

FFPEサンプルを用いたシーケンス

November 6, 2015



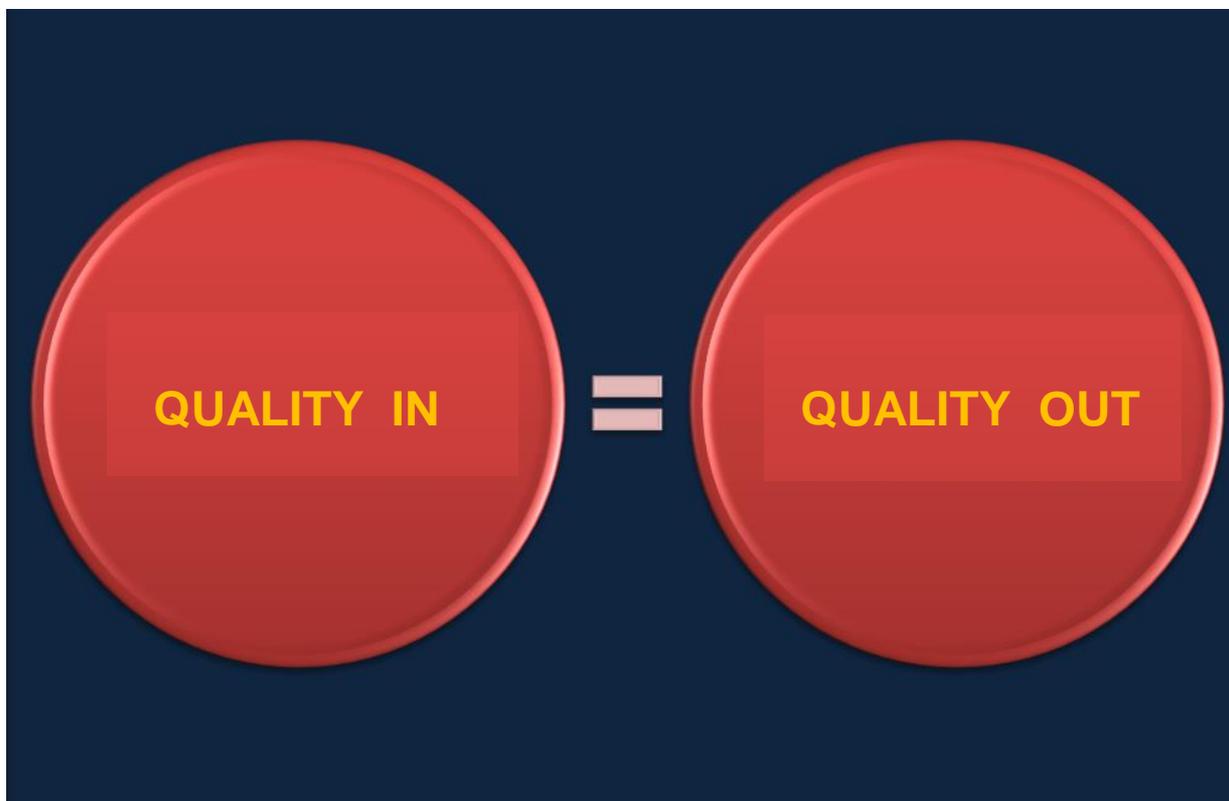
山重 リエ
イルミナ株式会社
テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, VeraCode, the pumpkin orange color, and the Genetic Energy streaming bases design are trademarks or registered trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.

illumina®

FFPEライブラリーをシーケンスする際のポイント



サンプルの品質/核酸の抽出方法= ライブラリーの品質

- ▶ インプットの量は、最終的なライブラリーの収量とライブラリーの多様性を決める
- ▶ インプットの核酸と最終的なライブラリーのQCを適切に行うことが重要
- ▶ ライブラリーの定量を適切に行い、適切な収量が取れていることを確認してからシーケンスに進むことが重要

Overview

1. FFPEサンプル作成の一般的なワークフロー
2. FFPEサンプルから核酸（DNA/RNA）を採取する際に注意するポイント
3. FFPE サンプルに対応したライブラリー調製キットのご紹介

Overview

1. FFPEサンプル作成の一般的なワークフロー

FFPEサンプル作成の一般的なワークフロー

Steps:

1. 手術行い、病変組織を取り除く



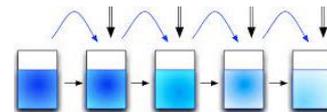
2. 組織を取り除いてすぐに、その組織もしくはその一部をPBSで洗浄し、血液を洗い流す



3. 組織を10 ml以上のホルマリンにつける



5. その後、組織をEt-OHに浸し、その後、水分を取り除くためにキシレン処理を行う



6. 組織をトレイに移し、パラフィンワックスを含浸する。このワックスは組織の性状を固くし、ミクروتームによる超薄切片の作成を可能にする。



FFPEサンプル作成の一般的なワークフロー

▶ 超薄切片の作成

- ミクロトームを用いて行われる
- 病理検査の目的でも使用されるが、核酸抽出のためのサンプルの粉碎の目的でも使用
- 手技、手法により、核酸の収量が変わってくる
- コンタミネーションの原因となりうる



Overview

1. FFPEサンプル作成の一般的なワークフロー



2. FFPEサンプルから核酸（DNA/RNA）を採取する際に注意するポイント

FFPEサンプルから核酸（DNA/RNA）を採取する際に注意するポイント

- ▶ あらゆるタイプのサンプルを使用可能:
 - FFPE処理された組織ブロック、スライド、切片（セクション）
 - 生検ニードル/レーザーマイクロダイセクション法で採取したサンプルはサポートしていない
- ▶ FFPEサンプルからの核酸抽出キット
 - QuickExtract FFPE DNA/RNA Extraction Kit (Epicentre, an Illumina company)
 - QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)
 - Phenol Chloroform Extraction (Traditionally used)

一般的なFFPEサンプルからの核酸抽出ステップ:

脱パラフィン: 熱をかけて、パラフィンを溶解



細胞溶解: Lysis buffer および 消化酵素によるステップ.

- (Proteinase Kが一般的に用いられる)



ホルマリン・クロスリンクの解離: 核酸をフリーにするステップ

- (加熱処理もしくは酸化処理が一般的)



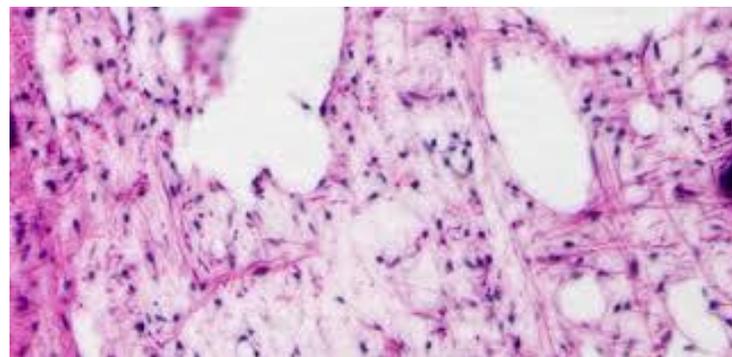
DNA/RNA精製ステップ:

- (カラム精製/沈殿精製.)



核酸のクオリティはFFPEサンプルの状態によって異なる

- ▶ FFPE処理および処理後の保管の方法:
 - 核酸への化学修飾、ダメージ、分解などが起こる
- ▶ サンプル間での核酸のクオリティの変化の要因
 - ホルマリン固定を行うまでの時間
 - ホルマリン固定の時間
 - 使用したホルマリン (e.g. 中性緩衝ホルマリンを使用しているか？)
 - サンプルの保管条件 (温度、湿度、光源など)
 - サンプルの保管年数
 - どの組織に由来するサンプルか？
 - 核酸の抽出方法、テクニック



FFPEサンプルから抽出した核酸について考慮すべき点

▶ 定性:

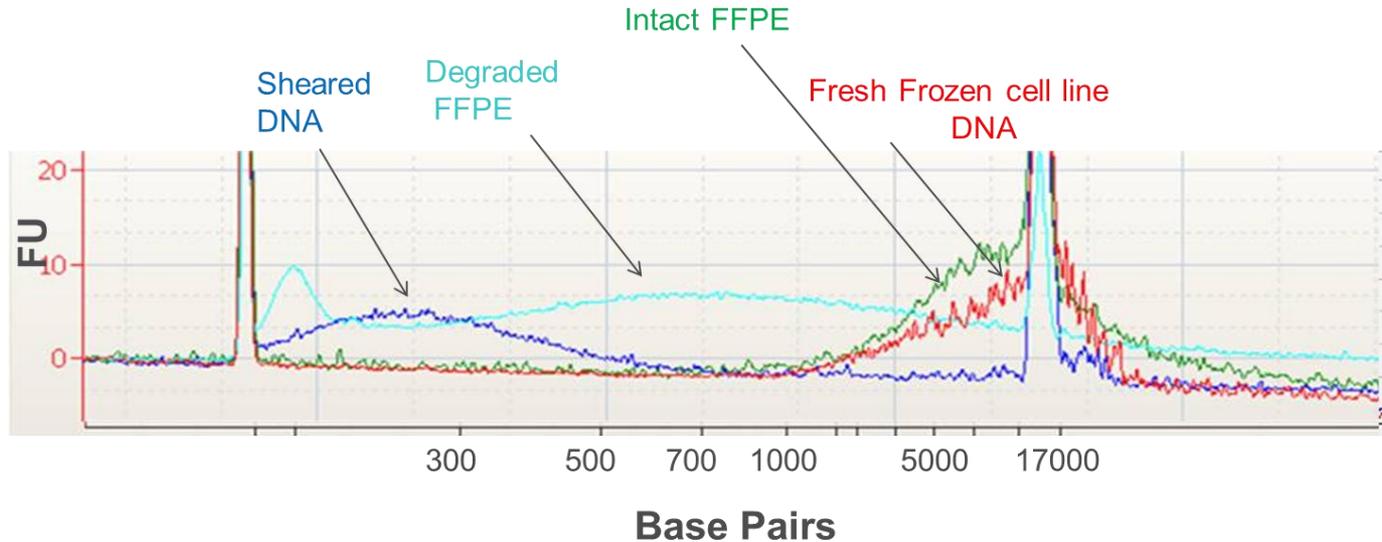
- BioAnalyzerで核酸のクオリティを確認
- OD 260/280（核酸純度）：~1.8 for DNA、~2.0 for RNA
- OD 260/230（精製度）：~2.0 (1.5以下ではないことを確認)
- 用いるライブラリー調整キットによっては、input DNAのフラグメントサイズの確認のために qPCRの実施が必要

▶ 定量:

- 推奨定量方法: 蛍光分析 または qPCR
- DNAシーケンス：20~250ng starting input（サンプルのクオリティ、使用するキットに依存）
- RNAシーケンス：20-100ng starting input（サンプルのクオリティ、使用するキットに依存）

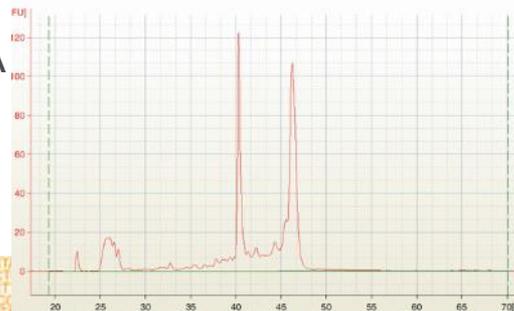
一般的なバイオアナライザーでのFFPEサンプルのトレース

- ▶ FFPEサンプルは分解されていることが多い:
 - ライブラリの収量の低下、データの多様性の低下、シーケンスデータの品質低下を引き起こす
- ▶ 分解の進んだDNAのFFPEサンプルは一般的にブロードな丸みのあるトレースとなり、DNAサイズの短い領域にピークが見られる

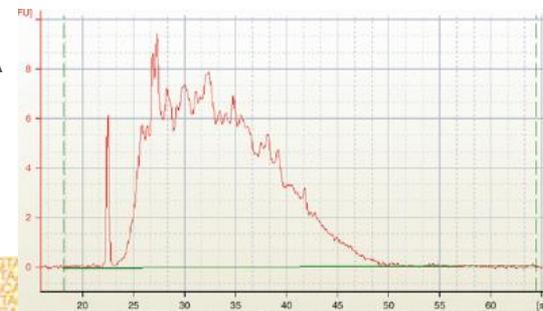


- ▶ 分解の進んだRNAのFFPEサンプルは18Sおよび 28S rRNAのピークがなくなり、RIN値が低下する:

Hi Quality RNA
RIN=10



FFPE RNA
RIN=2.9



Overview

1. FFPEサンプル作成の一般的なワークフロー



2. FFPEサンプルから核酸（DNA/RNA）を採取する際に注意するポイント



3. FFPE サンプルに対応したライブラリー調製キットのご紹介

FFPE サンプルに対応したライブラリー調製キットのご紹介

1. FFPE DNAサンプル用ライブラリー調製キット:

1. TruSeq Custom Amplicon 1.5
2. TruSeq Custom Amplicon Low Input 

FFPE DNAサンプルに使用できるがんパネル

1. TruSight Tumor 15 
2. TruSight Tumor 26
3. TruSeq Amplicon Cancer Panel

2. FFPE RNAサンプル用ライブラリー調製キット:

1. Coding Transcriptome: TruSeq RNA Access Library Prep
2. Whole Transcriptome: TruSeq Stranded Total RNA Library Prep
3. Targeted Expression: TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep

少量DNAからのサンプル調製を可能にする TruSeq Custom Amplicon Low Input

new

	v1.5	Low Input
 gDNA インプット量	50 ng	1-10 ng
 FFPE DNA インプット量	250 ng	10-50 ng* <small>*インプット量は品質に依存</small>
 精製方法	Filter plate	ビーズ精製
 アッセイ時間	10 時間	6.5 時間
 Amplicon数 (シングルプール)	Up to 10,000 (via Concierge)	Up to 1536
 Ampliconサイズ	150, 175, 250, 425 bp	150, 175, 250 bp
 キットサイズ (サンプル数)	96+	16, 96+

少量DNAからのサンプル調製を可能にする TruSeq Custom Amplicon Low Input



- ▶ インプット量**10ng~**、FFPEサンプルに対応
- ▶ クオリティの高いデータで高感度な変異検出を実現
 - 10ng FFPEサンプルを用いて5%のアリル頻度の変異の検出も可能
 - [Data Sheet](#)
- ▶ 早いターンアラウンドタイム
 - オートメーションのワークフローの採用で6.5時間でのサンプル調製が可能（ハンズオンタイム3時間）
- ▶ 専用解析ツールで、自動でレポート作成
 - 既定のレポート機能により、バリエントコールとフィルタリングを自動で行い、レポート作成まで実施



illumina®

Big discoveries
now start smaller.

Introducing the new low-input
amplicon solution.

Featuring as low as 1 ng DNA input, FFPE compatibility, and high data quality, the new TruSeq® Custom Amplicon Workflow takes you from custom design to streamlined analysis with BaseSpace® Apps. It's never been easier to confidently call variants from your most challenging samples.

TruSeq Custom Amplicon Low Inputのワークフロー

FFPE DNA抽出

FFPE QC kitによる
DNAクオリティの確認

DNAのクオリティによりインプット量のを決定固定パネル製品:

DNA Quality	ΔCq	Input (ng) ^{1, 2}
High	-1 to 1	10
Medium	>1.0-2.5	20-50
Low	2.5-4.0	50-100

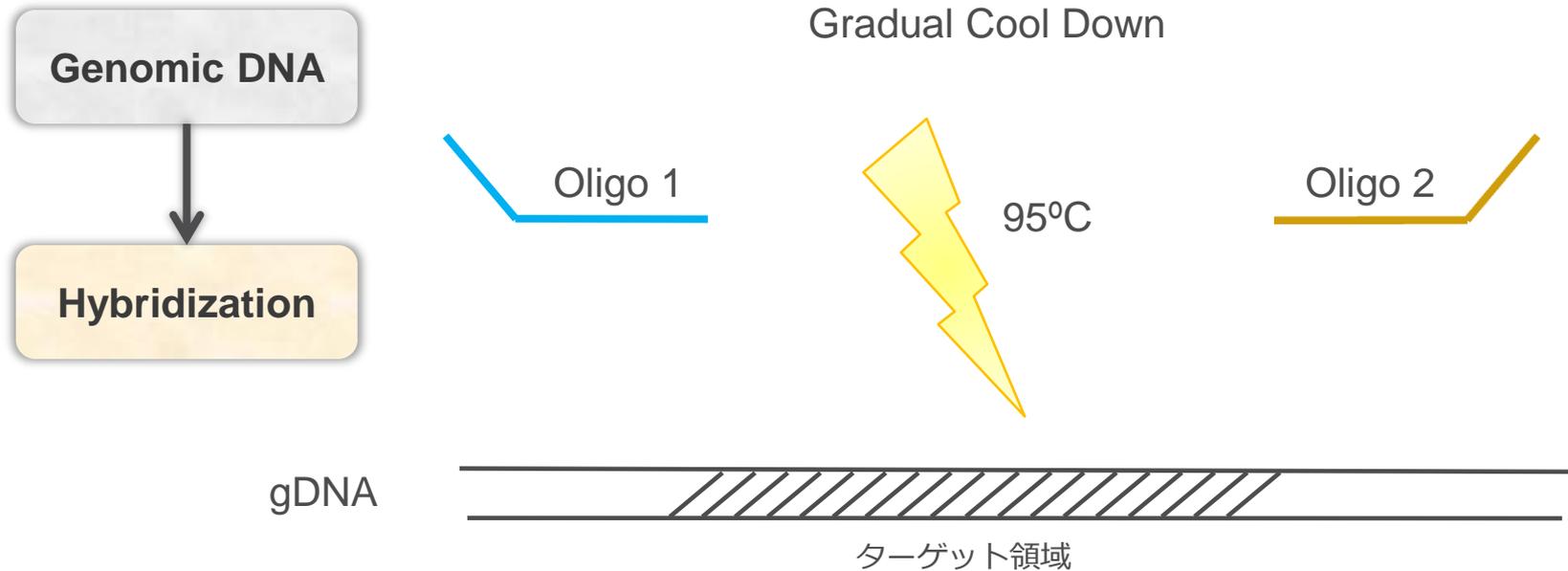
Target Specific Oligos → ハイブリダイゼーション
& 伸長反応

精製ビーズによる
によるWash

PCRでの
アダプター付加

TSA Overview

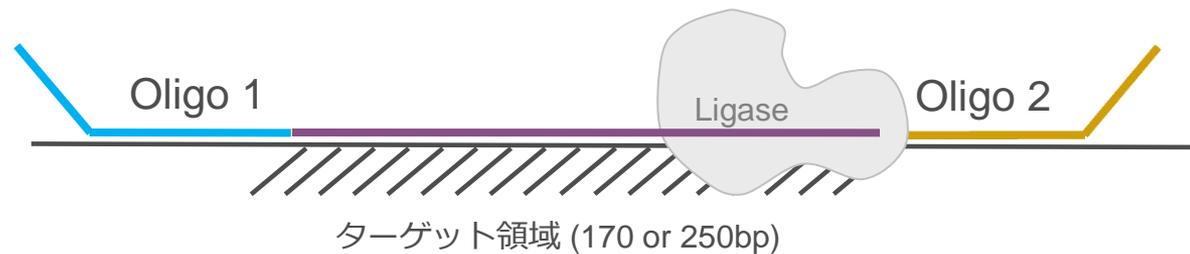
How the assay works



- ▶ 95°CのヒートブロックでDNAを変性後、40°Cまで徐々に温度を下げつつ、カスタムオリゴをターゲット領域へとハイブリさせる
- ▶ サンプル精製ビーズで、ターゲットにハイブリしなかったオリゴを除去

TSA Overview

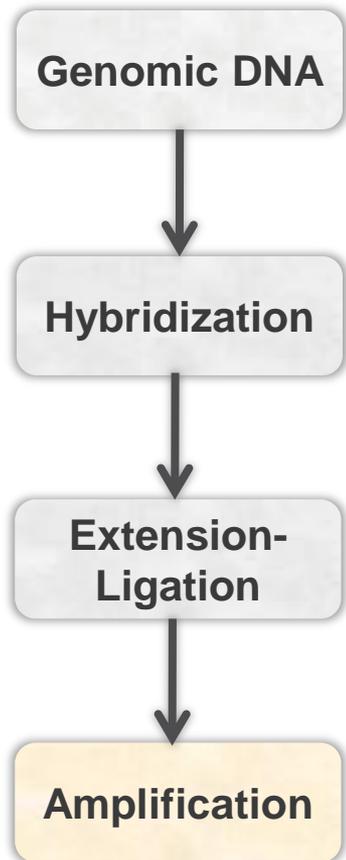
How the assay works



- ▶ Oligo 1の3末端から、伸長反応ののち、Oligo 2 とのライゲーション反応。
- ▶ 37°Cで 45 min反応

TSA Overview

How the assay works



1. Index付きプライマーでPCR反応
2. PCRでライブラリを増幅
3. AMPure XPで精製



FFPEサンプルに使用できる3つのがんパネル

new

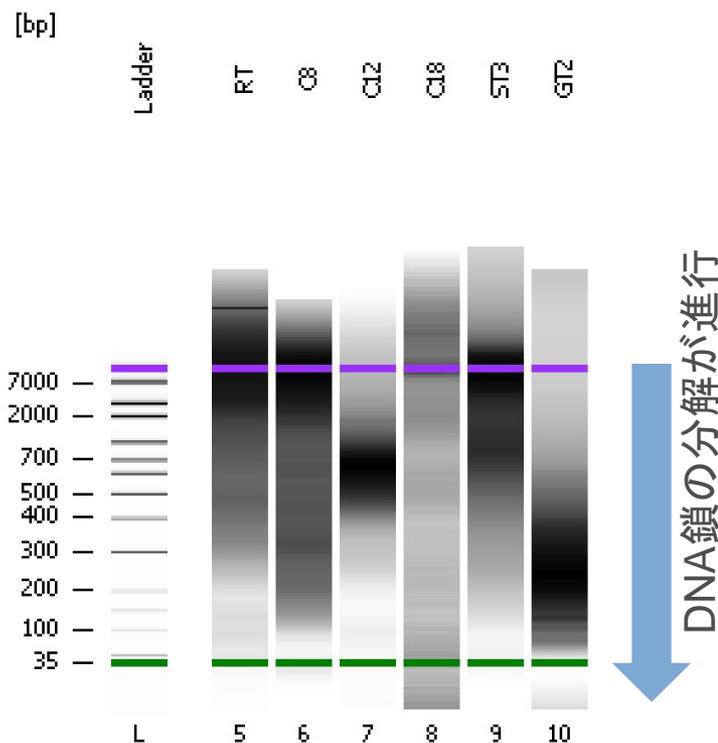
	TruSight Tumor 15	TruSight Tumor 26	TruSeq Amplicon Cancer Panel*
使用目的	固形癌のホットスポット解析	固形癌のホットスポット解析	幅広い癌のホットスポット解析
対象遺伝子数	15 (44Kb)	26 (21Kb)	48 (35Kb)
スタート量	20 ng	30~300 ng	250 ng
FFPE	Yes	Yes	Yes
ワークフロー	7時間	8時間	10時間
手法	マルチプレックスPCR	アンプリコン (dual pool)	アンプリコン
ランあたりのサンプル数	8	6	96
キットサイズ	24	48	96
感度	500×のカバレッジで5%	1000×のカバレッジで5%	-
ベースAssay	TSCA Low Input	TSCA v1.5	TSCA v1.5

Update: 2016Q1

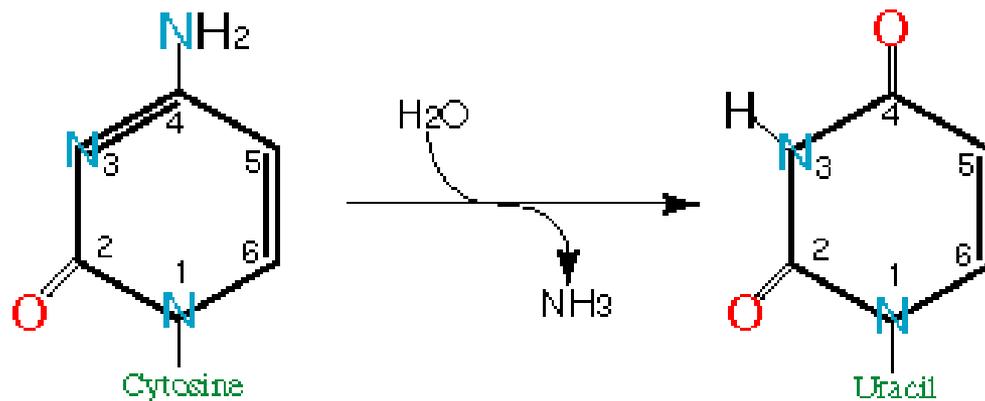
FFPEから抽出したDNAは損傷や劣化が生じている

FFPEサンプルの問題点

劣化によるDNAの断片化



ヌクレオチドの損傷



加水分解反応によりシトシンがウラシルに置換

少量のDNAからのサンプル調製を可能にする TruSight Tumor 15



- ▶ High FidelityなDNA polymeraseの採用で、FFPE処理由来のアーチファクトを軽減
- ▶ 15の固形癌関連遺伝子の関連領域をターゲット
- ▶ 簡便なMultiPlex PCR法による手法を採用
- ▶ インプット量**20ng**、FFPEサンプルに対応
 - 少ないFFPEサンプルインプット量 (20ng) と短いTAT (~36時間)でOncologyユーザー向けに最適化
- ▶ 高感度、高い信頼性でバリエーションを検出
 - 500x 以上のカバレッジで、5%のアリル頻度の体細胞変異を同定
- ▶ 専用解析ツールで、自動でレポート作成
 - 既定のレポート機能により、バリエーションコールとフィルタリングを自動で行い、レポート作成まで実施

Breast
Melanoma
Colon
Prostate
Lung
Ovary

FFPE サンプルに対応したライブラリー調製キットのご紹介

1. FFPE DNAサンプル用ライブラリー調製キット:

1. TruSeq Custom Amplicon
2. TruSeq Custom Amplicon Low Input 

FFPE DNAサンプルに使用できるがんパネル

1. TruSight Tumor 15 
2. TruSight Tumor 26
3. TruSeq Amplicon Cancer Panel

2. FFPE RNAサンプル用ライブラリー調製キット:

1. Coding Transcriptome: TruSeq RNA Access Library Prep
2. Targeted Expression: TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep
3. Whole Transcriptome: TruSeq Stranded Total RNA Library Prep

FFPEサンプルに使用できるRNAライブラリー調製キット

製品名	アプリケーション	RNAの種類	最少 インプ ット量
TruSeq Stranded Total RNA	発現およびスプライス解析 変異検出、融合、アイソフォーム	mRNA + ncRNA (miRNAを含まず)	100 ng
TruSeq RNA Access	発現およびスプライス解析 変異検出、融合、アイソフォーム 遺伝子発現プロファイル	mRNA	20 ng~
TruSeq Targeted RNA Expression	発現およびスプライス変化のプロ ファイリングと検証 変異、融合、アイソフォームのプロ ファイリングと検証	最大2000ターゲッ ト mRNA + ncRNA (miRNAを含まず)	100 ng~

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

Extracted FFPE RNA

QC: BA or TapeStation

Ribo Zeroによる
rRNAの除去

RNA断片化

cDNA合成

アダプターライゲーション
とPCR

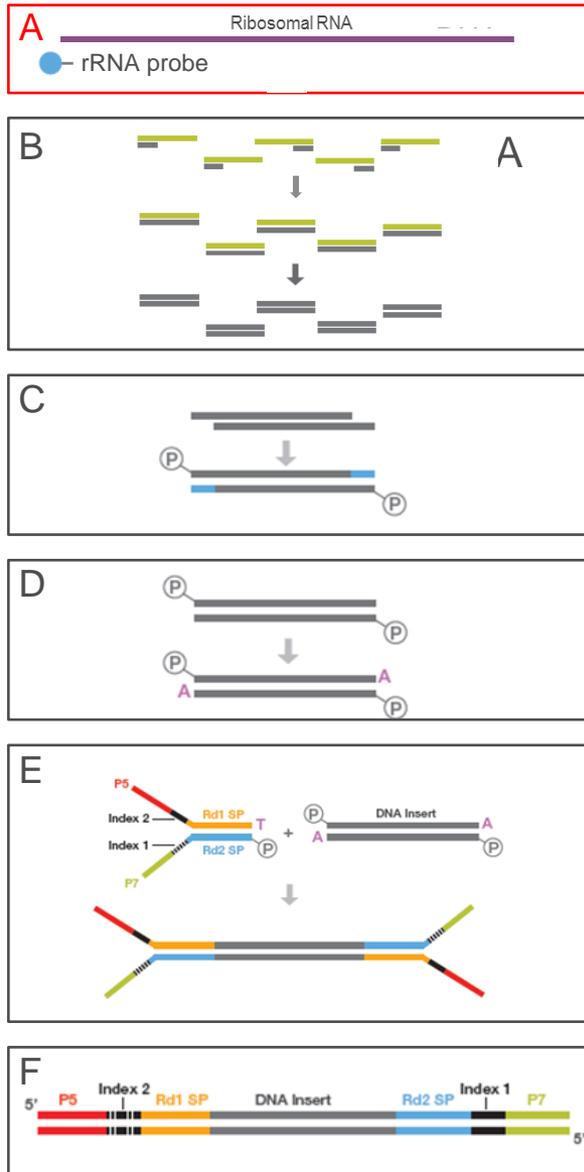
分解の進んだ
FFPEサンプル
の場合スキップ



Considerations:

- **インプット:**
0.1-1ug トータルRNA
- **インプットRNAのQC:**
BioAnalyzer/TapeStation
(RNA 6000 Nano Chip)
- **Pooling可能な最大サンプル数:**
24 samples for LT Kit (Set AとBを同時に使用の場合)
96 samples for HT Kit
- **アウトプット:**
Whole transcriptome
(mRNAs & ncRNAs)
- **Support Page:**
[TruSeq Stranded Total RNA](#)

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit



A) Total RNAからrRNAプローブ (Ribo Zero) を用いてrRNAを除去

B) (RNA断片化) ランダムプライマーを用いてcDNA合成

C) 末端平滑化、リン酸化

D) Aテイル負荷

E) インデックス付アダプターライゲーション

F) PCR

TruSeq RNA Access Library Prep Kit

<これまでの手法>

TruSeq Stranded Total RNA

- 分解が進んでいるため、polyAを利用した手法は使えない
- ランダムプライマーを用い、トータルRNAを対象に解析（rRNAは除去可能）

<利点>

- mRNA以外のncRNAを観察できる

<課題>

- 多くのリード量が必要
- mRNA以外の情報がでてくる



<新たな提案>

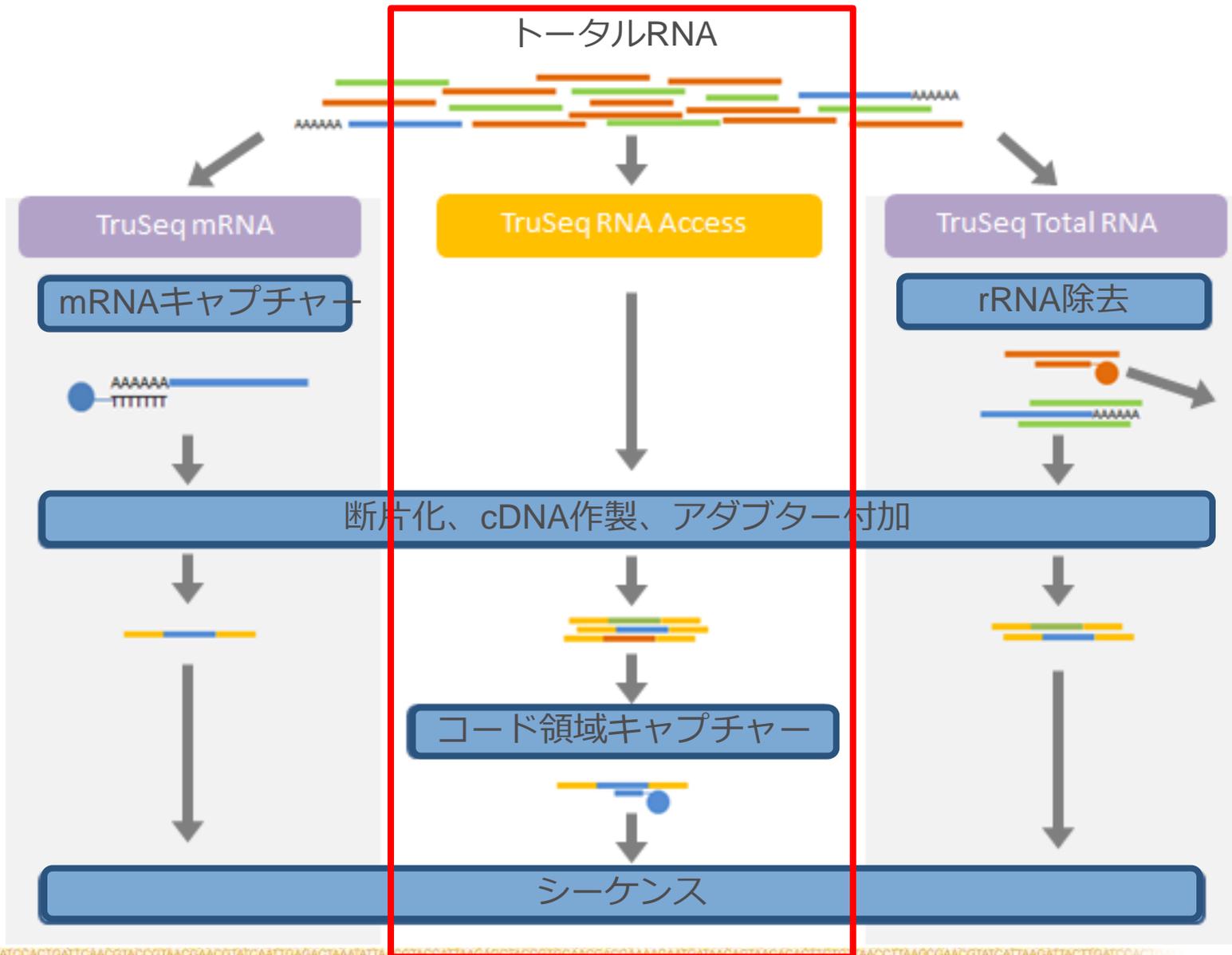
TruSeq RNA Access

- ランダムプライマーを用い、トータルRNAから調製
- 途中でコーディング領域だけをキャプチャーすることで、mRNAに絞って解析可能

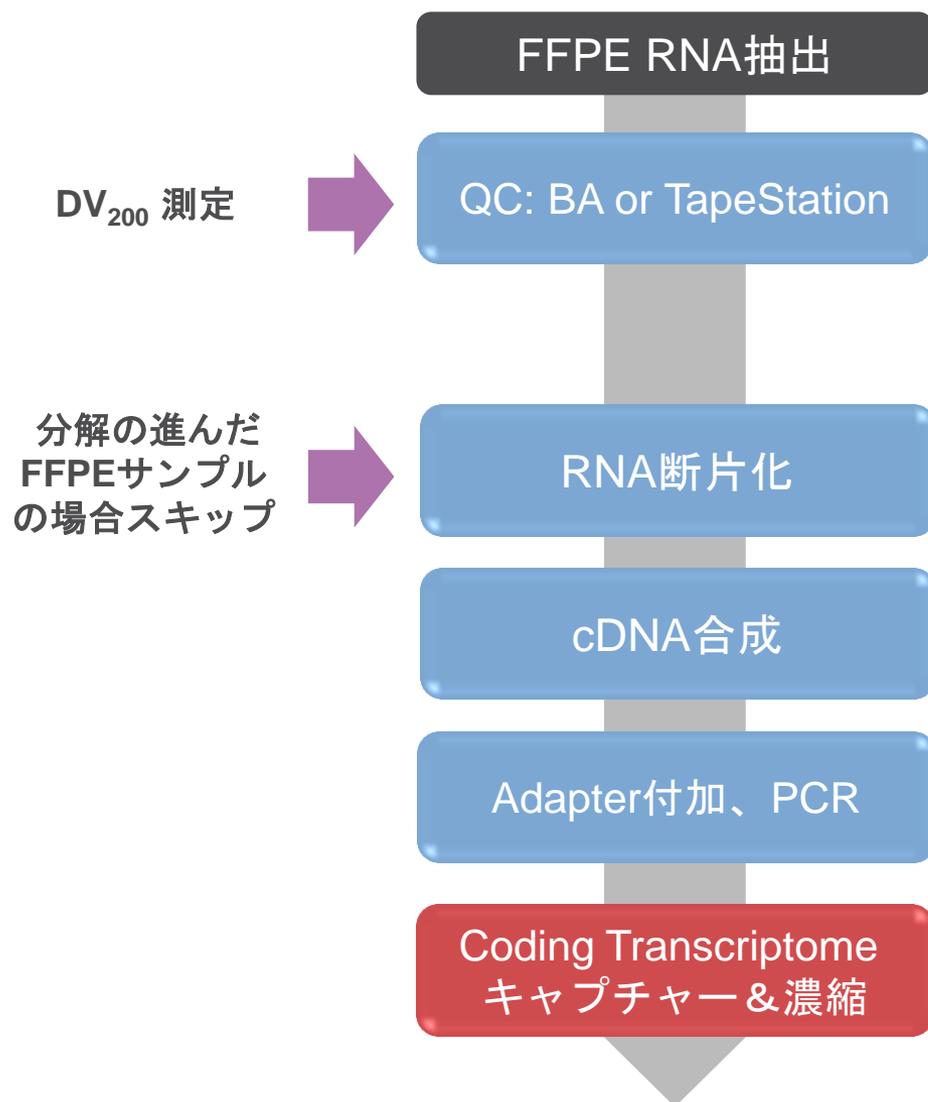
<利点>

- 分解サンプルからでも、mRNAにフォーカスした解析ができる
- これまでの手法と比べて、リード量は少なくすむ
- 効率のよい解析が可能

TruSeq RNA Access Library Prep Kit



TruSeq RNA Access Library Prep Kit



Considerations:

- インプット:
20-100ng FFPE sample Total RNA
- インプットRNAのQC :
BioAnalyzer/TapeStation Trace
(RNA 6000 Nano Chip)
- Pooling可能な最大サンプル数:
1度に4 samplesまでの濃縮が可能
Poolingの組み合わせは24Sampleまで可能
- アウトプット:
Coding transcriptome (mRNAs)
- Support Page:
[TruSeq RNA Access](#)

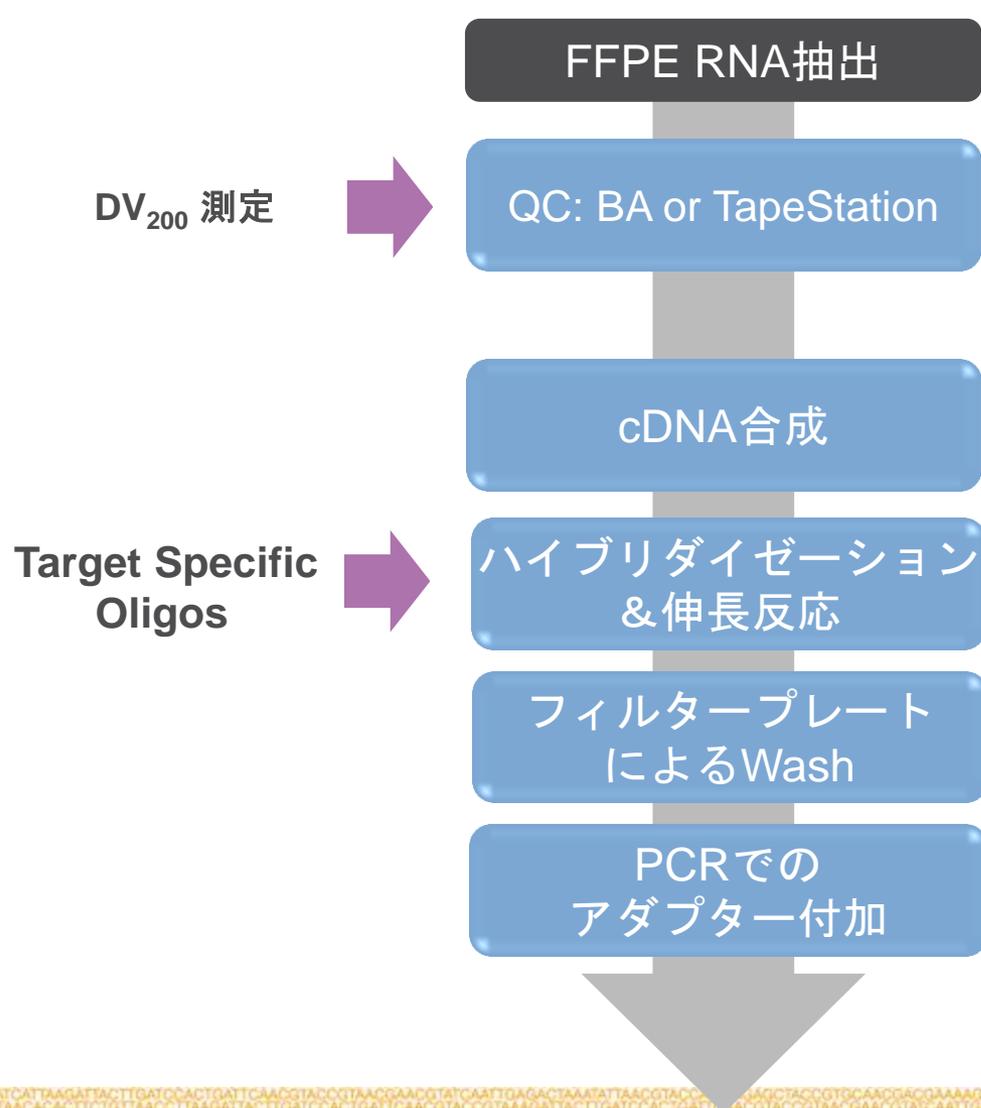
11/17サポートウェビナー→[ご登録はこちら](#)

TruSeq RNA Access Library Prepキットを用いたFFPE検体のRNA-Seq

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

- ▶ 実測かつ低コストでのRNAプロファイリングを実施可能にするキット
- ▶ 中規模プレックスRNAのハイスループットな定量的解析が可能
 - 12–1000ターゲットを10-100サンプル同時にアッセイ
 - 検証実験を高密度に可能
- ▶ サンプルあたりのコストがRT-PCR またはTaqman アッセイと比較して低コスト
 - 初期コストの大幅削減が可能
- ▶ 迅速なワークフローと早いターンアラウンドタイム
 - サンプル調製からデータ解析まで2日以内
- ▶ 必要サンプルスタート量が少ない
 - FFPEサンプルの場合トータルRNA100ng以上
- ▶ 必要データ量が少ないため、MiSeq試薬とご利用いただくことを推奨

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit



Considerations:

- **インプット:**
100ng~400 ngのトータルRNA
- **インプットRNAのQC :**
BioAnalyzer/TapeStation Trace
(RNA 6000 Nano Kit)
- **Pooling可能な最大サンプル数:**
384 samples per lane
- **パネル:**
10種の固定パネル、カスタム、固定パネルにアドオン
- **アウトプット:**
Targeted mRNA & ncRNA Transcripts
- **Support Page:**

[TruSeq Targeted RNA Expression](#)

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

パネル名	遺伝子数	MiSeq v3シーケンス試薬 1ランあたりで解析可能なサンプル数
幹細胞	100	250
P53 パスウェイ	52	384
シトクローム P450	28	384
NFκB パスウェイ	105	238
ヘッジホッグシグナル伝達	76	329
心臓毒性（心臓安全性）	76	329
アポトーシス	177	214
神経パネル	77	325
Wnt パスウェイ	93	269
細胞周期	63	384

その他サポート情報:



Find the right kit >

Sample Prep Kit Selector

http://www.illumina.com/applications/sequencing/dna_sequencing.ilmn

Lower Right Corner of Page

-For FFPE DNA Library Prep, choose:

Starting Material: DNA

Sequencing Project Type: Whole Genome or Amplicon

-For FFPE RNA Library Prep, choose:

Starting Material: RNA

RNA Quality: Low Quality RIN <8

Support Webinars >

Webinars

http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn

Support Bulletins >

Bulletin Board

<https://icom.illumina.com/MyIllumina/Bulletins>

VIEW SUPPORT

General Support

<http://support.illumina.com/>

その他サポート情報:

- ▶ Support Bulletins:
- ▶ [What applications are suitable for use with the Infinium HD FFPE Restoration and FFPE QC Kits?](#)
- ▶ Illumina FFPE qPCR Quality Control Protocol:
- ▶ [Using the Illumina FFPE QC Kit with the TruSeq Amplicon-Cancer Panel](#)
- ▶ Additional informative resources on FFPE samples:
- ▶ [Next-Generation Sequencing of RNA and DNA Isolated from Paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of Human Cancer and Normal Tissue](#)

ご清聴ありがとうございました!

本日セッション終了後のご質問は、
techsupport@illumina.comにお問い合わせください



Questions?