



# SureSelect Cancer All-In-One NGS ターゲットエンリッチメント

## 製品概要ガイド

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

All-In-One ターゲットエンリッチメントとは	2
キット型番	4
カスタムSureSelect Cancer All-In-Oneパネルの設計	5
SureSelect Cancer All-In-One アッセイのプロトコル上の留意点	6
SureCallでの結果の解析	8
ワークフローガイドライン	9

本日本語ガイドは、英語版の

SureSelect Cancer All-In-One Target Enrichment Product Overview Guide  
[G9702-90100], Revision B0, June 2019

に対応しています

## All-In-One ターゲットエンリッチメントとは

Agilent の SureSelect Cancer All-In-One は、1回の SureSelect アッセイで、以下の様々な構造変化について関心領域のゲノムを調べることができるターゲット次世代シーケンシング(NGS)ソリューションです。

- SNV (一塩基変異)
- InDel (短い挿入と欠失)
- 遺伝子の増幅や欠失を含む CNV (コピー数変異)
- トランスロケーション

SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムと、目的遺伝子に対して様々なタイプの変異をキャプチャするように設計したプローブオリゴライブラリを用いて、ターゲット NGS ライブラリを調製します。得られたNGS ライブラリを Illumina プラットフォームでシーケンスし、次いで Agilent の SureCall ソフトウェアを用いてデータを解析します。

SureSelect Cancer All-In-One プローブライブラリのオリゴは、検出目的とする変異タイプごとに、以下表1に示されるようなゲノム領域に標的する形で設計され、一つもしくは複数の変異を選択することができます。

表1 SureSelect Cancer All-In-One アッセイを用いて検出される変異

標的ゲノム領域	検出される変異タイプ
codingエキソンとエキソン-イントロンの境界	SNV、InDel、
選択したイントロン	トランスロケーション
ゲノムワイドおよび遺伝子領域のCNVバックボーン領域	CNV(遺伝子増幅および欠失)

カスタム SureSelect Cancer All-In-One パネル (最大 24 Mb) は、5ページに示されているように、Agilentの SureDesign ウェブアプリケーションの専用ワークフローを使用して作成します。肺または固形癌の研究に関連する遺伝子の変異をキャプチャするようにあらかじめデザインされたパネルもあります。

SureSelect Cancer All-In-One パネルを用いたライブラリの調製およびターゲットエンリッチメントは、SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input システムの標準プロトコルに従いますが、6ページに記載する点を追加でご注意ください。図1に、SureSelect Cancer All-In-One NGSサンプル調製ワークフローの概要を示します。

NGSデータが得られたあとは、Agilent の SureCall ソフトウェア (v4.1以降) が SureSelect Cancer All-In-One アッセイのシーケンスデータの解析ワークフローを提供します。SureCall は、変異タイプごとに特異的なプローブ (表1参照) によってキャプチャされたシーケンスを用いて、各種変異タイプの解析を行います。Triage View ウィンドウおよび Reports メニューから解析結果にアクセスします。詳しくは8ページをご覧ください。

## SureSelect Cancer All-In-One NGS Solution ワークフロー



図1. SureSelect Cancer All-In-One ターゲットエンリッチメント ワークフロー

## キット型番

SureSelect Cancer All-In-One LungアッセイとSureSelect Cancer All-In-One Solid Tumorアッセイは、SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input 試薬キットと、プローブキャプチャライブラリとのセット品として提供されます(表2参照)。カスタム SureSelect Cancer All-In-One キャプチャライブラリは、5ページに示されているように、Agilent の SureDesign ウェブアプリケーションで作成します。あらかじめデザインされたSureSelect Cancer All-In-One Lung と Solid Tumor キャプチャライブラリのデザイン内容も、SureDesign ウェブアプリケーションからアクセスできます。

表2 試薬キット+プローブキャプチャライブラリ型番

(カスタム SureSelect Cancer All-In-One キャプチャライブラリは試薬キットとのセットではありません。別途 SureSelect XT HS 試薬キットもしくは SureSelect XT Low Input 試薬キットをご購入ください。)

プローブ キャプチャ ライブラリ	SureSelect XT HS キット			SureSelect XT Low Input キット	
	16 反応、 インデックス 1-16	16 反応、 インデックス 17-32	96反応、 インデックス 1-32*	96 反応 インデックス 1-96 (マニュアル用 /自動化用)	96 反応 インデックス 97-192 (マニュアル用 /自動化用)
SureSelect Cancer AIO Lung,	G9704R	G9705R	G9706R	G9707R/G9507R	G9708R/G9508R
SureSelect Cancer AIO solid tumor	G9704S	G9705S	G9706S	G9707S/G9507S	G9708S/G9508S

\* インデックスプライマー1-32をそれぞれ3バイアル含む、合計96のライブラリ調製用

以下の表3の Agilent の Human Reference DNA は、6ページに詳述されているように、SureSelect Cancer All-In-One 解析における unmatched reference サンプルとして使用できます。

表3 Agilent Human Reference DNA 製品 (必要に応じて使用)

製品名	型番
OneSeq Human Reference DNA, Male	5190-8848
OneSeq Human Reference DNA, Female	5190-8850

## カスタム SureSelect Cancer All-In-One パネルの作成

Agilent の SureDesign ウェブアプリケーションの、SureSelect All-In-One デザインワークフローのウィザードに従い、SureSelect Cancer All-In-One キャプチャパネルを作成します(下の図2を参照)。あらかじめ定義されたがん遺伝子のリストから標的遺伝子を選択する、もしくは変異タイプごとに興味のある遺伝子名や領域を入力することで、カスタムパネルを作成することができます。CNVおよびトランスロケーションをターゲットとするデザインを作成するときに特に留意する点を以下に記載します。

CNV検出のための1つもしくは複数の遺伝子をターゲットとするCancer All-In-One カスタムパネルには、全てのパネルに 100 kb のプローブサイズの小さなゲノムワイド CNV backbone がパネルデザインに追加されます。さらに、CNV検出の標的遺伝子の転写領域、およびAgilent が定義する padding 領域に均等間隔に配置された backbone プローブも含まれます。これらの backbone は、コピー数のノーマライゼーションのための情報や、また、Agilentの SureCall CNVアルゴリズムが各CNVコールのクローン画分を推定するための一塩基多型(SNP) 情報を与えます。

トランスロケーションは、反復配列をより多く含むイントロン領域および遺伝子間領域で頻繁に起こります。そのため、トランスロケーションのホットスポット領域を含むデザインでは、エキソンにフォーカスしたデザインよりもキャプチャ特異性が低くなる可能性があり、その結果 on-target のリード率が低くなります。さらに、非常に小さなデザイン (50 kb 未満) では、on-target のリードの割合がより低くなる場合があります。

したがって、カスタム Cancer All-In-One パネルのデザインが 50 kb 未満の場合は、標的領域を追加するか、予備実験に基づいてシーケンシング量を増やして、on-target リード率の低下を抑えることを推奨します。AgilentのTier1カスタムプローブデザインは、最大 500 kb のターゲット領域を含むことができます。

カスタムパネルは、SureDesign の各パネルデザインの **Order** リンクをから注文することができます。

図2. SureDesignのSureSelect All-In-One カスタムデザイン画面。変異タイプごとに標的する遺伝子の設定を行います。(同じ遺伝子のCNVとトランスロケーションの両方をターゲットとするデザインは作成できません)

## SureSelect Cancer All-In-One Assay のプロトコル上の留意点

SureSelect Cancer All-In-One パネルを用いてのライブラリ調製およびターゲットエンリッチメントは、SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input システムプロトコルの内容に従って実施しますが、以下に示した追加の留意事項も使用してください。

### Reference サンプルの使用

Agilent の SureCall アプリケーションの SureSelect Cancer All-In-One システム解析では、実験サンプルのシーケンスデータに加えて、対象領域に構造変化のない reference サンプル (matched または unmatched) のシーケンスデータが必要です。CNVの検出では reference サンプルの内容が特に重要です。CNV検出感度を最も高めるためには、matched の正常の(非腫瘍組織) reference サンプルを含めて、腫瘍-正常のペア解析を行います。それができない場合、サンプルのターゲットエンリッチメントを行う度毎に、性別一致の reference サンプルまたは性別不一致の reference サンプルを含めます。プロトコルの出発物質として 50 ng の reference DNA を用います。

**注意** 同じプローブキャプチャライブラリで以前にキャプチャしたreference サンプルデータを使用することもできますが、バッチ差による潜在的なバイアスが、コピー数ノイズを増加させ、CNV検出の精度を低下させる可能性があります。

unmatched reference サンプルには、Agilent の Human Reference DNA 製品を使用することを推奨します。(別途購入が必要です。情報については表3を参照。)

Agilentが提供する reference サンプルの代わりに別の reference サンプルを使用する場合、特に重要なことは、サンプルが二倍体であり、CNV変化が全くない、もしくは最小限であることです。さらに、選択した Agilent 以外の reference DNA サンプルを使ってバリデーションを行うことをおすすめします。選択したreferenceサンプルを既知構造変化を有するサンプルと比較解析し、SureCall がそのCNVおよびその他の構造変化を正確にコールすることを確認してください。

### サンプルタイプ、腫瘍含量、DNAインプット量の推奨

SureSelect Cancer All-In-Oneシステムは、細胞株、新鮮凍結組織、およびFFPE組織ブロックから精製されたDNAサンプルに対応しています。Agilentは、ctDNA または針吸引サンプルから精製したDNAによる SureSelect Cancer All-In-One システムはバリデーションしていません。また15%以上の腫瘍細胞含量を有する腫瘍サンプルの使用を推奨します。

SureSelect Cancer All-In-One システムによりエンリッチおよび解析するサンプルとして、使用ゲノムDNAの最適範囲は50 – 200 ngです。SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムのユーザーマニュアルに記載されている10 – 200 ngのインプットDNA範囲を使用することができるかもしれませんが、50ng以下のDNAを使用した場合、検出感度は低下することがあります。

### FFPEサンプルの定量

FFPEサンプルに関しては、Agilentは、qPCRベースのAgilent NGS FFPE QC Kitを使用して品質を確認し、その後qPCRで測定した増幅可能なDNAの濃度を使用してインプットDNAサンプルを調製することを推奨しています。qPCR法が使用できない場合は、QubitアッセイまたはAgilentの Genomic DNA ScreenTape アッセイによりインプットDNA量を測定することも可能です。

## SureCall 解析では分子バーコードを使用しません

現在、SureCall ソフトウェア (v4.1) の *All-In-One Analysis* ワークフローは、duplicate リードを排除するときに分子バーコードを使用しません。しかしながら、SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムにより調製されるライブラリには分子バーコードが含まれているので、カスタマイズした解析パイプラインを使えば、分子バーコードに基づく duplication 排除を実行することは可能です。

*SureCall All-In-One Analysis* ワークフロー (詳しい情報は [8 ページ](#)参照)で解析するにあたり、標準の方法で得られるのはシングルインデックスサンプルのため、i5 分子バーコードのリードを取得する必要はありません。もしご自身の実験デザインに、この標準ワークフローとは異なるサンプルの調製方法や解析方法が含まれている場合は、i5 インデックスリードを取得して解析するかどうかを検討する必要があります。i5 インデックスリードを必要とするものとしては、Agilent の Dual Indexing P5 Indexed Adaptor で調製したサンプルを使用したデュアルインデックススペースの demultiplexを行う場合、および分子バーコードリードを組み込んだカスタマイズした解析パイプラインを使う場合です。

## シーケンスリード長

トランスロケーションの検出には、Agilent は少なくとも 2×100bp、できれば 2×150bp のペアエンドリードでのシーケンスを強く推奨しています。他のアプリケーションでは、SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ターゲットエンリッチメントシステムユーザーマニュアルに記載されているリード長の推奨内容に従ってください。

## シーケンス深度

50 ng のDNAインプット量のときのシーケンス深度の推奨は、5% 変異アリル頻度 (VAF) については 4000x 以上、1% VAF については 8000x 以上です。DNAインプット量が少ないほど、また、DNAが分解しているほど (DIN <3 もしくは ddCq >2)、より多くのシーケンス深度が必要となることがあります。

SureSelect Cancer All-In-One Lung と Solid Tumor アッセイの推奨リード数を以下の表4に示します。

表4 リード数の推奨

アッセイ	ターゲット VAF	推奨リード数
SureSelect Cancer All-In-One Lung アッセイ	5%	9 M
	1%	18 M
SureSelect Cancer All-In-One Solid Tumor アッセイ	5%	30 M
	1%	60 M

## SureCall での結果の解析

Agilent の SureCall ソフトウェア v4.1 は、SureSelect Cancer All-In-One アッセイのシーケンスデータの解析に必要なツールとアルゴリズムを有します。SureCall は、アラインメント前の FASTQ ファイルまたはアラインメント後の BAM ファイルを使用して解析をおこなうことができます。

SureCall を使用して SureSelect Cancer All-In-One データを解析する手順を図3に示しました。SureCall Help 機能により、それぞれのステップについて具体的な操作説明をみることができます。SureCall ソフトウェアの任意の画面からF1を押すと、関連する Help の内容にアクセスすることができます。

### SureSelect Cancer All-In-One アッセイの SureCall Analysis Workflow

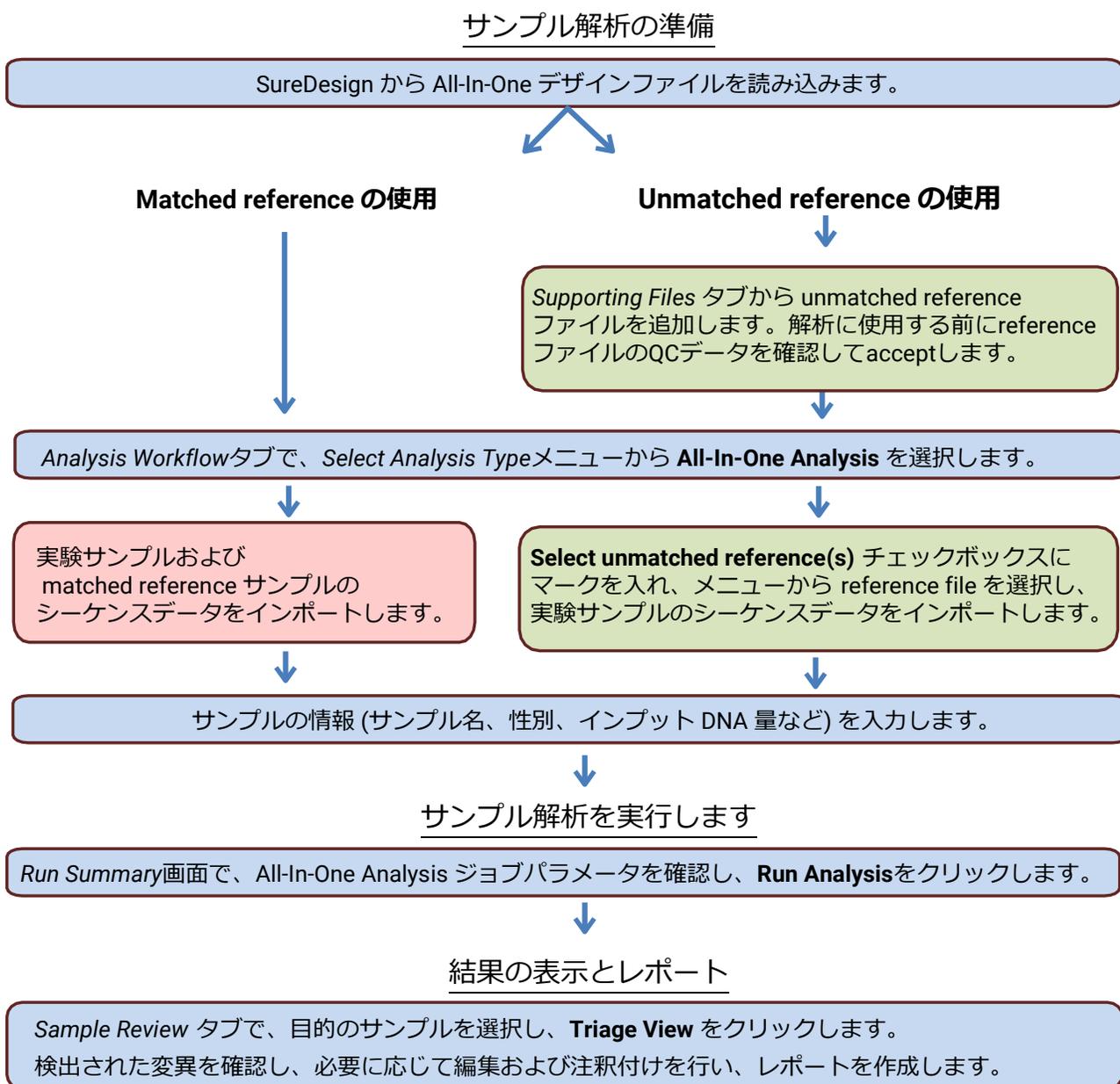


図3. SureCall の All-In-One データ解析ワークフロー 概要

## ワークフローガイドライン

サンプルの内容		
サポートするサンプルタイプ	サンプルの詳細	腫瘍含量
高品質のDNAサンプル	新鮮凍結細胞、細胞株、およびその他の通常高品質のDNAを得られるサンプルタイプ。	15%以上(ヘモトキシリン&エオシン染色で測定)
FFPEのDNAサンプル	切除組織(カール状切片またはスライド切片)により取得したもの。5 $\mu$ mの切片、最少3枚を推奨。	15%以上(ヘモトキシリン&エオシン染色で測定)
サポートしていないサンプルタイプ	コメント	
ctDNA	SureSelect Cancer All-In-One アッセイは、このサンプルタイプに対して、特別な最適化をしていません。しかし、ctDNA サンプルは、SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ライブラリ調製工程で、DNA断片化を省略することで結果を得られる可能性があります。最適化するために、読んだシーケンス深度が期待されるアリル頻度に対して適切であることを確認してください。	
針吸引/針生検	SureSelect Cancer All-In-One アッセイは、このサンプルタイプに対して、特別な最適化をしていません。サンプルから抽出したDNAが推奨DNAインプット量(50 ng)を満たすのであれば、サンプルはSureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input ライブラリの調製に進めることができる可能性があります。キャプチャ前ライブラリのQC結果で、量とサイズ分布がライブラリDNAとして想定内であれば、ライブラリはSureSelect Cancer All-In-One アッセイターゲットエンリッチメントおよびNGS解析ワークフローステップに適している可能性があります。	

DNA抽出とQC			
サポートするサンプルタイプ	推奨DNA抽出キット	最適なDNA QC方法と基準	代替DNA QC法と基準
高品質のDNAサンプル	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	50-200 ng インプットDNA、Qubit BR dsDNA アッセイ (Thermo Fisher Scientific)で定量し、AD260/280にて品質を確認する。	50-200 ng インプット DNA、Qubit BR dsDNA アッセイ (Thermo Fisher Scientific) または Agilent TapeStationあるいはBioanalyzerプラットフォームアッセイで定量し、AD260/280にて品質を確認。
FFPEのDNAサンプル	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) または Agencourt FormaPure Kit (Beckman Coulter)	50-200 ng インプット DNA、Agilent NGS FFPE QC Kitを用いたqPCRにより品質を確認する。 SureSelect Cancer All-In-Oneアッセイでは $\Delta\Delta Cq \leq 5$ を推奨。 品質に応じた定量方法: $\Delta\Delta Cq \leq 1$ の高品質のサンプルは Qubitで測定した濃度を使用。 $\Delta\Delta Cq > 1$ の低品質サンプルは、qPCRで測定した増幅可能なDNAの濃度を使用。	50-200 ng インプットDNA、Agilent TapeStation Genomic DNA Analysis アッセイで品質を確認する。SureSelect Cancer All-In-One アッセイには DIN=2 以上を推奨。Qubit BR dsDNA アッセイで定量する。

断片化		
サポートするサンプルタイプ	機械的 (Covaris) 断片化ガイドライン	酵素による断片化ガイドライン
高品質のDNAサンプル	SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input システムプロトコルに従い、2ラウンドの断片化 (2×120秒) を行います。	SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentationプロトコルに示されているDNA断片化プロトコルを用います。このプロトコルは、7 µl容量中 50–200 ng のインプットDNA試料を必要とします。DNAサンプル容量は、nuclease-free水で希釈するか、または真空濃縮、DNAスピニングまたは他の適切なDNA濃縮法を用いた方法によって調節します。
FFPEのDNAサンプル	SureSelect XT HS または SureSelect XT Low Input システムプロトコルに従い、1ラウンドの断片化 (240秒) を行います。高度に分解されたサンプルを含め、全てのFFPEサンプルについて同じ断片化条件を用います。Covaris を用いた機械的断片化では、すでにターゲット断片化サイズより小さいDNAはさらに断片化されることはありません。	高度に分解されたサンプルを含め、全てのFFPEサンプルについて同じ断片化条件を用います。DNA断片の末端がligationに適しているようにするためです。高品質のDNAサンプルについては上記のガイドラインを参照のこと。

キャプチャ前QC、ハイブリダイゼーション、キャプチャ後QCチェックポイント			
サポートするサンプルタイプ	キャプチャ前 QC	ハイブリダイゼーションに使用する量	キャプチャ後 QC
高品質のDNAサンプル	Agilent TapeStation または Bioanalyzerシステムでキャプチャ前ライブラリDNAを定量し、品質を確認します。エレクトロフェログラムは、300-400 bp のDNA断片サイズのピークを示し、収量は通常500 ng 以上です。	500–1000 ng の調製ライブラリDNA	Agilent TapeStation または Bioanalyzerシステムで、キャプチャ後ライブラリを定量し、品質を確認します。エレクトロフェログラムは、200–400 bp の DNA 断片サイズのピークを示します。
FFPEのDNAサンプル	Agilent TapeStation または Bioanalyzerシステムでキャプチャ前ライブラリDNAを定量し、品質を確認します。エレクトロフェログラムは、200-400 bp のDNA断片サイズのピークを示し、典型的に収量は300 ng 以上です。	最適な結果を得るためには 500–1000 ng の調製ライブラリDNAを用いてハイブリダイズします。500ngの増幅プレキヤプチャライブラリが得られない場合 (例えば、高度に分解されたDNAサンプルから調製されたライブラリの場合)、300ngまでDNAインプット量を減らすことも可能ですが、その場合キャプチャ性能またはNGSデータ基準に影響することがあります。	キャプチャ後ライブラリ収量は非常に多様です。各サンプルの収量がサンプルプールの計画とNGSプラットフォームの要件にあっていればシーケンスに進みます。

シーケンス	
サポートする サンプル タイプ	ライブラリ・プール・ガイドンス
高品質のDNA サンプル	Illumina のシーケンスサンプル調製プロトコルに応じて、キャプチャ後ライブラリを等モル量プールし、2nM、4nM、または10nMの濃度に調製します。真空濃縮を用いてプールを乾燥し、次いで必要な容量で再懸濁するか、もしくはSolid Phase Reversible Immobilization (SPRI) ビーズを用いてシーケンスライブラリープールの容量を調整することもできます。
FFPEのDNA サンプル	

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## 本書は

本ガイドは、Agilent の SureDesign アプリケーションを用いた  
プローブキャプチャライブラリの作成、  
SureSelect XT HS Reagent Kits または  
SureSelect XT Low Input Reagent Kits のいずれかを用いたサンプル調製、  
および Agilent の SureCall ソフトウェアによる解析に関する留意点を含む、  
Agilent の SureSelect Cancer All-In-One システムの概要情報を示します。

© Agilent Technologies, Inc. 2018, 2019  
Revision B0, June 2019

G9702-90100

