

# AmpliSeq™ for Illumina Custom RNA Sequencing Panel

一貫性のある正確な RNA 定量を AmpliSeq アンプリコンケミストリーとイルミナのシーケンステクノロジーを組み合わせて、最大 1200 のヒト遺伝子ターゲットをマルチプレックスで実施することができます。

## 特長

- 一貫性と再現性のある RNA 定量**  
 さまざまなサンプルタイプのレプリケート間で高い再現性
- 幅広いダイナミックレンジにわたる高精度な RNA 定量**  
 低発現遺伝子に対する転写産物の高いカバレッジ
- 低品質または低インプット量サンプルからの高品質なデータ**  
 FFPE サンプルなどさまざまなサンプルタイプにも対応
- 迅速で拡張性のあるワークフロー**  
 シーケンスランあたり 384 サンプルをサポートする高いマルチプレックス性能

## はじめに

次世代シーケンス (NGS) の進歩により、RNA シーケンス研究の速度は加速し、正常および疾患の生理学に関する理解が深まっています<sup>1</sup>。NGS に基づいた全トランスクリプトームシーケンスは探索用アプリケーションにはパワフルな方法ですが、多くの研究者はターゲットリシーケンスやカスタム RNA シーケンスなど、ターゲットを絞ったアプリケーションを求めようになっています<sup>2</sup>。カスタム RNA シーケンスを用いることで、小さなサブセットの転写産物についての詳細な研究や、定量的 PCR (qPCR) アッセイの代わりに NGS のパワーを集中させ、選択した遺伝子や目的の領域をシーケンスします。ターゲットを絞ったアプローチによって、発現の低い遺伝子を検出する高い感度<sup>3</sup>、短いターンアラウンドタイム、少ない要件でのデータ解析、シーケンスコストの低減が可能になります<sup>5</sup>。

これらの NGS の長所を活用していただくために、イルミナは AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel を提供します。AmpliSeq Custom RNA Panel は、アンプリコンケミストリーとイルミナのシーケンス技術を統合し、正確で一貫した RNA 発現プロファイルを行う DNA を産生します (図 1)。PCR に基づく方法で、目的の領域を増幅し、転写産物アインフォーム、遺伝子融合、一塩基多型などの検出を行います。AmpliSeq ケミストリーにより、1 回の反応で最大 1200 アンプリコンを増幅し、1 回のシーケンスランで最大 384 サンプルをマルチプレックスでランすることができます。AmpliSeq for Illumina Custom RNA はわずか 1 ng のインプット RNA に対応し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルにも対応します。(表 1)。

AmpliSeq for Illumina Custom RNA は、便利なオンラインによるアッセイデザインと注文、迅速なライブラリー調製、そしてユーザーフレンドリーなデータ解析を含めた完全な統合型のソリューションです。

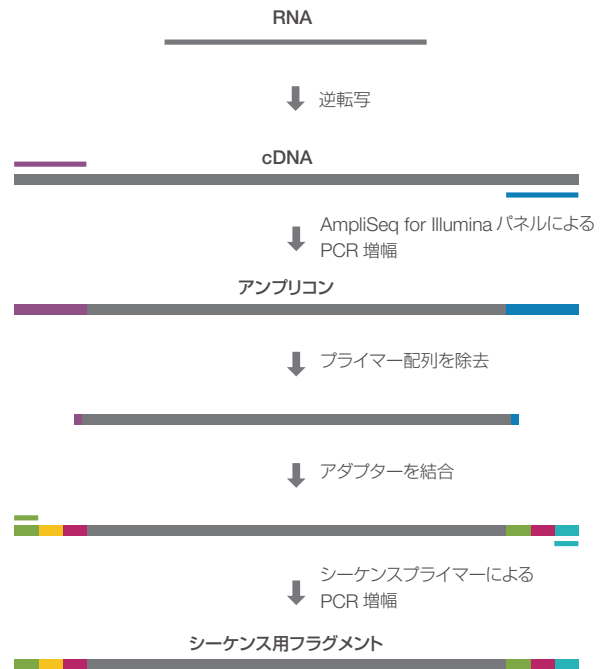


図 1 : AmpliSeq for Illumina Custom RNA ライブラリー調製ケミストリー高度なマルチプレックス化と PCR に基づくアッセイにより、1 回の反応で最大 1200 アンプリコンを増幅します。

表 1 : AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel の仕様概要

パラメーター	仕様
核酸タイプ	RNA
インプット量	1 ~ 100 ng (推奨 10 ng)
アッセイ時間	5.5 ~ 7.5 時間
ハンズオン時間	1.5 時間未満
作用機序	マルチプレックス PCR
マルチプレックス数	最大 384 プレックス
1 反応あたりのアンプリコン数	12 ~ 1200 アンプリコン
ターゲットインサートサイズ	150 bp
注文あたりの反応数	1125 反応
推奨されるシーケンサーシステム	iSeq™ 100、MiniSeq™、MiSeq™、NextSeq™ 550
サンプルタイプ	血液、FFPE 組織
テクノロジー	シーケンス
手法	アンプリコンシーケンス、ターゲット RNA シーケンス
生物種	ヒト

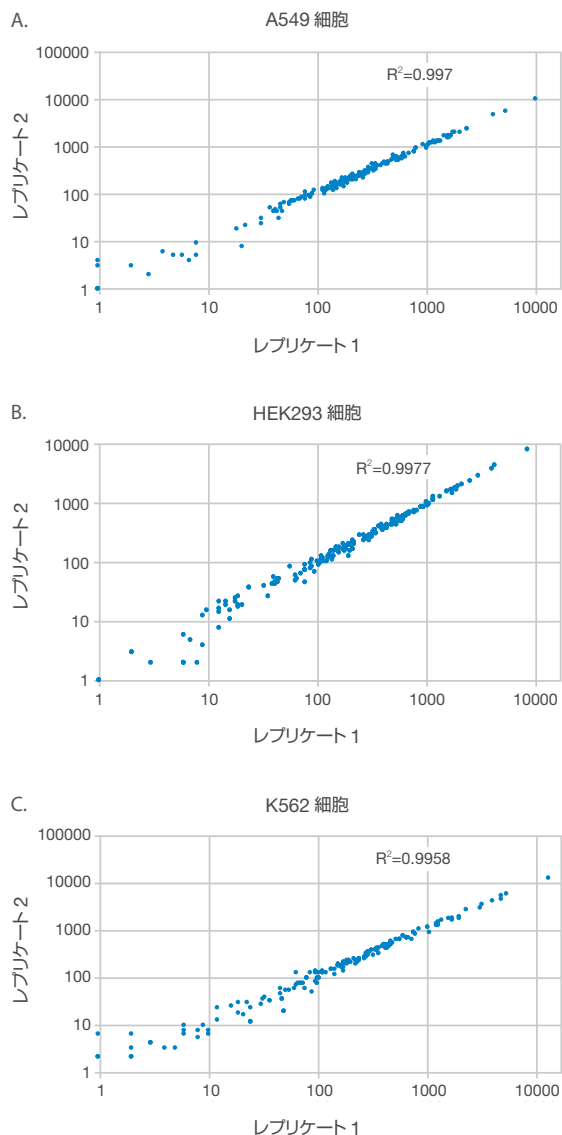


図2：レプリケート間の高い再現性 レプリケート1のリードカウント（x軸）とレプリケート2のリードカウント（y軸）の比較。(A) A549ヒト肺がん細胞、(B) HEK293ヒト胎児腎細胞、(C) K562ヒト慢性骨髄性白血病細胞。ダイナミックレンジはリードカウントの最低値と最高値を示すアンプリコン間の5桁分の幅をカバーしています。

## 一貫性と再現性のある RNA 発現プロファイル

AmpliSeq for Illumina Custom RNA アッセイの一貫した再現性を示すために、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) をターゲットにした 168 のカスタム RNA 遺伝子発現パネルを用いてライブラリーを作成しました。MAPK カスタムパネルは [DesignStudio™](#) ソフトウェアを用いてデザインしました。このカスタムパネルは [AmpliSeq Community Panel](#) としてもデザインできます。ライブラリーの調製は、特性の詳細が明らかになっている A549 ヒト肺がん細胞 (ATCC, CCL-185)、K562 ヒト慢性骨髄性白血病細胞 (ATCC, CCL-243)、および HEK293 ヒト胎児腎細胞 (ATCC, CRL-1573) から、それぞれ 10 ng の total RNA を用いました。

ライブラリーは 2 × 151 bp のラン構成で [iSeq™ 100 システム](#) でシーケンスを行いました。ライブラリータイプごとに 2 つのレプリケートを比較した RNA 発現プロファイルでは、ピアソン相

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。

関係数が 0.996 ~ 0.998 の間にある一貫性のある再現性の高い結果を示しました (図2)。さらに、アンプリコンのリードカウントは 5 桁の幅にわたっており、幅広いダイナミックレンジと高い感度を示しています。

## 高い精度の RNA 発現プロファイル

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Sequencing Panel の高精度な発現プロファイルを示すために、AmpliSeq External RNA Controls Consortium (ERCC) RNA Spike-In Mix (イルミナ、カタログ番号 20030697) から既知の RNA 量を含むサンプルについて実験を行いました。ERCC コントロールは、各転写産物に対して既知のモル濃度で転写産物が事前に混合されています。ERCC コントロールはさまざまな発現レベルの自然な真核性の mRNA を再現するためにデザインされており、遺伝子発現実験における標準的なベースライン値を規定するために一般的に用いられます。添加した ERCC の検出と測定は AmpliSeq ERCC Companion Panel (イルミナ、カタログ番号 20030696) で実施しました。このパネルは ERCC 添加分子をターゲットにしたプライマーから成る、あらかじめデザインされたパネルです。

ERCC コントロールライブラリーをプールし、2 × 151 bp のラン構成で [MiSeq™ システム](#) を用いてシーケンスを行いました。AmpliSeq ERCC ライブラリーからのリードカウントと ERCC RNA Spike-In Mix の既知のモル濃度を比較しました。これにはクラウドベースのイルミナのゲノムコンピューティング環境かつストレージプラットフォームである [BaseSpace™ Sequencing Hub](#) の [RNA Amplicon App](#) を用いました (図3)。データは相関係数が 0.99 であり、5 桁の幅にわたって非常に高い精度と感度を示しています。

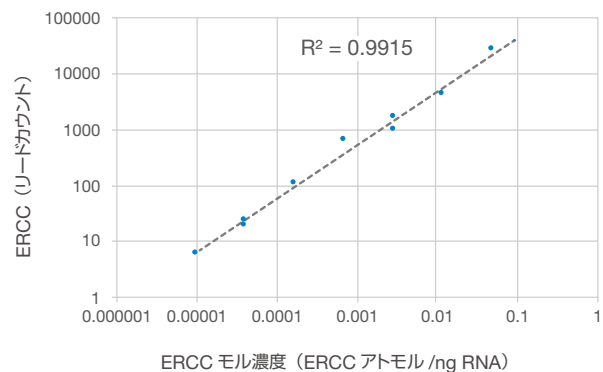


図3：高精度な RNA 発現プロファイル 既知の ERCC 転写産物モル濃度（x軸）と AmpliSeq for Illumina ERCC RNA Companion Panel (y軸) からのシーケンスリードカウントの比較。

## 幅広い RNA インプット量と RNA サンプル品質からの優れた性能

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は幅広い RNA インプット量から高い品質のデータを産生します。さまざまなインプット量で一貫した性能を示すために、827 ターゲットのパネルを AmpliSeq for Illumina Custom RNA アッセイを用いてデザインしました。ライブラリーは Human Brain Reference RNA サンプルおよび Universal Human Reference RNA サンプルを用いてトリプレケートで調製しました。1 ng、10 ng、および 100 ng

のインプットライブラリーから脳とリファレンスの log2 比の発現量の比較により、高い一貫性と高い相関のあるデータが示されます (図 4)。

遺伝子発現プロファイルの研究では、インプット量の少ない、または品質の低いサンプルに頼ることがよくあります。がん研究では、サンプルは貴重な腫瘍検体と正常検体、または FFPE 組織サンプルを用いることがあります。FFPE 組織サンプルは豊富な生物学的情報源となりますが、これらのサンプルは固定と保存の処理による核酸分解によって、検証が困難である場合があります<sup>6</sup>。AmpliSeq for Illumina Custom RNA アッセイは、ポリ(A)のキャプチャーを行わずに、転写産物から直接増幅を行うことでこの問題に対処しています\*。

### デザインからデータ取得までの包括的なワークフロー

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は、プロセスのすべてのステップに対するソリューションを含む、デザインからデータ取得までの包括的なワークフローの一部です (図 5)。Custom RNA Panel は、特異的な遺伝子または目的の領域にインデックスを付加し、これらをターゲットにしたシーケンス用のライブラリーを産生します。わずか 1 ng の total RNA から開始でき、qPCR のような手法と比べて潜在的なバイアスを最小化し、ワークフローステップを削減するため、すべてのターゲットを 1 回の反応で増幅します。パネルのデザインを行った後、ライブラリー調製からデータ解析までわずか 2 日で行います。

### Design Studio Software による簡単なオンラインアッセイデザイン

無料のウェブアッセイデザインツールである、DesignStudio を用いることで簡単にカスタムコンテンツのデザインと注文が行えます。DesignStudio Software では、逐次デザインの状況を確認しながらターゲット領域のシーケンスカバレッジを最適化できるため、カスタムプロジェクトのデザインに要する時間を短縮できます。20,000 リファレンスシーケンス遺伝子から選択し、12 ~ 1200 アンプリコンの完全なカスタムパネルを作成できます。DesignStudio ツールにアクセスするには、お持ちの Myllumina アカウントにログインしてください。

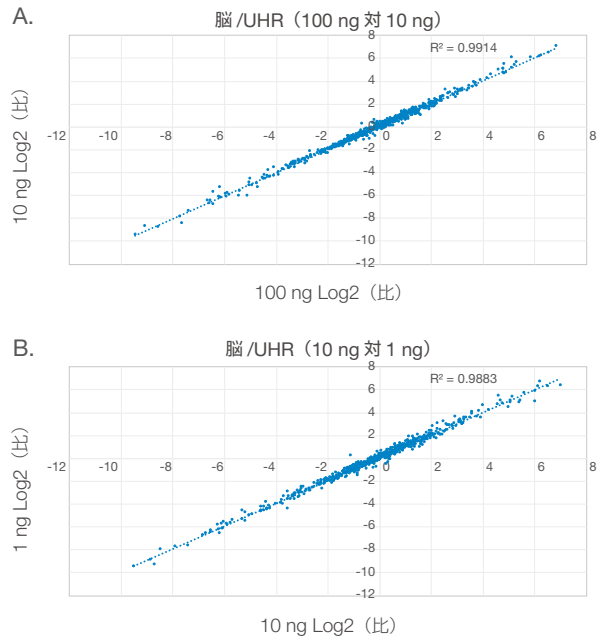


図 4: さまざまなインプット量での優れた性能 Human Brain Reference RNA と Universal Human Reference の (A) 100 ng と 10 ng の RNA サンプル、(B) 10 ng と 1 ng の RNA サンプルから生成したライブラリー間の log2 比の発現。

### ライブラリーマルチプレックスによるターゲットとサンプルへの高い適応能力

ライブラリーマルチプレックスは多くのライブラリーを一緒にプールし、同時にシーケンスすることが可能なプロセスです。マルチプレックスは、ラン時間やコストを大幅に増やすことなく、1 回のランで解析するサンプル数を飛躍的に増加させるパワフルな手法です。AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は、シーケンサーシステムの性能とカスタムパネルサイズに応じて、最大 384 のライブラリーを 1 回のランでマルチプレックスを実施することができます (表 2)。MiSeq システムで 2500 万リードで行う場合 (ターゲットあたり平均 1,000 リードで) 1 回のランあたり 25,000 データポイントを生成することができ、これは 384 ウェルプレート 65 枚分に相当します。最大 384 サンプルをマルチプレックスで処理するには AmpliSeq CD Indexes Sets A-D (イルミナ、カタログ番号 20031676) が必要です。

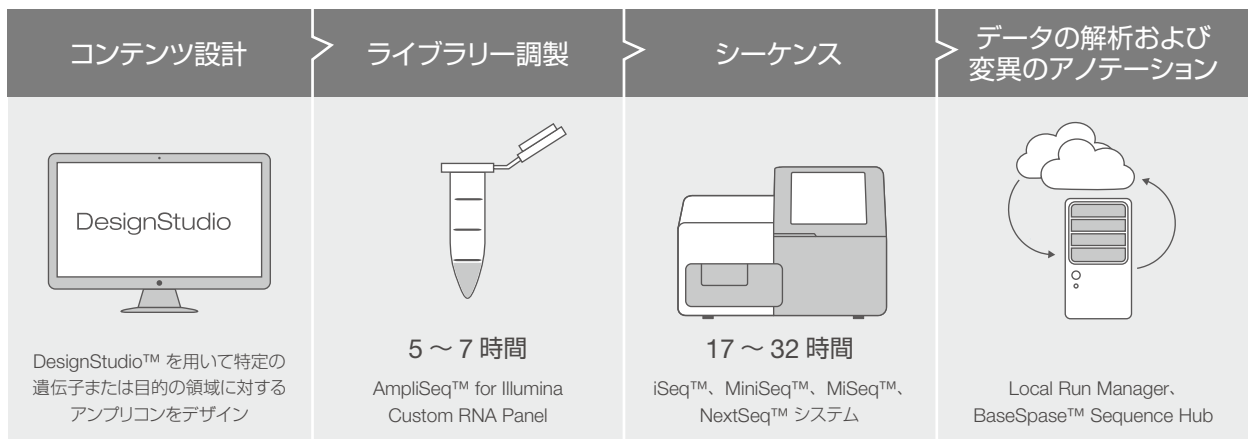


図 5: AmpliSeq for Illumina Custom RNA ワークフロー AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel は、アンプリコンデザインからデータ解析までの包括的な統合型シーケンスソリューションの一部です。

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。

表 2 : AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel によるマルチプレックス

カスタム RNA パネルの内容	実験ごとのリード <sup>a</sup>	装置 (リード/ラン)	サンプル/ラン
12 遺伝子パネル	50 K	iSeq 100 (400 万)	80
		MiniSeq HO (2,500 万)	384
		MiSeq v3 (2,500 万)	384
		NextSeq 550 MO (2 億 6,000 万)	384
NF-kB / Cell Cycle (168 ターゲット)	200 K	iSeq 100	20
		MiniSeq HO	125
		MiSeq v3	125
		NextSeq 550 MO (2 億 6,000 万)	384
MAPK (197 ターゲット)	100 万	iSeq 100	4
		MiniSeq HO	25
		MiSeq v3	25
		NextSeq 550 MO (2 億 6,000 万)	260
Immune Response (398 ターゲット)	100 万	iSeq 100	4
		MiniSeq HO	25
		MiSeq v3	25
		NextSeq 550 MO (2 億 6,000 万)	260

a. 実験あたり必要となるリード数は、パネルの内容、サンプルタイプによる転写産物プロファイル、実験デザインの目的により異なります。

## ユーザーフレンドリーなデータ解析

AmpliSeq for Illumina Custom RNA のデータ解析は、高度に訓練されたバイオインフォマティクスサポートまたは高性能な専用のコンピューティングインフラストラクチャーを必要としません。ローデータをシーケンサーシステムから直接 [BaseSpace Sequence Hub](#) に送ることも可能です。リードアライメントおよび発現プロファイルを含む二次解析は BaseSpace の [RNA Amplicon App](#) で行うことができます。このアプリにはリードカウントおよび差別的遺伝子発現解析のための Differential Expression Analysis (DESeq2) が含まれます。

## 装置上での解析

同一の二次解析ワークフローは Local Run Manager の RNA Amplicon Module で実施することができます。Local Run Manager はランの設定、稼働状況のモニタリング、シーケンス

データの解析を行うための装置に内蔵されたソフトウェアプラットフォームです。Local Run Manager はシーケンサーシステム (iSeq™、MiniSeq™、MiSeq™、NextSeq™ システム) の装置上で使用できるだけでなく、他のコンピューターにインストールして装置外で使用することもできます。

## 製品情報

製品名	カタログ番号
AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel	20020496
AmpliSeq for Illumina ERCC RNA Spike-In Mix	20030697
AmpliSeq for Illumina ERCC Companion Panel	20030696
AmpliSeq for Illumina CD Indexes Set A-D	20031676

\* FFPE サンプルでのパフォーマンスはサンプル品質、インプット量、およびパネルデザインに応じて異なります。FFPE サンプルを用いた研究にはライブラリー調製のために多くの RNA インプット量と高い平均シーケンスカバレッジを必要とすることがあります。

## 詳しくはこちらから

AmpliSeq for Illumina Custom RNA Panel の詳細については、こちらをご覧ください。

[www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-custom-rna-panel.html](http://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-custom-rna-panel.html)

## 参考文献

- Ozsolak F and Milos PM. [RNA sequencing: advances, challenges and opportunities](#). *Nat Rev Genet*. 2011; 12(2):87-98.
- Illumina. (2017) [Benefits of NGS Targeted Resequencing](#).
- Jamuar SS, Lam AT, Kircher M, et al. [Somatic mutations in cerebral cortical malformations](#). *N Engl J Med*. 2014; 371:733-43.
- Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. [Deep resequencing of GWAS loci identifies independent low-frequency variants associated with inflammatory bowel disease](#). *Nat Genet*. 2011; 43:1066-73.
- König K, Peifer M, Fassunke J, et al. [Implementation of amplicon parallel sequencing leads to improvement of diagnosis and therapy of lung cancer patients](#). *J Thorac Oncol*. 2015; 10:1049-57.
- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, and Schlimpberger M. [Determinants of RNA quality from FFPE samples](#). *PLoS ONE*. 2007; 2(12):e1261.
- Penland SK, Keku TO, Torrice C, et al. [RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors](#). *Lab Invest*. 2007; 794:383-391.

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
[jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illuminakk](https://www.facebook.com/illuminakk)

販売店

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。 販売条件 : [jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. 770-2019-004-A-JPN QB7644 14JUN2019

