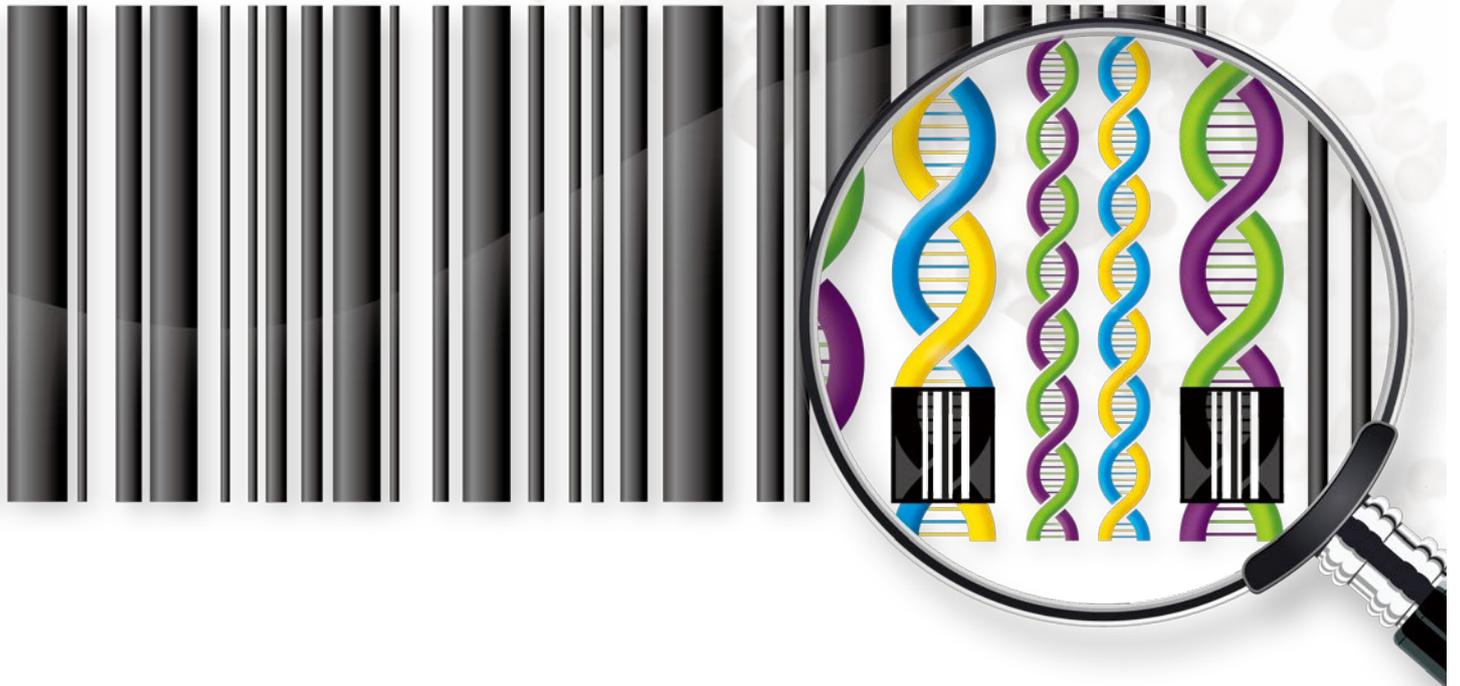


次世代シーケンス用ターゲットエンリッチメント試薬

SureSelect XT HS



FFPE サンプルに
対応



高感度



ワークフローの
簡素化



Agilent Technologies

SureSelect XT HS

What is it?

SureSelect XT HS は、アジレントの次世代シーケンス (NGS) 用の最も高感度なハイブリッドキャプチャベースのライブラリ調製とターゲットエンリッチメントのソリューションとして、新たに SureSelect ライブラリ調製試薬のラインナップに加わりました。

KEY FEATURES

- **10 ng** の DNA からスタート
- 高品質で分解していない DNA や高品質の FFPE 由来 DNA だけでなく、低品質の **FFPE 由来 DNA** にも最適化
- **分子バーコード** による陽性的中率 (PPV) の向上
- ターゲット領域にマップされるリードの割合が高く、複雑性が高いライブラリを作製
- ハイブリダイゼーション時間は **90 分**、**マスターミックス** 試薬で迅速で効率的なワークフローを実現



FFPE サンプルに対応

FFPE サンプルに最適化したライブラリ調製の重要性

FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) サンプルからは多様な遺伝子情報を得ることができますが、FFPE 組織からの DNA 精製においては、増幅・検出に必要なサイズ・品質の DNA を精製することが課題として挙げられます。通常、ライブラリ調製のために DNA を精製するまでの間に、FFPE 由来 DNA は分解しすぎた状態になってしまい、高感度な NGS 解析は困難な場合があります。そのため、ライブラリ調製方法を最適化しステップ数を最低限に抑えることは、サンプルロスを低減し分析困難な FFPE サンプルから高品質なライブラリを調製するためにきわめて重要です。

FFPE サンプルに最適化したアジレントのライブラリ調製

SureSelect XT HS は、さまざまなタイプの組織の新鮮なサンプルおよび FFPE サンプルから、わずか 10 ~ 200 ng のインプット DNA 量で、ターゲット領域にマップされるリードの割合が高く、複雑性が高いライブラリを作製することができます。さまざまな品質の FFPE サンプルに対する 1 塩基置換 (SNV) 検出の精度と変異検出の一貫性を改善するために、アジレントは DNA の品質評価法 (FFPE QC キット、型番 G9700A/G9700B、および 4200 TapeStation システム) と単一チューブでのライブラリ調製を特長とするワークフローソリューションを開発しました。

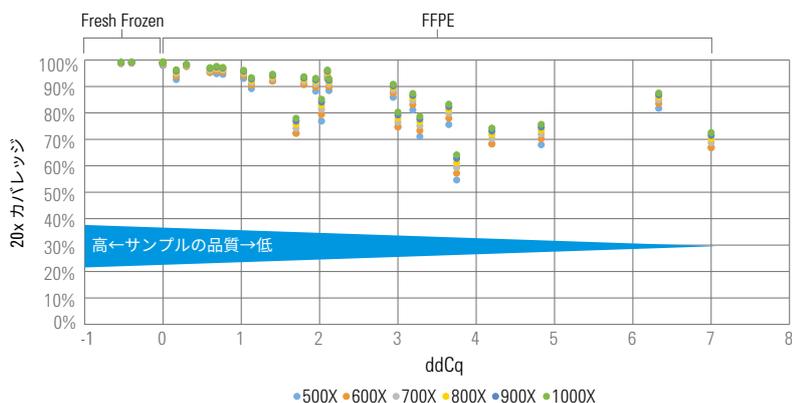


図 1. FFPE サンプルに最適化された SureSelect XT HS のパフォーマンス：さまざまな品質のサンプルで 20x カバレッジを高い割合で達成

段階的にシーケンス量を変えた (4 ~ 8 M リード、2x100 bp) 際の、リード深度が 20x 以上で読まれた領域の割合 (%) を gDNA の品質に対してプロット。gDNA の品質は、アジレントの FFPE QC キットを用いて ddCq 値で評価し、数値が大きいほど品質が低いことを示す。

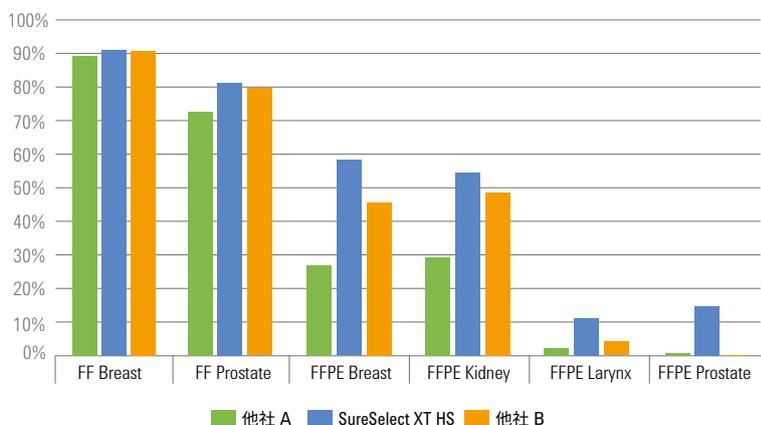


図 2. SureSelect XT HS の低品質サンプルにおける優れた 100x カバレッジ

100x 以上のリード深度で読まれた領域の割合を gDNA の品質 (ddCq) が異なる複数のサンプルについてプロットしたものの (ddCq はアジレントの FFPE QC Kit による計算、1,000x のシーケンス量、8 M リード、2x100 bp)。他社製品 A、B と比較して優れた 100x カバレッジを示す。



利点

- FFPE 由来 DNA の SNV コールの改善
- ライブラリ調製ステップ数を削減し DNA ロスを低減
- DNA の品質を問わず複雑性の高いライブラリを調製

SureSelect XT HS

高感度

検出感度の重要性

感度とは、真の変異が正しく検出される割合のことを表します。多くの場合、感度はインプット量、アッセイの性能、PCR およびシーケンスにおけるエラー率によって影響を受けます。その結果、従来の NGS アッセイで見られるエラーレベルでは、腫瘍の不均一性に起因する低頻度変異を検出する信頼性は低くなります。

SureSelect XT HS の優れた感度

SureSelect XT HS では分子バーコードを利用することで、ライブラリ調製、ターゲットエンリッチメント、およびシーケンスの過程で生じる、偽陽性変異をもたらすアーチファクトを取り除くことができます。SureSelect XT HS の分子バーコードによって、1%以下の頻度の稀少変異を検出することが可能になり、業界最高レベルの感度を達成しました。通常、信頼度の閾値を設定し3~5%以上のアリル頻度が解析に用いられる場合が多いため、より低頻度の変異検出が可能となります。

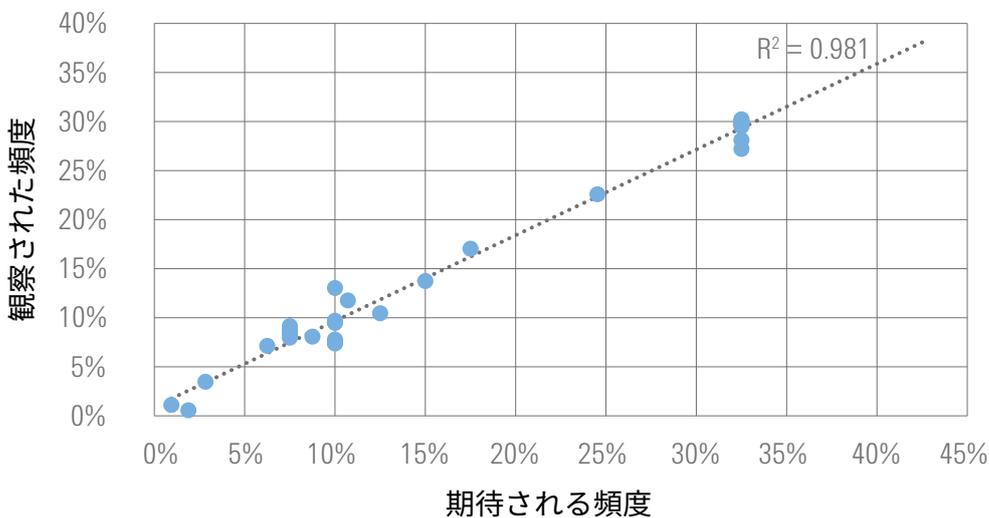


図 3. アリル頻度 1% の変異までも検出

SureSelect XT HS で作製したライブラリを 3,000x でシーケンスしたデータ。
わずか 1% の VAF であっても観察された頻度と期待される頻度との間で高い相関を示す
(HD200 Quantitative Multiplex Reference Standard および ClearSeq SS Comprehensive Cancer キャプチャライブラリ)。



利点

- 1%以下の頻度の変異を検出
- NGSの感度に影響する、増幅およびシーケンスアーチファクトを除去
- わずか 10 ng のスタート DNA 量でも高いデータ品質、シーケンス結果に対する信頼性を向上

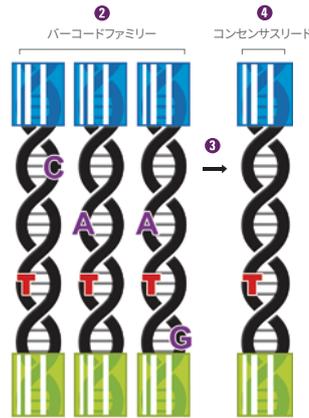
分子バーコード

分子バーコードとは？

分子バーコードとは、サンプル中の DNA フラグメントそれぞれに付加する DNA 配列のことです。これらのユニークな DNA 配列としては、ランダムなヌクレオチド、部分的に縮重させたヌクレオチドまたは配列が決まっているヌクレオチドのいずれかがあります。分子バーコードを DNA フラグメントに付加することで、各インプット分子を区別することができるようになります。

分子バーコードを用いた解析

- ステップ ① リードのアライメント
- ステップ ② 同じスタート-ストップ位置を持つリードペアのグルーピング
- ステップ ③ 同一分子バーコードを持つリードのグルーピング
- ステップ ④ 同一分子バーコードのコンセンサス配列を作成 (ランダムエラーを除去)



利点

- 偽陽性を取り除くことにより低頻度アレルの検出を改善
- 変異アレル頻度 (VAF) が 1% 以下の生物学的意義のある変異を正確に検出

分子バーコードが重要な理由

PCR 増幅およびシーケンス中の過程で生じたエラーによって、元の DNA テンプレートとは異なる塩基の割合が増加します。これらのエラーすなわち偽陽性により、サンプル由来の低頻度で生じている実際の変異を検出する感度は低下します。これは、ある種の腫瘍のサブポピュレーションなどの、よりヘテロな細胞集団の解析に特に問題になります。分子バーコードにより偽陽性を取り除き、より正確な変異コールのためのエラー修正を行うことで、テンプレート DNA 分子中の低頻度の変異を検出することができます。

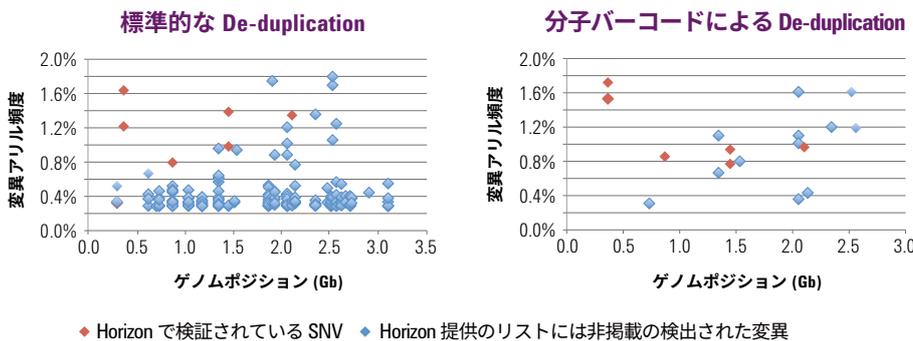


図 4. 分子バーコードで得られる高いデータ品質

Horizon cfDNA リファレンスおよび SureSelect XT カスタムキャプチャライブラリ (ターゲットサイズ 164 kb) を用いて作成した SureSelect XT HS ライブラリのターゲットシーケンスで、De-duplication 後のカバレッジの中央値は 808 (標準的な方法) / 906 (分子バーコード使用) でした。2% 未満の頻度のバリエーションで、Reference ゲノムと異なる SNV の数が標準的な De-duplication では 216 のところが、分子バーコードを使用すると 18 になり、分子バーコードは False call を 92% 削減しました。以上のデータは、Dr. L.J.Barber および Dr. M. Gerlinger (英国ロンドンの Centre for Evolution and Cancer, The Institute of Cancer Research) のご厚意により提供されたものです。

SureSelect XT HS

ワークフローの簡素化

ワークフローの簡素化により解析を迅速に

SureSelect XT HS は酵素反応ステップやクリーンアップステップ、チューブ間でサンプルを移すステップ数が少なくなったため、実験の手間を減らすとともに特に少ないインプット量（わずか 10 ng）でのライブラリの複雑性を保つことが可能となります。また、アジレントは業界で最短のハイブリダイゼーションを実現しました。ハイブリ時間はわずか 90 分で、マスターミックス試薬による高効率なサンプル処理と組み合わせることで、サンプルを 1 日でシーケンス可能なライブラリに調製することができます。さらに、このワークフローでは最大 32 サンプルのディープマルチプレックスシーケンスが可能です。



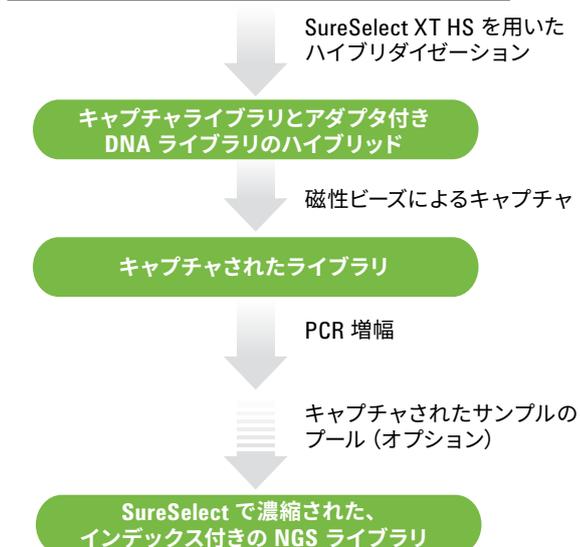
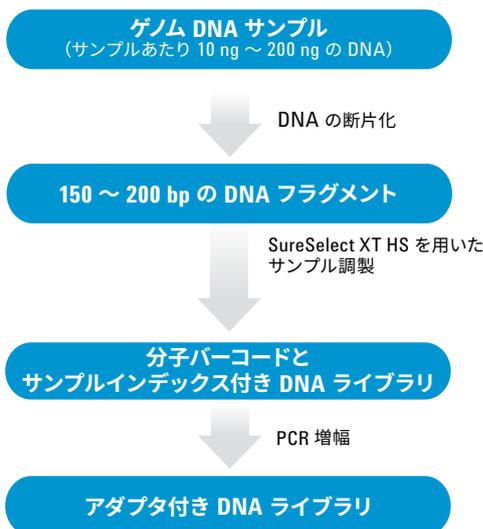
利点

- ハイブリ時間は 90 分、マスターミックス試薬による迅速で効率的なサンプル処理
- 1 日でサンプルからシーケンス可能なライブラリを作製
- SureCall ソフトウェアを用いた効率的なデータ解析

ターゲットキャプチャライブラリの選択



ライブラリ調製



SureSelect ライブラリ調製と ターゲットエンリッチメントソリューション



アジレントはがんおよび体質性疾患のアプリケーションの双方に適した、多彩なライブラリ調製とターゲットエンリッチメントのソリューションをご提供します。わずか 10 ng から 3 ug の DNA をスタート量として、SureSelect エクソームまたはカスタム、ClearSeq キャプチャライブラリとシームレスにご利用いただけるライブラリ調製およびターゲットエンリッチメントのソリューションをご用意しています。

SureSelect ライブラリ調製ソリューション				
製品	SureSelect XT HS	SureSelect XT Low Input	SureSelect XT	SureSelect QXT
DNA インプット量	10 ng - 200 ng	10 ng - 200 ng	200 ng - 3 µg	50 ng
ライブラリ調製に必要な時間	8 時間	8 時間	1.5 日間	7 時間
コバリスの必要性	必要	必要	必要	不要
ライブラリの複雑性	非常に高い	非常に高い	高い	中
特長	FFPE に最適化 分子バーコード対応 マスターミックス試薬 キャプチャ前にサンプル インデックスを付けることで、 サンプル間のクロスコンタミ ネーションの懸念を払拭	FFPE に最適化 分子バーコード対応 (オプション) マスターミックス試薬 キャプチャ前にサンプル インデックスを付けることで、 サンプル間のクロスコンタミ ネーションの懸念を払拭	FFPE サンプルに対応 優れた変異検出	トランスポゼース ベース マスターミックス 試薬 全ゲノムシーケンス およびターゲット エンリッチメントに 対応 インタクト DNA のみ に対応
主な利点	VAF 1% 以下を検出できる 高感度	96 サンプルインデックス (192 インデックスまで 対応予定)	多数の実績による 信頼性・堅牢性	コバリス不要の ワークフロー

製品情報

型番	製品名
G9702A	SureSelect XT HS Reagents (index 1-16), イルミナ, 16 反応
G9702B	SureSelect XT HS Reagents (index 17-32), イルミナ, 16 反応
G9702C	SureSelect XT HS Reagents (index 1-32), イルミナ, 96 反応

*上記製品にはキャプチャライブラリは含まれておりません。シーケンスしたい領域に対応したキャプチャライブラリを別途ご用意ください。

Trusted Answers. Together

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※ 仕様は予告なく変更する場合があります。

※ 本資料掲載の製品は全て研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://AgilentGenomics.jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2017

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, May. 2, 2017

5991-8014JAJP



Agilent Technologies