

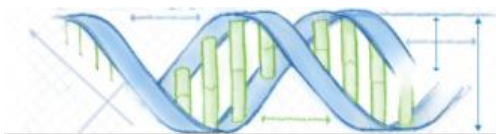
HaloPlex HS / HaloPlex カスタムデザイン操作法

SureDesign version 3.5 (日本語版)

2015/12/22

予告無くソフトウェアのアップデートを行う場合があります。そのため、本資料とソフトウェア画面が異なる場合があります。ご了承ください。

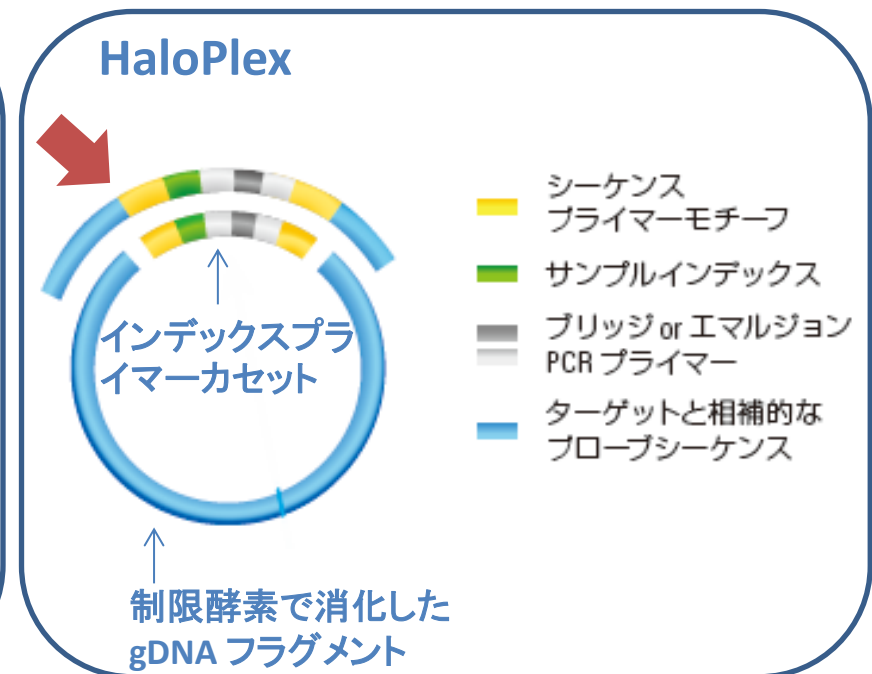
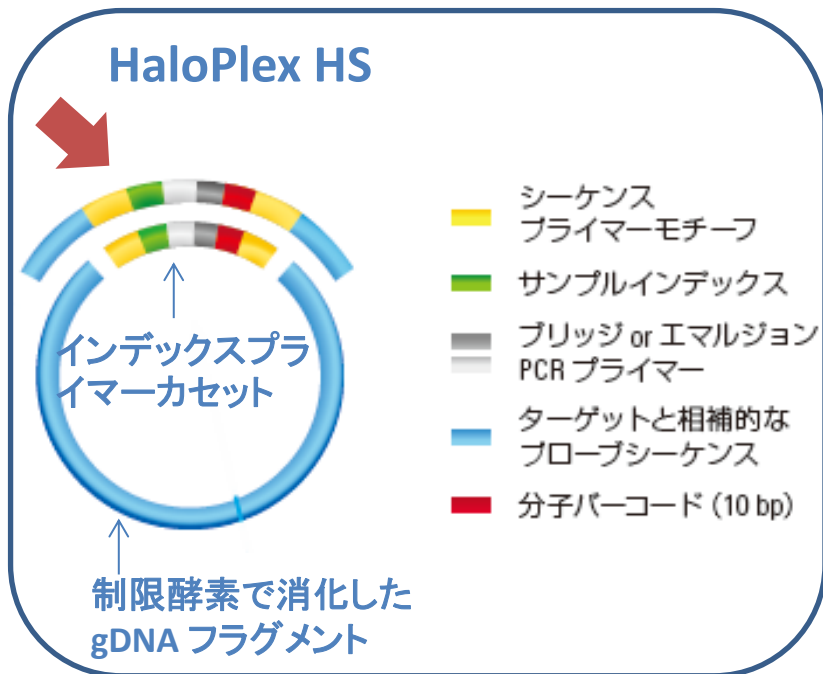
最新資料ダウンロードサイト ; <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002474>



1. 用語と定義

• HaloPlex HS / HaloPlex Probe

- ゲノムDNAの制限酵素処理によって生じる断片のうち、ターゲット領域に当たる断片の両端20数base に対して相補的な配列を持つシングルオリゴヌクレオチド



1. 用語と定義

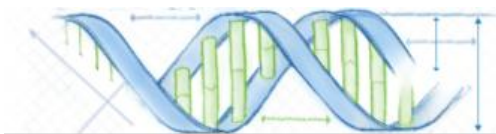
- **Design: デザイン**

- HaloPlex HS / HaloPlex Probe のあつまり
- ひとつのキットとして製造されるオリゴのセット



- **Design ID**

- HaloPlex HS / HaloPlex デザインのID番号です。この番号により、個々のデザインが認識されます。SureDesign から情報を得るときや、オーダーの際に必要な番号で重要な情報です。
HaloPlex HS / HaloPlex カスタムデザインを作成してオーダーする際は、必ずこの番号を記録しておくようにします。



1. 用語と定義

• 一つのDesign でキャプチャ対象とするターゲット領域について

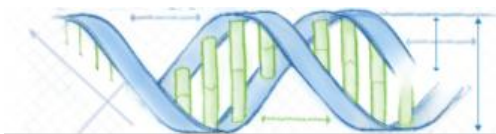
Capture Size やプローブ数によってイルミナ対応キットではTier 1-3、Ion PGM 対応キットではTier 1-2に区分され、価格が変わります。Tier1については、サイズの上限に達しなくてもプローブ数が20,000 個以上になる場合は Tier2となります。Tier 2, 3のプローブ数上限は200,000 個です。

イルミナ対応キット

- Tier1; 1 - 499 Kbp
(プローブ数20,000 未満)
- Tier2; 0.5 - 2.499 Mbp
(プローブ数200,000 未満)
- Tier3; 2.5 - 5 Mbp
(プローブ数200,000 未満)

Ion PGM対応キット

- Tier 1; 3-2.49 kb
(プローブ数20,000 未満)
- Tier 2; 250 kb - 2.5 Mb
(プローブ数200,000 未満)



2. カスタムデザイン作成開始の前に スタンダードウィザードとアドバンスドウィザード

SureDesign には2つのカスタム作成ウィザードがあります。

□ スタンダードウィザード (“アドバンスドオプションの表示”がチェックされていない状態)

- ・標準的な条件でプローブを設計
- ・1つのプローブグループからデザインを作成

→ 本資料をご覧ください

□ アドバンスドウィザード (“アドバンスドオプションの表示”がチェックされている状態)

- ・条件を変更してプローブを設計
- ・複数のプローブグループからデザインを作成
- ・独自のプローブをUploadしてデザインを作成

→ 別資料「[HaloPlex HS / HaloPlex アドバンスドオプションによるカスタムデザイン作成ガイド](#)」をご覧ください。

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002474>



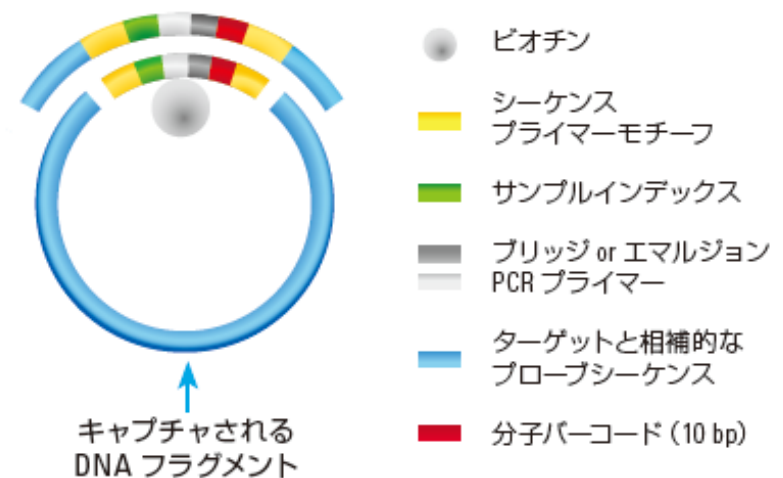
2. カスタムデザイン作成開始の前に

HaloPlex HS

SureDesign 3.0から追加されたHaloPlex HS は、従来のHaloPlex をベースに、DNA ライブラリに分子バーコードを導入することでPCR の Duplication を効果的に排除し、従来の NGS で用いられてきた手法と比較して、低頻度の変異を高い信頼性で検出することを目的とした製品です。**HaloPlex HS と従来のHaloPlex ではプローブの構造や実験プロトコル等が異なり、互換性がありません。**必ずカスタムデザイン作成前に、どちらを使用する予定か確認してからデザイン作成を開始して下さい。

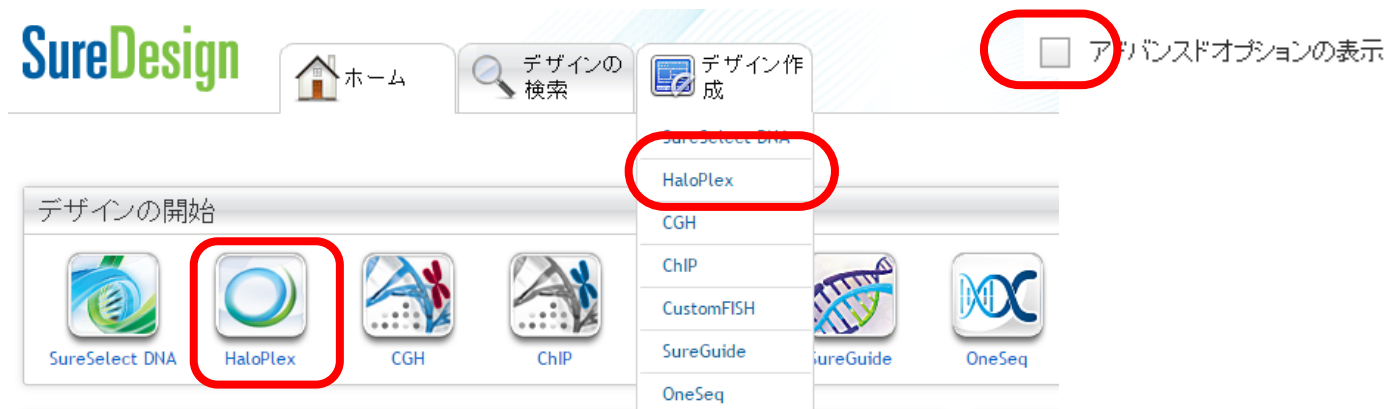
HaloPlex HS は、より最適な結果を得るために、SureDesign のアドバンスドオプションを用いて”FFPEサンプルに最適化”オプションを利用することをお勧めしています。初めてHaloPlex HS デザインを作成される場合は、別資料「[HaloPlex HS / HaloPlex アドバンスドオプションによるカスタムデザイン作成ガイド](#)」をご覧ください。

分子バーコード対応 HaloPlex HS のハイブリダイゼーション



3-1. HaloPlex HS / HaloPlex カスタムデザイン作成の流れ

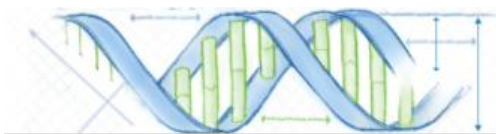
【アドバンスドオプション】からチェックが外れている状態で、【ホーム】タブのHaloPlex、もしくは【デザイン作成】タブのHaloPlex をクリックしてウィザードを開始します。



▶ デザインの定義

ターゲットの定義
ターゲットの確認
プローブの選択
ファイナライズ

カスタムデザイン作成の流れ



3-2. デザインの定義

HaloPlex HS または HaloPlex を選択します

Design Category: ☐ HaloPlex Next Gen PCR
☒ HaloPlex^{HS} High sensitivity Next Gen PCR using molecular barcodes

* デザイン名:

* 生物種:

ビルド:

* 作成先フォルダ: [選択](#)

* プラットフォーム: ▼

* リード長: ▼



3-2. デザインの定義

* デザイン名: OncoGene1

デザイン名を入力します。

* 生物種: H. sapiens

生物種はH. sapiensのみ選択できます。

ビルド: H. sapiens, hg19, GRCh37, February 2009

これから作成するデザインを入れるフォルダを選択します。【選択】をクリックして、新しくフォルダを作ることができます。

* 作成先フォルダ: AgilentGenomicsJapan

選択

* プラットフォーム: Illumina

NGSプラットフォームを選択します。

* リード長: 150

イルミナの場合のみ、リード長を100 bp, 150 bp, 250bpから選択。
Ion Torrent対応デザインはリード長はNAで固定。

NGSプラットフォーム選択

* プラットフォーム: Illumina

* リード長: Illumina
Ion Torrent PGM

リード長選択(イルミナ)

* プラットフォーム: Illumina

* リード長: 100

100
150
250

ここで選択するリード長は実際にシーケンシングする際のリード長です。

使用予定の機種・試薬にあわせてリード長を選択します。デザインとシーケンスのリード長が異なると、期待されるカバー率が得られなくなりますのでご注意ください。



3-3. デザインの定義

* ターゲット:

Enter gene IDs, gene symbols, or accessions.
SureDesign will map these identifiers to genomic locations
using the parameters below, then select probes from the
reference genome that match the locations.
SMAD4
NM_005359
ENST00000342988
CCDS11950
4089

Enter UCSC browser or BED coordinates
chr18:48573407-48573675
chr18 48573406 48573675

アップロード

例

クリア

ターゲットとする遺伝子または領域を、ここに示されたいずれかの形式で入力します。

- GeneID (推奨)
- GeneSymbol, AccessionID
- 位置情報
- アノテーション付き位置情報

複数のターゲットを入力する場合は、ファイルをUploadすることも可能です。

参照データベースを選択します。

* データベース

- ☒ RefSeq
- ☒ Ensembl
- ☒ CCDS
- ☒ Gencode
- ☒ VEGA
- ☒ SNP

キャプチャしたい領域

- ☒ コーディングエクソン
- ☐ コーディングエクソン+UTR
- ☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

隣接領域を含む:

3': 10 bp 5': 10 bp

☐ Allow Synonyms

どの領域をターゲットとするのかを選択します。

その領域の両側をどれだけ拡張してキャプチャするかを選択します。

Synonymを許容するかどうか選択します。

※詳細は次ページ以降を参照



3-3. デザインの定義

遺伝子名、アクセッションIDでの入力

* ターゲット:

BRCA1

アップロード

例

クリア

* データベース

- ☒ RefSeq
- ☒ Ensembl
- ☒ CCDS
- ☒ Gencode
- ☒ VEGA
- ☒ SNP

キャプチャしたい領域

- ☒ コーディングエクソン
- ☐ コーディングエクソン+UTR
- ☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

隣接領域を含む:

3': 10 bp 5': 10 bp

☐ Allow Synonyms

遺伝子の指定方法

(例)

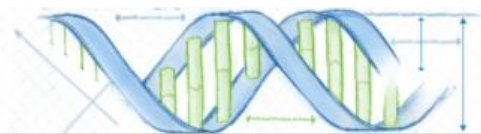
- Gene ID 4089
- Gene Symbol SMAD4
- RefSeq NM_005359
- Ensembl ENST00000342988
- CCDS CCDS11950
- VEGA OTTHUMT00000255993
- Gencode ENST00000342988
- SNP RS3740345

形式が混在していてもかまいません。
Gene IDを利用すると、選択したデータベースに登録されているIsoformを網羅し、かつ
Synonymの影響を避けることができます。

Allow Synonym

ここにチェックを入れると、Synonymも含めたデザインになります。
不要な遺伝子も入ってしまう可能性もあることにご注意ください。

500以上の遺伝子を入力する場合は次ページから参照してテキストファイルのアップロードにより入力してください。



3-3. デザインの定義

遺伝子名、アクセッションIDのアップロード

* ターゲット:

BRCA1

アップロード

例

テキストファイルをUploadする場合
の入力例 (GeneSymbol)

それぞれのGeneSymbolが異なる
行に記載されている必要があります。
ファイルはタブ区切りテキスト
ファイルとして保存してください。
カンマなどの記号は使用できません。

	A
1	AKT2
2	APC
3	BCL3
4	BCR
5	BRCA1
6	BRCA2
7	CBL
8	CCND1
9	CDK4
10	CSF1R
11	DCC
12	E2F1
13	EGFR
14	ELK1
15	ELK3

* データベース

- ☒ RefSeq
- ☒ Ensembl
- ☒ CCDS
- ☒ Gencode
- ☒ VEGA
- ☒ SNP

キャプチャしたい領域

- ☒ コーディングエクソン
- ☐ コーディングエクソン + UTR
- ☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

隣接領域を含む:

3' : 10 bp 5' : 10 bp

☐ Allow Synonyms

まずアップロードをクリックし、続けて 参照
をクリックして アップロードするファイルを
選択します



3-3. デザインの定義 データベースの選択

* ターゲット:

ABL
AKT2
APC
BCL2ALPHA
BCL2BETA
BCL3
BCR
BRCA1
BRCA2
CBL
CCND1
CDK4
CRK-II
CSF1R

アップロード

例

クリア

入力したGene ID, GeneSymbol や
Accession ID に対して
検索を行うデータベースを
選択します。

複数のデータベースを選択
した場合、この例では
選択したRefSeq およびCCDS
に登録されているCoding Exons
の位置情報をサーチして
両方の情報を反映する結果が
出力されます。

* データベース

- ☒ RefSeq
- ☐ Ensembl
- ☒ CCDS
- ☐ Gencode
- ☐ VEGA
- ☐ SNP

キャプチャしたい領域

- ☒ コーディングエクソン
- ☐ コーディングエクソン + UTR
- ☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

隣接領域を含む:

3' : 10 bp 5' : 10 bp

☐ Allow Synonyms



3-3. デザインの定義

SNPデータベースの選択

* ターゲット:

RS10824072
RS112643076
RS142879319
RS2072434
RS2076303
RS2277475
RS2744380
RS28639484
RS336283
RS35717505
RS3729711
RS3737378
RS3740345
RS45459491

アップロード

例

SNP IDをキャプチャのターゲットとして入力できます。

入力したSNP IDの位置情報を中心に、指定した隣接領域の長さが足された領域がターゲット領域として設定されます。その領域に対して、指定した条件でプローブが設計されます。

例えば3'、5'側にそれぞれ10bpの隣接領域を設定した場合、SNP位置をはさんで計21bpの領域がターゲットとなります。

クリア

(Repeat Masker との重なりにより、ターゲット領域のサイズは若干変わる場合があります。)

* データベース

- ☐ RefSeq
- ☐ Ensembl
- ☐ CCDS
- ☐ Gencode
- ☐ VEGA
- ☒ SNP

キャプチャしたい領域

- ☒ コーディングエクソン
- ☐ コーディングエクソン+UTR
- ☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

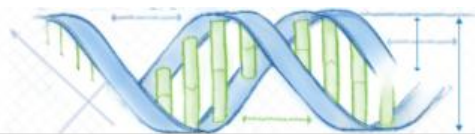
隣接領域を含む:

3' : 10 bp 5' : 10 bp

☐ Allow Synonyms

なおSNPのrs IDは頻繁にUpdateされているため、Not Foundになる場合があります。

その場合は、SNP位置から±10bp程度の幅をもたせたターゲット位置情報を入力ください。(後述参照)



3-3. デザインの定義

キャプチャしたい領域のパラメータ設定

キャプチャしたい領域

入力した遺伝子について選択したデータベースに登録されている位置情報をサーチします。

コーディングエクソンのみ

コーディングエクソン+5'UTR、3'UTR

全転写領域のいずれかが選択できます。

コーディングエクソン+UTRs

・5' UTR, 3' UTRのそれぞれで含めるかどうかを設定できます。

全転写領域

・Codings Exon, Intron, UTRをすべて含んだ領域の位置情報をサーチします。

* **Non Coding RNA** を検索する場合はコーディングエクソン+UTRsまたは全転写領域を選択してください。

Allow Synonym

Synonym を許容するかどうかを選択します。

不要な遺伝子も入ってしまう可能性もあることにご注意ください。

キャプチャしたい領域

☒ コーディングエクソン

☐ コーディングエクソン+UTR

☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

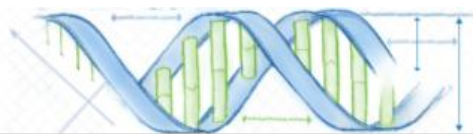
隣接領域を含む:

3' : bp 5' : bp

☐ Allow Synonyms

隣接領域を含む:

指定した領域からの延長分を0, 10, 25, 50 bp から選択できます。Coding Exons またはCoding Exons + UTRs を選択したときのみ有効です。



3-3. デザインの定義

ターゲットの位置情報の入力

位置情報のフォーマット

下記A またはB のいずれかのフォーマットで入力します。

フォーマットから、塩基の数が判断されます。フォーマットが異なると、意図した領域と1 bp ずれが生じますのでご注意ください。

A、Browser format

染色体の最初の塩基を「1番目」として、何番目の塩基までという指定方法(one-based, closed)タブまたはスペースで区切って領域にIDをつけることができます。いくつかの領域に同じID をつけることも可能です。

下記フォーマットに従い、1行に1 interval 記載します。

chr18:48573407-48573675 MyGene1

chr18:48575046-48575240 MyGene1

B、Bed format

染色体の最初の塩基を「0番目」として扱い、終わりのポジションを1つ次の番号で指定(zero-based, half open)。タブまたはスペースで区切って4番目のカラムに領域のIDを入力することができます。いくつかの領域に同じID をつけることも可能です。

下記フォーマットに従い、1行に1 interval 記載します。

chr18 48573406 48573675 MyGene2

chr18 48575045 48575240 MyGene2

* ターゲット:

Enter gene IDs, gene symbols, or accessions.
SureDesign will map these identifiers to genomic locations
using the parameters below, then select probes from the
reference genome that match the locations.

SMAD4
NM_005359
ENST00000342988
CCDS11950
4089

Enter UCSC browser or BED coordinates
chr18:48573407-48573675
chr18 48573406 48573675

Enter coordinates with identifiers
chr18:48575655-48575704 MyGene1

アップロード

例

クリア

* データベース

☒ RefSeq
☒ Ensembl
☒ CCDS
☒ Gencode
☒ VEGA
☒ SNP

キャプチャしたい領域

☒ コーディングエクソン
☐ コーディングエクソン+UTR
☐ 全転写領域 ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

隣接領域を含む:
3' : 10 bp 5' : 10 bp

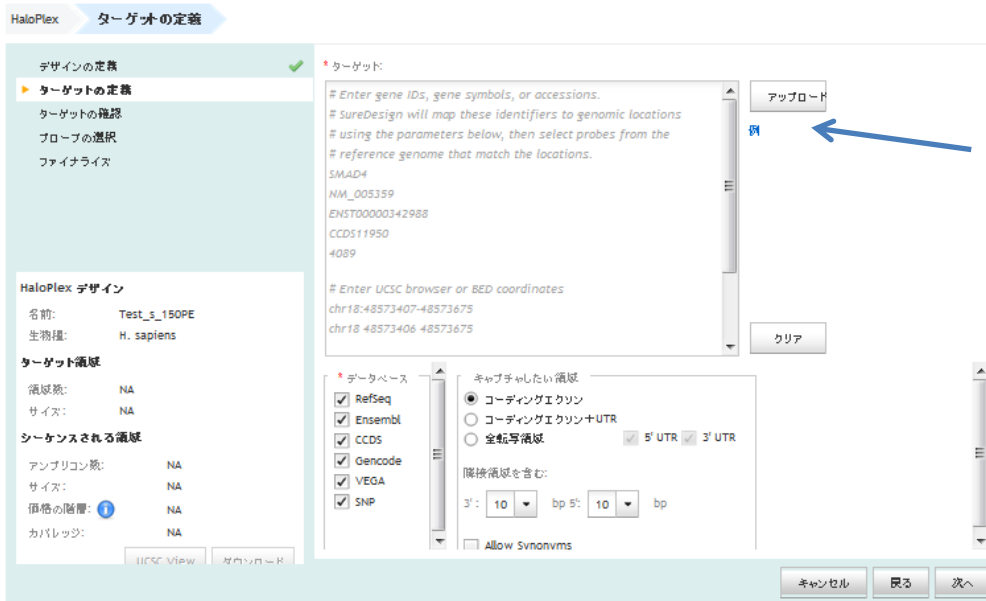
☐ Allow Synonyms

キャプチャしたい領域

位置情報で入力した場合、データベース、キャプチャしたい領域のパラメータは反映されません。



3-3. デザインの定義 ターゲットの位置情報のUpload

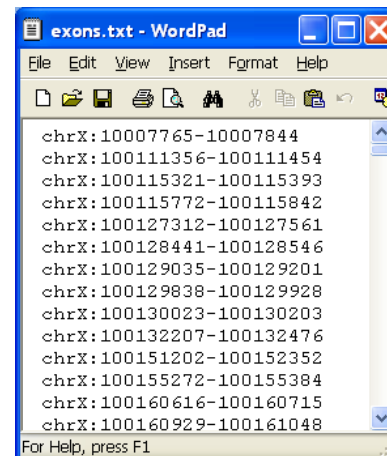


ターゲットの位置情報を含んだファイルを
Upload

前ページを参照し、Browser format または Bed format で
ターゲットの位置情報 (Genomic interval) を含んだ
ファイルを作成します。

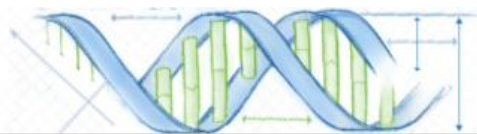
それぞれのinterval は異なる行に記載されている必要が
あります。ファイルはテキストファイルとして
保存してください。カンマなどの記号は使用できません。
アップロードできる領域数は最大80,000個です。

Browser formatの場合の例



まずアップロードをクリックし、続けて 参照
をクリックしてアップロードするファイルを
選択します。

Database, Regions of interestの
パラメータは反映されません。



3-3. デザインの定義

ターゲット遺伝子・位置情報を混在させるケース

Uploadを複数回行い
GeneSymbolやAccession IDと
位置情報を、両方とも一度に
入れることができるように
なりました。

<<重要>>

ただし、この場合、この設定では
遺伝子名で入力したものに対しては
Coding Exons に10bp ずつFlanking
したものがターゲット領域となり
位置情報の入力については
その位置情報そのものが
ターゲット領域となります。

(位置情報内部のCoding Exons
は検索しません。位置情報に
ついては、flanking 設定も
反映されません。)

HaloPlex ターゲットの定義

デザインの定義 ☒

ターゲットの定義 ☒

ターゲットの確認

プローブの選択

ファイナライズ

HaloPlex デザイン

名前: Test_s_150PE

生物種: H. sapiens

ターゲット領域

領域数: NA

サイズ: NA

シーケンスされる領域

アンブリコン数: NA

サイズ: NA

価格の階層: NA

カバレッジ: NA

ターゲット:

chr	start	end	gene
VRK3			
WEE1			
WEE2			
WNK1			
WNK2			
WNK3			
WNK4			
YES1			
chr17	41197694	41197819	BRCA1
chr17	41199659	41199720	BRCA1
chr17	41201137	41201211	BRCA1
chr17	41203079	41203134	BRCA1
chr17	41209068	41209152	BRCA1
chr17	41215349	41215390	BRCA1

データベース

☒ RefSeq

☒ Ensembl

☒ CCDS

☒ Gencode

☒ VEGA

☒ SNP

キャプチャしたい領域

☒ コーディングエクソン

☐ コーディングエクソン+UTR

☐ 全転写領域

隣接領域を含む: ☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

3': 10 bp 5': 10 bp

☐ Allow Synonyms

アップロード

クリア

3-3. Define Targets 設定の完了

SureDesign

ヘルプ - ターゲットの定義

HaloPlex

ターゲットの定義

デザインの定義

ターゲットの定義

ターゲットの確認

プローブの選択

ファイナライズ

HaloPlex デザイン

名前: Test_s_150PE

生物種: H. sapiens

ターゲット領域

領域数: NA

サイズ: NA

シーケンスされる領域

アンプリコン数: NA

サイズ: NA

価格の階層: NA

カバレッジ: NA

UCSC View

ダウンロード

* ターゲット:

VRK3
WEE1
WEE2
WNK1
WNK2
WNK3
WNK4
YES1
chr17 41197694 41197819 BRCA1
chr17 41199659 41199720 BRCA1
chr17 41201137 41201211 BRCA1
chr17 41203079 41203134 BRCA1
chr17 41209068 41209152 BRCA1
chr17 41215349 41215390 BRCA1

アップロード

例

クリア

* データベース

- ☒ RefSeq
- ☒ Ensembl
- ☒ CCDS
- ☒ Gencode
- ☒ VEGA
- ☒ SNP

キャプチャしたい領域

☒ コーディングエクソン

☐ コーディングエクソン+UTR

☐ 全転写領域

☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

隣接領域を含む:

3': 10 bp 5': 10 bp

☐ Allow Synonvms

設定が完了したら
次へをクリックします。
設定条件によるサーチが
開始されます。

キャンセル

戻る

次へ



3-3. Define Targets

ターゲット領域が上限を超えた場合

SureDesign ヘルプ - ターゲ

HaloPlex **ターゲットの定義**

デザインの定義 ✓

▶ **ターゲットの定義**

ターゲットの確認

プローブの選択

ファイナライズ

ターゲット:

chr17	41197694	41197819	BRCA1
chr17	41199659	41199720	BRCA1
chr17	41201137	41201314	BRCA1

アップロード

例

エラー

領域サイズが 5000000 bp を超えています。ターゲット領域の合計サイズを減らしてターゲットリストを再送信してください。

閉じる

HaloPlex デザイン

名前: Test_s_150PE

生物種: H. sapiens

ターゲット領域

サイズ: NA

シーケンスされる領域

アンプリコン数: NA

GenSeq

☒ Ensembl

☒ CCDS

☒ GenBank

コーディングエクソン+UTR

全転写領域

☒ 5' UTR ☒ 3' UTR

クリア

入力したターゲット領域の合計が5 Mb を超えると、エラーメッセージが表示され、Close すると再び入力画面に戻ります。ターゲットを削る、Flanking を減らすなどを行った上で、再度Next をクリックします。



3-4. Review Targets

Not foundになったターゲットの確認

ターゲットサマリ

- 8 個のターゲット ID に対して 2 個のターゲット (47 領域) が見つかりました。
- 1 個のターゲット ID が見つかりませんでした。

ターゲット詳細

[View targets in UCSC](#)

ターゲット ID	領域数	bp	Position
CBF	Not found		
BRCA1	6	440	chr17:41197695-41215390
C3	41	5812	chr19:6677882-6720610

Not Foundになっているターゲットの有無をターゲットサマリで確認し、具体的にどのTarget ID がNot Found であるかをDetails の画面で確認してください。

Not Found になっているターゲットについては、他の名前に変更する必要があります。戻るで元の画面に戻り、UCSCのBrowserでサーチできるGeneSymbol もしくはAccession ID にターゲット名を変更して再度デザインしてください。



3-4. Review Targets ターゲット領域の確認

見つからないターゲットが0
になったことを確認します。

トータルのサイズが
自分の予想と大きく
異なっていないかを
確認します。大きく
異なっている場合
設定を間違えている
可能性があるので
“戻る”で戻り、設定を
再確認します。

HaloPlex ターゲットの確認

デザインの定義 ✓
ターゲットの定義 ✓
▶ ターゲットの確認
プローブの選択
ファイナライズ

HaloPlex デザイン
名前: Test_s_150PE
生物種: H. sapiens
ターゲット領域
領域数: 78
サイズ: 10.833 kbp
シーケンスされる領域
アンプリコン数: NA
サイズ: NA
価格の階層: NA
カバレッジ: NA

ターゲットサマリ

- 8 個のターゲット ID に対して 3 個のターゲット (78 領域) が見つかりました。
- 0 個のターゲット ID が見つかりませんでした。

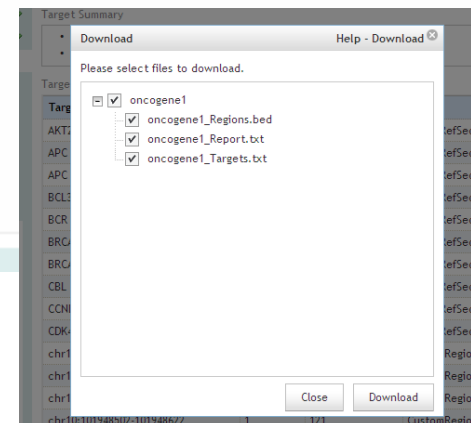
ターゲット詳細

ターゲット ID	領域数	bp	Position
BRCA1	6	440	chr17:41197695-41215390
C3	41	5812	chr19:6677882-6720610
CFB	31	4581	chr6:31895519-31919817

[View targets in UCSC](#)

ダウンロード

ターゲット領域の情報をダウンロードして
内容を確認します。



3-4. Review Targets

Downloadしたファイルによるターゲット領域の確認

name_Regions.bed

	A	B	C	D	E	F
1	browser position chr2:69702990-69870182					
2	track name="Target Regions" description="Agilent HaloPlex -					
3	chr2	69702990	69703105	AAK1		
4	chr2	69704001	69704132	AAK1		
5	chr2	69706072	69706203	AAK1		
6	chr2	69707981	69708103	AAK1		
7	chr2	69709832	69709954	AAK1		
8	chr2	69723106	69723222	AAK1		
9	chr2	69732690	69732815	AAK1		
10	chr2	69734542	69734720	AAK1		
11	chr2	69736352	69736602	AAK1		
12	chr2	69741592	69741891	AAK1		
13	chr2	69746075	69746382	AAK1		
14	chr2	69747955	69748130	AAK1		
15	chr2	69752154	69752254	AAK1		
16	chr2	69754337	69754461	AAK1		
17	chr2	69757129	69757282	AAK1		
18	chr2	69757746	69757848	AAK1		

name_Report.txt

	A	B	C	D	E	F
1	# File Summary					
2	File Type: HaloPlex Design Report					
3	Created By: W izard					
4	User: fumiko.yoshizaki@agilent.com					
5	Workgroup: Agilent					
6	Folder: Agilent					
7	Timestamp: 29-Sep-2012					
8						
9	# Design Summary					
10	Design Name: Halo_test					
11	Design Id: 09230-1348909164					
12	Species: H19, GRCh37, February 2009)					
13	Platform: Illumina					
14	Read Length: 100 bp					
15						
16	# Target Summary					
17	46 Target IDs comprising 783 regions.					
18	0 Target IDs were not found.					
19	Region Size: 143,511 kbp					
20						
21	# Target Parameters					
22	Databases: RefSeq, CCDS					
23	Region: Coding Exons					
24	Region Extend and 10 bases from 5' end.					
25						

name_Targets.txt

	A	B	C	D	E	F
1	# File Type: Input Target File					
2	# Timestamp: #####					
3	# User: fumiko.yoshizaki@agilent.com					
4	# Created: HaloPlex Design Wizard					
5	# Species: H. sapiens, 19, GRCh37, February 2009)					
6						
7	AAK1					
8	AATK					
9	ABL					
10	ACTR					
11	ACVR1					
12	ACVR1B					
13	ACVR1C					
14	ACVR2A					
15	ACVR2B					
16	ACVRL1					
17	ADCK1					
18	ADCK4					
19	ADCK5					
20	ADRBK1					
21	ADRBK2					
22	AKT1					
23	AKT2					
24	AKT3					
25	AIK					

ターゲット領域をbedファイルの形式で出力したものです。UCSCのBrowserなどで確認することができます。

ターゲット領域をサーチする条件やサーチ結果をまとめたサマリレポートです。

入力したターゲットの一覧です。ターゲットを再確認することができます。



3-4. Review Targets

ターゲット確認の完了、プローブデザインの開始

SureDesignヘルプ - ターゲットの確認

HaloPlex

ターゲットの確認

デザインの定義

ターゲットの定義

ターゲットの確認

プローブの選択

ファイナライズ

HaloPlex デザイン

名前: Test_s_150PE

生物種: H. sapiens

ターゲット領域

領域数: 78

サイズ: 10.833 kbp

シーケンスされる領域

アンプリコン数: NA

サイズ: NA

価格の階層: NA

カバレッジ: NA

UCSC View

ダウンロード

ターゲットサマリ

- 8 個のターゲット ID に対して 3 個のターゲット (78 領域) が見つかりました。
- 0 個のターゲット ID が見つかりませんでした。

ターゲット詳細

View targets in UCSC

ターゲット ID	領域数	bp	Position
BRCA1	6	440	chr17:41197695-41215390
C3	41	5812	chr19:6677882-6720610
CFB	31	4581	chr6:31895519-31919817

キャンセル

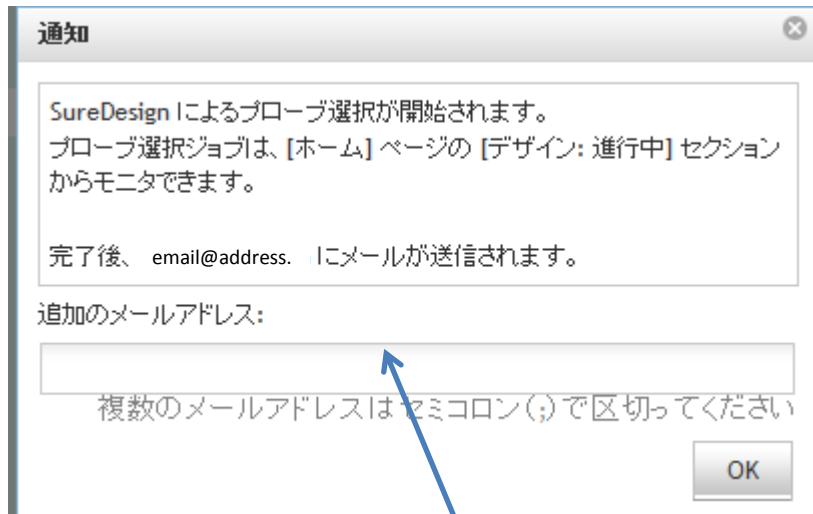
戻る

プローブ選択の開始

ターゲット領域の確認が完了したら
プローブ選択の開始をクリックします。
プローブデザインの画面に進みます。



3-4. Review Targets プローブデザインの開始



プローブデザインにはある程度の時間がかかります。
プローブデザインが完了すると、SureDesign に登録されている
メールアドレスに、メールで完了のお知らせがきます。
もし別のメールアドレスにお知らせがほしい場合には
ここでメールアドレスを入力します。



3-4. Review Targets プローブデザインの開始

SureDesign Help - Select Probes

HaloPlex **Select Probes**

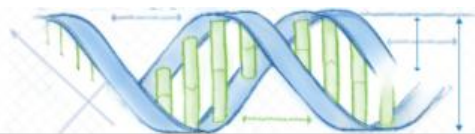
Define Design ✓
Define Targets ✓
Review Targets ✓
▶ **Select Probes**
Finalize

Your probe selection job is currently running.

HaloPlex Design
Name: Halo_test
Species: H. sapiens
Target Regions
Regions: 783
Size: 143.511 kbp
Sequenced Regions
Amplicons: NA
Size: NA
Price Tier: NA
Coverage: NA
[Download](#)

Close Design Wizard

Close Design Wizardをクリックして、この画面を閉じます。



3-5. プローブデザインの確認

プローブデザインが完了すると、下記のメールが登録されたメールアドレスに届きます。



SureDesign: HaloPlex probe selection succeeded

SureDesign has successfully selected probes for the design *Halo_test*.

To complete your design:

- Log into [SureDesign](#).
- Find your design in the Designs In Progress list on your home page.
- Click the 'continue' icon to reopen the design wizard.

添付レポートでデザインの結果を確認した後に、再度SureDesign にログインして、次のステップに進みます。



Contact support: informatics_support@agilent.com

Login to SureDesign: www.agilent.com/genomics/suredesign

Learn more about Agilent's high performance tools for genomics: www.agilent.com/genomics



3-5. プローブデザインの確認 プローブ数が上限を超えた場合

HaloPlex HS / HaloPlex で1つのデザインに含めることのできるプローブ数は最大200,000個です。入力したターゲット領域に対してデザインされるプローブ数が200,000を超えると、下記のメールが届きます。

SureDesign: HaloPlex probe selection failed

SureDesign was not able to process the probe selection job that you submitted for the design
Design_name.

Reason for failure: **Number of amplicons exceeds the limit for the HaloPlex Illumina protocol** Reduce the number of target regions and resubmit the design.

Please contact Agilent technical support for more information.



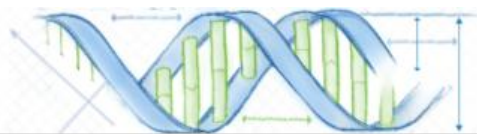
Agilent Technologies

Contact support: informatics_support@agilent.com

Login to SureDesign: www.agilent.com/genomics/suredesign

Learn more about Agilent's high performance tools for genomics: www.agilent.com/genomics

ターゲット領域を減らして再度デザインしてください。



3-5. Reportによるプローブデザインの確認

Design Information

Design Name: 20130111_1

Design ID: 04818-1357891703

Species: H. sapiens (H. sapiens, hg19, GRCh37, February 2009)

Platform: Illumina

Read Length: 100 bp

← リード長が使用予定のシーケンサ・試薬に適合していることを確認します。

Target Summary

115 Target IDs resolved to 117 targets comprising 1399 regions.

0 Target IDs were not found.

Region Size: 299.240 kbp

← Not Foundになっているターゲットがないことを確認します。

Amplicon Summary

Total Amplicons: 13138

Total Target Bases Analyzable: 280.29 kbp

Total Sequenceable Design Size: 694.43 kbp

Target Coverage: 93.67 %

Recommended Minimum Sequencing per Sample: 138.89 Mbp

Pricing: Illumina Tier 1 (Target Region Size = 0 - 499 kbp; up to 20K probes).

P/N: G9901B/C

← トータルのプローブの数とサイズを確認します。

← 推奨シーケンス量を確認します。

← Tierを確認します。

Target Parameters

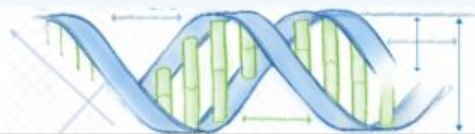
Databases: RefSeq, Ensembl, CCDS, Gencode, VEGA

Region: Coding Exons

Region Extension: 25 bases from 3' end and 25 bases from 5' end.

Allow Synonyms: Yes

← 設定パラメータを確認します。

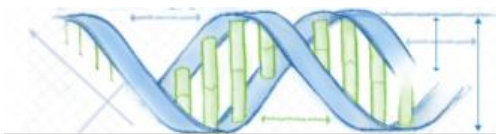


3-5. Reportによるプローブデザインの確認

Design Details

Target ID	Regions	Coverage	High Coverage ($\geq 90\%$)	Low Coverage ($< 90\%$)
AAK1	21	100.00 %	21	0
AATK	14	99.89 %	14	0
ABL	18	99.97 %	18	0
ABL	12	98.28 %	11	1
ACTR	21	99.79 %	21	0
ACVR1	9	100.00 %	9	0
ACVR1B	10	100.00 %	10	0

遺伝子ごと、領域ごとにDesign Coverageが表示されます。



3-5. プローブデザイン終了後 次のステップに進む

SureDesign



Home



Find
Designs



Create
Designs

Start Designing



HaloPlex



SureSelect DNA

Designs: In Progress



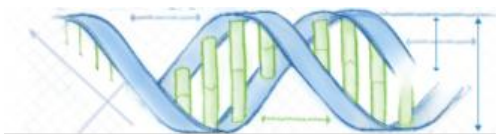
Halo_test

HaloPlex | Updated 29-Sep-2012 | HaloPlex Tiling (Complete)

Draft



Home画面のIn Progress中の
デザインでContinueボタンを
クリックして、次のステップに
進みます。



3-6. Finalize

SureDesign

Help - Finalize Design

HaloPlex

Finalize

Define Design ✓

Define Targets ✓

Review Targets ✓

Select Probes ✓

Finalize

Species: H. sapiens

Target Regions

Regions: 783

Size: 143,511 kbp

Sequenced Regions

Amplicons: 7475

Size: 385,994 kbp

Price Tier: Tier 1

Coverage: 99.37 %

Download

You are now ready to finalize this design. After finalizing:

- The design is finalized and the design summary report and the probe design are confirmed.
- The design is finalized and the design summary report and the probe design are confirmed.

特にPrice Tier (サイズとプローブ数によって価格帯が変わります)は
予期した価格帯のサイズになっているかどうか、必ず再確認ください。

デザインを再度変更したい場合はModify Design を
このまま最終確定する場合は Finalize Design をクリックします。
Finalize すると、このデザイン情報はアジレントの製造部に
送られますが、実際にオーダーするまでは製造は開始されません。

Modify Design

Finalize Design



3-6. Finalize デザインファイルのダウンロード

SureDesign

Help - Finalize Design

HaloPlex

Finalize

- Define Design ✓
- Define Targets ✓
- Review Targets ✓
- Select Probes ✓

Finalize

Species: H. sapiens

Target Regions

Regions: 783

Size: 143,511 kbp

Sequenced Regions

Amplicons: 7475

Size: 385,994 kbp

Price Tier:  Tier 1

Coverage: 99.37 %

Download

You are now ready to finalize this design. After finalizing:

- The design can no longer be modified.
- A design ID will be assigned.
- Design information will be sent to Agilent's manufacturing facility. Manufacturing will not begin until you have submitted a purchase order.

Download

Hel

Please select files to download.

- ☒ 09230-1348909164
 - ☒ 09230-1348909164_Report.pdf
 - ☒ 09230-1348909164_AllTracks.bed
 - ☒ 09230-1348909164_Amplicons.bed
 - ☒ 09230-1348909164_Covered.bed
 - ☒ 09230-1348909164_Regions.bed
 - ☒ 09230-1348909164_Report.txt
 - ☒ 09230-1348909164_Targets.txt

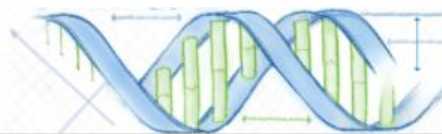
Finalize/Modify Design前に
デザインファイルをダウンロード
できます。
7ファイルをダウンロードして
確認します。
各ファイルの詳細は次ページで
説明します。

Modify Design

Finalize Design

Close

Download



3-6. Finalize Design デザインの最終確認

各ファイルの内容は下記のとおりです。

<Design ID>_Amplicon.bed

	A	B	C	D	E
1	track name="Amplicons" description="Agilent HaloPlex				
2	chr10	88635413	88635780	BMPR1A	
3	chr10	88635413	88635780	BMPR1A	
4	chr10	88635413	88635780	BMPR1A	
5	chr10				
6	chr10				
7	chr10				
8	chr10				
9	chr10				
10	chr10	88635737	88635938	BMPR1A	
11	chr10	88635766	88635994	BMPR1A	
12	chr10	88635766	88635994	BMPR1A	
13	chr10	88635766	88635994	BMPR1A	
14	chr10	88635766	88635994	BMPR1A	

Designに含まれる
Ampliconの位置情報を
記載したbed ファイル

<Design ID>_Covered.bed

	A	B	C	D	E
1	track name="Covered" description="Agilent HaloPlex				
2	chr1	92428159	92428661	BRDT	
3	chr1	92428666	92428761	BRDT	
4	chr1	92430112	92430329	BRDT	
5	chr1				
6	chr1				
7	chr1				
8	chr1				
9	chr1				
10	chr1	92441624	92442057	BRDT	
11	chr1	92442068	92442163	BRDT	
12	chr1	92442278	92442466	BRDT	
13	chr1	92442510	92443151	BRDT	
14	chr1	92443395	92443490	BRDT	
15	chr1				

Designでカバーされる
領域の位置情報を記載
したbedファイル

<Design ID>_Regions.bed

	A	B	C	D
1	browser position chr2:69702990-69870182			
2	track name="Target Regions" description="Agilent HaloPlex			
3	chr2	69702990	69703105	AAK1
4	chr2	69704001	69704132	AAK1
5	chr2	69706072	69706203	AAK1
6	chr2			
7	chr2			
8	chr2			
9	chr2			
10	chr2	69734542	69734720	AAK1
11	chr2	69736352	69736602	AAK1
12	chr2	69741592	69741891	AAK1
13	chr2	69746075	69746382	AAK1
14	chr2	69747955	69748130	AAK1

最初にInputしたターゲット
領域の位置情報を記載した
bedファイル

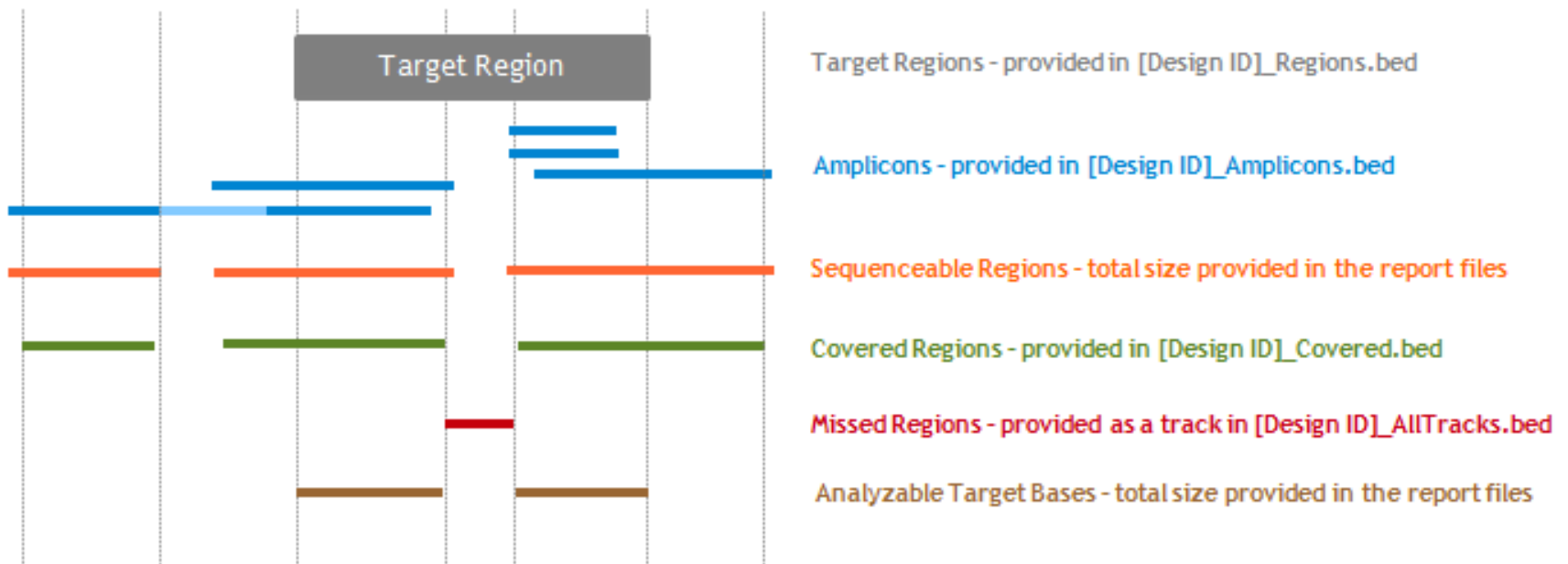
<Design ID>_AllTracks.bed

	A	B	C	D	E
1	browser position chr2:69702990-69870182				
2	track name="Target Regions" description="Agilent HaloPlex				
3	chr2	69702990	69703105	AAK1	
4	chr2	69704001	69704132	AAK1	
5	chr2	69706072	69706203	AAK1	
6	chr2				
7	chr2				
8	chr2				
9	chr2				
10	chr2	69734542	69734720	AAK1	
11	chr2	69736352	69736602	AAK1	
12	chr2	69741592	69741891	AAK1	
13	chr2	69746075	69746382	AAK1	
14	chr2	69747955	69748130	AAK1	
15	chr2	69752154	69752254	AAK1	
16	chr2	69754337	69754461	AAK1	

Amplicon, Covered, Regionsの
3トラックの情報を含む
bed ファイル



3-6. Finalize Design デザインの最終確認



Target Regions

ターゲット領域の位置情報、[Design ID]_Regions.bed に記載

Amplicons

実際に増幅されるアンプリコンの位置情報 [Design ID]_Regions.bed に記載

Sequenceable Regions

Ampliconの位置情報とリード長から計算された、実際にシーケンスされる領域
この領域の合計が、Report.pdf ファイルの "Total Sequenceable Design Size" となります。

Covered Regions

Sequenceable Region の両端を5 bpずつ削った領域。両端5 bpは制限酵素認識サイトであるため、バイアスがかかる可能性があり、解析可能領域からは除外しています。

[Design ID]_Covered.bed に記載

Missed Regions

解析できない領域 [Design ID]_AllTracks.bed の中のトラックとして記載

Analyzable Regions

Target RegionのうちCoveredに入っている領域。

この領域の合計が、Report.pdf ファイルの "Total Target Bases Analyzable" となります。



3-6. Finalize Design デザインの最終確認

各ファイルの内容は下記のとおりです。

<Design ID>_Report.txt

```
# File Summary
File Type: HaloPlex Design Report
Created By: HaloPlex Standard Design Wizard
User: fumiko.yoshizaki@agilent.com
Workgroup: Agilent
Folder: Agilent
Timestamp: 29-Sep-2012

# Design Summary
Design Name: Halo_test
Design ID: 00220_1240000164
Species: H. sapiens, hg19, GRCh37, February 2009
Platform: Illumina HiSeq
Read Length: 100 bp

# Target Summary
46 TargetIDs resolved to 49 targets comprising 783 regions.
0 TargetIDs were not found.
Region Size: 143.511 kbp

# Amplicon Summary
Total Amplicons: 7475
Total Target Bases Analyzable: 142.60 kbp
Total Sequenceable Design Size: 385.99 kbp
Target Coverage: 99.37 %
Recommended Minimum Sequencing per Sample: 77.20 mbp
```

Designのサマリーを記載
したテキストファイル

<Design ID>_Report.pdf

Design Information

Design Name: Halo_test
Design ID: 00220_1240000164
Species: H. sapiens, hg19, GRCh37, February 2009
Platform: Illumina HiSeq
Read Length: 100 bp

Designのサマリーを記載
したPDFファイル
メールで到着するものと
同じ内容

Target Summary
46 TargetIDs resolved to 49 targets comprising 783 regions.
0 TargetIDs were not found.
Region Size: 143.511 kbp

<Design ID>_targets.txt

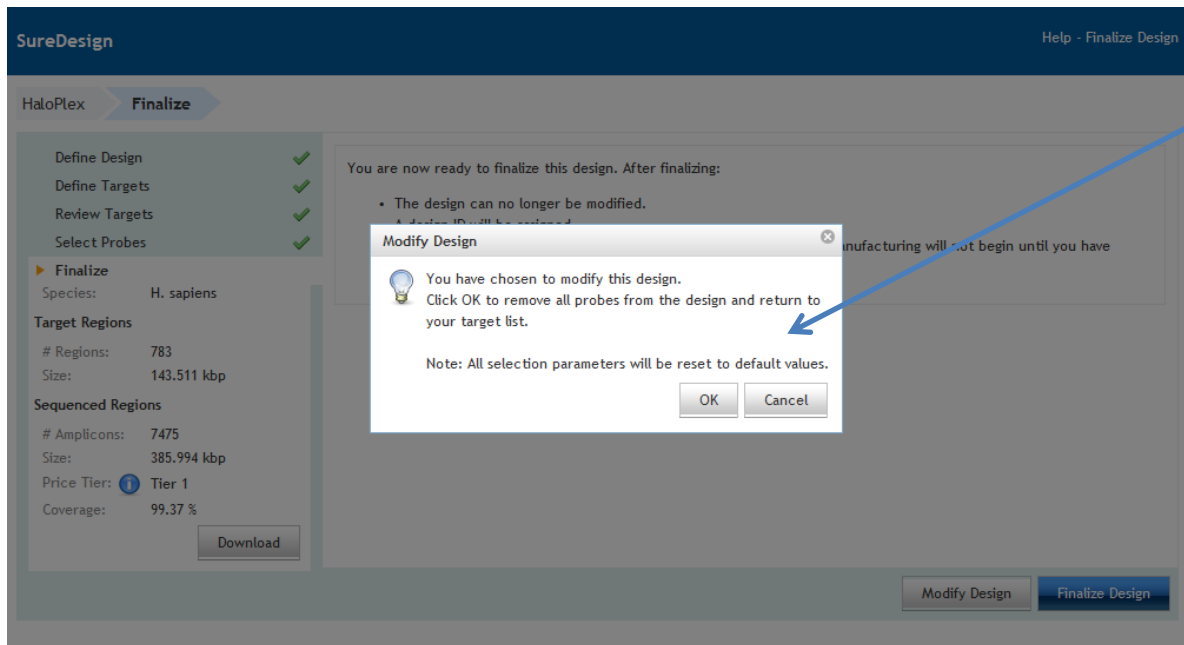
```
# File Type: Input Targets File
# Timestamp: 29-Sep-2012
# User:
# Created By: HaloPlex Standard Design Wizard
# Species: (H. sapiens, hg19, GRCh37, February 2009)

AAK1
AATK
ABL
ACTR
ACVR1
ACVR1B
ACVR1C
ACVR2A
ACVR2B
ACVRL1
ANKK1
```

最初にInputしたターゲット
の内容



3-6. Modify Design デザインの変更



Modify Designを選択すると
デザインされたプローブは
削除され、ターゲットのリスト
の画面に戻ります。
また全てのパラメータはDefault
設定に戻りますので、ご注意
ください。



3-6. Finalize Design デザインのファイナライズ

The screenshot shows the SureDesign web interface. At the top, there's a blue header with 'SureDesign' on the left and 'Help · Finalize Design' on the right. Below the header, a navigation bar shows 'HaloPlex' and 'Finalize' (the active step). On the left side, a sidebar lists the design process steps: 'Define Design', 'Define Targets', 'Review Targets', 'Select Probes', and 'Finalize'. The 'Finalize' step is expanded, showing details: 'Species: H. sapiens', 'Target Regions' with '# Regions: 6153' and 'Size: 2.467 Mbp', and 'Sequenced Regions' with '# Amplicons: 89239', 'Size: 4.177 Mbp', 'Price Tier: Tier 2', and 'Coverage: 97.91 %'. A 'Download' button is at the bottom of this sidebar. The main content area has a message: 'You are now ready to finalize this design. After finalizing:' followed by a bulleted list: 'The design can no longer be modified.', 'A design ID will be assigned.', and 'Design information will be sent to Agilent's manufacturing facility. Manufacturing will not begin until you have submitted a purchase order.' At the bottom right, there are two buttons: 'Modify Design' and 'Finalize Design'. A blue arrow points from the Japanese text on the right to the 'Finalize Design' button.

デザインの内容を確認したら
Finalize Designをクリックします。

ご発注前に必ずファイナライズが
必要です。



3-6. Finalize Design デザインの最終確認

SureDesign

Help - Design Complete

HaloPlex

Design Complete

Your HaloPlex design is now complete.

Name: Halo_test
Design ID: 09230-1348909164
Species: H. sapiens
Target Regions: 783
Total Target Regions Size: 143.511 kbp
Amplicons: 7475
Total sequenced regions size: 385.994 kbp
Price Tier:  Tier 1
Coverage: 99.37 %

Your design has been saved in the "Agilent" workgroup folder.

Order

Mark as Favorite

Download

Finalizeしたデザインを確認します。

Design詳細をDownloadボタンから取得できます。Finalize前のファイルと同じ内容になります。

Add to favoriteボタンを押すと、HomeタブのDesign Recent and Favorites欄に表示されます。



3-7. デザインサービス

ターゲットとする遺伝子、ゲノム領域のリストをお預かりして HaloPlex HS / HaloPlex のデザインを代行するデザインサービス(無料)もご用意しています。

下記のような複雑な条件設定が必要な際などにご利用ください。

- ・遺伝子によって、Coding Exon のみ、UTR ありなどの条件を変更したい
- ・Synonym を除いて設計したい
- ・Non coding RNA も設計に含めたい

ターゲット遺伝子、領域のリストを次ページからをご参照の上、ご用意いただきまして、担当営業あてにお問い合わせください。

3-7. デザインサービス お知らせいただく内容

デザインの概要

- ・プラットフォーム（Illumina または Ion PGM）
- ・リード長（Illumina の場合のみ、100 bp, 150 bp, 250 bp から選択。実際のシーケンシング時のリード長となります）

ターゲット領域の情報 遺伝子リストの場合

・遺伝子リスト

Gene Symbol または Gene ID または Accession Number のリスト
Synonym を避けるためには、Gene ID で指定いただくのが最も確実です。

・データベースの選択

RefSeq, Ensembl, CCDS, Gencode, VEGA
上記から1つ以上選択してください。

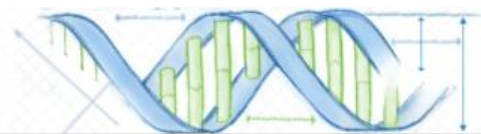
・ターゲット領域の条件

Coding Exons
Coding Exons + UTRs (3', 5' それぞれ指定可能)
Entire Transcribed Region (イントロン込み)
上記から1つ選択してください。

・Flanking Base

0. 10. 25. 50 bp から選択してください。

The screenshot displays two panels from the SureDesign interface. The left panel, titled '* Databases', contains a list of databases with checkboxes: RefSeq (checked), Ensembl (checked), CCDS (checked), Gencode (checked), and VEGA (checked). The right panel, titled 'Regions of Interest', contains three radio button options: 'Coding Exons' (selected), 'Coding Exons + UTRs' (unchecked), and 'Entire Transcribed Region' (unchecked). To the right of the 'Coding Exons + UTRs' option are two checked checkboxes for '5' UTR' and '3' UTR'. Below these is a section 'Include Flanking Bases:' with two input fields: '3': 10' and 'bp 5': 10' bp, each with a dropdown arrow. At the bottom of the right panel is an unchecked checkbox labeled 'Allow Synonyms'.



3-7. デザインサービス お知らせいただく内容

ターゲット領域の情報 ゲノム位置情報の場合

下記AまたはBのいずれかのフォーマットのリストをご用意ください。

フォーマットから、塩基の数が判断されます。フォーマットが異なると、意図した領域と1 bp ずれが生じますのでご注意ください。

A、Browser format

染色体の最初の塩基を「1番目」として、

何番目の塩基までという指定方法(one-based, closed)

タブまたはスペースで区切って領域にIDをつけることができます。いくつかの領域に同じIDをつけることも可能です。

下記フォーマットに従い、1行に1 interval 記載します。

chr18:48573407-48573675 MyGene1

chr18:48575046-48575240 MyGene1

B、Bed format

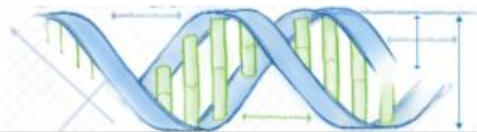
染色体の最初の塩基を「0番目」として扱い、終わりのポジションを1つ次の番号で指定(zero-based, half open)。

タブまたはスペースで区切って4番目のカラムに領域のIDを入力することができます。いくつかの領域に同じIDをつけることも可能です。

下記フォーマットに従い、1行に1 interval 記載します。

chr18 48573406 48573675 MyGene2

chr18 48575045 48575240 MyGene2

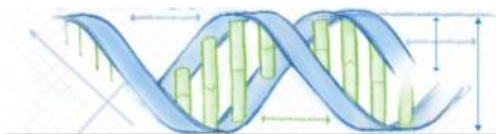


4. Order/Quote(見積もり依頼)

これ以降の操作につきましては
購入方法の資料もご参考ください。

SureDesign日本語資料サイト内「購入方法」

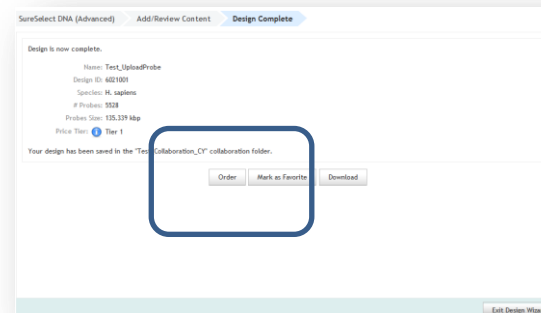
<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002474>



4. Order/Quote(見積もり依頼)

1) 見積もり画面に進むには、3つの方法があります。下記方法A,B,Cいずれかで見積もり画面に入ります。

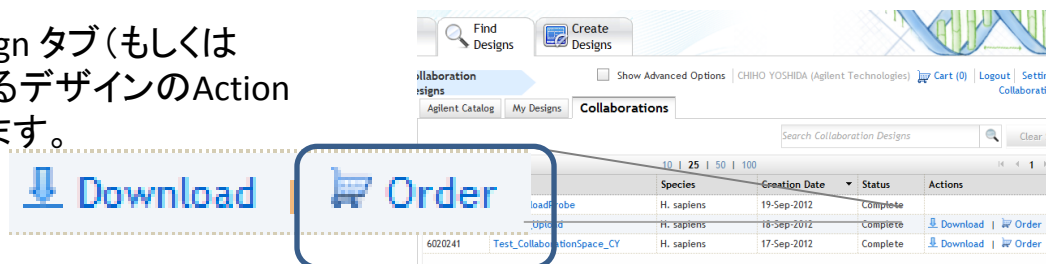
方法A; 前項Step 4の続き画面から手配する方法場合、Order ボタンをクリックします。



方法B; HomeタブのDesigns; Recent and Favorites の中から該当するデザインのOrderボタンをクリックします。



方法C; Fine DesignsタブのMy Design タブ(もしくは Collaboration タブ)の中の該当するデザインのAction 欄にあるOrder ボタンをクリックします。



2) 見積もり内容を設定します。

SureDesign Help - Order

HaloPlex **Order**

Design Name: Halo_test

Design ID: 09230-1348909164

* Quantity:

Sequencing Platform: Illumina

Sample size:

Design Part Number: G9901C

Workgroup Name
Agilent Technologies
Company Name
Internal
Company Number
Internal

You are currently logged into SureDesign.

SureDesign shares a shopping cart with the Agilent Genomics website. To purchase online, you also need to be registered with that site.

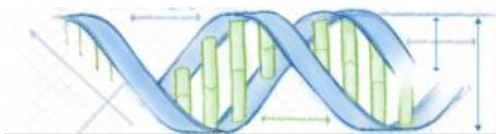
To check-out, click the cart icon, and you will be transferred to the Agilent Genomics page. You must be logged in to see your discounted prices.

Quantity; 注文するライブラリのキットの個数を設定 (例えば96 reaction 反応の試薬を2セット頼む場合、ここは 2を入力します)

Sequencing Platform; デザイン開始時に選択したプラットフォームが記載されています。
この段階での変更はできません。

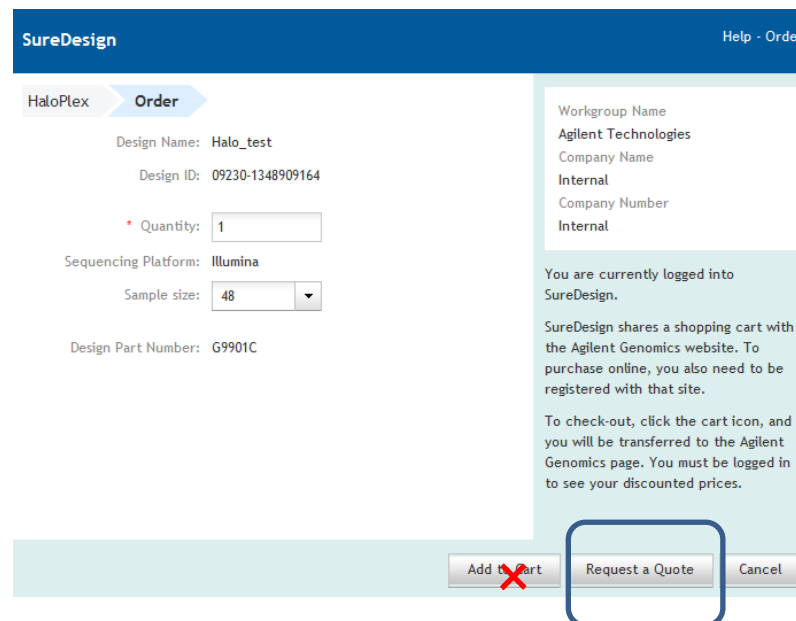
Sample Size; キットの1キットあたりのサンプル数を選択:

Sample size の 48とは、1種類のライブラリを 48反応分の解析に使用することを意味します。

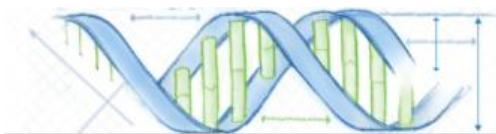
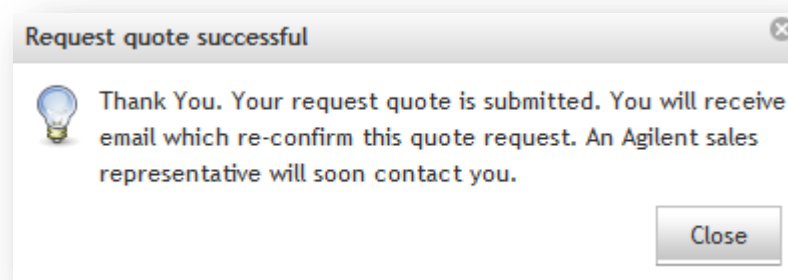


3) Request Quote ボタンを押してください。

*Add to Cart ボタンは日本ではご利用いただけません。



4) Request quote successful のボックスが表示されますのでClose ボタンで閉じてください。



4) 見積もり請求が送信された旨、メールが到着します。

差出人 ; Agilent Sure Design
[suredesign_noreply@agilent.com]

タイトル ; Sure Design: Request for quote for
HaloPlex HS kit received

内容 ; デザイン情報および見積もり依頼で設定
いただいた内容

SureDesign: Request for quote

We have received your request-for-quote for the following HaloPlex kit:

Design Details

Design ID: 09230-1348909164

Design Name: Halo_test

Species: H. sapiens

Kit Details

Sequencing Platform: Illumina

Samples: 48

Quantity: 1

Design Part Number: G9901C

Company details

Workgroup: Agilent Technologies

Company Name: Internal

Company Number: Internal



5) アジレント社担当営業もしくは取り扱い販売店から
見積もり金額の提示 → 発注へ

* 発注の際の注意事項は別紙ご参考ください。



標準納期は発注後
約6~8週間です。

5. お問い合わせ先

- SureDesign に関するサポートお問い合わせ窓口

TEL: 0120-477-111

E-mail: email_japan@agilent.com

SureDesign に関する質問と明示ください。

価格、納期等のご質問は、担当営業にご連絡ください。

