遺伝子
- 1塩基変異
- コピー数
- 転座、逆位など

多検体におけるスクリーニング

- 癌遺伝子
- 癌抑制遺伝子
- 癌関連変異

原因遺伝子、変異  
を明らかに！



領域を絞って  
迅速に解析

# これまでの解析手法と次世代シーケンサーの比較

項目	これまでの解析手法		次世代シーケンサー	
スループット	低	1回の解析で1検体の1箇所を解析 (キャピラリーシーケンサー、MALDI-TOF ベース)	高	1回の解析で数十箇所、数十検体を解析
感度	低	25%程度の変異を検出 (キャピラリーシーケンサー)	高	5%未満の変異も検出
網羅性	低	既知の変異のみ (MALDI-TOFベース)	高	既知変異も未知変異も検出

# キャピラリーシーケンサーと次世代シーケンサーのスループット比較

## 192ターゲット領域を96サンプル解析するには

キャピラリーシーケンサー

鋳型調製, PCR, 精製



- 96穴プレートを192枚



テンプレート定量



- 96穴プレートを192枚



シーケンス



- 96穴プレートを192枚

2-3週



次世代シーケンサー



- 1ウェルで192箇所同時増幅



- 96サンプルを混合



- 1ランで同時解析

2日





# TruSeq Amplicon – Cancer Panel

FFPEサンプル対応、1ウェルで212箇所のアンプリコン解析

## ▶ 癌にフォーカスしたコンテンツ

- 48 遺伝子
- 212 アンプリコン (合計35kb)
- FFPEサンプル対応のプローブデザイン

## ▶ 高精度に変異を検出

- 低頻度(5%以下)の変異を検出
- 90%以上の特異性と均一性

## ▶ イルミナトータルソリューション

- FFPEサンプル用のQCキット
- TruSeq Amplicon Cancer Panel
  - 増幅、インデックスを含んだサンプル調製キット
  - サンプル混合時のノーマライゼーションキット附属
- 解析用ソフトウェア
  - サンプルシート作成: Illumina Experiment Manager
  - 変異解析: MiSeq Reporter
  - データ閲覧: Illumina Amplicon Viewer

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	<b>GNA11</b>	KRAS	PTPN11	
CTNNB1	<b>GNAQ</b>	MET	RB1	



# 設計位置の詳細は Manifest ファイルで提供

**illumina**

製品とサービス | テクノロジー | サポート | コミュニティ | イルミナについて

製品 & サービス

シーケンスアプリケーション

概要

ゲノム解析

- Nexteraサンプル調製
- エクソーム濃縮
- カスタム濃縮
- アンプリコン
  - Cancer Panel
  - カスタムアンプリコン

シーケンスアプリケーション:  
ゲノム解析 / TruSeqアンプリコンキット - Cancer Panel

**Webinar開催!** 4月17日 16:00-16:45  
**TruSeq Amplicon Cancer Panel**  
「48の癌関連遺伝子をターゲットとするディープシーケンス」

TruSeq Amplicon Cancer Panelは体細胞変異の検出のための、高いマルチプレックス能力をもつターゲットリシーケンス用アッセイです。MiSeqの長いペアエンドリードとスピード、高品質のデータにより、これまで数ヶ月かかったプロジェクトが、数日で終了します。

TruSeq Amplicon Cancer Panelは、BRAF、KRAS、EGFRなどを含む癌に関連する重要な遺伝子の変異を高感度に検出します。これらの変異は、大腸癌、肺癌、肺がん、黒色腫など多くの癌に関連が示されています。独自のアッセイ高い検出能力をもつこの製品は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)サンプルにも対応しており、様々な癌タイプの貴重なゲノム情報を明らかにすることができます。

ターゲットとする遺伝子

ABL1	EGFR	GNAS	MLH1	RET
AKT1	ERBB2	HNFB1A	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	GNAO	MET	RB1	

関連情報

- Product Literature
- Publication
- faqs

参考資料

- TruSeq Amplicon Cancer Panel Data Sheet (E)
- TruSeq Custom Amplicon Data Sheet (E) (J)
- Amplicon Sequencing from FFPE Tissues on the MiSeq System (E) (J)
- High-Speed, Multiplexed 16S Microbial Sequencing on the MiSeq System (E) (J)

関連リンク

- MiSeq

[- 印刷用ページを開く](#)

[ターゲット遺伝子および領域のダウンロードはこちらから >>](#)  
(MyIlluminaへのログインが必要です)

# Manifest ファイルの内容

## タブ区切りテキスト形式

[Header]					
Customer Name	ILLUMINA, INC.				
Product Type	15032433				
Date Manufactured	25/10/2012				
Lot	35105				
DesignStudio ID	NA				
Target Plexity	212				
[Probes]					
Target Region Name	Target Region ID	Target ID	Species	Build ID	omosc
MPL1_2	MPL1_2.chr1.43815008.43815009	MPL1_2.chr1.43815008.43815009_tile_1	Homo sapiens	hg19	chr1
NRAS1_7	NRAS1_7.chr1.115256528.115256531	NRAS1_7.chr1.115256528.115256531_tile_1	Homo sapiens	hg19	chr1
NRAS8_13	NRAS8_13.chr1.115258730.115258748	NRAS8_13.chr1.115258730.115258748_tile_1	Homo sapiens	hg19	chr1
ALK1	ALK1.chr2.29432664.29432664	ALK1.chr2.29432664.29432664_tile_1	Homo sapiens	hg19	chr2
ALK2	ALK2.chr2.29443695.29443695	ALK2.chr2.29443695.29443695_tile_1	Homo sapiens	hg19	chr2
IDH1_1_2	IDH1_1_2.chr2.209113112.209113113	IDH1_1_2.chr2.209113112.209113113_tile_1	Homo sapiens	hg19	chr2

Header部分

Start Position	End Position	Target Region	ULSO Sequence	ULSO	DLSO Sequence	DLSO	Probe Strand	Designer	Design Score	Expected Amp	SNP Masking	Labels
43815008	43815009	-	AAGTGGCGA	0	TCAGCAGCA	0	-	ILLUMINA	NA	183	TRUE	
115256528	115256531	-	CAATAGCATT	0	AGAGTACAGT	0	-	ILLUMINA	NA	182	TRUE	
115258730	115258748	-	GGGTTTTCAT	0	CTGACAATCC	0	-	ILLUMINA	NA	184	TRUE	
29432664	29432664	-	GATAAAATCC	0	GACATCTACA	0	-	ILLUMINA	NA	188	TRUE	
29443695	29443695	-	TGCTGCCCAT	0	CACCAGAACA	0	-	ILLUMINA	NA	171	TRUE	
209113112	209113113	-	GAGGGTTGAC	0	CATGCTTATC	0	-	ILLUMINA	NA	182	TRUE	

位置情報はプローブ配列

# 解析ワークフロー

90分

QCチェック  
(オプション)

6時間

アンプリコン  
(サンプル調製含む)

27時間

シーケンス & 解析  
(自動)

- FFPEサンプルの場合、クオリティを qPCR で確認
- サンプルがアッセイに適しているかをチェックすることでランの成功率を高める

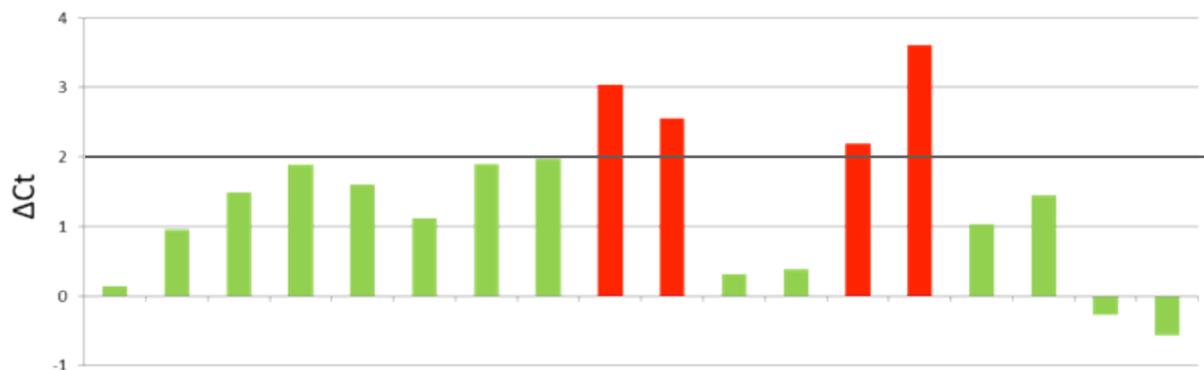
- 16から96サンプルで処理
- 1ウェルで 212 アンプリコンを増幅
- GoldenGate法で均一な増幅
- ノーマライゼーションはビーズで処理(キットに含む)

- 150bp x2 のランで解析
- 塩基の75%以上がQ30以上
- シーケンスラン終了後、自動でデータ解析
- Amplicon Viewer(無料)で視覚化



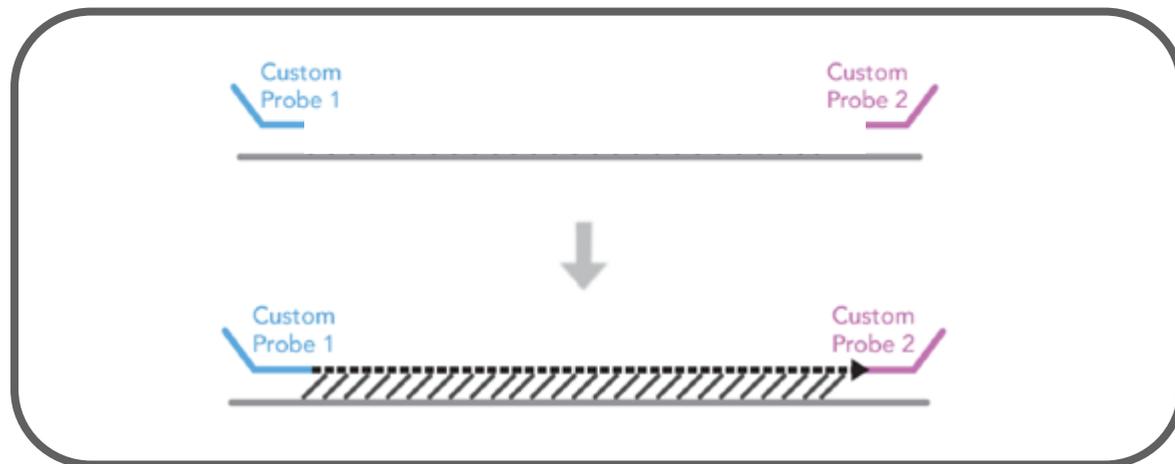
# QCチェック（FFPEサンプルの場合）

- ▶ シンプルな qPCRによるチェック
- ▶ 96サンプルを 90分でスクリーニング
- ▶ QCチェックをパスした80%以上のFFPEサンプルが、TruSeq Amplicon Cancer Panel で仕様を満たす結果が得られると予測

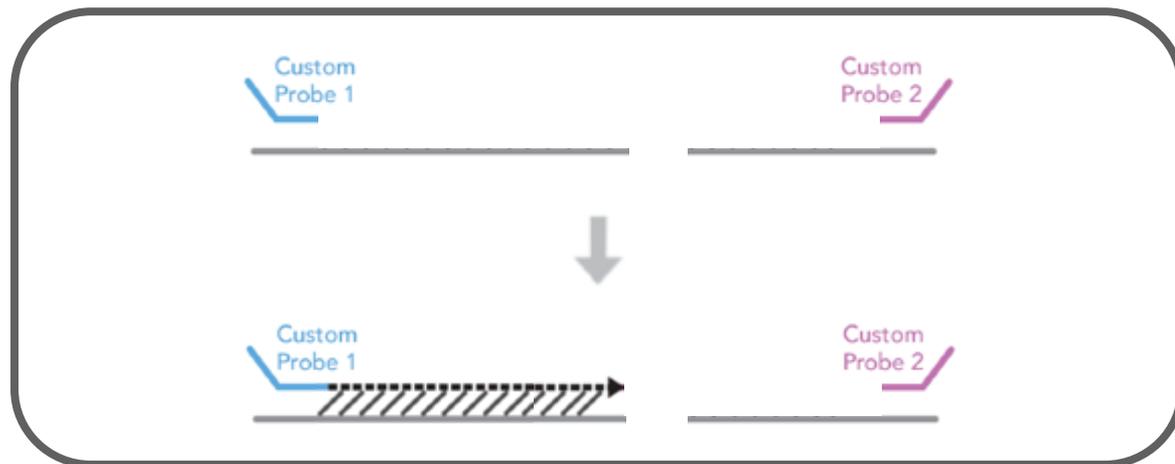


# QCチェック（FFPEサンプルの場合）

鋳型となるDNAが  
分解されて  
いない場合

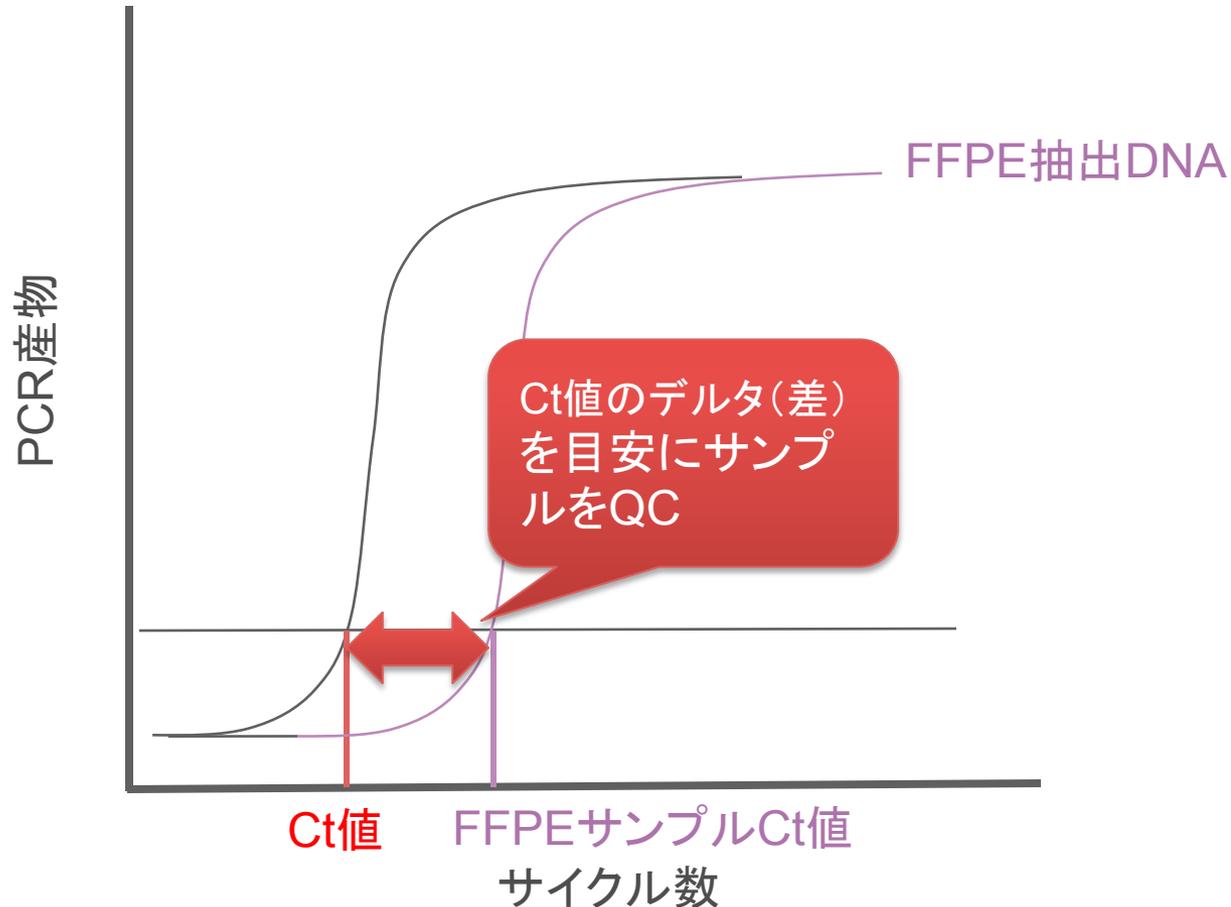


鋳型となるDNAが  
分解されて  
いる場合



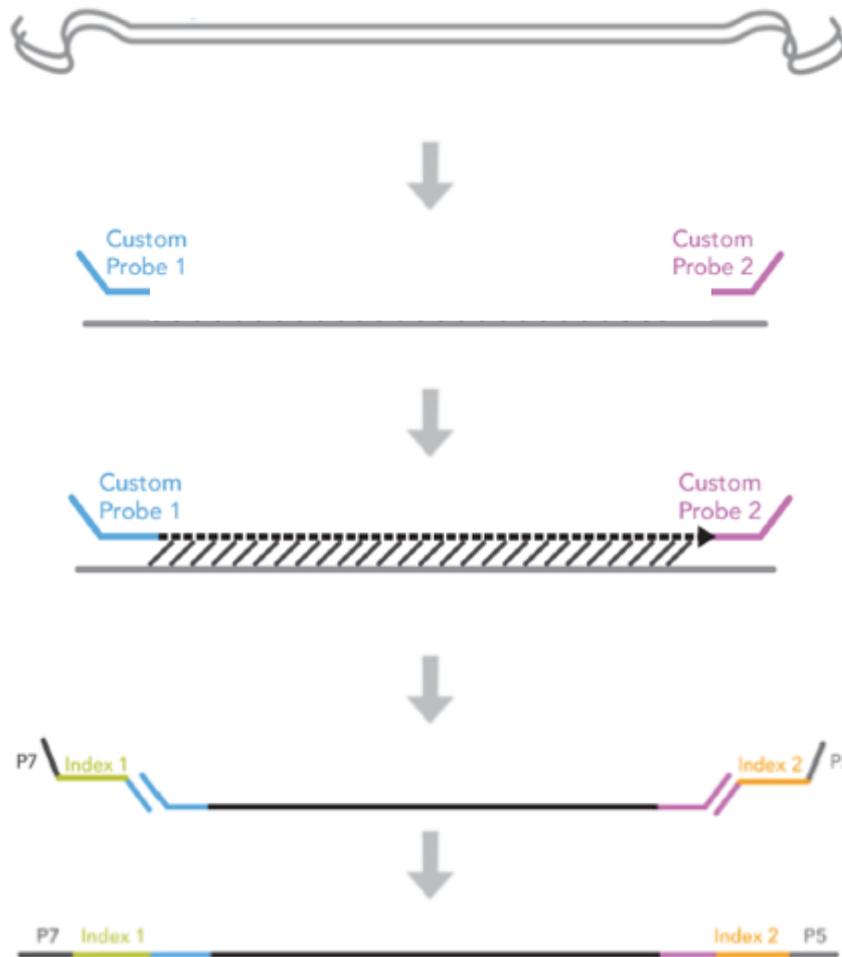
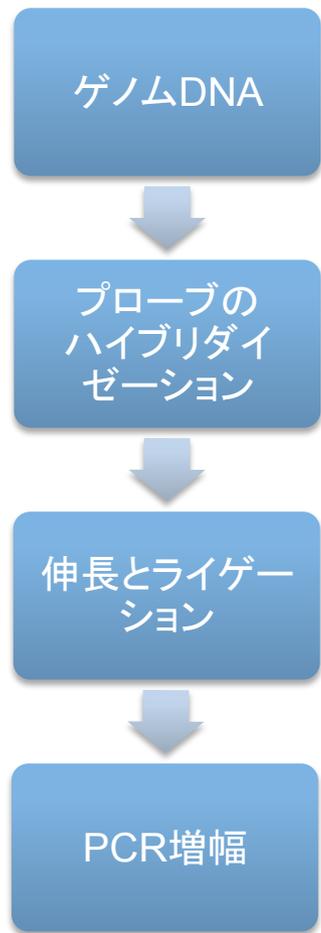
# QCチェック: qPCRにおけるCT値 ( Threshold Cycle )

- ▶ CT値; 指数関数的に増幅されている領域にベースラインを引き(Threshold Line)、各増殖曲線上でこのThresholdの値に相当するサイクル数



# アンプリコンの増幅

独自テクノロジーで高い特異性での増幅を実現。212箇所を1ウェルで増幅



各サンプル  
250 ng ゲノムDNA

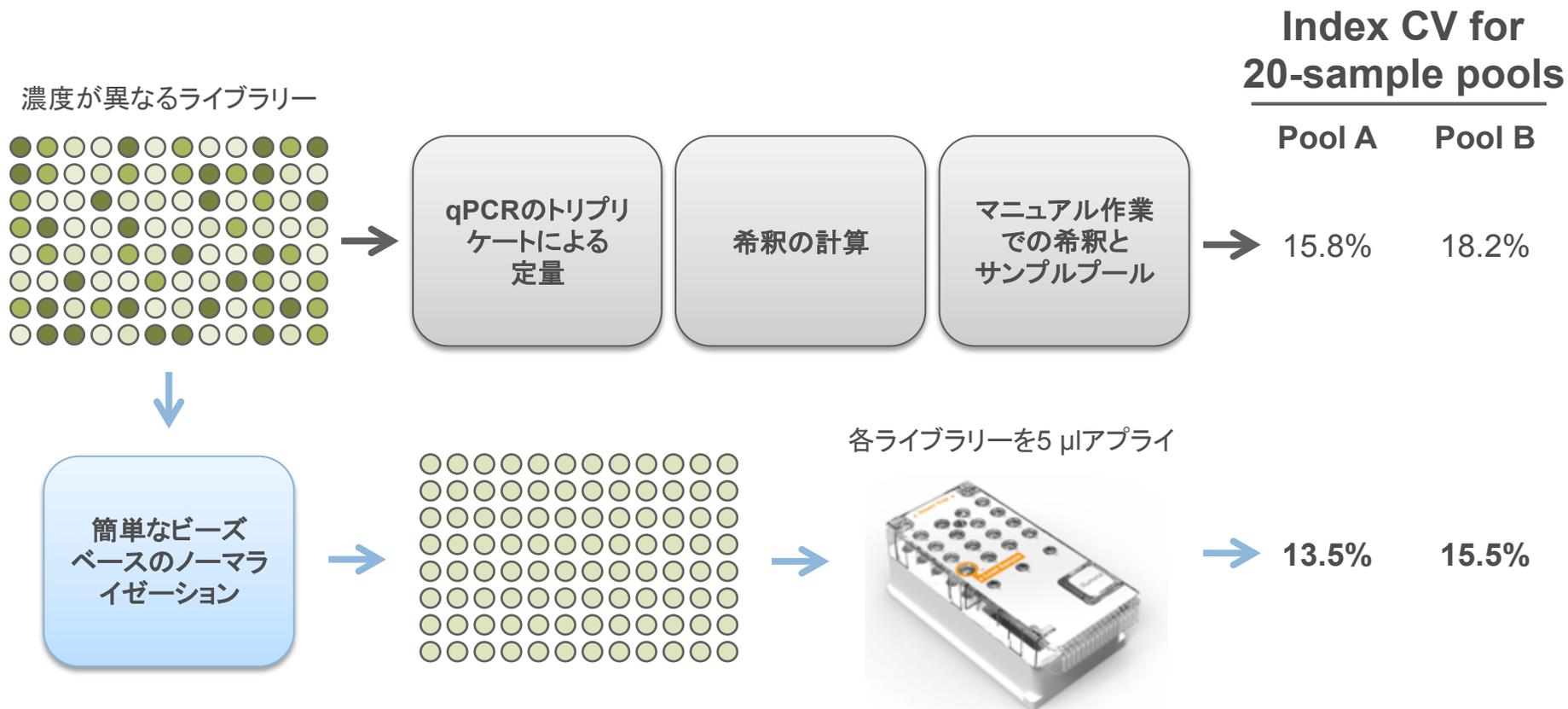
ターゲット領域は  
170 ~ 190 塩基

212箇所  
を1ウェルで増幅

サンプルごとに  
インデックスのついた  
プライマーで増幅

最大95サンプル  
各サンプル212箇所  
を混合して  
1枚のプレートでサンプル調製

# 定量ノーマライゼーションはビーズで実施



TruSeq Amplicon Cancer Panel では、ビーズを使い一括で定量ノーマライゼーションを実施

# 定量ノーマライゼーションはビーズで実施

- ▶ DNA結合ビーズを用いてPCR産物の量を調整

ライブラリ調製で少ない鋳型

ライブラリ調製で多い鋳型

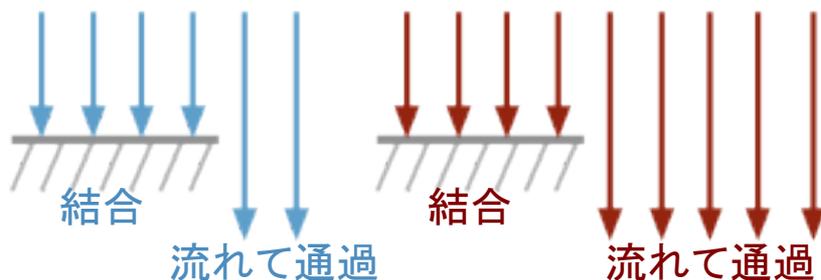


Figure 7. Sample Representation

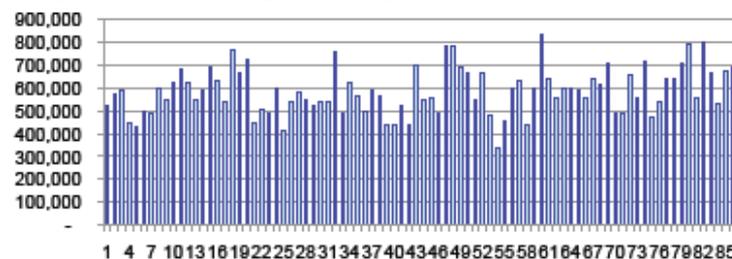


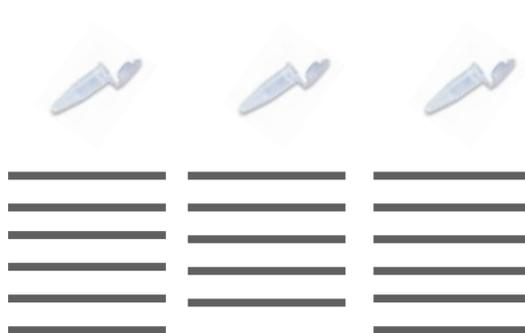
Figure 7. Representation of Samples in Pool. In addition to high multiplexing capabilities, another unique advantage of the TSCA method is a bead normalization step which eliminates the need to quantify and manually normalize samples before pooling. The bead normalization followed by equal volume pooling produces sample pools with coefficients of variation of <17% as seen in the figure above. Samples are all within 2-fold of one another thereby maximizing yield on the MiSeq.

# ランの計画：どの程度の depth で解析を行うか

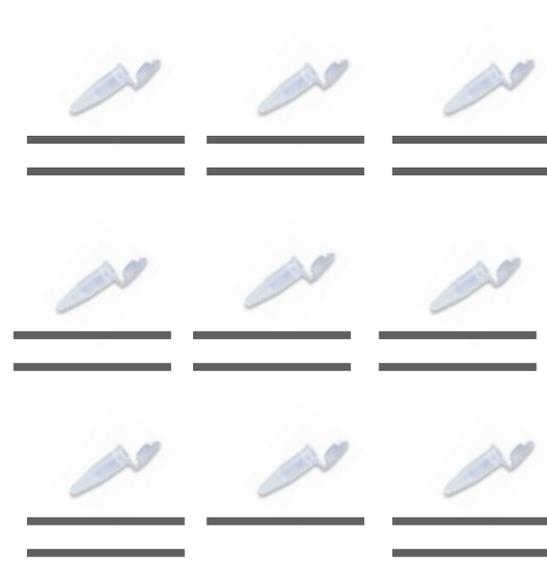
1サンプルを  
Ultra Deep に  
シーケンス



数サンプルを  
Deep に  
シーケンス



多サンプルを  
シーケンス



# 解析デザイン1

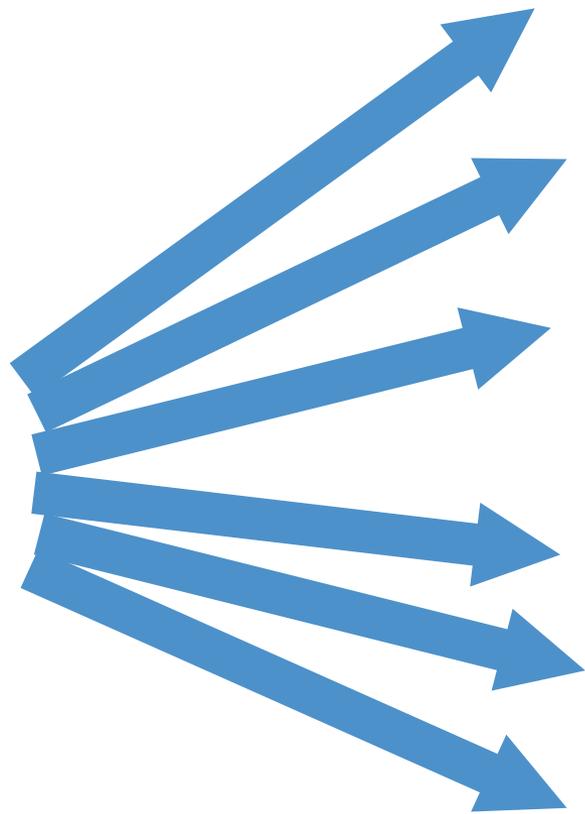
95サンプルを x1000 で解析

TSCAアッセイ



1ウェル1サンプル

95サンプル  
+  
1コントロール



16サンプル  
+ 1コントロール



MiSeq 1 ラン



15 サンプル  
+ 1コントロール

サンプル調製 2日

シーケンス 6ラン(8日)

# 解析デザイン2

95サンプルを x1000 で解析

TSCAアッセイ



1ウェル1サンプル

95サンプル  
+ 1コントロール

MiSeq 6 ラン

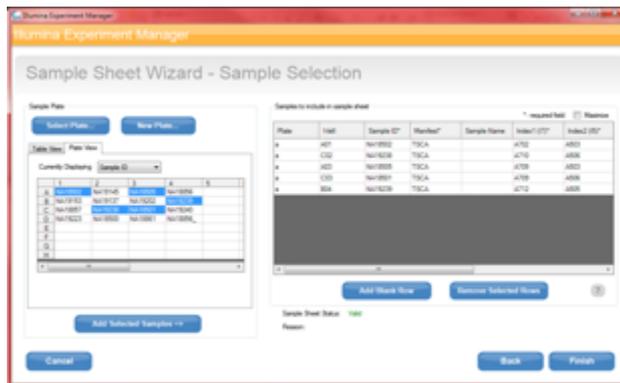
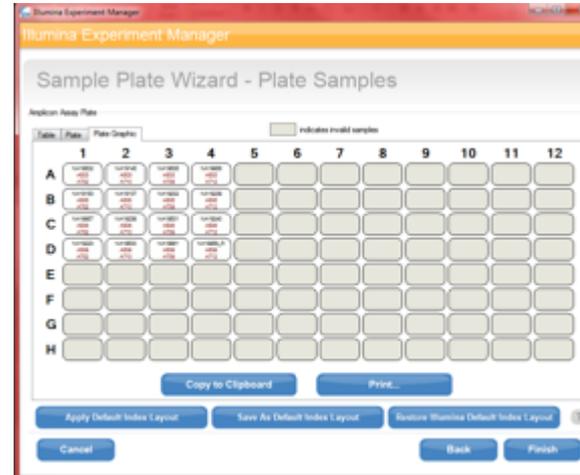
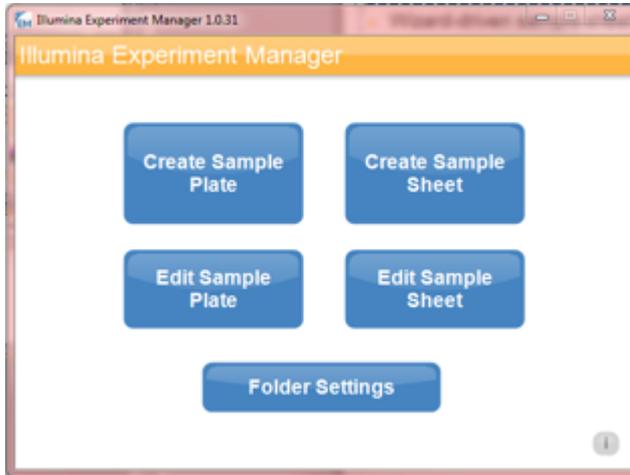
95サンプル  
+  
1コントロール

サンプル調製 2日

シーケンス 6ラン(8日)

# Illumina Experiment Manager を用いたサンプルシートの作成

- ▶ 無料のサンプルシート作成用ソフト
- ▶ サンプルとターゲットがわかりやすいようにプレートマップの使用



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	[Header]											
2	EMFileVersion					3						
3	Investigator Name	Dr McCoy										
4	Project Name	Nxtera_Reseq										
5	Experiment Name	NXTR00111010										
6	Date	10/10/2011										
7	Workflow	Resequencing										
8	Assay	Nxtera										
9	Description	Tribbles										
10	Chemistry	Nxtera										
11	[Reads]											
12		151										
13		151										
14	[Settings]											
15	OnlyGenerateFASTQ	0										
16	[Data]											
17	Sample_ID	Sample_Name	Sample_F	Sample_I	Sample_J	Index1	Index2	IS_Index	Description	Genome	Folder	
18	Tri001	Tri0_Pool A01	NXT_B			TAAGGGG	N701		TAGATGG	N501	Tribbles	
19	Tri002	Tri0_Pool A02	NXT_B			GGTACTAC	N702		TAGATGG	N501	Tribbles	
20	Tri003	Tri0_Pool A03	NXT_B			AGGAGAGA	N703		TAGATGG	N501	Tribbles	
21	Tri004	Tri0_Pool A04	NXT_B			TCTGTAGG	N704		TAGATGG	N501	Tribbles	
22	Tri005	Tri0_Pool A05	NXT_B			GGACTCTC	N705		TAGATGG	N501	Tribbles	
23	Tri006	Tri0_Pool A06	NXT_B			TAGGCATN	N706		TAGATGG	N501	Tribbles	
24	Tri007	Tri0_Pool A07	NXT_B			CTCTCTAC	N707		TAGATGG	N501	Tribbles	
25	Tri008	Tri0_Pool A08	NXT_B			CAGAGAG	N708		TAGATGG	N501	Tribbles	

# MiSeqでシーケンス

- ▶ カートリッジ式の試薬キット
  - シーケンスに必要な試薬が全てまとめられている
  - 溶かして、ライブラリーをロードしてセットするだけ
- ▶ RFIDを採用した試薬のトラッキング
- ▶ 簡潔で自動化されたワークフロー



# MiSeqでシーケンス

- ▶ カートリッジ式の試薬キット
  - シーケンスに必要な試薬が全てまとめられている
  - 溶かして、ライブラリーをロードしてセットするだけ
- ▶ RFIDを採用した試薬のトラッキング
- ▶ 簡潔で自動化されたワークフロー

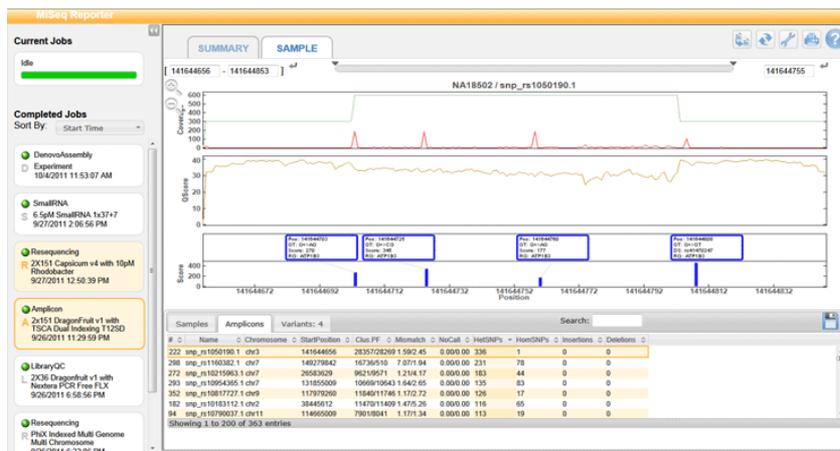
Go



# MiSeq Reporter によるデータ解析

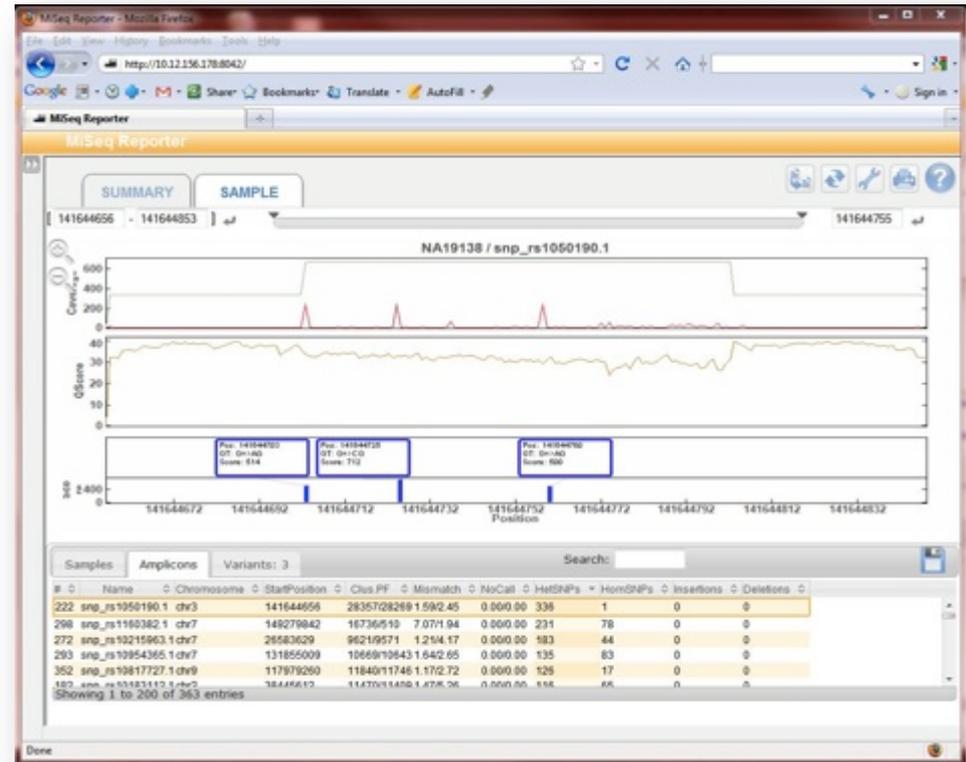
シーケンスラン終了後にMiSeq Reporter によるデータ解析が自動的に開始

- ▶ 150x2 でシーケンスラン
- ▶ 1次解析(ベースコール)はリアルタイムで解析
- ▶ 2次解析(アライメント & 変異コール)はラン終了後に自動でスタート
  - BAM形式(アライメント)
  - VCF形式(変異コール)



# MiSeq Reporter: MiSeq上で動く解析用ソフトウェア

- ▶ MiSeqに搭載のWindows 7にインストール
- ▶ アンプリコン解析の場合
  - サンプルごとの各アンプリコンをアセンブル
  - 変異を検出
  - グラフとレポートを作成
    - アンプリコンごとのカバレッジ
    - クオリティ
    - 変異スコア



# illumina Amplicon Viewer: 解析結果を表示するソフト

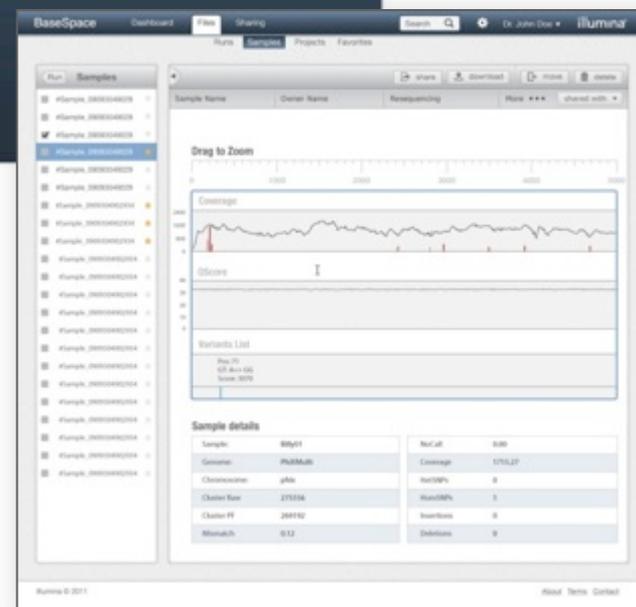
## 8kbの連続領域を53個のアンプリコン(タイリング)で行った例



# 新登場 イルミナのクラウドソリューション BaseSpace

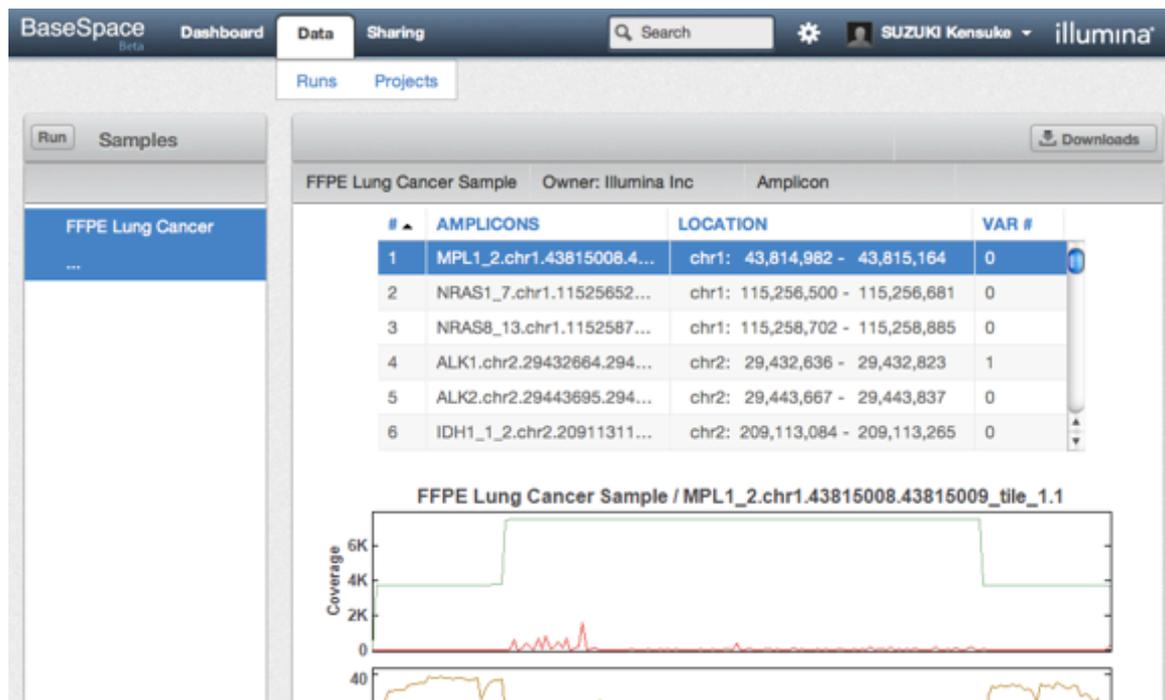


お客様サイトのストレージとコンピュータを必要を無くします  
ウェブベースのデータ管理と解析  
共同研究とデータ共有のためのツール  
イルミナのお客様もそうでは無いお客様も利用可能  
イルミナ iCom (新 My Illumina) ログインからスタート



# TruSeq Custom Amplicon Cancer Panel データ

<https://basespace.illumina.com/s/rfTW6T>



Details		Variants								
#	LOCATION ▲	SCR	TYPE	CALL	dbSNP	RefGene	A	C	G	T
1	29,432,7...	3070	SNP	T->CT	rs373...	ALK	25	...	6	...

# Early Accessでのパフォーマンス 優れた特異性、均一性、カバレッジ

- ▶ TruSeq Amplicon Cancer Panel を初めて使用したサイト
- ▶ 様々な癌種(肺癌、脳腫瘍、大腸癌)よりのFFPEサンプル
- ▶ 全てのアンプリコンでリードが得られた
  - リードがえ得られなかった(ドロップアウト)アンプリコンは無し

	ラン 1	ラン 2	ラン 3
サンプル数	20	20	1
MiSeq アウトプット	1.8 Gb	2.0 Gb	1.9 Gb
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%
アンプリコンド ロップアウト	0	0	0

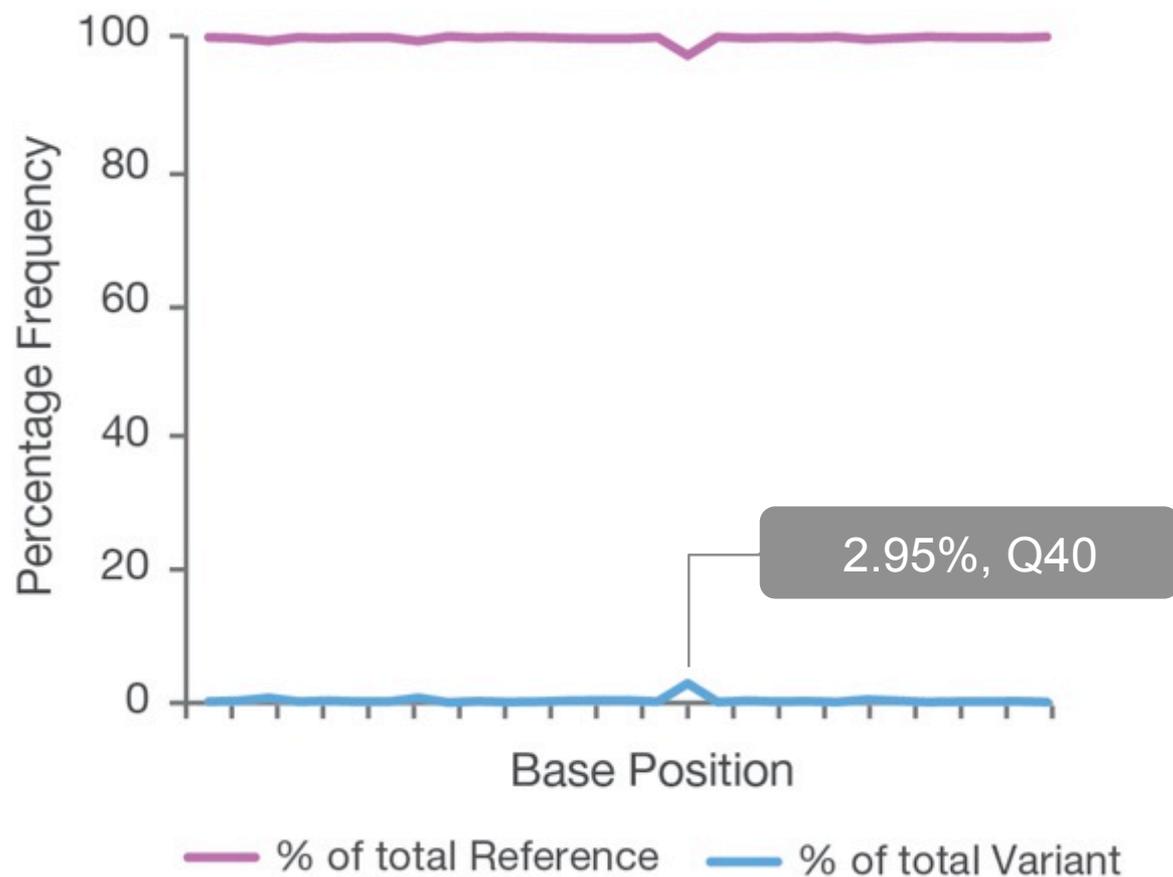
\* 特異性: 得られたシーケンスのうち、ターゲット領域にマップしたリードの%

\*\* 均一性: 平均カバレッジ x 0.2 でカバーできたターゲット領域の塩基の割合

(例 平均カバレッジが1000xの場合、 $1000 \times 0.2 = 200x$  でカバーできた塩基の割合が X%)

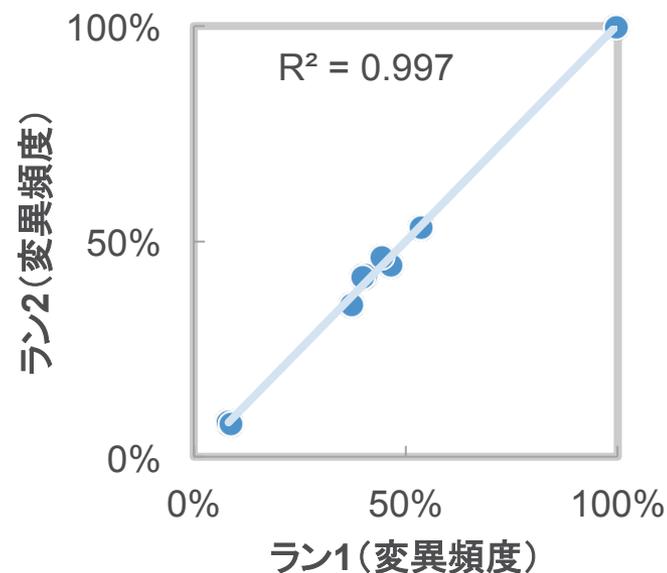
# 5%以下の体細胞変異検出

- ▶ 大腸癌サンプル; 6,048x カバレッジで解析
- ▶ BRAF遺伝子の 2.95% の変異 (A > T) を検出 – Q40 (99.99%) の変異スコア



# Early Accessでのパフォーマンス 繰り返し実験でも高い再現性を示す

		TruSeqアンプリコン – Cancer パネル	
	ターゲット 遺伝子	ラン1 変異頻度% (カバレッジ)	ラン2、 変異頻度% (カバレッジ)
サンプル1	EGFR	37.1% (1387x)	35.3% (1591x)
サンプル2	EGFR	40.5% (941x)	42.2% (1092x)
		39.8% (1810x)	41.8% (2123x)
サンプル3	cKIT	46.4% (1030x)	44.3% (1074x)
サンプル4	cKIT	44.4% (2006x)	46.3% (2080x)
サンプル5	BRAF	99.8% (2706x)	99.8% (3262x)
サンプル6	BRAF	53.6% (5130x)	53.1% (4945x)



# TruSeq カスタムアンプリコン Cancer Panel 製品仕様

パラメーター	詳細 <sup>1</sup>	ポイント
DNA スタート量	250ng	限られた貴重なサンプルも解析
コンテンツ	<b>212 アンプリコン</b>	パネルコンテンツは固定
アンプリコンサイズ	<b>170-190 bp</b>	FFPEサンプルにも対応
アッセイ時間	7時間以下(2時間のハンズオンタイム)	迅速に結果取得
インデックスレベル	最大96	1プレートで多くのサンプルを簡単調製
濃縮特異性	<b>85%以上</b>	ターゲットにフォーカス
カバレッジ均一性	<b>85%以上が0.2 x以上の平均バレッジ<sup>2</sup></b>	均一なアンプリコンパフォーマンス
平均カバレッジ1,000以上で読んだときの結果	<b>リードを得られなかったアンプリコンは無し</b>	全てのターゲット領域のリードを取得
FFPE QC	<b>QCをパスしたサンプルの80%以上が、上記仕様の結果が得られると予測</b>	適したサンプルをスクリーニングするシンプルな手法

<sup>1</sup> TSCAと異なる部分は太青字でハイライト

<sup>2</sup> 例) 100 x でシーケンスしたとき、20x以上 (100 x 0.2) のカバレッジを示す塩基

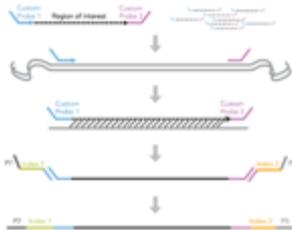
# TruSeq Amplicon Cancer Panel

イリミナが設計から解析まで提供する癌研究のソリューション

TruSeq Amplicon  
Cancer Panel



TSCA  
実験



サンプルシート作成  
Illumina Experiment  
Manger



MiSeq



MiSeq Reporter  
Amplicon Viewer



FFPE用QCキット  
増幅用オリゴ

212箇所を  
1ウェルで増幅  
95サンプルを  
1プレートで解析  
ノーマライゼーション  
キットも附属

Windows 7で  
GUIを使って  
サンプル情報の  
記入

鋳型増幅から  
シーケンスまで  
自動で実行

全自動で  
データ解析  
閲覧用ソフト

# TruSeq Amplicon Cancer Panel 価格

## ■ 製品情報

カタログ番号	製品名	サンプルあたりの価格	価格※
FC-130-1008	TruSeq Amplicon - Cancer Panel (96 samples)	¥18,750-	¥1,800,000-
FC-130-1003	TruSeq Custom Amplicon Index Kit (96 Indices, 384 Samples)	¥372-	¥143,000-
FC-130-1007	TruSeq Index Plate Fixture and Collar Kit (2 Each)	-	¥26,300-
WG-321-1001	Illumina FFPE QC Kit (384 samples)*	¥36-	¥13,700-

\*FFPE サンプル解析時に必要となります。

※ 価格に消費税は含まれません。

## シーケンス試薬価格

カタログ番号	製品名	価格※
MS-102-1001	MiSeq Reagent Kit (300 Cycles)	¥145,000-



WG-321-1001



FC-130-1008



FC-130-1005



MS-102-1001

ご清聴ありがとうございました。