





表1：イルミナのターゲットリシーケンスソリューション

主な性能 / 利点	ターゲット領域の累積サイズ / プローブ数または アンプリコン数	DNA インプット量	MiniSeq システムでの ランあたりの サンプル数 <sup>a</sup>
<b>カスタムのターゲットシーケンスパネル</b>			
<b>Nextera Rapid Capture Custom</b> <ul style="list-style-type: none"><li>カスタムコンテンツの濃縮</li><li>1.5 日のライブラリー調製時間</li></ul>	0.5~15Mb 3,000~67,000 プローブ <sup>b</sup>	50ng	1~96 サンプル / ラン <sup>c</sup>
<b>TruSeq Custom Amplicon v1.5</b> <ul style="list-style-type: none"><li>FFPE に対応</li><li>カスタムコンテンツの増幅</li></ul>	2~650kb 16~1,536 アンプリコン <sup>d</sup>	50ng (gDNA) 150ng (FFPE)	1~96 サンプル / ラン <sup>c</sup>
<b>TruSeq Custom Amplicon Low Input</b> <ul style="list-style-type: none"><li>FFPE に対応</li><li>カスタムコンテンツの増幅</li><li>少ない DNA インプット量</li></ul>	2~650kb 16~1,536 アンプリコン	10ng (gDNA) 10~50ng (FFPE) <sup>e</sup>	1~96 サンプル / ラン <sup>c</sup>
<b>固定コンテンツのターゲットシーケンスパネル</b>			
<b>TruSight® One Panel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>既知の臨床表現型に関連する 4,813 の遺伝子をターゲット</li><li>1.5 日のライブラリー調製時間</li></ul>	12Mb	50ng	3 サンプル / ラン
<b>TruSight Cardio Panel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>17 の遺伝性心臓疾患に関連する 174 遺伝子をターゲット</li><li>1.5 日のライブラリー調製時間</li></ul>	244kb	50ng	12 サンプル / ラン
<b>TruSight Inherited Disease Panel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>小児の重篤な劣性遺伝病に関連する 552 遺伝子をターゲット</li><li>8,801 のターゲットエクソン</li></ul>	2.25Mb 約 30,000 プローブ	50ng	8 サンプル / ラン
<b>固定コンテンツのがん研究用ターゲットシーケンスパネル</b>			
<b>TruSight Tumor 15</b> <ul style="list-style-type: none"><li>FFPE に対応</li><li>固形がんでの変異がよくみられる 15 遺伝子をターゲット</li><li>5% のアリル頻度の変異を検出</li></ul>	44kb 250 アンプリコン	50 ng	8 サンプル / ラン
<b>TruSight Myeloid Sequencing Panel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>骨髄性悪性腫瘍にみられる体細胞変異にフォーカスした 54 遺伝子をターゲット</li><li>5% のアリル頻度の変異を検出</li></ul>	141kb 568 アンプリコン	50ng	8 サンプル / ラン
<b>TruSight Cancer Panel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>がん素因に関連する 94 遺伝子をターゲット</li><li>5% のアリル頻度の変異を検出</li></ul>	255kb 約 4,000 プローブ	50ng	24 サンプル / ラン
<b>TruSeq Amplicon Cancer Panel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>FFPE に対応</li><li>変異ホットスポットのあるがんに関連する変異の頻度が高い 48 遺伝子をターゲット</li></ul>	> 35kb 212 アンプリコン	150ng (gDNA) 250ng (FFPE)	42 サンプル / ラン

- a. MiniSeq Sequencing Kit (高出力) を使用
- b. プローブ数はキット構成により異なります。
- c. サンプルスルーputは実験デザインや平均カバレッジにより異なります。
- d. イルミナコンシェルジュを利用して、アンプリコン数を増やすことができます。
- e. インプット量は、TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kit を使った QC スコアにより異なります。

### アンプリコンシーケンスに適したシーケンスカバレッジの選択

シーケンスカバレッジ（深度）とは、既知のレファレンス塩基にアライメントされる、または、既知のレファレンス塩基を「カバーする」リード数の平均値のことです。カバレッジレベルは、多くの場合、特定の塩基位置で検出された変異が一定の信頼度を伴っているか否かを判定する決め手となります。より高いカバレッジレベルでは、ベースコールの信頼性がさらに高くなり、希少な変異の検出力が向上します。特定の研究で適切な検出レベルを得るためのカバレッジに関するガイドラインは、以下のとおりです：

- ヘテロ接合体の検出 – 40x のカバレッジ
- 5% の変異頻度の単一塩基変化および多塩基欠失 – 1,000x のカバレッジ
- 1% の変異頻度の単一塩基変化および多塩基欠失 – 5,000x 以上のカバレッジ
- 単一塩基のインデル検出には、より高い深度が必要となる場合があります。

本製品の使用目的は研究に限られます。診断での使用はできません。





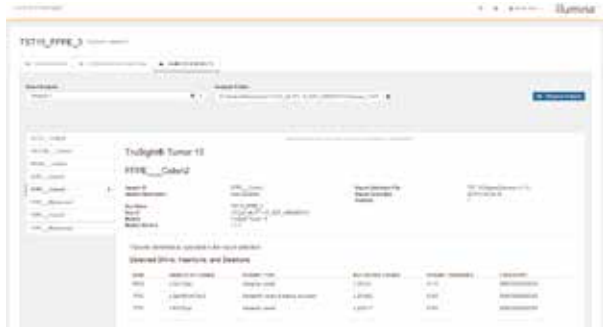


図 5: Local Run Manager のユーザーインターフェイス Local Run Manager により、シーケンスシステム上で直接ランの設定、準備、および解析が行えます。

MiniSeq システムでは、ライブラリーや試薬のロード、ランの設定やモニタリングなど、ラン全体を構成する各ステージの進行に合わせた分かりやすい案内が、直感的なタッチパネル操作のインターフェイスに表示されます。MiniSeq Control Software は、装置内で画像解析、ベースコール、および品質評価を行います。Sequencing Analysis Viewer (SAV) ソフトウェアを使えば、1 回のランまたは複数回のランの品質に関する指標をリアルタイムに確認できます。SAV ソフトウェアは、シーケンスシステムから使用することも、お使いの WindowsPC から場所を問わずにアクセスすることもできます。

### 簡素化されたバイオインフォマティクス

MiniSeq システムで行うデータ解析では、インフォマティクスの専門知識もコマンドラインの習得も必要ありません。MiniSeq システムは、ランを設定し、稼働状況をモニターし、シーケンスデータを解析する Local Run Manager ソフトウェアを装置に搭載しています (図 5)。Local Run Manager は、ランが完了すると自動的に装置上でデータ解析を行います。データ解析用モジュールは、さまざまなシーケンスアプリケーションに幅広く利用できるシンプルなレポートを作成します。モジュラー方式を採用しているため、必要に応じて自身の解析モジュールだけをインストールしアップデートすることができます。

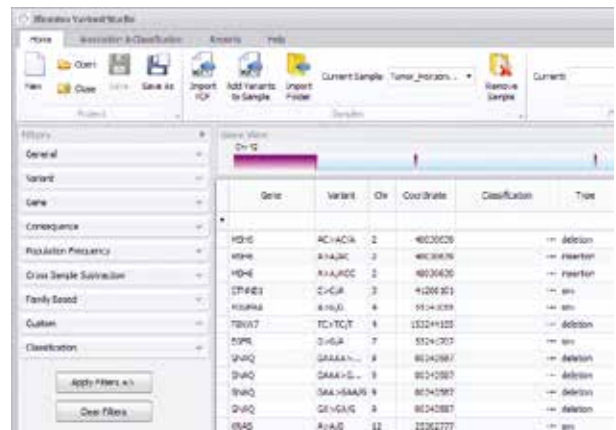


図 6: VariantStudio のユーザーインターフェイス イルミナの VariantStudio アปเดตーションソフトウェアにより、疾患に関連する変異の同定、分類、およびレポートングが迅速に行えます。

さらに、MiniSeq システムで作成したシーケンスデータを Base Space コンピューティング環境 (クラウドまたはオンサイト) に瞬時に転送して、保管や解析を行うこともできます。BaseSpace のターゲットリシーケンスソフトウェアアプリは、インフォマティクス初心者でも 1 クリックだけでスタートできるようデザインされた直感的なユーザーインターフェイスに、専門家が汎用するデータ解析ツールをまとめて表示します (図 5)。これらのアプリは、アライメントやバリエーションコールなど、シーケンスデータ解析の一般的なニーズを幅広くサポートする最適化された解析パイプラインが利用いただけます。BaseSpace の Isaac™ Enrichment アプリ<sup>5</sup> は、濃縮ワークフローで超高速の Isaac Aligner<sup>6</sup> を使ってターゲットシーケンスリードのアライメントを行い、Starling Variant Caller<sup>6</sup> によりバリエーションコールを行います。TruSeq Amplicon アプリ<sup>7</sup> は、アンプリコンワークフローで Smith-Waterman アライメントを利用して、ゲノム解析ツールキット (GATK 1.6)<sup>8</sup>、Isaac Variant Caller<sup>6</sup>、またはイルミナが開発した Somatic Variant Caller<sup>9</sup> によるバリエーションコールを行うことができます。

表2: CEシーケンス法、q/RT-PCR法、およびNGSターゲットリシーケンス法の比較

サンプル	CE シーケンス法	q/RT-PCR 法	ターゲットリシーケンス法
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA 配列の狭い領域を<sup>a</sup>コスト効率よくシーケンス</li> <li>迅速かつシンプルなワークフロー</li> <li>現在最も汎用されるシーケンス法</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高感度<sup>b</sup></li> <li>迅速かつシンプルなワークフロー</li> <li>ほぼすべてのラボで設置済みの装置設備</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>より高いシーケンス深度が実現するさらに高い感度 (1% の変異頻度まで)<sup>b</sup></li> <li>より高い検出力 (何百もの遺伝子を同時にスクリーニング)</li> <li>より高い解像度 (ヌクレオチドの同一性を判定可能)</li> <li>同じ DNA インプット量でより多くのデータを産出<sup>d</sup></li> <li>サンプルのマルチプレックスによる得られるより高いサンプルスループット</li> </ul>
課題	<ul style="list-style-type: none"> <li>低い感度 (20% の変異頻度まで)<sup>b</sup></li> <li>低い検出力</li> <li>DNA 配列の広い領域<sup>c</sup>に非対応の低いコスト効率性</li> <li>サンプルのインプット必要量が多く、スケール調整に制限あり</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>一部の変異のみ調べることが可能</li> <li>検出力はほとんどなし</li> <li>変異の解像度に制限あり</li> <li>サンプルのインプット必要量が多く、スケール調整に制限あり</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA 配列の狭い領域<sup>a</sup>のシーケンスに非対応の低いコスト効率性</li> <li>DNA 配列の狭い領域<sup>a</sup>のシーケンスに非対応の低い時間効率性</li> </ul>

a. 狭い領域 = 15-20 アンプリコン未満  
 b. 感度 = アリル頻度の検出限界  
 c. 広い領域 = 15-20 アンプリコン以上  
 d. 10ng の DNA から、CE シーケンス法ではおよそ 1kb、ターゲットリシーケンス法ではおよそ 300kb のデータを産出 (250bp のアンプリコン長 × TruSeq Custom Amplicon ワークフローで 1,536 アンプリコン)

本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。



DesignStudio は、提出したターゲットを 100% カバーした 144 アンプリコンのプローブセットを作成しました (図 7)。UCSC Genome Browser\* でデザイン不可能なギャップを確認した後、デザインを承認し、DesignStudio からプローブセットを発注しました。

### ライブラリー調製

TruSeq Custom Amplicon Low Input のライブラリー調製法では、ビーズを用いてハイブリダイゼーション-伸長-ライゲーションを行います (図 3)。オプションとして、FFPE サンプルの品質評価および推奨量での DNA インプットには、TruSeq FFPE QC コンパニオンキット (カタログ番号 FC-131-9999) の使用を推奨しています。『TruSeq Custom Amplicon Low Input Sample Prep Guide』に従って、ライブラリー調製を行いました。10 TruSeq Custom Amplicon ライブラリーは、肺、胃、および直腸の組織サンプルの 3 つの腫瘍 / 正常サンプルペアから作成しました。TruSeq FFPE QC キットの評価結果とインプット推奨量に応じて、総量 10~50ng の FFPE 由来 DNA インプットで各サンプルライブラリーを調製しました。ライブラリー QC により、すべてのライブラリーで MiniSeq システムでのクラスター形成とシーケンスに十分な収量が得られたことが明らかになりました。各腫瘍 / 正常サンプルペアを複製し、12 サンプルすべてを同時にプールして MiniSeq システムでシーケンスを行いました。

### MiniSeq システムで行うシーケンス

プールしたサンプルライブラリー、試薬カートリッジ、およびフローセルを MiniSeq システムにロードしました。Local Run Manager によりクラスター形成と 150 x 2 のリード長でのランをセットアップし、ユーザによる途中操作なしに自動で行った場合の、シーケンスランの所要時間は約 24 時間でした。ランの進捗をモニターし (図 8)、最終のラン指標を作成して BaseSpace で確認しました。

### データ解析

画像解析およびベースコールを MiniSeq システムで行いました。BaseSpace の TruSeq Amplicon アプリを使って、デマルチプレックス、アライメント、およびベースコールを行いました。最後に、VariantStudio を使って、バリエーションのフィルタリングおよびアノテーションを行いました (BaseSpace からアクセス可)。サマリー一覧を作成して、オンターゲット %、カバレッジ均一性、バリエーションに関する追加統計をレポートしました (図 9)。この実証されたワークフローにより、分解の進んだ FFPE6 サンプルすべてで、93.28% のオンターゲットカバレッジ (リード 1 およびリード 2 にアライメントできたリード % の平均) と 94.3% のカバレッジ均一性を達成しました。

\* DesignStudio から UCSC Genome Browser にリンクしています。

### まとめ

MiniSeq システムのターゲットリシーケンスソリューションでは、対象となる特定の遺伝子または領域を高感度かつ高精度に解析することができます。NGS シーケンスの幅広いダイナミックレンジを活用することにより、対象となる特定の遺伝子領域をより高感度かつ高精度に測定することができます。選定されたコンテンツによるカタログパネルの迅速性、ユーザーデザインによるカスタムパネルの柔軟性のどちらを選んでも、よりコンパクトでより身近になったプラットフォームと合わせた MiniSeq ターゲットリシーケンスソリューションにより、高品質の NGS データが得られます。



図 9: BaseSpace クラウドで行うターゲットリシーケンスデータの解析 BaseSpace で TruSeq Amplicon アプリを使えば、結果が直感的なフォーマットで表示されるため、シンプルなデータ解析が行えます。MiniSeq システムでシーケンスを行った場合の、アライメントしたリード %、バリエーションコール、およびカバレッジ均一性の指標を表示しています。





