

TruSight Tumor 15パネルを用いた固形腫瘍からの体細胞変異検出

February 26, 2016



宮崎 隆明
イルミナ株式会社
シニア アプリケーションサイエンティスト

© 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.

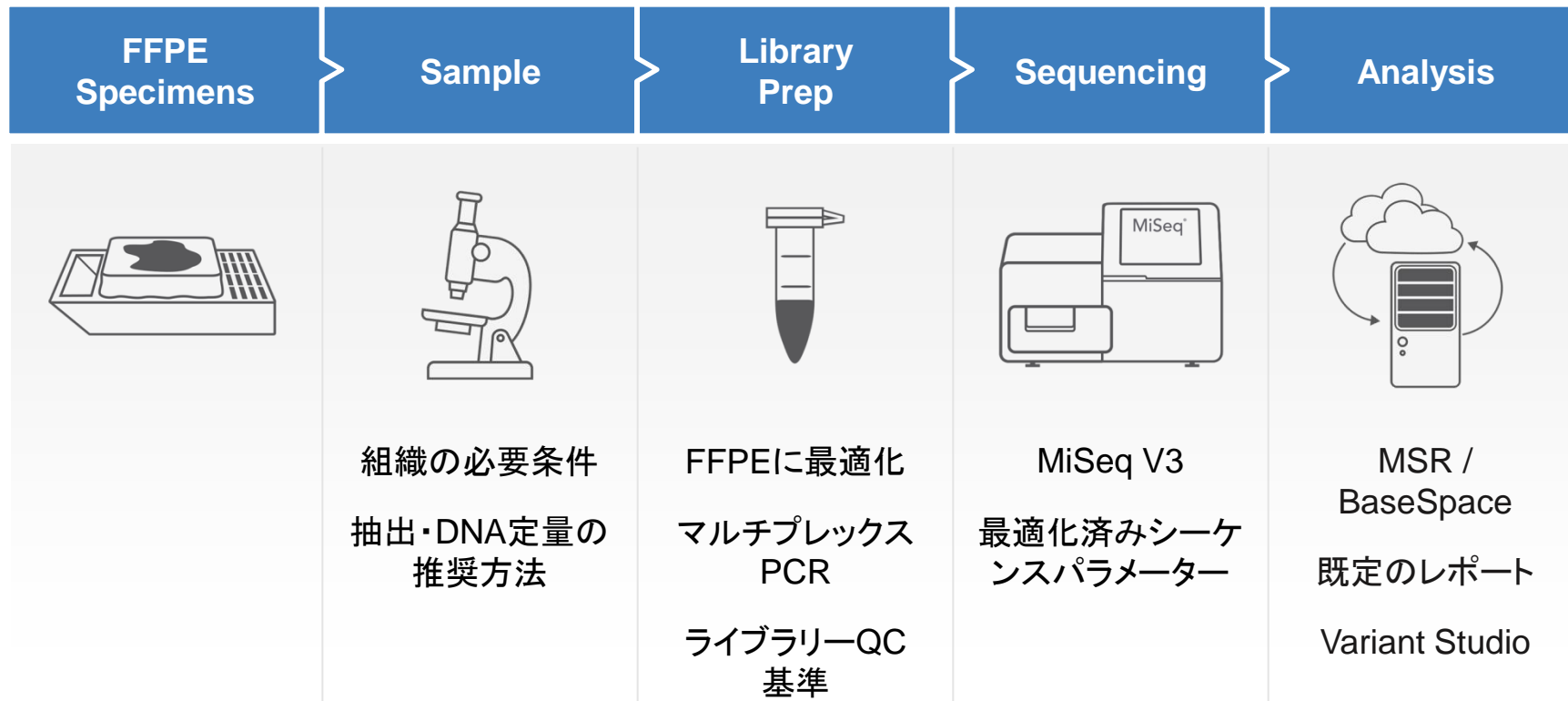
illumina®

本日のトピック

- 製品概要とコンセプト
- 実験時の注意点とポイント
- 解析ツールのご紹介とポイント

TruSight Tumor 15

サンプルから結果までのワークフローソリューション



ライブラリー調製だけでなく、トータルソリューションの提供が可能に

TruSight Tumor 15 標的遺伝子リスト

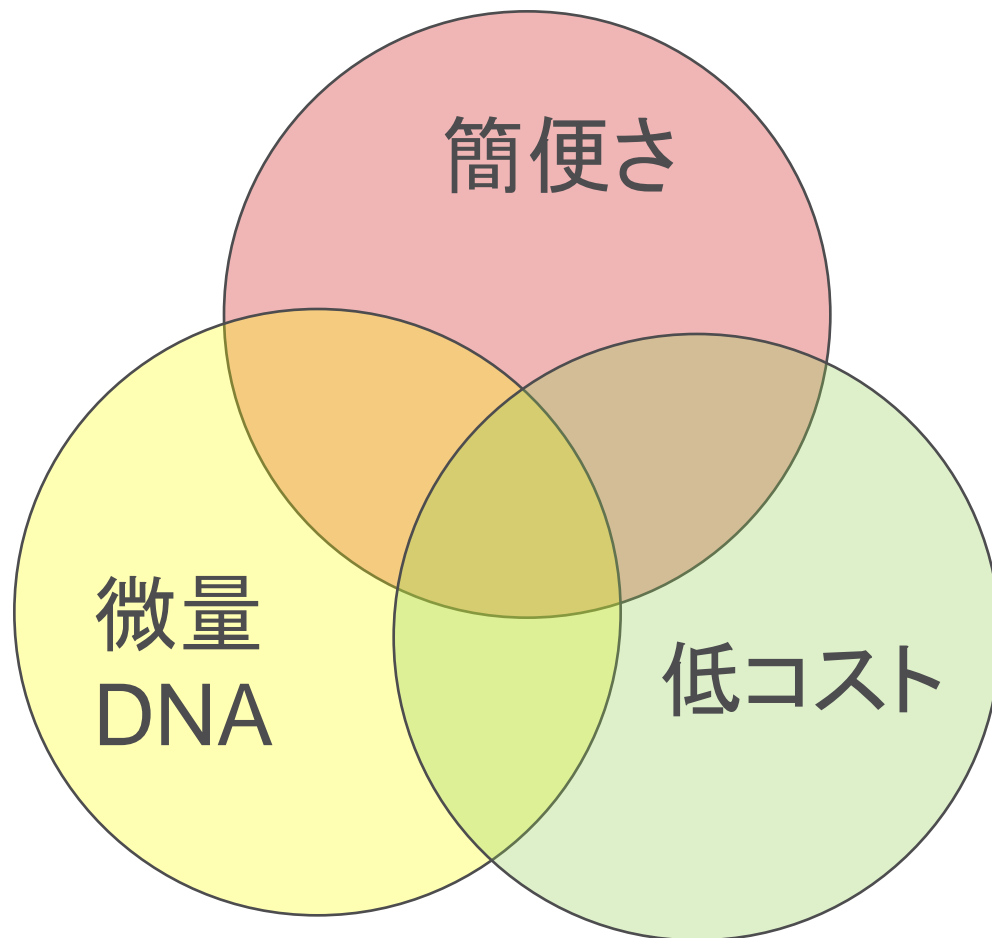
- CAP (College of American Pathologists : 米国臨床病理医協会) 臨床検査施設の精度管理面で世界的権威
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network : 米国総合癌センターネットワーク) 全米を代表とする 21 のがんセンターで結成されたガイドライン策定組織

製品コンセプト

- **Gene content:** 業界ガイドライン (NCCN, CAP)、オピニオンリーダー、製薬企業の意見等に沿って選定
- **Relevance:** 最もがん研究で着目されることの多い遺伝子を対象とした解析
- **Focused:** 対象領域を絞った解析で検体からデータ取得までを迅速に実現

Gene	Associated Cancers	Target
AKT1	Breast	E17K
BRAF	Melanoma*, Colon* Lung	VK600E/K/R/M
EGFR	Lung*	Exon 19, 20, 21(L858R), G719A/X, S7681, T790M, L861Q
ERBB2	Breast, Lung	A775_G776insYVMA
FOXL2	Ovary	C134W
GNA11	Melanoma	Q209L
GNAQ	Melanoma	Q209L
KIT	Gastric, Melanoma*	Exons 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18
KRAS	Colon*, Gastric, Lung*	Codons 12, 13, 59, 61, 117, 146
MET	Lung*, Colon, Gastric	Focal Amplification
NRAS	Colon*	Codons 12, 13, 59, 61, 117, 146
PDGFRA	Gastric, Melanoma	Exons 12, 14, 18
PIK3CA	Lung, Breast, Prostate	Exons 9, 20
RET	Lung*	M918T
TP53	Lung, Melanoma, Ovary, Colon	Full CDS

TruSight Tumor 15 の特徴



TruSight Tumor 15

製品概要

Option #1 (MiSeqユーザー向け)

TruSight Tumor 15 バンドル

カタログ番号 OP-101-1001
定価 749,000円

1 Library Prep (24サンプル分)

& 3 MiSeq v3 600 Cycle Kits (3キット)

ライブラリー調製とシーケンス合わせて31,209円
/ サンプル

Total “All-In” = サンプル単価 31,209円

Option #2 (全装置ユーザー向け)

TruSight Tumor 15 ライブラリー調製のみ

カタログ番号 OP-101-1002
定価 450,000円

1 Library Prep (24サンプル分)

ライブラリー調製のみで
18,750円 / サンプル

TruSight Tumor 15

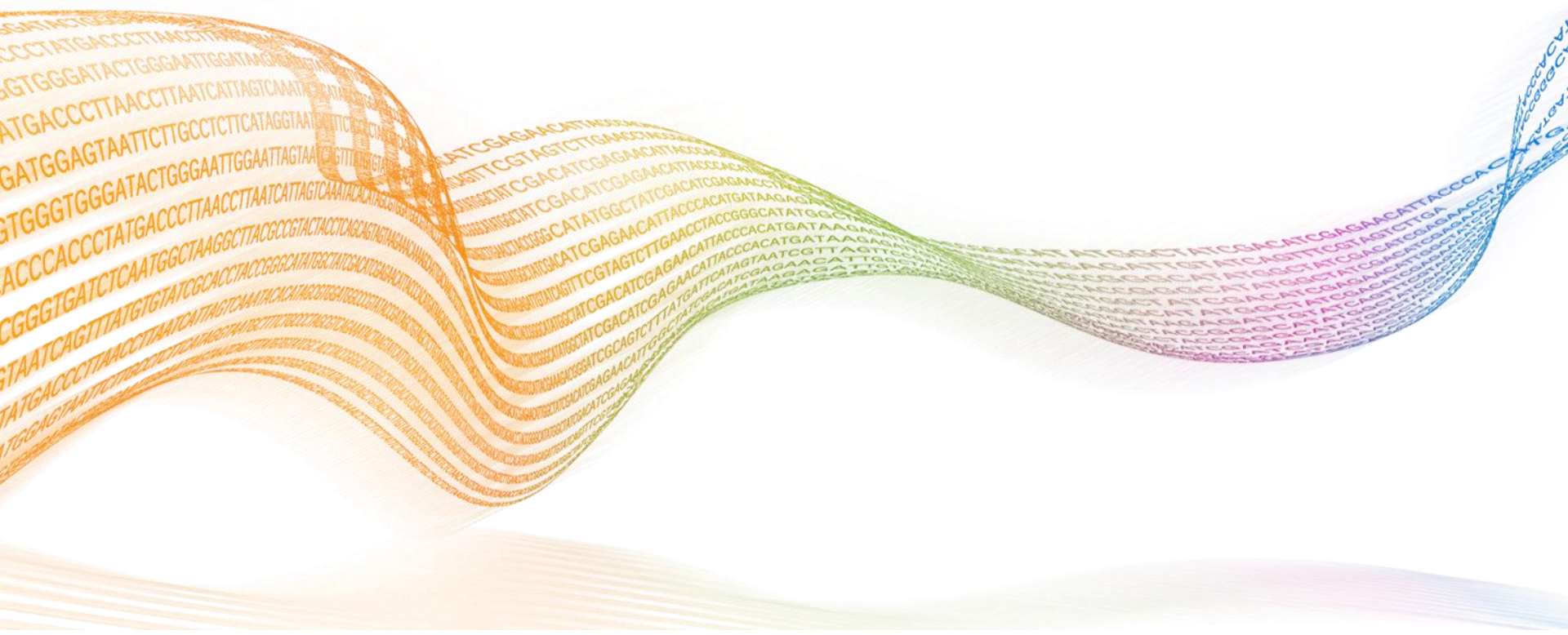
製品仕様



少量インプット (20 ng) から、
5%以上の頻度のバリエーションを、
8検体同時にスクリーニング

パラメーター	DETAIL
DNAインプット量	20 ng
パネルサイズ (標的領域全長)	44 kb
アンプリコンサイズ (* アダプターサイズ部分は含まない)	~150-175 bp
コンテンツ	~250 アンプリコン
ライブラリー調製時間	7 時間, 3.5 時間ハンズオンタイム
シーケンスラン時間	27 時間 (MiSeq、MiniSeq システム)
シーケンスラン	151 × 2 bp
スループット	8 検体を1ランで解析 (MiSeq v3試薬)
想定しているバリエーションの検出感度	5% まで
カバレッジ	≥ 97% の塩基が ≥ 500× でシーケンスされること

実験ワークフローとポイント

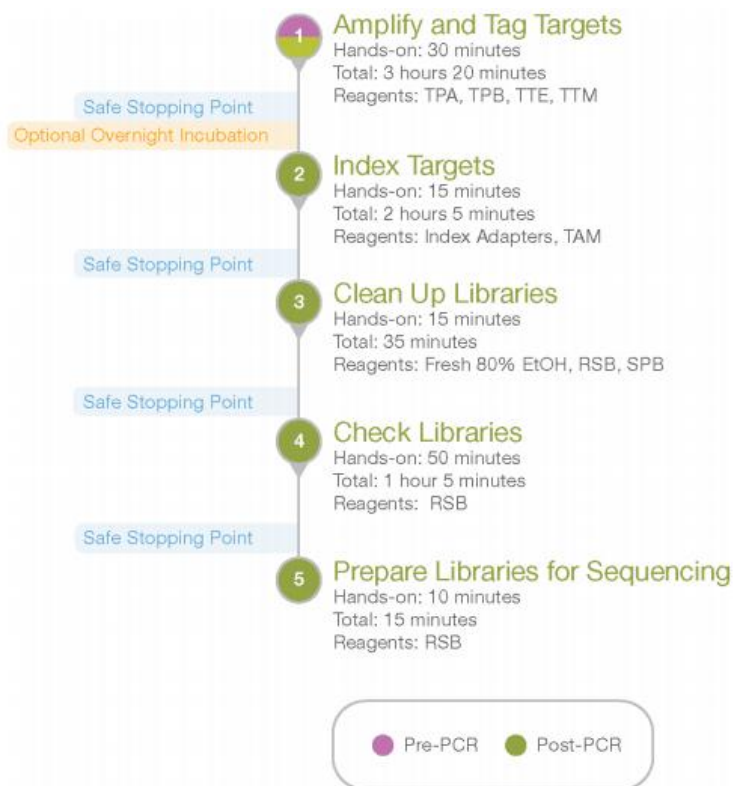


TruSight Tumor 15

ライブラリー調製ワークフロー



5ステップで簡単に調製



① 標的領域に対するマルチプレックスPCR
(~3時間)

② PCRでアダプターとインデックス付加 (~1時間)

③ 磁気ビーズで精製 (~ 30分間)

④ ライブラリーの品質チェック (~ 30分間)

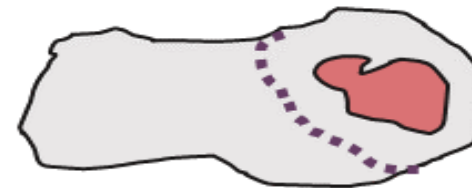
⑤ シーケンスの準備 (~ 30分間)

0. インプットDNAの準備

- FFPE検体の場合は推奨キットでDNAを抽出
(溶出はヌクレアーゼフリー水を勧める)
 - AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN)
 - QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN)
 - ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega)

FFPE検体の準備

- ミクロトームでの薄切後、 $\geq 140 \text{ mm}^2$ を利用 (非メラノーマ組織)
- 腫瘍部を30%以上含むこと

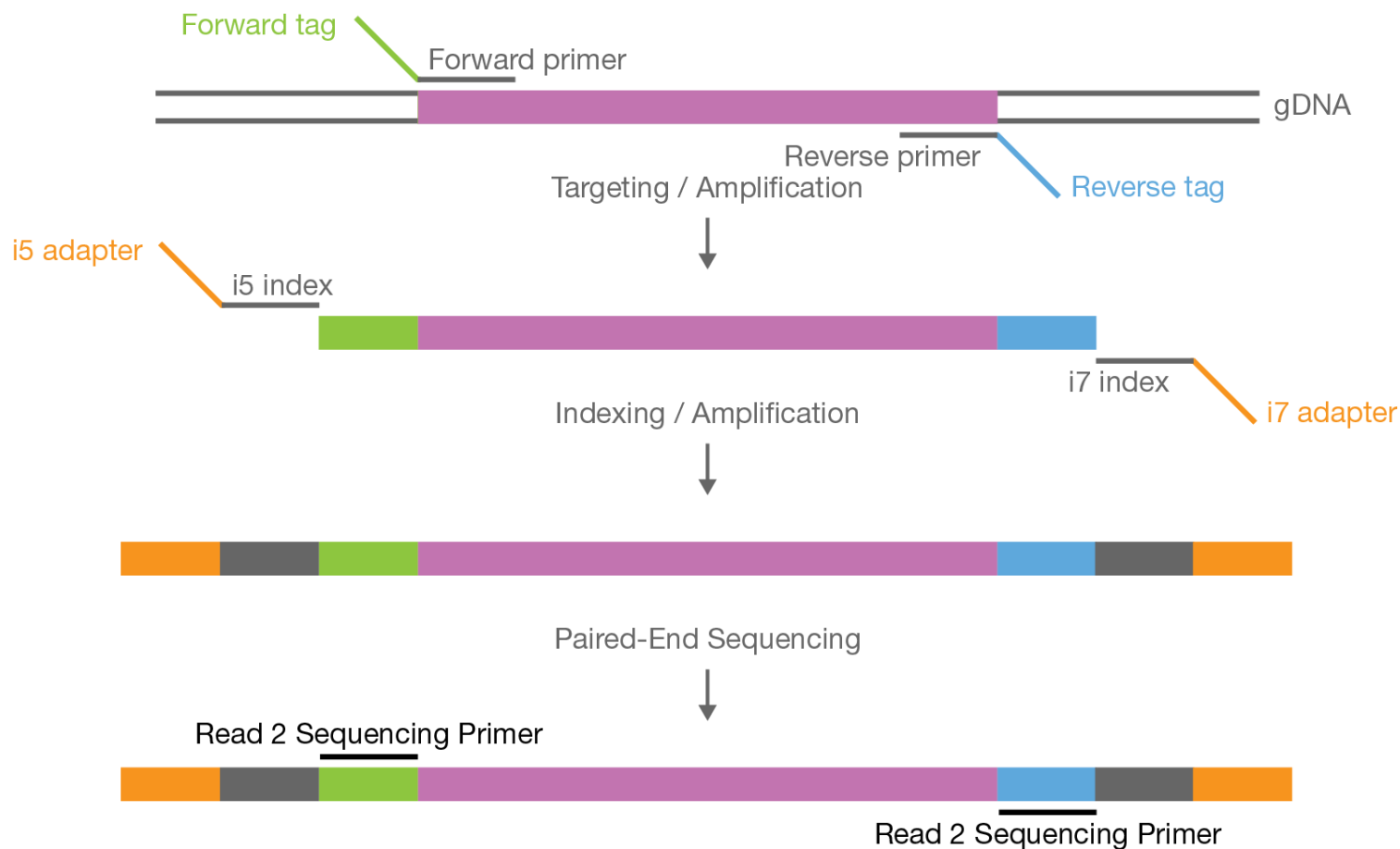


DNAの定量と準備

- 抽出後のDNA濃度を二重鎖DNA特異的な蛍光定量法(AccuClear、Qubit、Picogreenなど)で測定
- 2 ng/ μL 以上の濃度が確保できること * 濃度調整はヌクレアーゼフリー水で行う
- 体積10 μL 以上 (2ng/ μL で10 μL 、計20 ng以上) を準備

TruSight Tumor 15

マルチプレックスPCR

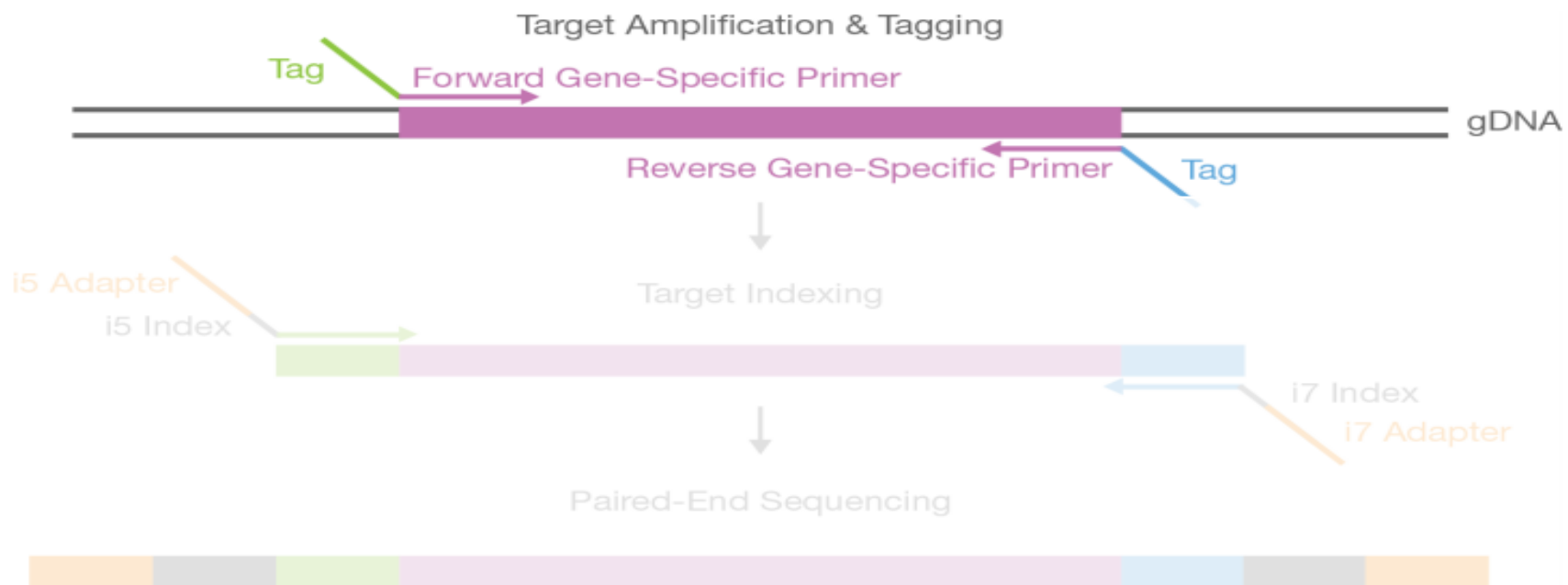


* プライマー、酵素は全てキットに同梱

1. Amplify and tag targets

1 Amplify and Tag Targets
Hands-on: 30 minutes
Total: 3 hours 20 minutes
Reagents: TPA, TPB, TTE, TTM

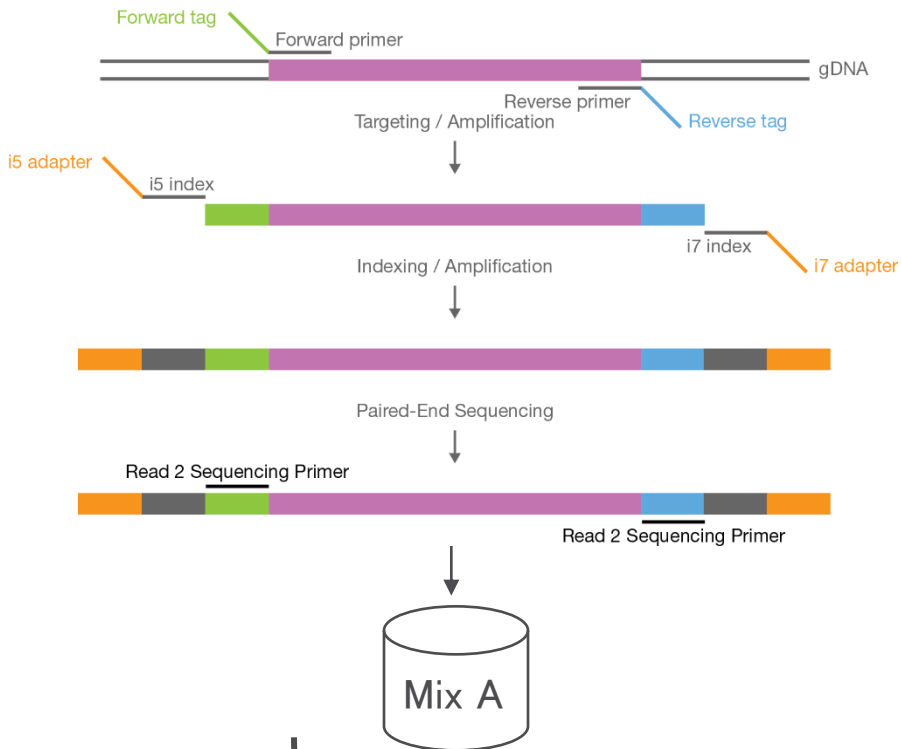
① 標的領域に対するマルチプレックスPCR (~3時間)



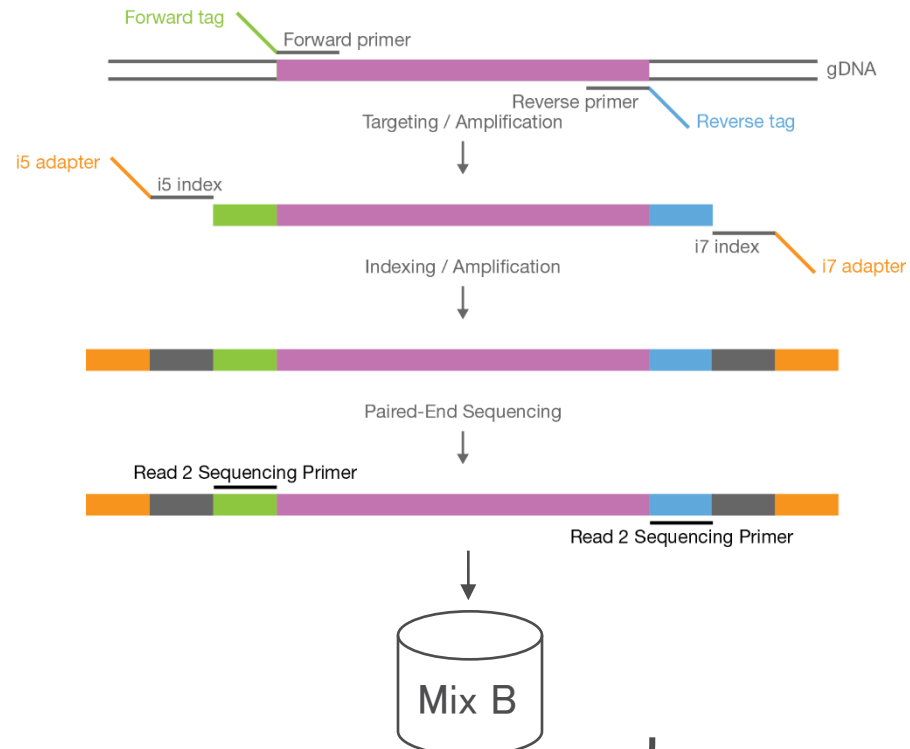
TruSight Tumor 15

マルチプレックスPCR

TPA: 135アンプリコン



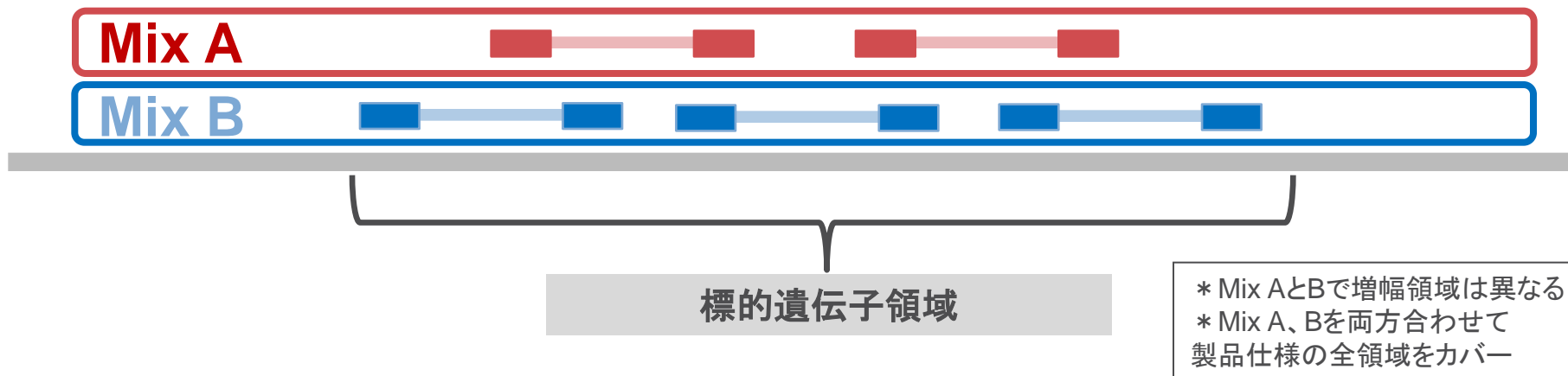
TPB: 118アンプリコン



1サンプルにつき2ライブラリーを作製: Pool A & Pool B
(専用データ解析ワークフローが結果を統合)

1. Amplify and tag targets

1 Amplify and Tag Targets
Hands-on: 30 minutes
Total: 3 hours 20 minutes
Reagents: TPA, TPB, TTE, TTM



2種類のプライマー (Mix A、およびMix B)で標的遺伝子を増幅

利用試薬(Box 1):

- TruSight Tumor Targeting Mix (TTM) : PCRバッファー
- TruSight Tumor Targeting Enzyme (TTE) : 酵素
- TruSight Tumor Primer Mix A (TPA) : プライマーミックスA
- TruSight Tumor Primer Mix B (TPB) : プライマーミックスB



1. Amplify and tag targets



Amplify and Tag Targets

Hands-on: 30 minutes

Total: 3 hours 20 minutes

Reagents: TPA, TPB, TTE, TTM

！！注意！！

サーマルサイクラーの温度設定が特殊なので、ユーザーガイドに沿って設定する
通常利用時よりもかなり遅い温度変化速度(所要時間 ~ 3時間)

3 Save the following program as TST15 PCR1 on a thermal cycler with a heated lid.
The TST15 PCR1 program requires specific ramp rate settings. See *Thermal Cyclers* on page 26.

- ▶ Choose the preheated lid option and set to 102°C
- ▶ 98°C for 3 minutes
- ▶ 16 cycles of:
 - ▶ 96°C for 45 seconds
 - ▶ 70°C for 1 minute
 - ▶ 54°C for 3 minutes
 - ▶ 72°C for 15 seconds
- ▶ 72°C for 5 minutes
- ▶ Hold at 10°C

Thermal Cyclers

Thermal Cycler	TST PCR1 Estimated Run Time	TST PCR1 54°C and 72°C Cycle Steps Ramp Rate*	
Bio-Rad C1000 Thermal Cycler	3:08:02	Down	0.1 °C/s
		Up	0.1 °C/s
Bio-Rad S1000 Thermal Cycler	3:51:52	Down	0.1 °C/s
		Up	0.1 °C/s
Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	2:55:00	Down	7%
		Up	7%
Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	3:06:00	Down	4.5%
		Up	4.0%
Eppendorf Mastercycler ep Gradient	3:14:00	Down	6%
		Up	4%
Eppendorf Mastercycler ep Gradient-5	2:50:00	Down	2%
		Up	2%



Down:

70°C for 1 min -> 54°C for 3 min

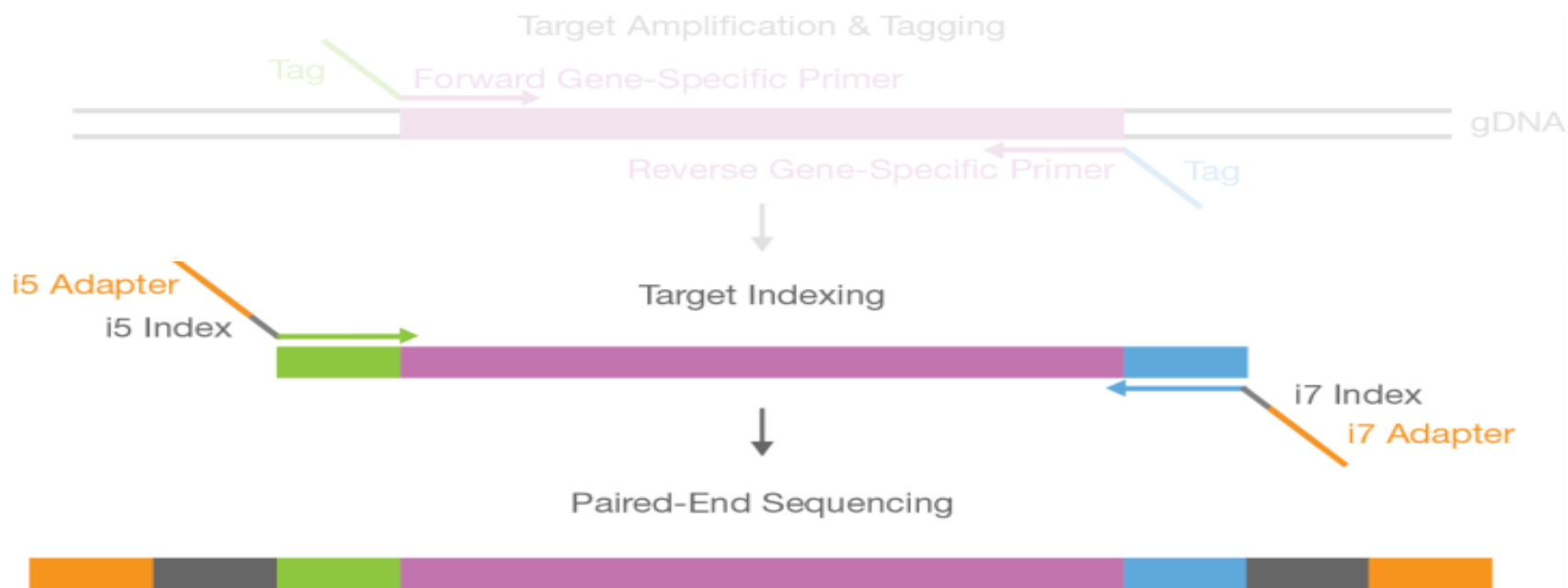
Up:

54°C for 3 min -> 72°C for 15 seconds

2. Index Targets

2 Index Targets
Hands-on: 15 minutes
Total: 2 hours 5 minutes
Reagents: Index Adapters, TAM

②PCRでアダプターとインデックス付加 (~1時間)



2. Index Targets

2 Index Targets
Hands-on: 15 minutes
Total: 2 hours 5 minutes
Reagents: Index Adapters, TAM

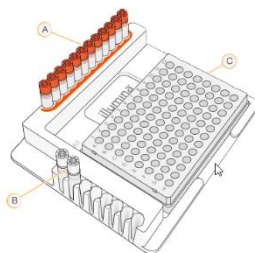
- 増幅したPCR産物にイルミナシーケンサー用のアダプターを付加
- 精製操作を挟まず、PCR産物に試薬を追加するだけ
- アダプターにはサンプル区別のためのバーコード(インデックス)も含まれる

利用試薬 (Box 2: -20°C、一番大きい箱)

- Tumor Amplification Mix (TAM) : PCRマスターミックス
- Index 1 (i7) + **オレンジキャップ** : インデックスプライマー (黄色)
- Index 2 (i5) + **白色キャップ** : インデックスプライマー (透明)

(別途準備)

TruSeq Index Plate Fixture



Save the following program as TST15 PCR2 on a thermal cycler with a heated lid.

- Choose the preheated lid option and set to 102°C
- 98°C for 30 seconds
- 17 cycles of:
 - 98°C for 20 seconds
 - 60°C for 30 seconds
 - 72°C for 45 seconds
- 72°C for 5 minutes
- Hold at 10°C

特殊な設定は無いので、通常通りPCRを実施



3. Clean Up Libraries

3

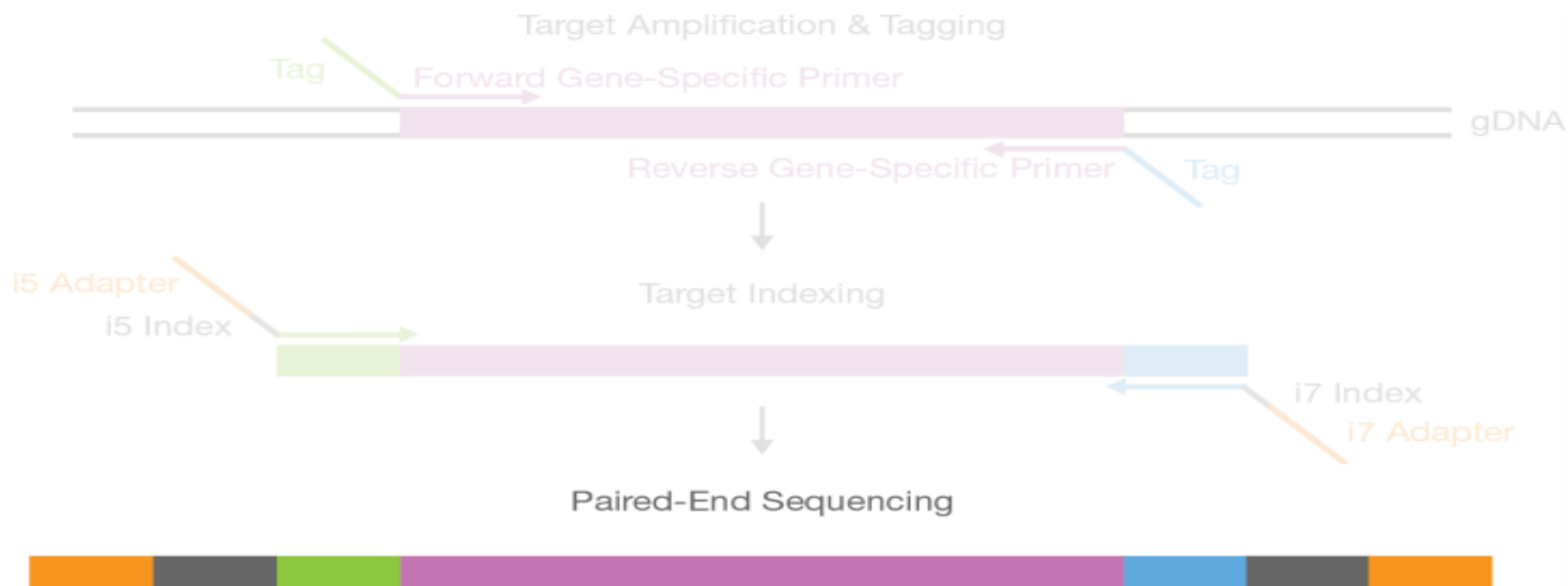
Clean Up Libraries

Hands-on: 15 minutes

Total: 35 minutes

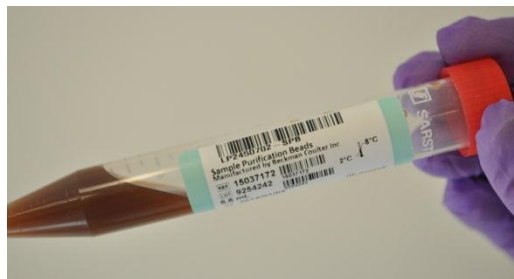
Reagents: Fresh 80% EtOH, RSB, SPB

③磁気ビーズで精製 (~ 30分間)



3. Clean Up Libraries

- 反応溶液中の不要な分子を除去
- ライブラリーのみ回収



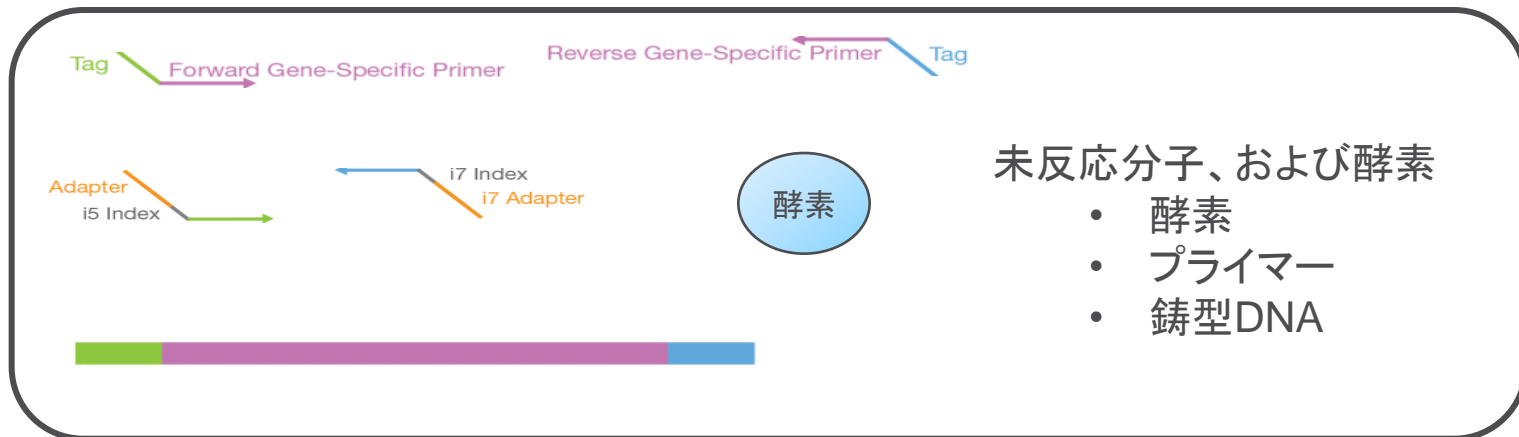
3

Clean Up Libraries

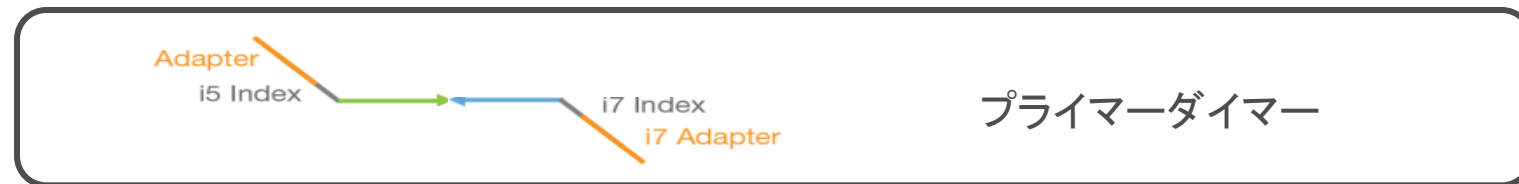
Hands-on: 15 minutes

Total: 35 minutes

Reagents: Fresh 80% EtOH, RSB, SPB



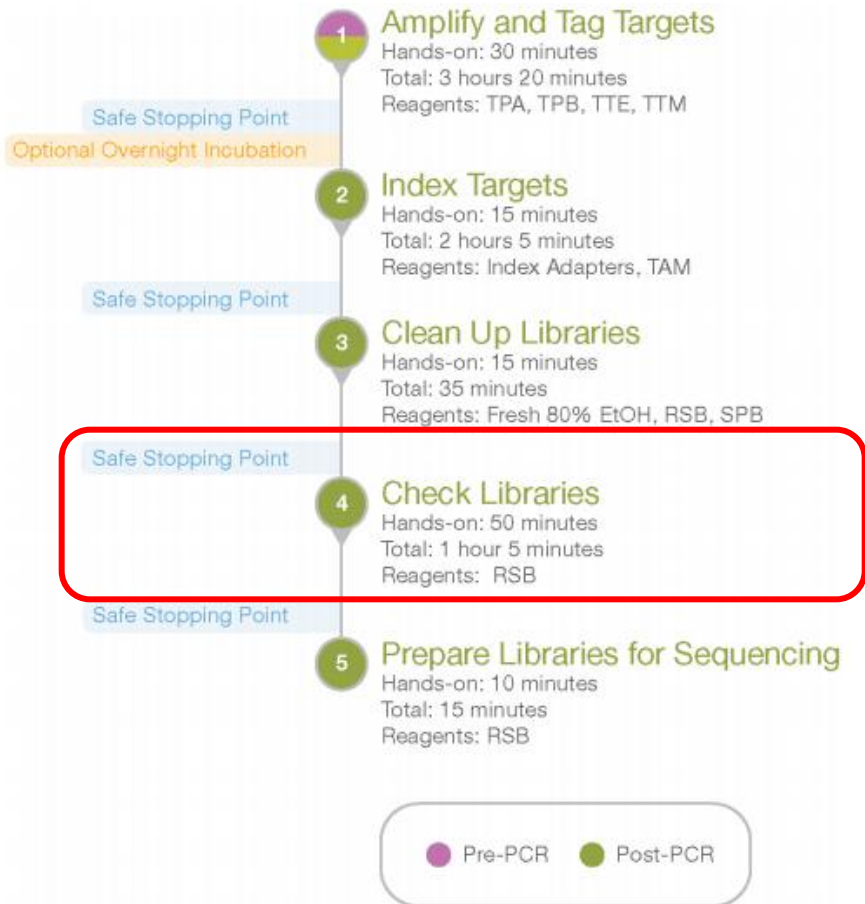
除去



回収

4. Check libraries

4 Check Libraries
Hands-on: 50 minutes
Total: 1 hour 5 minutes
Reagents: RSB



④ライブラリーの品質チェック (~ 30分間)

4. Check libraries

- 評価項目はライブラリー濃度と品質の2種類

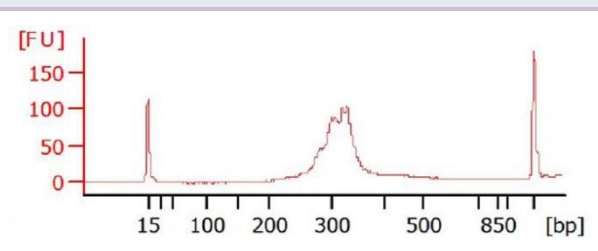


ライブラリー濃度

- 推奨されたライブラリー濃度 (20 ng/ul) を越えているか
- 二重鎖DNAに特異性のある蛍光定量法 (AccuClear、Qubit、Picogreenなど) で測定
- Mix A、B共に20 ng/ulを越えれば基準を満たす

ライブラリー品質

- サイズとアーティファクト残留の有無
- 目標サイズ (~350-bp)でライブラリーが得られたか
- プライマーダイマー (~150bp)が過剰に形成されていないか



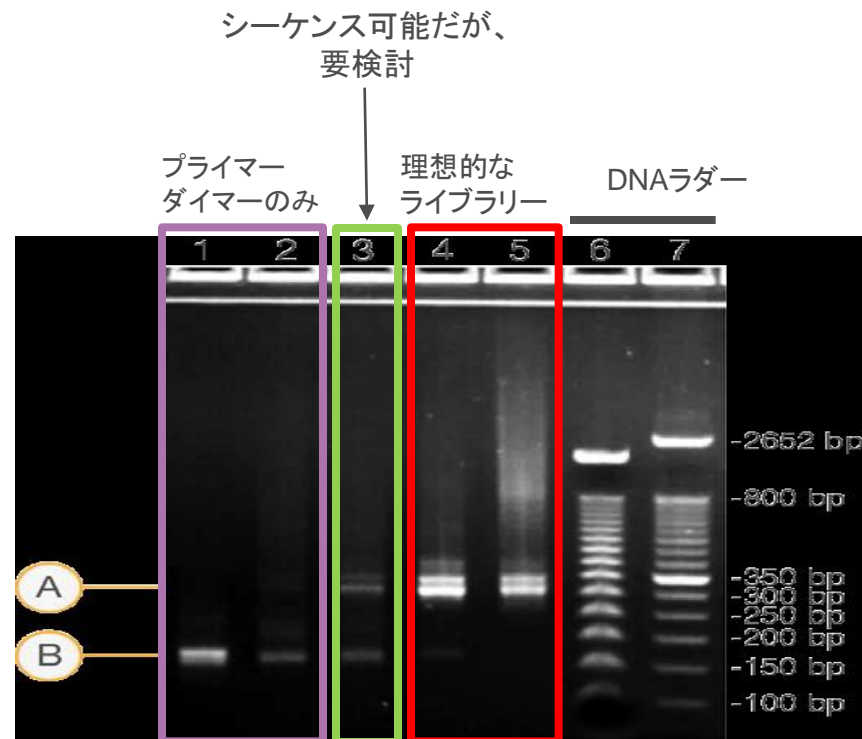
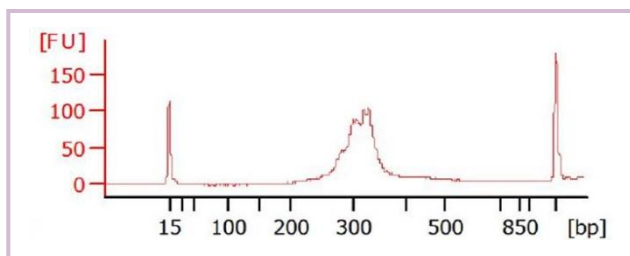
4. Check libraries

~350-bp付近に増幅産物が見られることを確認する
(2%アガロースゲル or BioAnalyzer相当品)

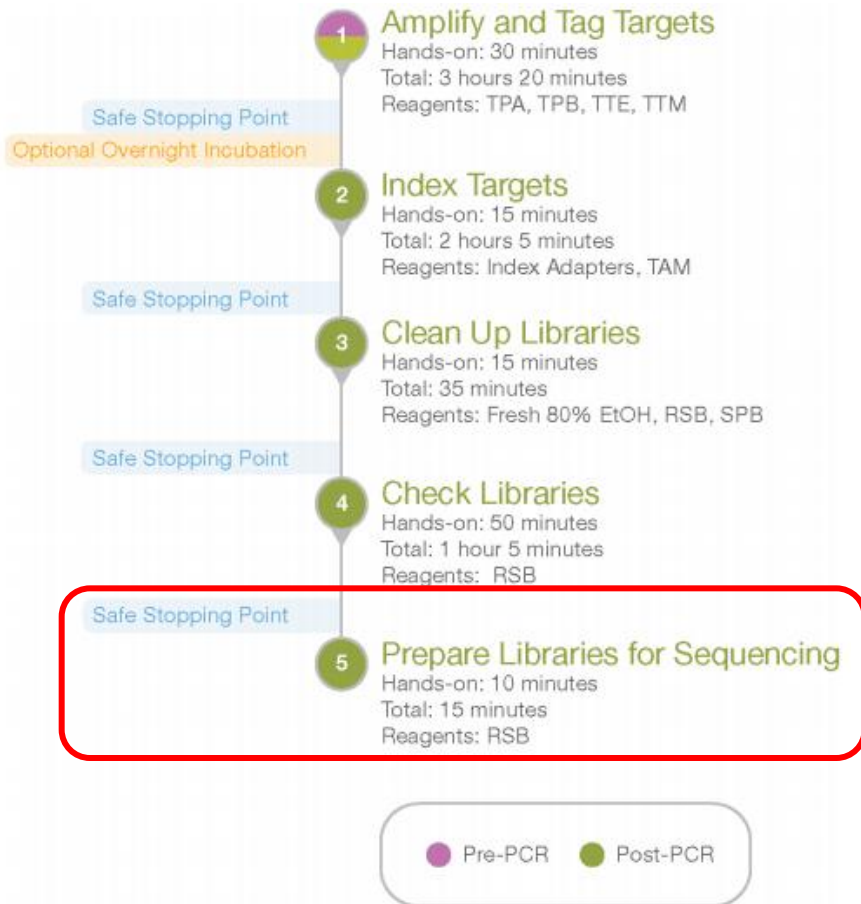
Non-Template Control (ネガティブコントロール)では
プライマーダイマーのみ顕著に見られる

ライブラリー収量が20 ng/ μ lを下回ったライブラリーは
シーケンス対象にしないことを勧める。

- ・シーケンスを希望する場合は、アダプターダイマーのみでないことを確認してから実施



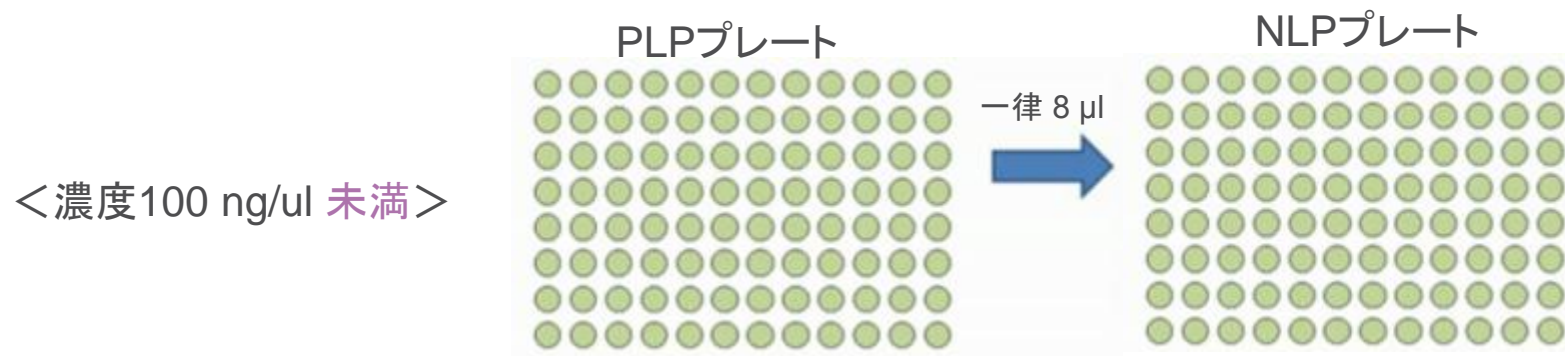
5. Prepare Libraries for Sequencing



⑤シーケンスの準備 (~ 30分間)

5. Prepare Libraries for Sequencing

- 取得ライブラリーの濃度を一律 **5 ng/ul** に希釈
- ライブラリー濃度が100 ng未満の場合はプレート (NLPプレート)、100 ng/ulを超えた場合は1.5 mlチューブ (NLPチューブ) での希釈を推奨



5. Prepare Libraries for Sequencing

- 取得ライブラリーの濃度を一律 **5 ng/ul**に希釈
- ライブラリーごとに以下の流れに沿って操作:

1. 計算式 $C1V1 = C2V2$ に各数値を入力してV2の数値を計算

C1: ライブラリー定量値

V1: 希釈に利用するライブラリー体積 → **8 μl**で固定

C2: 希釈後のライブラリー濃度 → **5 ng/μl**で固定

V2: 希釈後のライブラリー体積

2. $(V2 - 8 \mu\text{l})$ を計算する → 希釈に必要なバッファー量の見積もり

3. $(V2 - 8 \mu\text{l})$ の希釈バッファーを希釈用のプレート、あるいはチューブに分注

4. ライブラリー8 μlを希釈バッファーと混合

Ex. 定量値 50ng/ulのライブラリーの場合:

1. $C1V1 = C2V2$ を計算

$$50 \times 8 = 5 \times V2 \Rightarrow V2 = 80 \mu\text{l}$$

2. $(V2 - 8 \mu\text{l})$ を計算

$$80 \mu\text{l} - 8 \mu\text{l} = 72 \mu\text{l}$$

3. 72 μlの希釈バッファーを希釈用のプレートに分注

4. ライブラリー8 μlを希釈バッファーと混合

5. Prepare Libraries for Sequencing

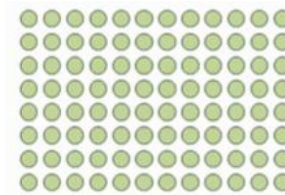
ライブラリー濃度を一律 5 ng/ulに調整

シーケンス予定のライブラリーを一律 4 μ lずつ
PNLチューブに入れる

PNLチューブの中身9 μ lをDNLチューブに移し、
RSBバッファ 41 μ lと混合

使用するシーケンス装置の利用手順に沿って希釈・変性

シーケンス実施 (2x151ペアエンド)



NLPプレート
(5 ng/ul、
ライブラリーごとに分かれている)



PNLチューブ
(5 ng/ul、ライブラリープール)



DNLチューブ
[0.9 ng/ul (~4 nM)、ライブラリープール]

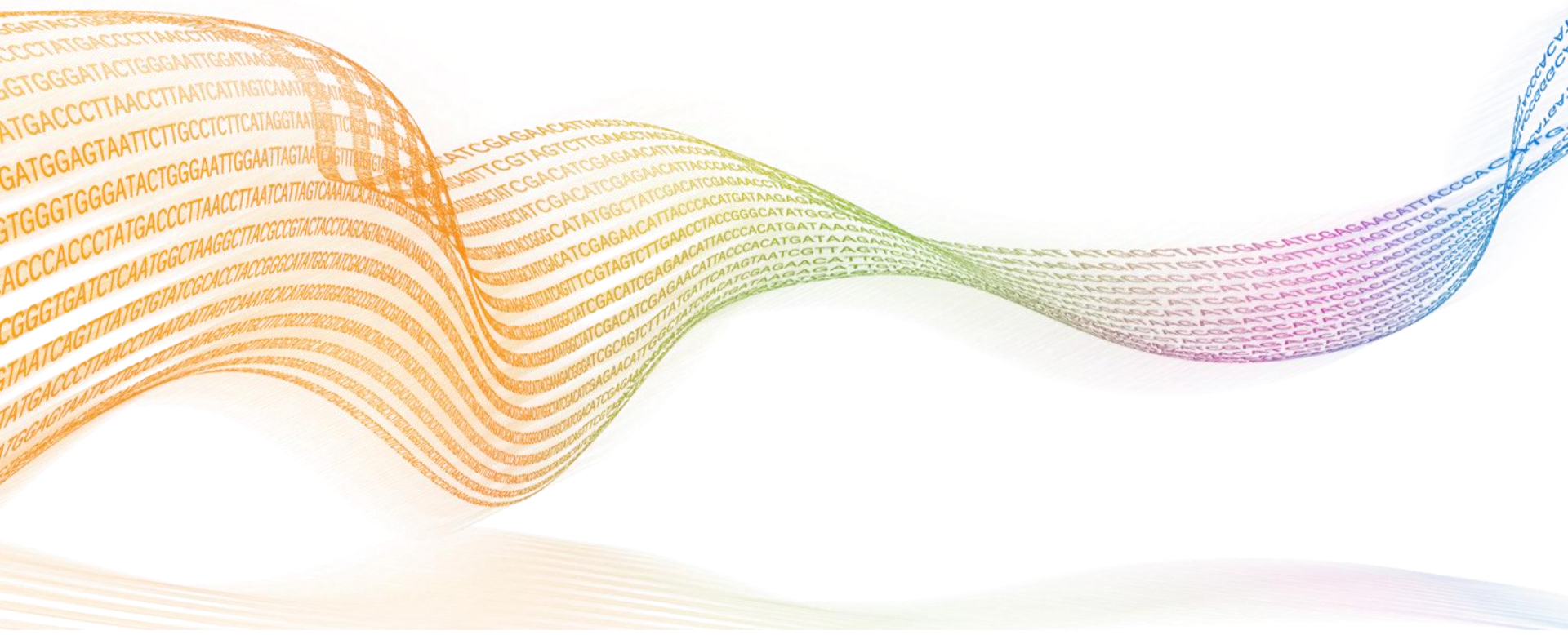


TruSight Tumor 15

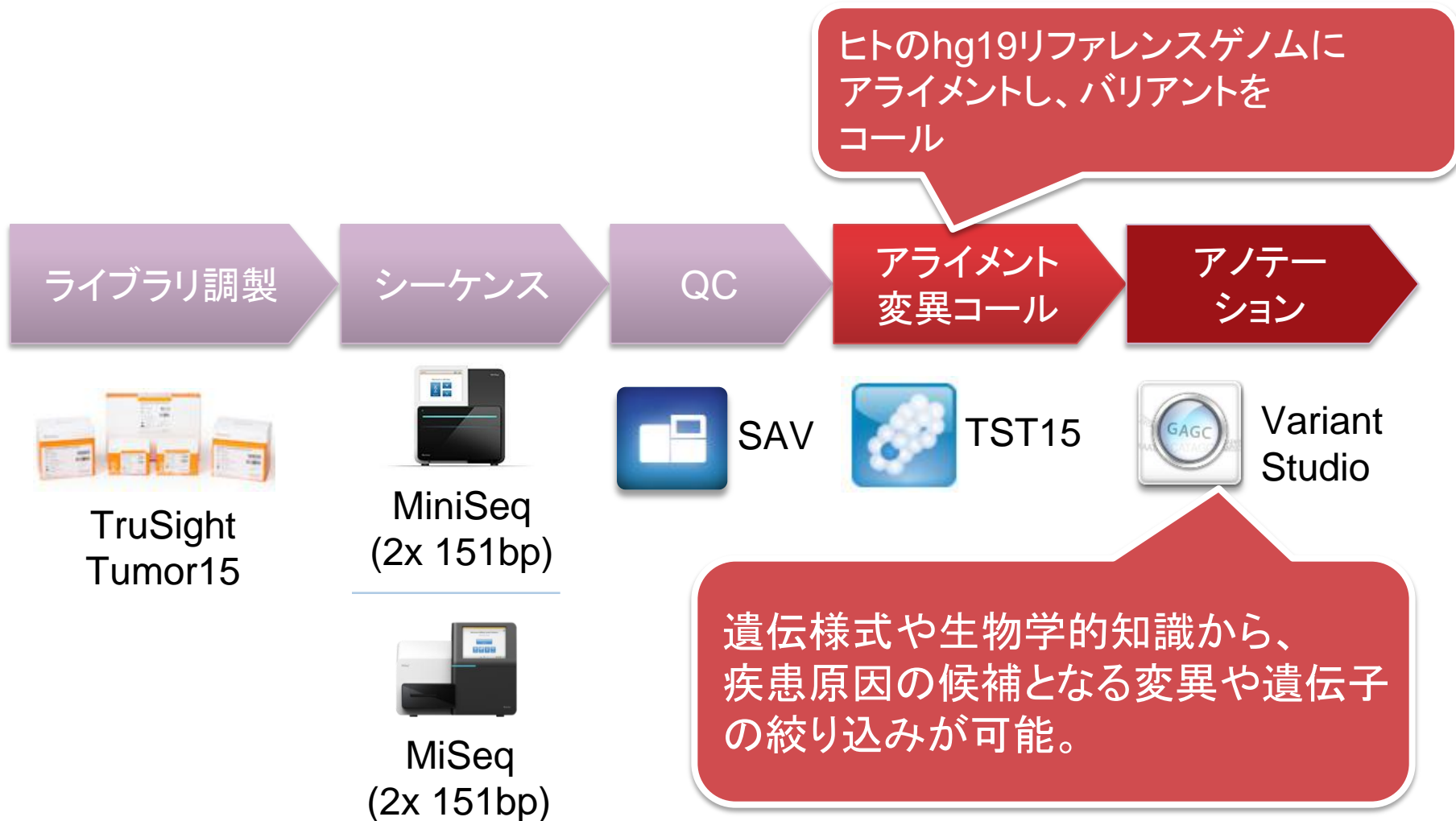
品質チェック (QC)方法 のまとめ

ステップ	QC手法	QC項目
FFPE検体の準備	マイクロームでの薄切	≥ 140 mm ² (非メラノーマ組織)を利用 腫瘍部を30%以上含むこと
DNAの抽出と準備	抽出後のDNA濃度を二重鎖DNA特異的な蛍光定量法で測定	2 ng/μL以上の濃度が確保できること
ライブラリー調製	最終ライブラリー収量を二重鎖DNA特異的な蛍光定量法で測定	20 ng/μL以上の収量が得られていること
	ライブラリーのサイズ確認(ネガティブコントロール以外)	~350bpのサイズの断片が確認できること
シーケンス結果	レポートの確認	97%以上の塩基が x500以上のカバレッジで読まれていること

データ解析オプション



TruSight Tumor 15 解析ワークフロー

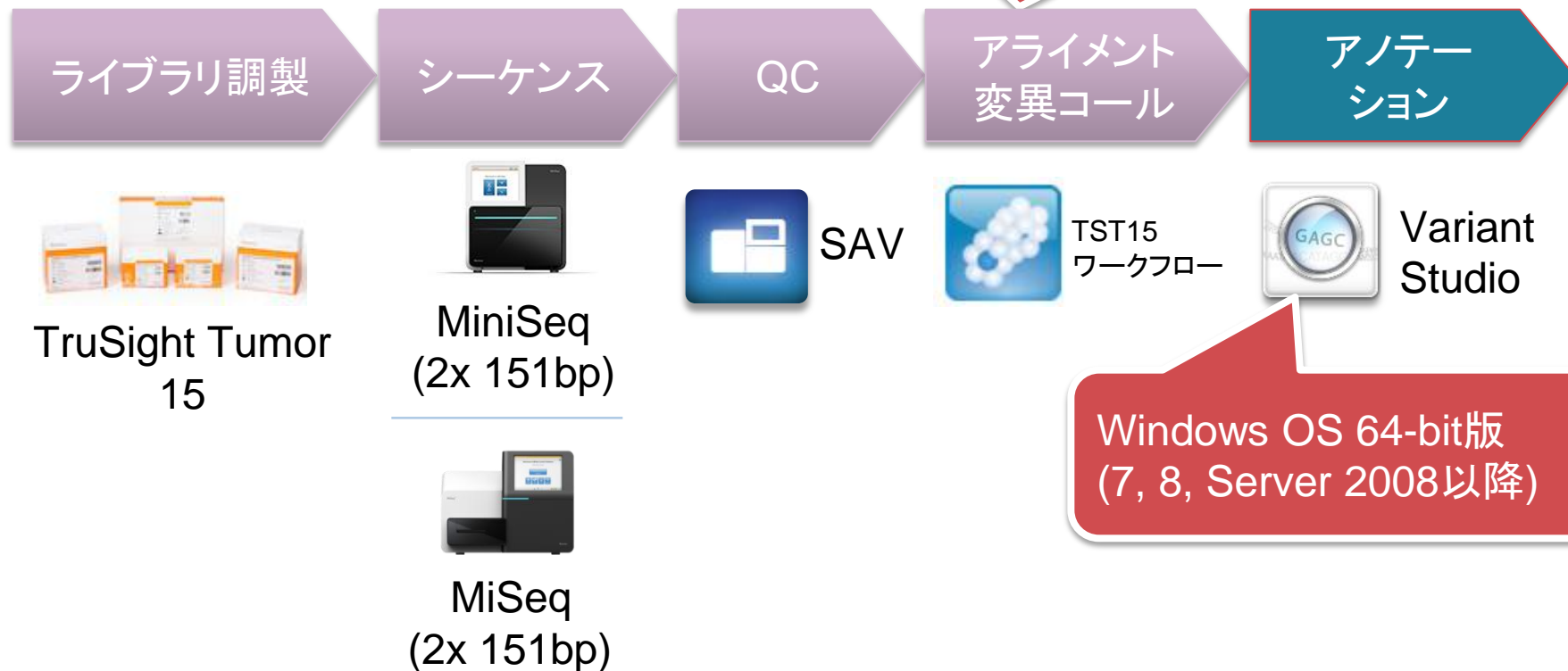


SAV:	Sequencing Analysis Viewer
TST15:	TruSight Tumor 15 Workflow / App

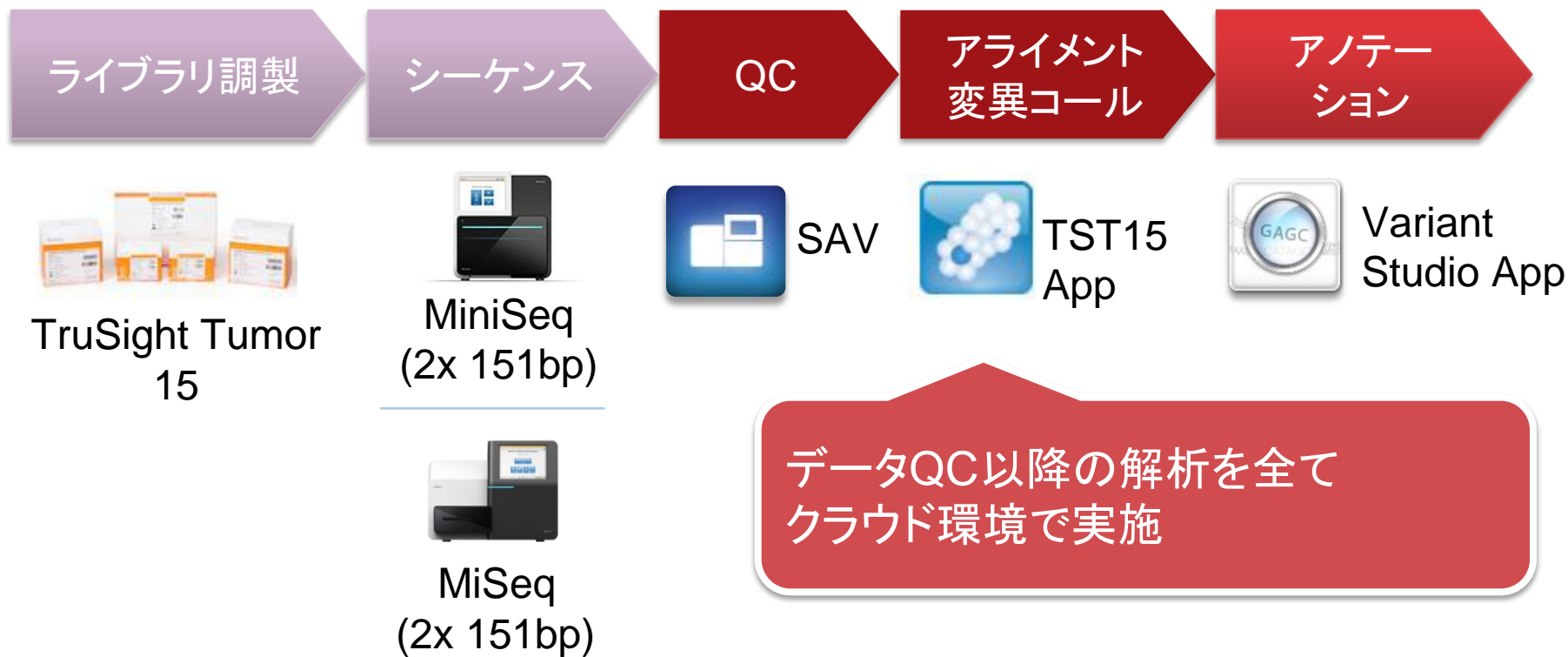
TruSight Tumor 15 解析オプション (#1: ローカル解析)



MiSeq Reporter (MiSeq)
Local Run Mager (MiniSeq)



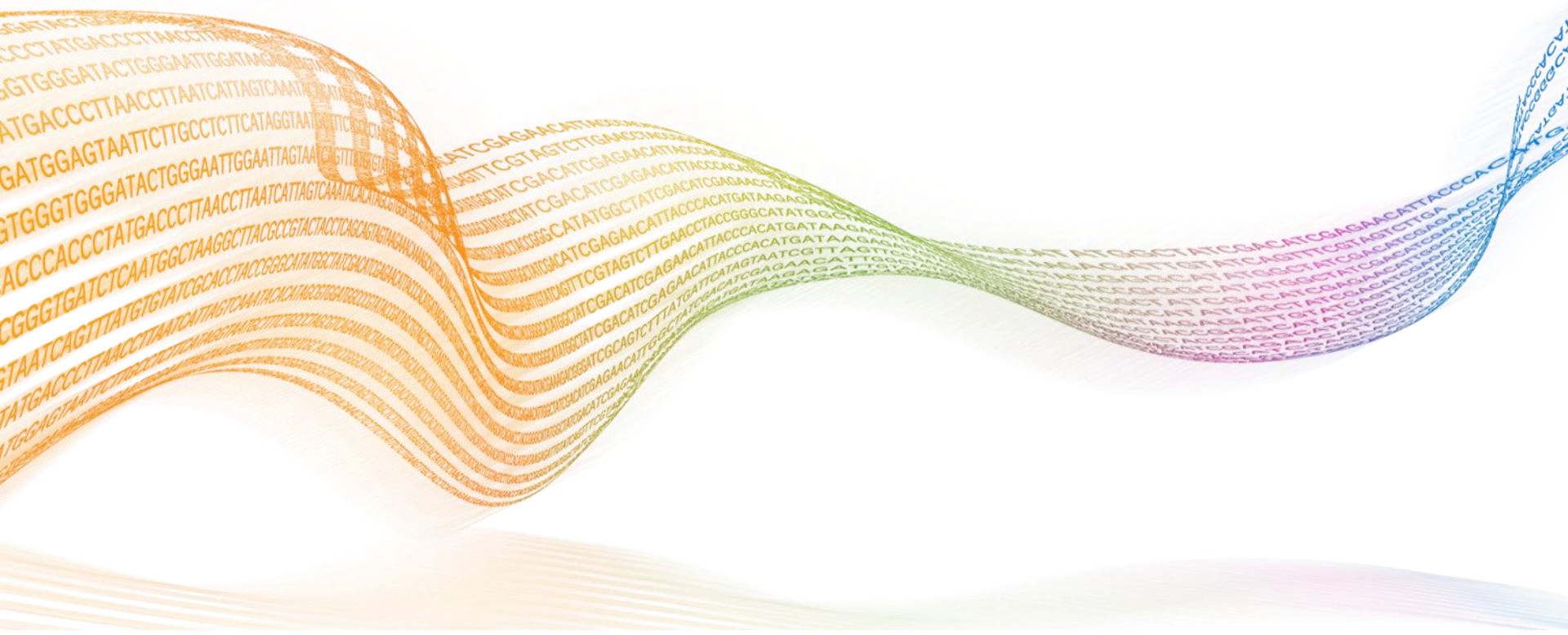
TruSight Tumor 15 解析オプション (#2: BaseSpace Cloud)



解析オプション#1:

ローカル解析

MiSeq Reporter / Local Run Manager



MiSeq Reporter / Local Run Manager

解析の流れ

➤ シーケンス以降、レポート作成まで自動で実施

ライブラリー作製

シーケンス

ライブラリー
ごとの結果

サンプル
ごとの結果

サンプル
ごとのレポート



- FASTQ
- BAM
- VCF

- gVCF

- VCF
- PDFレポート
- テキストレポート

MiSeq Reporter / Local Run Manager

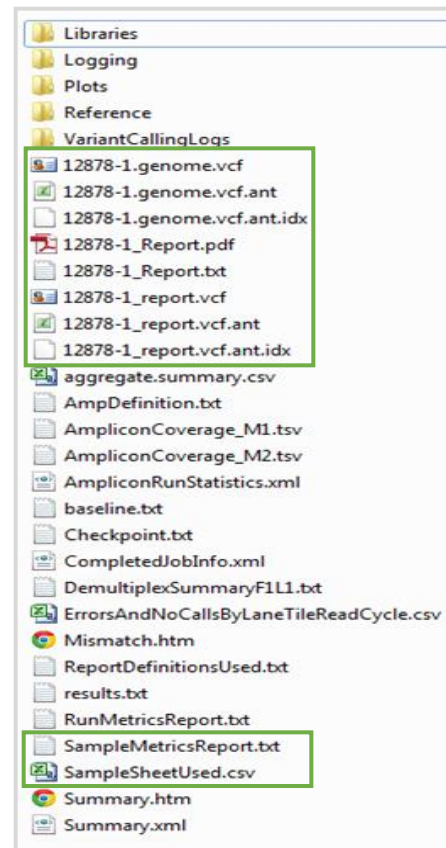
ワークフローレポートの確認

TST15ワークフロー特有の出カファイル

Run Metrics Report

Sample Metrics Report

Filtered gVCF File Report
• 1サンプル1ファイル



MiSeq Reporter / Local Run Manager

ワークフローレポートの確認

ファイル1: **RunMetricsReport.txt**



シーケンス情報を記載

- 日付
- 装置シリアル
- ソフトウェアバージョン
- パスフィルター後のリード数
- リードごとのQ30

Note:
あくまで**推奨値**であり、記載値は
スペックとは異なる

TruSight Tumor 15			
Run Metrics Report			
Report Date		7/23/2015	
Report Time		7:47 PM	
MiSeq Reporter Version	2.6.1.17		
MiSeq Control Software Version	2.6.0.11		
RTA Version	1.18.54		
Run Name	TST15_07062015		
Run ID	150714_M00806_0053_000000000-AGDJ2		
Instrument	M00806		
Sequencing Start Date		7/14/2015 0:00	
Sequenced By User	sbsuser		
Results			
Metric	Value		Guidelines

Reads PF (%)		85.5 >=	85
Q30+(R1)		91.6 >=	80
Q30+(R2)		84.8 >=	80

データ利用に当たっての**推奨値**を記載

MiSeq Reporter / Local Run Manager

ワークフローレポートの確認

▶ レポートファイル2: SampleMetricsReport.txt



- 1ランにつき1ファイル
- 全てのサンプル分の情報を含む
- 製品スペックとの比較情報を含む

TruSight Tumor 15					
Sample Metrics Report					
Report Date	10/23/2015				
Report Time	22:39				
		Coverage		On Target	
Results					
Sample Name	MixABases>=500x (%)	MixBBases>=500x (%)	MixAOnTarget (%)	MixBOnTarget (%)	
HDC749-Rep1	100	100	86.3	89	
HDC749-Rep2	100	100	87	89	
HDC749-Rep3	100	100	86.2	87.7	
HDC749-Rep4	100	100	86.2	88.1	
HDC749-Rep5	100	100	86.4	88.7	
HDC749-Rep6	100	100	86	91.7	
HDC749-Rep7	100	100	87.3	91.8	
HDC749-Rep8	100	100	86.8	91	

プライマーミックス AとBに分けて記載

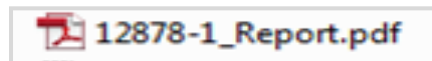
- 500x以上のカバレッジを持つ塩基の割合% (Coverage)
- 標的にアライメントされた塩基の割合 (On Target)

数値が**97**以上で
スペックイン

MiSeq Reporter / Local Run Manager

ワークフローレポートの確認

▶ レポートファイル3: Sample_Report.pdf



- サンプルごとにPDFのレポートが出力
- 809ヶ所の登録バリエーションに該当する結果があれば表示
- 解析基準に満たないバリエーションは No Calls として扱う

- 809ヶ所のバリエーションは編集(追加・削除)不可
- 解析結果はレポート(PDF or TXT)、もしくはVCFファイルから同一の内容が確認できる

以下の解析基準に満たないバリエーションは No Calls として扱う

- カバレッジ 500x 未満
- バリエーション頻度2.6%未満

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

TruSight® Tumor 15

HDC749-Rep1

Sample Name: HDC749-Rep1
Report Definition: TST_15-ReportDefinition-v1
Report Generated On: 2015-10-23 22:39

Variants identified as specified in the report definition

Detected SNVs, Insertions, and Deletions

Gene	Amino Acid Change	Variant Type	Nucleotide Change	Variant Frequency	Transcript
BRAF	p.Val600Glu	missense variant	c.1799T>A	0.123	ENST00000288602
EGFR	p.Gly719Ser	missense variant	c.2155G>A	0.254	ENST00000275493
EGFR	p.Leu858Arg	missense variant	c.2573T>G	0.044	ENST00000275493
KRAS	p.Gly13Asp	missense variant	c.38G>A	0.170	ENST00000256078
KRAS	p.Gly12Asp	missense variant	c.35G>A	0.061	ENST00000256078
NRAS	p.Gln61Lys	missense variant	c.181C>A	0.099	ENST00000369535
PIK3CA	p.Glu545Lys	missense variant	c.1633G>A	0.078	ENST00000263967
PIK3CA	p.His1047Arg	missense variant	c.3140A>G	0.186	ENST00000263967

No Calls

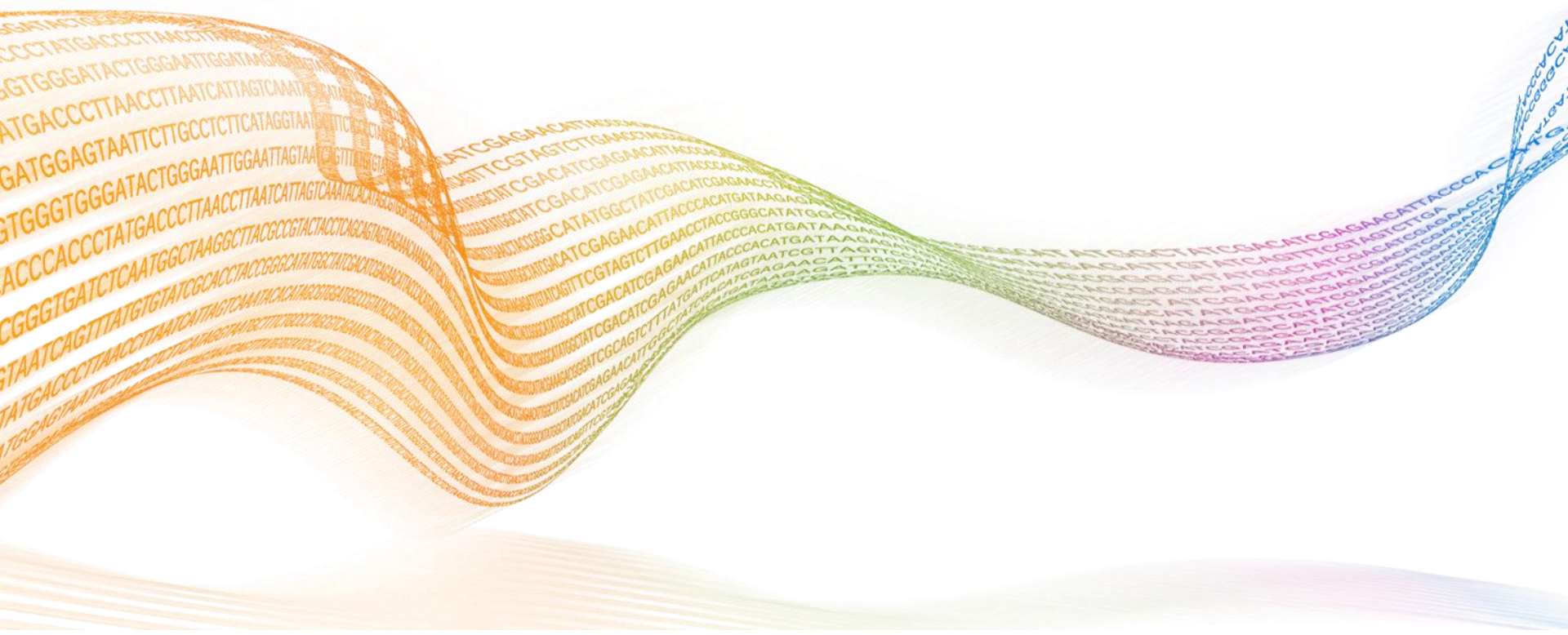
Gene	Chromosome	Coordinate	Failed Filter
EGFR	chr7	55242464	Low Variant Frequency
EGFR	chr7	55249071	Low Variant Frequency
TP53	chr17	7579650	Low Variant Frequency, Low Genotype Quality
TP53	chr17	7579666	Low Variant Frequency
TP53	chr17	7579684	Low Variant Frequency

MiSeq Reporter / Local Run Manager

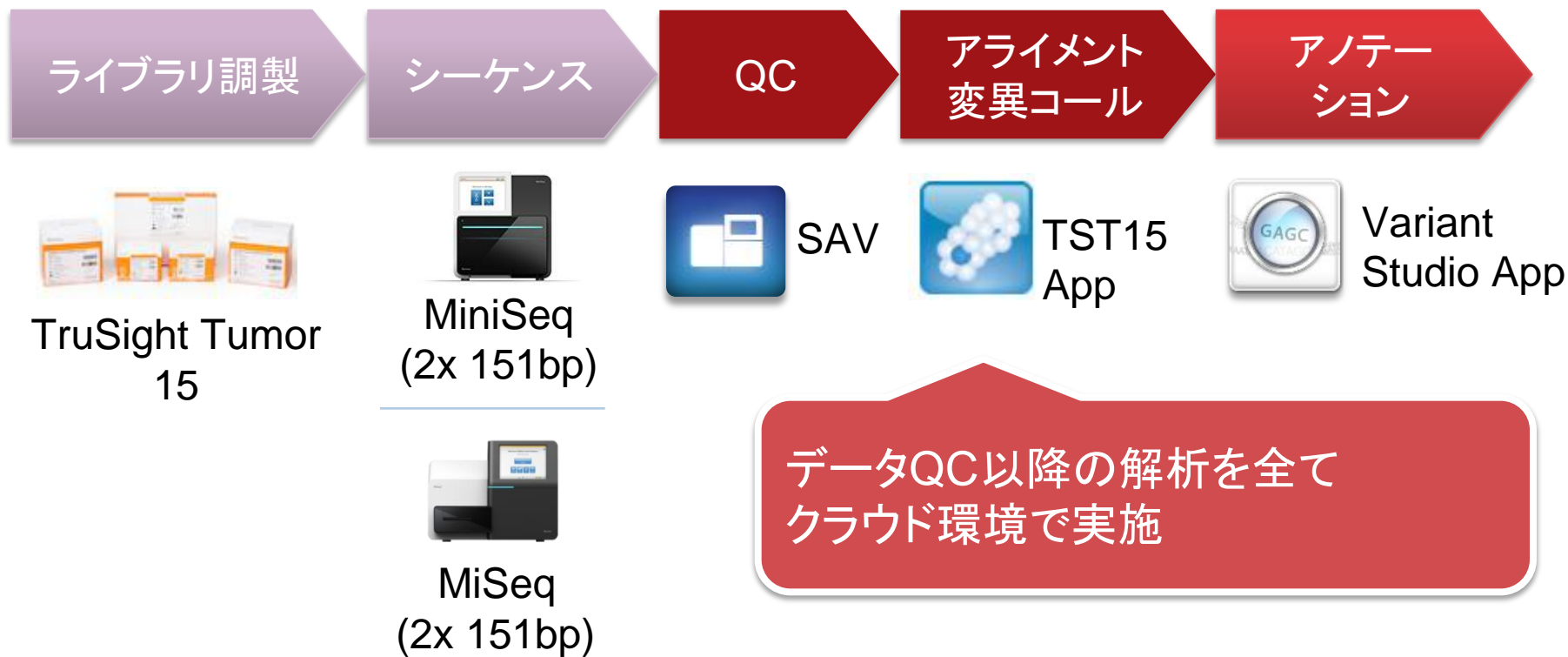
主な出力ファイルのまとめ

ファイル名	内容
AmpliconCoverage_M1.tsv	アンプリコンごとのカバレッジ情報 (Mix Aライブラリー)
AmpliconCoverage_M2.tsv	アンプリコンごとのカバレッジ情報 (Mix Bライブラリー)
Sample.genome.vcf	全バリエント情報を記載したデータファイル
Sample_report.vcf	登録809バリエントに該当する結果のみを記載したデータファイル
ReportDefinitionsUsed.txt	登録809バリエントの定義に関する情報
RunMetricsReport.txt	シーケンスの品質に関するレポート
aggregate.summary.csv	個々のサンプルのアライメントまでの解析結果をまとめたレポート
SampleMetricsReport.txt	カバレッジ、オンターゲット率などがスペックを満たしたかを記載したファイル
Sample_Report.pdf	登録809バリエントとの比較結果をまとめたレポート

解析オプション#2: BaseSpace Cloud



TruSight Tumor 15 解析オプション (#2: BaseSpace Cloud)



提供アプリ一覧

BaseSpace | DASHBOARD | PREP | RUNS | PROJECTS | **APPS** | PUBLISHED | illumina

Applications

Search Apps

 Cufflinks Assembly & DE Illumina, Inc.	 Genomatix Pathway System (GePS) Genomatix
 Illumina VariantStudio Desktop Illumina, Inc.	 Integrative Genomics Viewer BaseSpace Labs
 iPathwayGuide Advaita Bio	 LoFreq Rare Variant Caller Genome Institute of Singapore

Categories

ChIP-Seq (7)	De Novo Assembly (10)
Differential Expression (14)	Gene Fusion Detection (6)
Metagenomics (17)	Methyl-Seq (7)
Proteomics (8)	Quality (10)
Resequencing (28)	RNA-Seq (19)
Small RNA (8)	Synthetic Long Reads (4)
Targeted Sequencing (23)	Tumor Normal (12)
Variant Analysis (26)	

TruSight Tumor 15 アプリの検索

The screenshot shows the BaseSpace interface with the 'APPS' tab selected. The 'Applications' section displays two application cards: 'Amplicon DS' and 'TruSight Tumor 15'. A search bar at the top right contains the text 'TruSight', and a red arrow points to the 'Categories' dropdown menu. The dropdown menu is open, showing a list of categories with their respective counts:

- ChIP-Seq (7)
- De Novo Assembly (10)
- Differential Expression (9)
- Genome-Wide Association Studies (9)
- Methyl-Seq (7)
- Proteomics (8)
- Quality (10)
- Resequencing (28)
- RNA-Seq (19)
- Small RNA (8)
- Synthetic Long Reads (4)
- Targeted Sequencing (23)
- Tumor Normal (12)
- Variant Analysis (26)

「TruSight」でカテゴリーを選択

BaseSpaceから簡単操作

The screenshot shows the BaseSpace interface for the TruSight Tumor 15 v1.0.0 application. The navigation bar includes DASHBOARD, PREP, RUNS, PROJECTS, APPS, and PUBLIC DATA. The user is logged in as Takaaki Miyazaki. The main content area shows the analysis configuration:

- Analysis Name:** TruSight Tumor 15 02/18/2016 7:59:59
- Save Results To:** Select Project(s): test
- Sample Pairs:** A table with columns for Mix A Sample and Mix B Sample. The first row shows 'Mock' for both. A message at the bottom states 'All groups are valid.'

Three numbered red arrows indicate the steps for execution:

- ① 保存先を選択 (Select save destination) - points to the 'Select Project(s): test' dropdown.
- ② サンプルペアを選択 (Select sample pairs) - points to the 'Sample Pairs' table.
- ③ 実行 (Execute) - points to the 'Continue' button.


TruSight Tumor 15アプリの解析結果の確認

BaseSpace | DASHBOARD | PREP | RUNS | **PROJECTS** | APPS | PUBLIC DATA

Projects: MiSeq v3: TruSight Tumor 15 - Sample HDC749

About
Analyses
Samples

Analyses 1

<input type="checkbox"/>	NAME	LAST MODIFIED ▼
<input type="checkbox"/>	 TruSight Tumor 15 10/23/2015 2:28:24	Oct 23, 2015

各サンプルごとに解析結果のPDFを出力

BaseSpace DASHBOARD PREP RUNS PROJECTS APPS PUBLIC DATA

Search ? Takaaki Miyaz... illumina

Download Analysis Rename Analysis Move to Trash Stop Analysis

Analysis Info Results for Pair 8: HDC749-Rep8

Inputs

Output Files

Analysis Reports

- Pair 8: HDC749-Rep8
- Pair 7: HDC749-Rep7
- Pair 6: HDC749-Rep6
- Pair 5: HDC749-Rep5
- Pair 4: HDC749-Rep4
- Pair 3: HDC749-Rep3
- Pair 2: HDC749-Rep2
- Pair 1: HDC749-Rep1

Analysis Summary

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

TruSight[®] Tumor 15

HDC749-Rep8

Sample Name: HDC749-Rep8
Report Definition: TST_15-ReportDefinition-v1
Report Generated On: 2015-10-23 22:39

Variants identified as specified in the report definition

Detected SNVs, Insertions, and Deletions

Gene	Amino Acid Change	Variant Type	Nucleotide Change	Variant Frequency	Transcript
<i>BRAF</i>	p.Val600Glu	missense variant	c.1799T>A	0.122	ENST00000288602
<i>EGFR</i>	p.Gly719Ser	missense variant	c.2155G>A	0.265	ENST00000275493
<i>KRAS</i>	p.Gly13Asp	missense variant	c.38G>A	0.147	ENST00000256078

contact us

TST15 レポート結果

Detected SNVs, Insertions, and Deletions

Gene	Amino Acid Change	Variant Type	Nucleotide Change	Variant Frequency	Transcript
<i>KRAS</i>	p.Gly13Asp	missense variant	c.38G>A	0.541	ENST00000256078
<i>PIK3CA</i>	p.Glu545Lys	missense variant	c.1633G>A	0.495	ENST00000263967
<i>EGFR</i>	p.Leu861Gln	missense variant	c.2582T>A	0.532	ENST00000263967

No Calls

Gene	Chromosome	Coordinate	Failed Filter
<i>NRAS</i>	chr1	115252203	Low Coverage,Low Genotype Quality
<i>NRAS</i>	chr1	115252204	Low Coverage,Low Genotype Quality
<i>TP53</i>	chr17	7579651	Low Variant Frequency
<i>TP53</i>	chr17	7579654	Low Variant Frequency
<i>TP53</i>	chr17	7579660	Low Variant Frequency
<i>TP53</i>	chr17	7579666	Low Variant Frequency
<i>TP53</i>	chr17	7579671	Low Variant Frequency
<i>TP53</i>	chr17	7579679	Low Variant Frequency
<i>TP53</i>	chr17	7579684	Low Variant Frequency,Low Genotype Quality

全サンプルの解析結果

BaseSpace | DASHBOARD | PREP | RUNS | PROJECTS | APPS | PUBLIC DATA | Takaaki Miyaz... | illumina®

MiSeq v3: TruSight Tumor 15 - Sample HDC749: TruSight Tumor 15
10/23/2015 2:28:24

Download Analysis | Rename Analysis | Move to Trash | Stop Analysis

Analysis Info | Inputs | Output Files

Analysis Reports

- Pair 8: HDC749-Rep8
- Pair 7: HDC749-Rep7
- Pair 6: HDC749-Rep6
- Pair 5: HDC749-Rep5
- Pair 4: HDC749-Rep4
- Pair 3: HDC749-Rep3
- Pair 2: HDC749-Rep2
- Pair 1: HDC749-Rep1

Analysis Summary

Analysis Summary

Sample Metrics Report

Report Date	10/23/2015
Report Time	22:39

Results

Sample Name	MixABases>=500x (%)	MixBBases>=500x (%)	MixAOnTarget (%)	MixBOnTarget (%)
HDC749-Rep1	100.0	100.0	86.3	89.0
HDC749-Rep2	100.0	100.0	87.0	89.0
HDC749-Rep3	100.0	100.0	86.2	87.7
HDC749-Rep4	100.0	100.0	86.2	88.1
HDC749-Rep5	100.0	100.0	86.4	88.7
HDC749-Rep6	100.0	100.0	86.0	91.7
HDC749-Rep7	100.0	100.0	87.3	91.8
HDC749-Rep8	100.0	100.0	86.8	91.0

「Analysis Summary」をクリック

数値が**97**以上で
スペックイン

アプリ解析後の出力データの確認とダウンロード

BaseSpace DASHBOARD PREP RUNS PROJECTS APPS PUBLIC DATA

MiSeq v3: TruSight Tumor 15 - Sample HDC749: TruSight Tumor 15
10/23/2015 2:28:24

クリック

Download Analysis Rename Analysis Move to Trash Stop Analysis

Analysis Info

Inputs

Output Files

Analysis Reports

- Pair 8: HDC749-Rep8
- Pair 7: HDC749-Rep7
- Pair 6: HDC749-Rep6
- Pair 5: HDC749-Rep5
- Pair 4: HDC749-Rep4
- Pair 3: HDC749-Rep3
- Pair 2: HDC749-Rep2
- Pair 1: HDC749-Rep1

Analysis Summary

Output Files

NAME	TYPE	SIZE
..		
Libraries	Folder	--
HDC749-Rep8.genome.vcf	vcf	3.21 MB
HDC749-Rep8.genome.vcf.ant	ant	78.39 KB
HDC749-Rep8.genome.vcf.ant.idx	idx	0 B
HDC749-Rep8_Report.pdf	pdf	134.74 KB
HDC749-Rep8_Report.txt	txt	2.66 KB
HDC749-Rep8_report.vcf	vcf	6.50 KB
HDC749-Rep8_report.vcf.ant	ant	824 B
HDC749-Rep8_report.vcf.ant.idx	idx	0 B

BaseSpace Cloud (TruSight Tumor 15 App)

主な出力ファイルのまとめ

ファイル名	内容
Sample.genome.vcf	検出された全バリエント情報を記載したデータファイル
Sample_Report.pdf	登録809バリエントとの比較結果をまとめたレポート (pdf)
Sample_Report.txt	登録809バリエントとの比較結果をまとめたレポート (テキスト)
Sample_Report.vcf	登録809バリエントに該当する一致するバリエントのみを記載したデータファイル

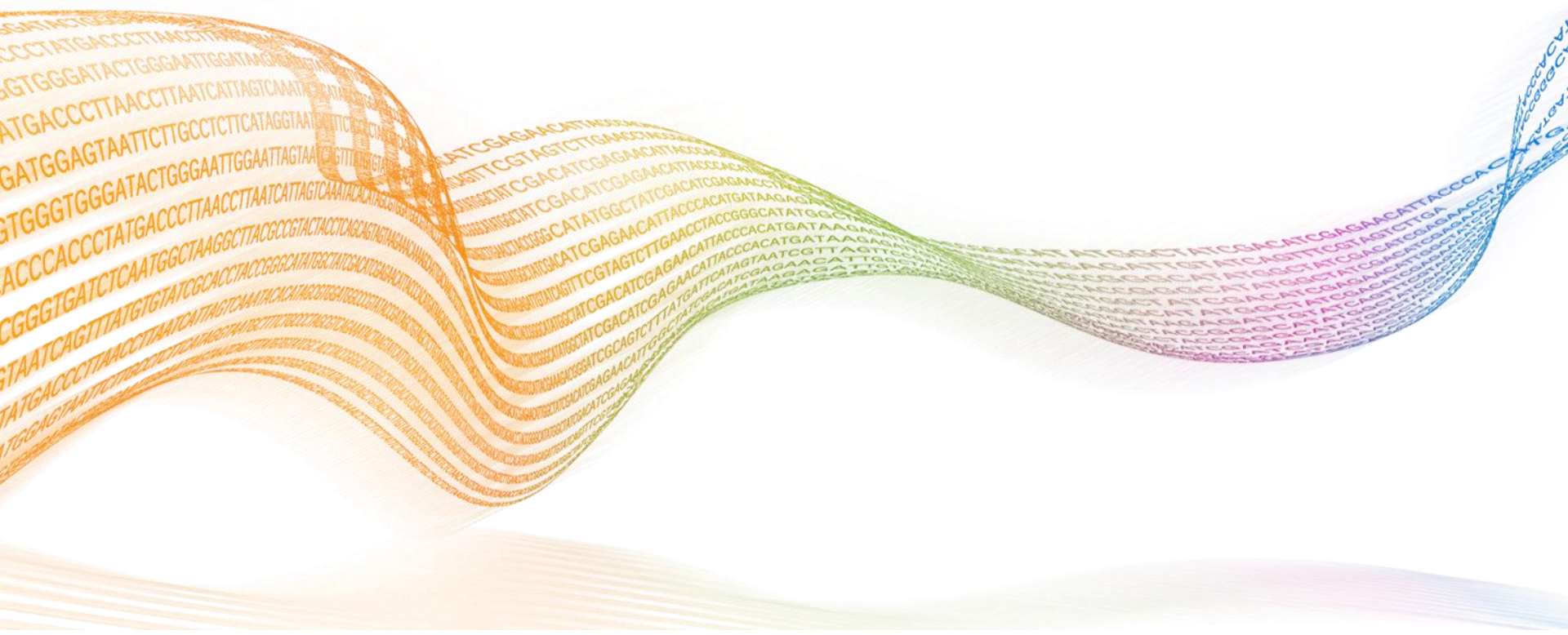
Horizon HD-C749について

- ▶ GENESIS™ ジーンエディティングテクノロジーを用いて開発した同質遺伝子細胞株からDNA標準サンプルを作製
- ▶ HDxの変異導入済み細胞株は全て、十分に特徴付けされた親株から作製し、共通の遺伝的バックグラウンドを有する

PRODUCT INFORMATION				
Verified Mutations	Chromosome	Gene	Variant	Expected Allelic Frequency, %
	7q34	BRAF	V600E	10.50%
	4q11-q12	cKIT	D816V	10.00%
	7p12	EGFR	ΔE746 - A750	2.00%
	7p12	EGFR	L858R	3.00%
	7p12	EGFR	T790M	1.00%
	7p12	EGFR	G719S	24.50%
	12p12.1	KRAS	G13D	15.00%
	12p12.1	KRAS	G12D	6.00%
	1p13.2	NRAS	Q61K	12.50%
3q26.3	PI3KCA	H1047R	17.50%	
3q26.3	PI3KCA	E545K	9.00%	

<https://www.horizondiscovery.com/quantitative-multiplex-reference-standard-hd-c749>

アノテーションアプリ VariantStudioも使ってみよう



TruSight Tumor 15 解析ワークフロー

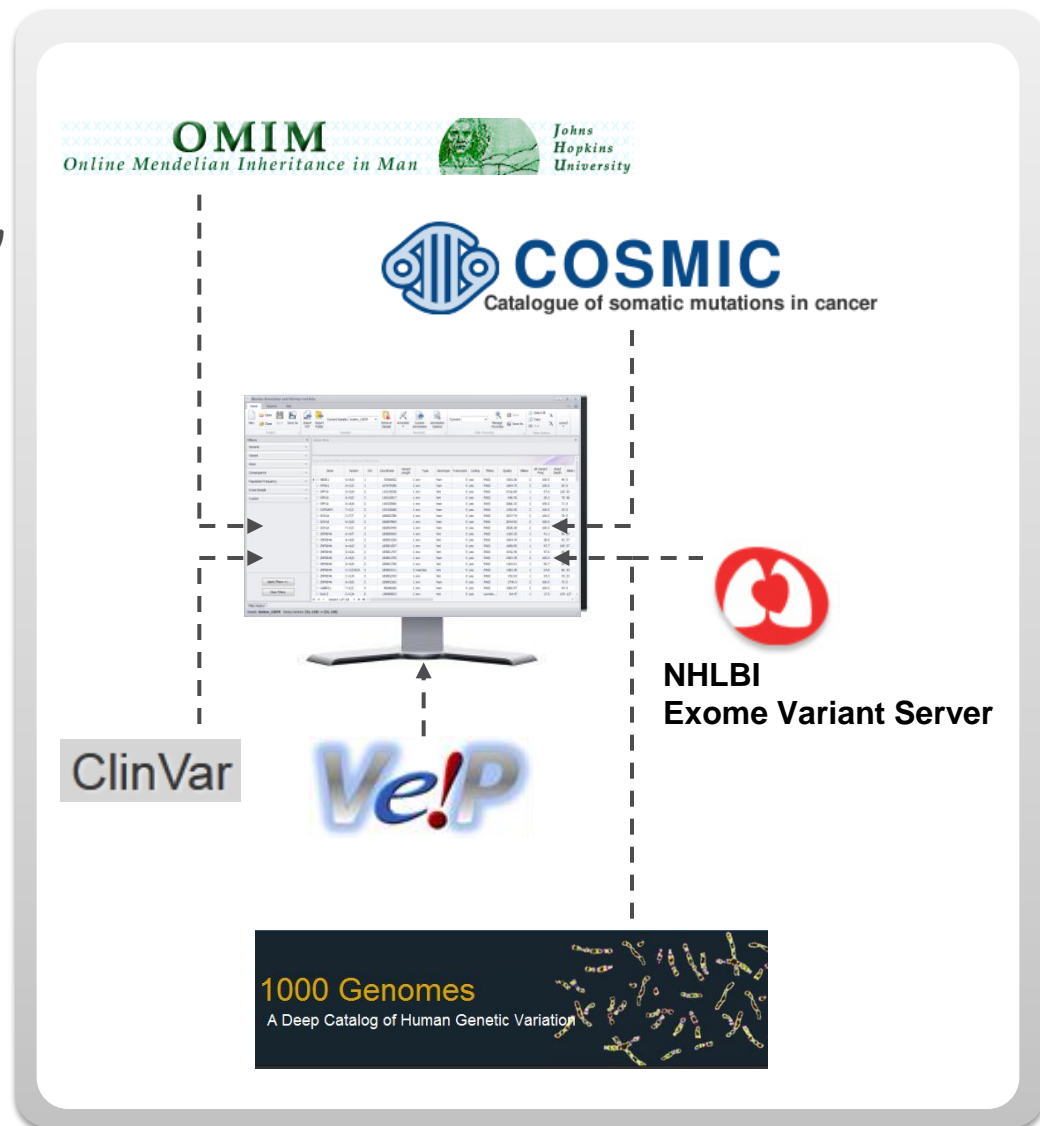
BaseSpace®



生物学的情報のアノテーションを用いた絞り込み

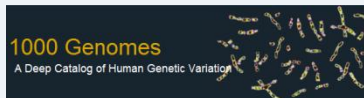
アノテーション情報

- ▶ 変異タイプ: シノニマス、フレームシフト、ミスセンス等
- ▶ 機能的影響: PolyPhen または SIFT の推定
- ▶ 人種ごとのアレル頻度: 1000 Genomes、dbSNP 等
- ▶ 疾患関連情報: ClinVar、OMIM、COSMIC
- ▶ 科学文献: PubMed、Google Scholar



イルミナ VariantStudioの流れ

データを入力、生物学的知識を出力



ClinVar

dbSNP



RefSeq



VariantStudio
アノテーションデータベース

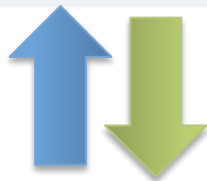


COSMIC

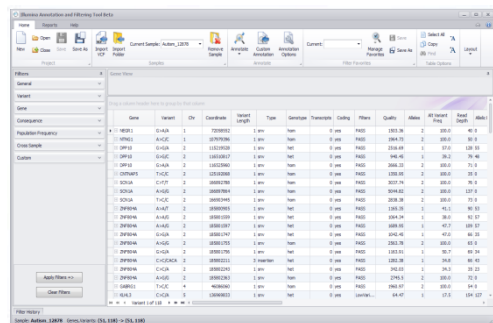
Catalogue of somatic mutations in cancer



NHLBI Exome Variant Server



VCF または gVCF ファイルの入力

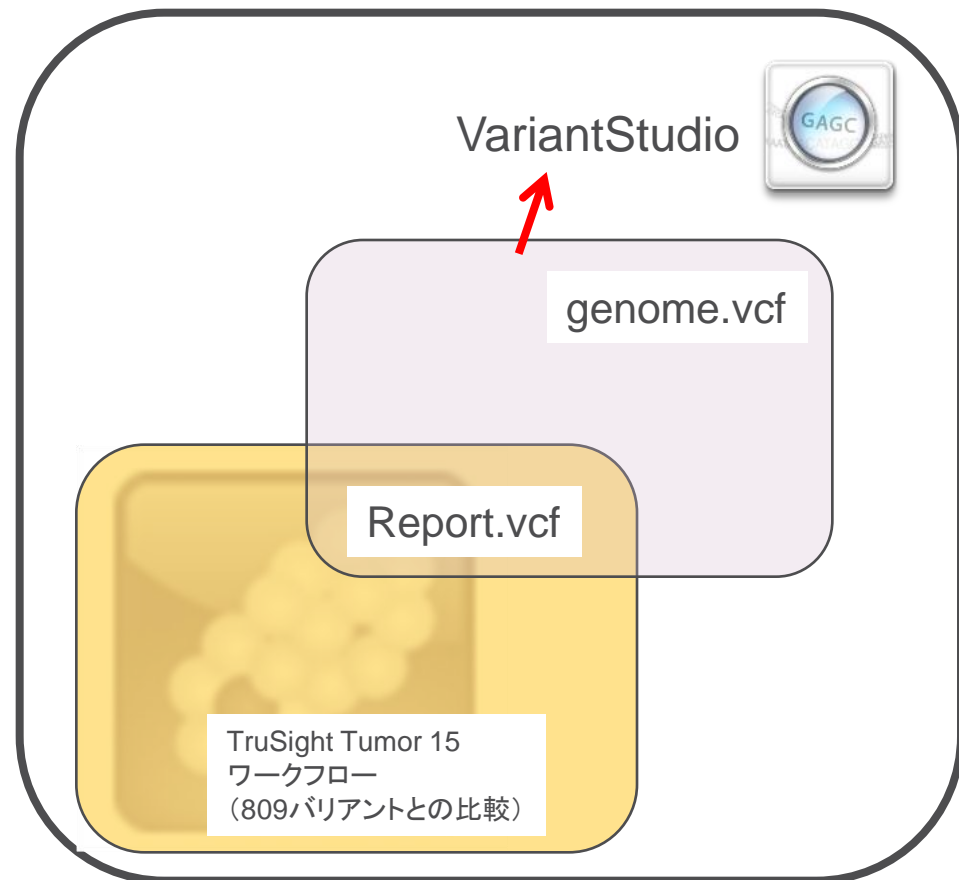


解釈した変異をレポートとして出力

イルミナ VariantStudio デスクトップ版

VariantStudioによる解析例

登録外のバリアントのアノテーションには
別なツールが必要
→ VariantStudio



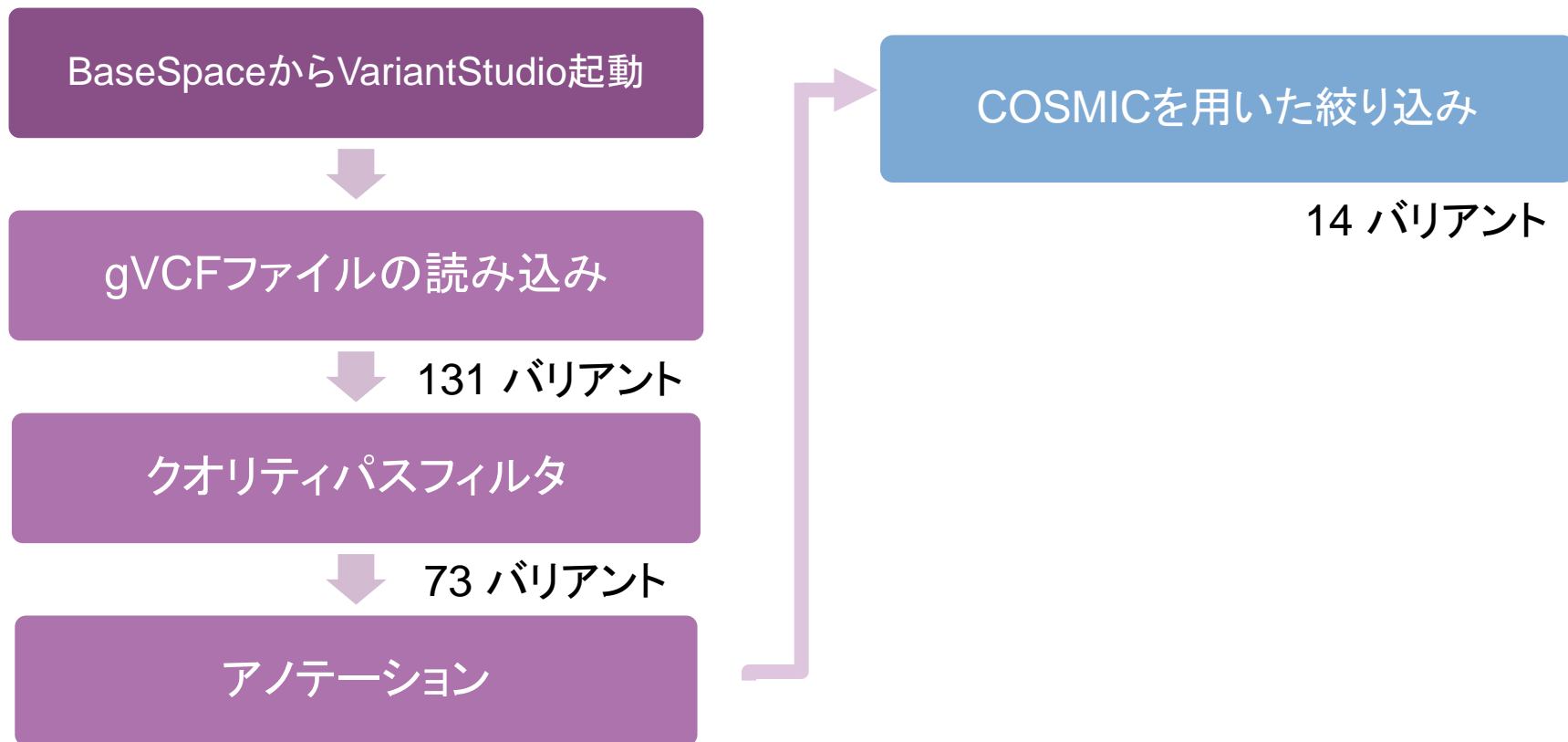
検出されたバリアントはgenome.vcfに収納

TruSight Tumor 15ワークフローは、登録
809バリアントを解析・レポート出力の対象に
(Report.vcf)

ファイル名	内容
genome.vcf	検出された全バリアント情報を記載した データ ファイル
Report.vcf	登録809バリアントに該当する一致する バリ アントのみを記載したデータファイル

VariantStudioによる解析例

(BaseSpaceパブリックデータ「HD-C749:Rep8」genome.vcfより)



クオリティが良いバリエントの絞り込み

「Variant」セクション

「Pass Filter」をチェック。
フィルタをパスしている
バリエントの絞り込み

「Apply Filters」ボタンをクリック

131 => 73 バリエント

Variant	Exonic	Filters	Quality	GQX	Alter Alle
ERBB2 G>G/T 17 37851328 1 snv het yes	yes	PASS	100	100	
EGFR,EGF... G>G/A 7 55249063 1 snv het yes	yes	PASS	100	100	
EGFR T>T/G 7 55259515 1 snv het yes	yes	LowVarian...	61	61	
EGFR GGGAAATT... 7 55242464 15 deletion het yes	yes	LowVarian...	28	28	
EGFR G>G/A 7 55222755 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR A>A/T 7 55222057 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR G>G/A 7 55222755 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR G>G/T 7 5514647 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR G>G/A 7 55188688 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR G>G/A 7 55155747 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR T>T/TA 7 55159715 2 insertion het no	no	R8	100	100	
EGFR T>T/TA 7 55159715 1 insertion het no	no	R8	100	100	
EGFR A>A/AACAC 7 55155747 4 insertion het no	no	R8	100	100	
EGFR A>A/AAC 7 55155747 2 insertion het no	no	LowVarian...	100	100	
EGFR AAC>AAC/A 7 55155747 2 deletion het no	no	R8	100	100	
EGFR AACAC>A... 7 55155747 4 deletion het no	no	R8	100	100	
EGFR AACACAC... 7 55155747 6 deletion het no	no	LowVarian...	62	62	
EGFR A>G/G 7 55128207 1 snv hom no	no	PASS	100	100	
EGFR G>G/A 7 55121139 1 snv het no	no	PASS	100	100	
EGFR G>G/A 7 55097226 1 snv het no	no	PASS	100	100	
DHRS7B C>C/T 17 21087671 1 snv het yes	yes	PASS	100	100	
EGFR G>G/T 7 5514647 1 snv het yes	yes	PASS	100	100	

バリエーションへのアノテーション(注釈)

The screenshot displays the Illumina VariantStudio interface. The 'Annotate & Classification' menu is highlighted with a red box. A red arrow points from the 'Annotate' icon to a pink text box containing the instruction: 「All variants of current sample」を選択し、連携データベースの情報を取得 (Select 'All variants of current sample' and retrieve information from the linked database).

The 'Gene View' section shows a table of variants for Chromosome 7 (Chr 7). The table columns are Gene, Variant, Chr, Coordinate, Variant Length, and Type. The data is as follows:

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Variant Length	Type
ERBB2	G>G/T	17	37851328	1	snv
EGFR,EGF...	G>G/A	7	55249063	1	snv
EGFR	T>T/G	7	55259515	1	snv
EGFR	AGGAATT...	7	55242464	15	deletion
EGFR	G>G/A	7	55241707	1	snv
EGFR	A>A/T	7	55228053	1	snv
EGFR	G>G/A	7	55222755	1	snv
EGFR	A>A/G	7	55220177	1	snv
EGFR	G>G/T	7	55214647	1	snv
EGFR	G>G/A	7	55188688	1	snv
EGFR	G>G/A	7	55187715	1	snv

バリエーションへのアノテーション(注釈)

	COSMIC ID	COSMIC Wildtype	COSMIC Allele	COSMIC Gene	COSMIC Primary Site	COSMIC Histology	ClinVar RS	ClinVar Ref	ClinVar Alleles	ClinVar Allele Type	ClinVar Significance	Cl Di
	COSM625...	G;G	A;T	EGFR;EGFR	biliary_tra...	carcinoma...	rs28929495	G	A:T	somatic	other;pat...	None
	COSM6223	AGGAATT...	A	EGFR	oesophag...	carcinoma...						
	COSM580:...	G;G	T;C	NRAS;NRAS	liver,cervix...	haematop...						
	COSM45985	G	T	TP53	ovary	carcinoma	rs1042522	G	C	germline	non-patho...	not_
	COSM295...	T;T	A;G	EGFR;EGFR	lung;breas...	carcinoma...	rs121434...	T	G	germline	other	Ader
	COSM249...	A;A;A;A;A	C;G;T;G;T	PIK3CA;PI...	large_inte...	carcinoma...	rs121913...	A	G:T	somatic	other	Kera
	COSM22413	C	T	PDGFRA	soft_tissu...	gastrointe...						
	COSM184...	A;A;A	G;T;C	BRAF;BRA...	skin,prost...	carcinoma...	rs113488...	A	C:T	somatic	other;pat...	Astro
	COSM150...	C	T	MET	stomach	carcinoma						
	COSM145...	G	A	EGFR	large_inte...	carcinoma						
	COSM143...	A	G	PDGFRA	large_inte...	carcinoma						
	COSM132...	G;G	C;A	KIT;KIT	bone,larg...	haematop...						
	COSM127...	A;A;A	G;T;C	KIT;KIT;KIT	soft_tissu...	haematop...	rs121913...	A	T	germline	pathogenic	Mast
	COSM125...	G;G;G;G	A;C;C;A	PIK3CA_E...	oesophag...	malignant...	rs104886...	G	A	somatic	other	Kera
	COSM114...	C;C;C;C;C	T;A;T;G;A	KRAS_EN...	oesophag...	lymphoid_...	rs112445...	C	A:T	somatic	other;pat...	Brea
	COSM113...	C;C;C;C;C	T;A;G;A;T;G	KRAS_EN...	oesophag...	haematop...	rs121913...	C	A:G:T	somatic:g...	other;pat...	Panc

Variant 120 of 131

CosmicやClinVarのアノテーションを確認

COSMICデータベースへの参照

Gene View

Gene	Conserved Sequence	COSMIC ID	COSMIC Wildtype	COSMIC Allele	COSMIC Gene	COSMIC Primary Site	COSMIC Histology	ClinVar RS	ClinVar Ref	ClinVar Alleles	ClinVar All Type
EGFR	yes	COSM625...	G								
NRAS	yes	COSM580;...	G								
TP53		COSM45985	G								
PIK3CA	yes	COSM249...	A								
PDGFRA	yes	COSM22413	C								
▶ BRAF	yes	COSM184...	A								
MET	yes	COSM150...	C								
EGFR,EGF...	yes	COSM145...	G								
PDGFRA	yes	COSM143...	A								
KIT	yes	COSM132...	G								
KIT	yes	COSM127...	A								
PIK3CA	yes	COSM125...	G								
KRAS	yes	COSM114...	C								
KRAS	yes	COSM113...	C;C;C;C;C	T;A;G;A;T;G	KRAS_EN...	oesophag...	haematop...	rs121913...	C	A;G:T	somatic;g
ERBB2	yes							rs1136201	A	G	germline

Home | About | Resources | Curation | Tools | Data | News | Help

Enter search here... [Login](#)

Cosmic » Mutation » Overview » BRAF » p.V600A / c.1799T>C [View in GRCh37 Archive](#)

Overview | Tissue Distribution | Samples | Pathways Affected | References

Gene Name: BRAF
Mutation Id: COSM18443
AA Mutation: p.V600A (Substitution - Missense)
CDS Mutation: c.1799T>C (Substitution)
GRCh38: [Ensembl Contig View](#) 7:140753336..140753336
COSMIC Genome Browser: [COSMIC JBrowse](#) 7:140753336..140753336
CDD: [NP_004324.2](#)
Homologene: [3197](#), click [here](#) to look at the multiple sequence alignment.
Ever confirmed somatic: Yes

Variant 6 of 15

Horizon HD-C749 変異アレル頻度(Rep 8)と TruSight Tumor 15で検出された変異アレル頻度の比較

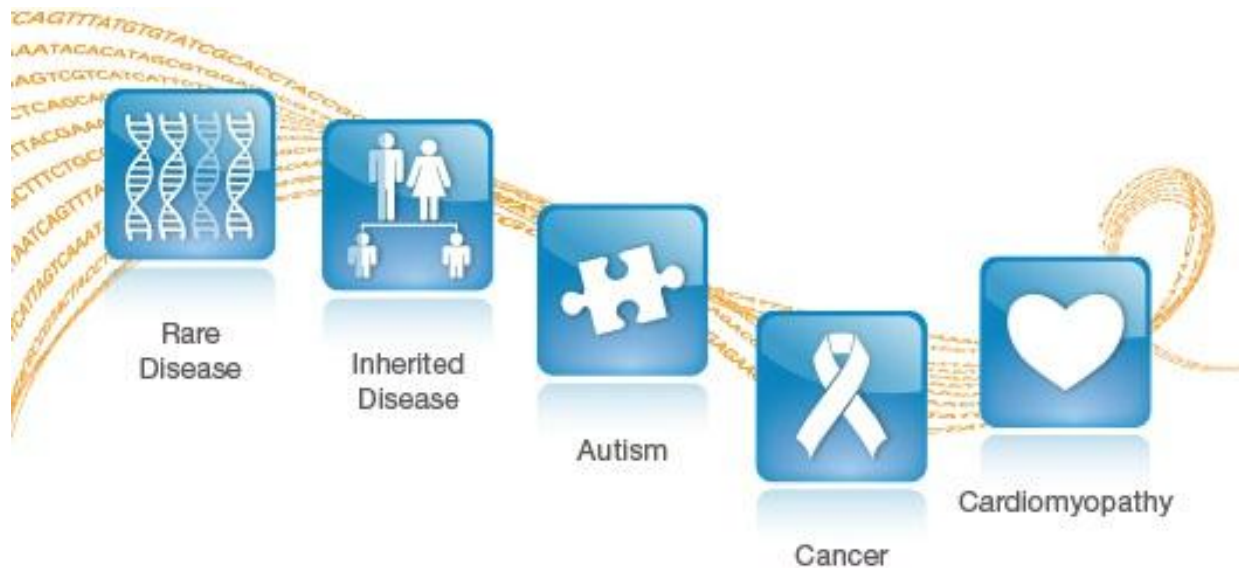
Chromosome	Gene	Variant	Horizon アレル頻度	TruSight Tumor 15 検出アレル頻度
7q34	BRAF	V600E	10.50%	12.2%
4q11-q12	cKIT	D816V	10.00%	11.4%
7p12	EGFR	ΔE746 - A750	2.00%	1.7%
7p12	EGFR	L858R	3.00%	2.5%
7p12	EGFR	T790M	1.00%	ND
7p12	EGFR	G719S	24.50%	26.5%
12p12.1	KRAS	G13D	15.00%	14.7%
12p12.1	KRAS	G12D	6.00%	7.2%
1p13.2	NRAS	Q61K	12.50%	10.3%
3q26.3	PI3KCA	H1047R	17.50%	19.6%
3q26.3	PI3KCA	E545K	9.00%	8.0%

デスクトップ版とクラウド版VariantStudio

	illumina VariantStudio 2.2	BaseSpace VariantStudio 2.2
特徴	デスクトップ版	クラウド版
ソフトウェア起動	ローカルPCより起動	BaseSpaceより起動
VCF読み込み	ローカルPCに保存されたVCFファイル	BaseSpaceにアップロード/共有/インポートされたVCFファイル
プロジェクト保存	ローカルPCに保存	ローカルPCに保存
取得方法	TruSightシリーズ製品の購入	BaseSpaceから利用可能

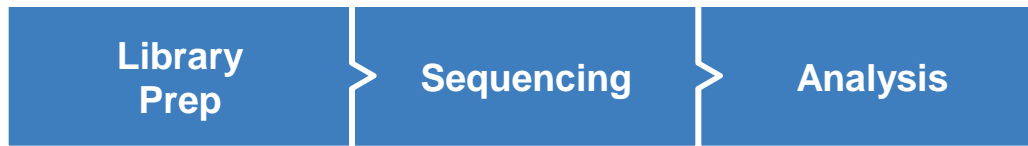
llumina VariantStudio デスクトップ版

製品の入手方法



- ▶ VariantStudio デスクトップ版はTruSight 製品の注文と同時に提供します。
 - 1年間ライセンスを無償提供キャンペーン実施中
 - TruSightキャンペーンと合わせてご検討ください

TruSight Tumor 15 キット まとめ



FFPEに最適化
マルチプレックス
PCR
ライブラリーQC
基準



MiSeq V3
最適化済みシーケ
ンスパラメーター



MSR /
BaseSpace
既定のレポート
Variant Studio

- マルチプレックスPCRで簡便にがん関連の15遺伝子を解析
- ポイントを押さえた実験で微量DNAから低コストな研究を提供
- 装置内蔵、あるいはBaseSpaceのツールでレポート形式で結果を取得
- VariantStudioの併用で効率的な結果の解釈を後押し

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