illumina®

MiniSeq™系统上的靶向重测序方案

MiniSeq系统为靶向重测序应用带来了触手可及且经济有效的方案

要点

- **高度集中、容易管理的研究**
  关注感兴趣的区域，产生更小、更容易管理的数据集
- **更高的覆盖度水平**
  在高的覆盖度水平实现深度测序，有助于稀有变异的鉴定
- **更低的成本和更小的数据集**
  降低测序成本和数据分析的负担
- **从样本到答案的时间短**
  与更为广泛的方法相比，缩短了周转时间

图1：靶向重测序 – MiniSeq系统上的靶向重测序实现了重点而深度的测序，能够鉴定稀有变异。

简介

世界各地的科学家已经利用Illumina的测序和芯片技术，鉴定出成千上万个与疾病相关的位点。在通过全基因组关联研究（GWAS）、全基因组测序（WGS）或全外显子组测序（WES）鉴定出宽泛的基因组区域后，他们通常开展靶向重测序（图1），以更高的深度研究更精确的目标区域。

靶向重测序带来了几个好处：它高效又经济，将新一代测序（NGS）的能力集中在一组基因或基因组区域上。它以更高的覆盖度水平进行测序，带来了几乎无限的动态范围和更高的灵敏度。靶向重测序能够发现那些通过WGS、PCR或毛细管电泳（CE）无法鉴定或鉴定成本过高的变异。这种检测稀有变异的能力可推动新的功能变异的鉴定，促进生物标志物的发现，或实现转化研究中临床相关靶点的确定。[1] 在发现复杂样本（如混有生殖系DNA的恶性肿瘤）中的稀有体细胞突变时，扩增子测序特别有用[2,3]。无论是开展GWAS的后续研究，还是在牛的育种或作物选择时分析样本，抑或是开展转化研究，用户都能靶定与他们的特定兴趣相关的基因组区域。

简单而完整的流程

MiniSeq系统为靶向重测序提供了最经济、易实现的NGS流程（图2）。除了定制试剂盒，您也可购买带有预选择内容的靶向重测序试剂盒。目前我们提供广泛的靶向重测序文库制备试剂盒，包括含有针对癌症、心肌病、遗传疾病及其他疾病的探针组的试剂盒（表1）。

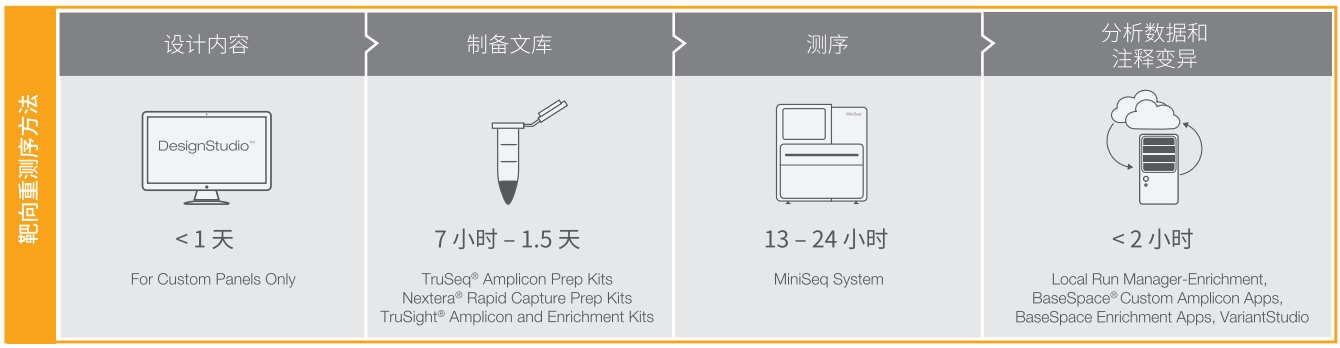

图2：MiniSeq系统的靶向重测序流程 – 完整的流程带来了简化的文库制备、测序和数据分析，实现了针对各种样本经济有效的研究。

仅供研究使用。不得用于诊断。

文库制备

Illumina的靶向重测序方法

Illumina目前支持2种靶向重测序方法 —— 基于捕获的目标富集以及扩增子生成（图3）。对于目标富集，我们通过生物素化探针的杂交来捕获感兴趣的特定区域，随后通过磁珠pulldown来分离。这种高度多重的方法实现了广泛的应用，适合遗传变异的发现、验证或筛查。第二种方法，扩增子测序，利用高度多重的寡核苷酸集合来扩增和纯化感兴趣的区域。

预先设计的靶向重测序试剂盒

靶向测序试剂盒是分析感兴趣的基因或区域中特定突变的有用工具。预先设计的试剂盒包含了与疾病或表型相关的重要基因或基因区域，它们是根据文献或专家指导而选择的。这些试剂盒通过关注特定的基因或区域而节省了资源，最大限度地减少数据分析的时间，并降低数据存储的要求。对于样本筛查，或变异鉴定，许多样本中的多个基因可平行评估，而不再需要反复运行单独的检测，节省了时间，降低了成本。目前提供几个研究领域的预先设计试剂盒，包括癌症、遗传疾病、心肌病及其他（表1）。

定制测序试剂盒和DesignStudio™

对于感兴趣的特定区域，研究人员可以通过DesignStudio设计和订购定制试剂盒。开始使用DesignStudio时，只需上传通过GWAS、WGS或芯片实验鉴定出的目标列表。快速建立一个最多含有数千个扩增子的定制试剂盒（取决于试剂盒），或在之前订购的试剂盒上添加新的目标。DesignStudio提供动态反馈，便于优化目标区域的覆盖，减少设计定制项目所需的时间。取决于文库制备试剂盒的参数，定制目标富集可捕获10 kb-62 Mb的区域。定制扩增子测序让研究人员一次能测序16-1536个扩增子（Illumina Concierge还能达到更多），涵盖2.4-652.8 Kb的内容，这也取决于所使用的文库制备试剂盒。

Illumina Concierge带来扩展选项

Illumina Concierge服务为Illumina的定制靶向重测序项目提供了额外的设计支持和扩展特征。一些定制靶向测序试剂盒可融合独特的分子标识符，增强等位基因检测，并提高灵敏度。[4] 独特的分子标识符有助于PCR重复的去除，这实现了单个分子的检测。TruSeq Custom Amplicon Assay与双链测序兼容，避免了因福尔马林固定时的脱氨基作用或其他DNA损伤而引起的假阳性。Illumina Concierge也能够设计较小的扩增子（~100 bp），增强了与片段化DNA的兼容性，如来自福尔马林固定、石蜡包埋（FFPE）组织的DNA。若希望获得Illumina Concierge服务，请联系Illumina的代表。

MiniSeq系统上的测序

MiniSeq系统是为轻松、简化的操作而设计的（图4）。为了实现上样即运行的快速设置，MiniSeq Reagent Kits提供了流动槽、洗涤液，以及单个试剂卡盒，其中预上样了所有必需的测序试剂。目前提供Mid-Output和High-Output模式的试剂盒，让研究人员可根据读长、样本数量和产量要求来优化研究设计。

MiniSeq系统具有直观的触摸屏界面，可在测序运行的每个阶段提供简单的逐步指导，包括文库和试剂上样、运行配置和运行监控。使用MiniSeq Control Software进行仪器上的图像分析、碱基检出和质量评分。利用Sequencing Analysis Viewer（SAV）软件可实时监控一个或多个运行的质量统计数据。SAV软件可在测序仪器上使用，也可通过Windows系统的计算机在任意地点访问。

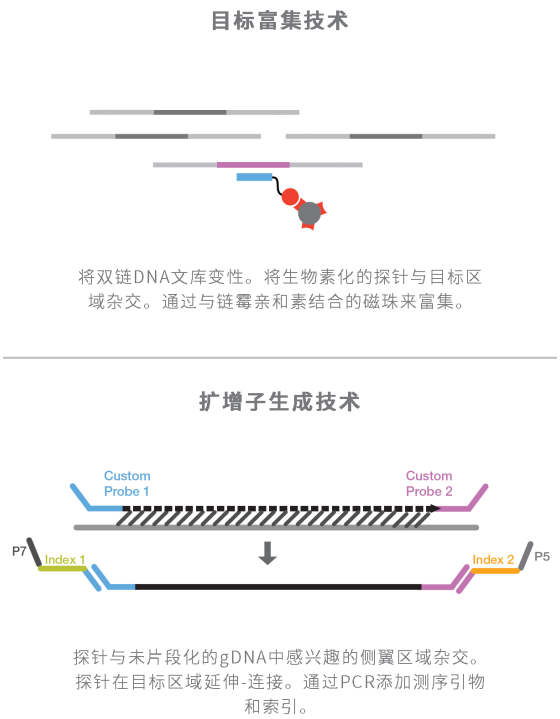

图3：靶向重测序方法 – Illumina为靶向重测序文库制备提供了2种方法：靶向富集和扩增子生成。

图4：MiniSeq系统 – MiniSeq系统利用SBS技术的最新进展，采用简单而完整的流程。

仅供研究使用。不得用于诊断。

表1：Illumina的靶向重测序方案

	关键特点/优势	目标区域累积大小/探针或扩增子的数量	DNA起始量	MiniSeq每次运行的样本数量[a]
定制靶向测序试剂盒				
Nextera Rapid Capture Custom	• 富集定制内容 • 1.5天文库制备	0.5-15 Mb 3000-67,000 个探针[b]	50 ng	1-96 个样本/运行[c]
TruSeq Custom Amplicon v1.5	• 与FFPE兼容 • 扩增定制内容	2–650 kb 16–1536 个扩增子[d]	50 ng for gDNA 150 ng for FFPE	1-96 个样本/运行[c]
TruSeq Custom Amplicon Low Input	• 与FFPE兼容 • 扩增定制内容 • DNA起始量低	2–650 kb 16–1536 个扩增子	10 ng for gDNA 10-50 ng for FFPE[e]	1-96 个样本/运行[c]
预先设计的靶向测序试剂盒				
TruSight® One Panel	• 针对与已知临床表型相关的4813个基因 • 1.5天文库制备	12 Mb	50 ng	3 个样本/运行
TruSight Cardio Panel	• 针对与17种遗传性心肌病相关的174个基因 • 1.5天文库制备	244 kb	50 ng	12 个样本/运行
TruSight Inherited Disease Panel	• 针对与严重的隐性小儿疾病相关的552个基因 • 8801个目标外显子	2.25 Mb ~30,000 个探针	50 ng	8 个样本/运行
适用于癌症研究的预先设计的靶向测序试剂盒				
TruSight Tumor 15	• 与FFPE兼容 • 针对实体瘤中经常突变的15个基因 • 检测等位基因频率低至5%的变异	44 kb 250 个扩增子	20 ng	8 个样本/运行
TruSight Myeloid Sequencing Panel	• 针对54个基因，侧重于恶性血液病中的体细胞突变 • 检测等位基因频率低至5%的变异	141 kb 568 个扩增子	50 ng	8 个样本/运行
TruSight Cancer Panel	• 针对与癌症易感性相关的94个基因 • 检测等位基因频率低至5%的变异	255 kb ~4000 个探针	50 ng	24 个样本/运行
TruSeq Amplicon Cancer Panel	• 与FFPE兼容 • 针对48个带有突变热区的经常突变的癌基因	> 35 kb 212 个扩增子	150 ng for gDNA 250 ng for FFPE	42 个样本/运行

a. 使用High-Output MiniSeq Sequencing Kit
b. 探针数量取决于试剂盒配置
c. 样本通量因实验设计和平均覆盖度而异
d. Illumina Concierge可达到更多扩增子
e. 起始量取决于TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kit的QC结果

选择扩增子测序的测序深度

测序覆盖度（灵敏度）是指比对或“覆盖”已知参考碱基的平均序列数量。覆盖度水平往往决定了特定碱基位置上的变异发现是否具有一定程度的置信度。在更高的覆盖度水平，碱基检出可以有更高程度的置信度，并且检测稀有变异的能力也会有所增加。以下的覆盖度指南可帮助某些研究达到适当的检测水平：

- 杂合子检测——40倍覆盖度
- 单碱基改变和多碱基缺失中5%的变异——1000倍覆盖度
- 单碱基改变和多碱基缺失中1%的变异——≤5000倍覆盖度
- 单碱基插入缺失可能需要更高的覆盖深度

仅供研究使用。不得用于诊断。

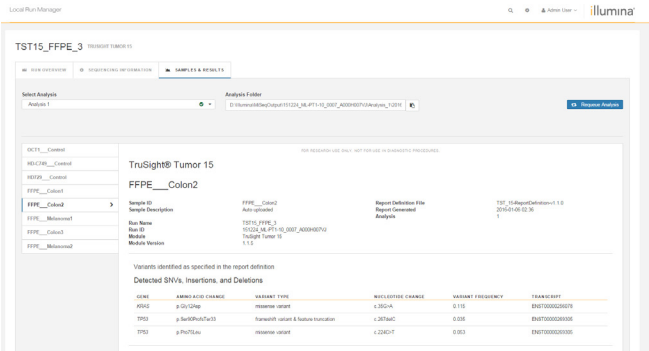

图5：Local Run Manager的用户界面 – 可在测序仪器上使用Local Run Manager，直接设置、组织和分析每次的运行。

简化的生物信息学

MiniSeq系统上的数据分析不需要信息学专业知识或命令行的经验。MiniSeq系统特有Local Run Manager软件，一个创建运行，监控状态和分析测序数据的仪器上系统（图5）。有了Local Run Manager，仪器上数据分析可在测序运行完成后自动开展。数据分析模块生成各种测序应用的简单报告。模块化设计让用户能够在需要时安装和更新个别的分析模块。

此外，MiniSeq系统上产生的测序数据可立即转移到BaseSpace计算环境（云端或现场），进行存储和分析。BaseSpace Targeted Resequencing Software Apps提供了专家首选的数据分析工具，以及为信息学新手而设计的点击即运行的直观界面（图5）。这些应用程序带来了优化的流程，支持各种常见的测序数据分析需求，如比对、变异检出及其他。对于富集流程，BaseSpace Isaac™ Enrichment App[5]通过超快速的Isaac Aligner[6]比对靶向序列，并通过Starling Variant Caller[6]开展变异检出。对于扩增子流程，TruSeq Amplicon App[7]开展banded Smith-Waterman比对，并通过基因组分析工具（GATK 1.6）[8]、Isaac Variant Caller[6]，或Illumina开发的Somatic Variant Caller[9]开展变异检出。

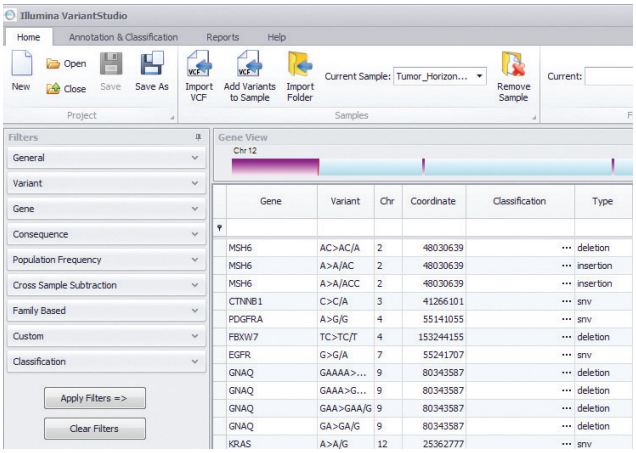

图6：Local Run Manager的用户界面 – 可在测序仪器上使用Local Run Manager，直接设置、组织和分析每次的运行。

对于下游分析，Illumina的VariantStudio分析软件实现了疾病相关变异的鉴定和分类，并生成了结构化的详细报告（图6）。此外，BaseSpace Apps生成了输出文件，可以直接导入各种数据分析工具。BaseSpace Environment包括不断增加的开发人员社群，他们使用并提供观察、分析和共享的软件工具。这个NGS生态环境提供了目前最大的商业化和开源分析工具的集合。

NGS靶向重测序 vs 传统技术

尽管CE测序和PCR等传统方法可用于深度挖掘感兴趣的特定区域，NGS靶向重测序却为测序最广泛的目标区域提供了最经济的方法，且灵敏度最高（表2）。

表2：CE测序、q/RT-PCR和NGS靶向重测序的比较

	CE 测序	q/RT-PCR	靶向重测序
好处	• 经济的测序，适合小片段[a]的DNA序列 • 快速简单的流程 • 目前的测序金标准	• 高灵敏度[b] • 快速简单的流程 • 大多数实验室已有资产设备	• 更高的测序深度带来更高的灵敏度（低至1%）[b] • 更高的发现能力（同时筛查数百个基因） • 更高的突变分辨率（可确定核苷酸类型） • 通过相同量的DNA产生更多的数据[d] • 通过样本多重分析实现更高的样本通量
挑战	• 灵敏度低（低至20%）[b] • 发现能力低 • 大片段[c]的DNA序列不够经济 • 因样本起始量要求不断提高，扩展性低	• 只能深度挖掘一组有限的突变 • 几乎没有发现能力 • 有限的突变分辨率 • 因样本起始量要求不断提高，扩展性低	• 测序小片段[a]的DNA序列不够经济 • 测序小片段[a]的DNA序列不够省时

a. 小片段 = 少于~15-20个扩增子
b. 灵敏度 = 等位基因频率的检测极限
c. 大片段 = 超过~15-20个扩增子
d. 10 ng DNA通过CE测序将产生~1 kb，通过靶向重测序将产生~300 kb（使用TruSeq Custom Amplicon Workflow，250 bp扩增子长度 x 1536个扩增子）

仅供研究使用。不得用于诊断。

经过验证的流程：TruSeq Custom Amplicon Low Input

定制设计

一组以Excel表格形式列出的已知基因目标被上传到DesignStudio。在上传基因列表之后，选择下列参数：

- Assay Version – TruSeq Custom Amplicon Low Input
  理由：为了使用TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit的低起始量特征。
- Variant Source – dbSNP
  理由：与这个检测设计最相关的SNP来源，选择全世界所有群体。
- Amplicon Length – 175 bp
  理由：证明在高度片段化的FFPE DNA上的表现。

DesignStudio生成了144个扩增子的探针组，对所提交的目标达到100% 覆盖（图7）。利用UCSC Genome Browser复查无法设计的缺口后，*我们核准了这一设计，并通过DesignStudio订购探针组。

文库制备

TruSeq Custom Amplicon Low Input的文库制备方法是基于磁珠的，利用杂交-延伸-连接的过程（图3）。我们建议使用TruSeq FFPE QC Companion Kit（货号 FC-131-9999）来评估FFPE样本的质量，并提供DNA起始量的建议。我们根据TruSeq Custom Amplicon Low Input Sample Prep Guide[10]制备文库。TruSeq Custom Amplicon文库是从3个肿瘤-正常配对样本中产生的，包括高度降解的肺、胃和直肠FFPE组织样本。每个样本的文库是从10-50 ng总FFPE DNA中制备的，具体取决于TruSeq FFPE QC Kit的评估结果和起始量建议。文库QC显示，所有文库都足够用于簇生成和MiniSeq系统上的测序。每个肿瘤-正常配对都一式两份，而全部12个样本混合后用于MiniSeq系统的运行。

* A link to the UCSC Genome Browser is provided from DesignStudio

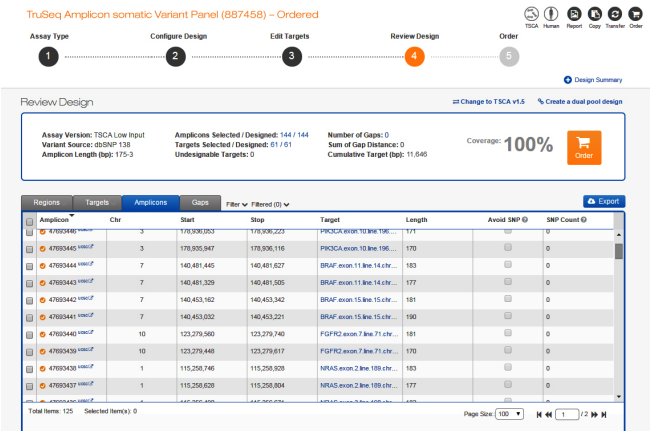

图7：DesignStudio的用户界面 – DesignStudio截屏显示了Review Design步骤的已设计目标。用户可链接到UCSC Genome Browser查看可能的覆盖缺口。DesignStudio的最后一步允许用户订购探针组，和/或将设计留待后用。

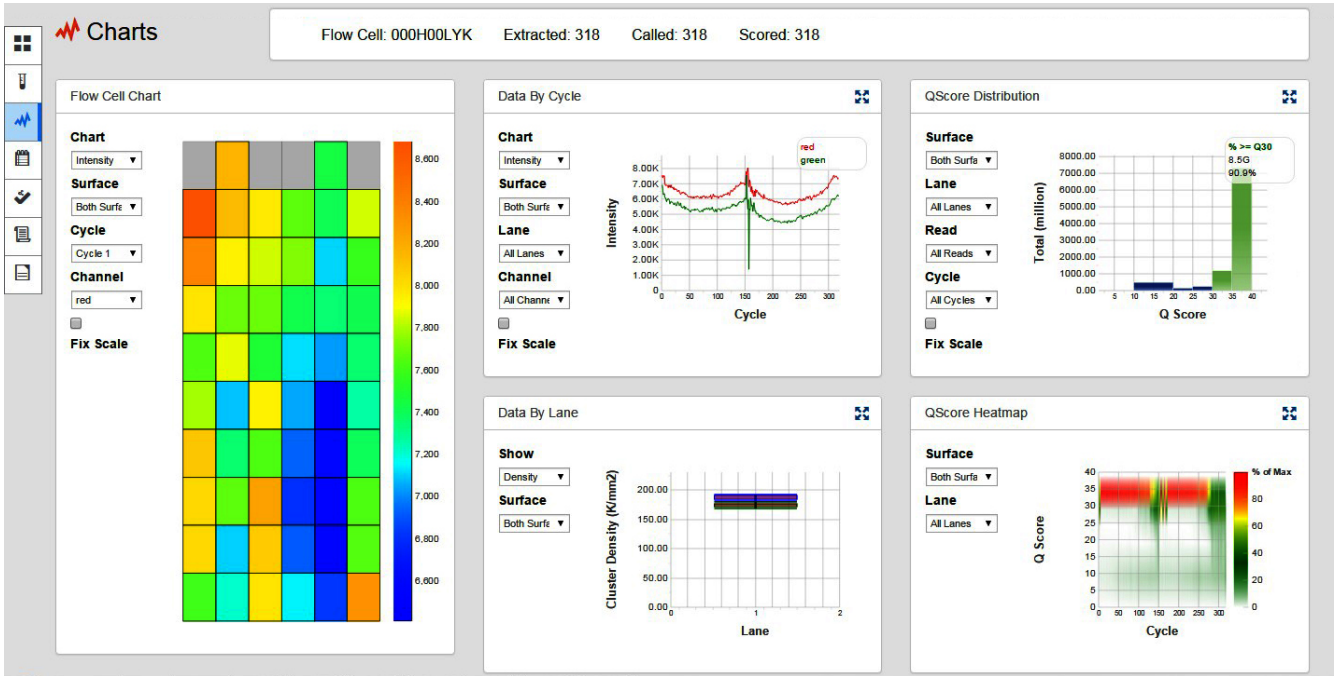

图8：BaseSpace中的运行监控 – 通过BaseSpace运行进度表可实时监控运行过程。在运行过程中可查看每个循环的数据、Q值分布、每个通道的数据、Tile by Tile指标及其他。

仅供研究使用。不得用于诊断。

MiniSeq系统上的测序

混合后的文库可与试剂卡盒和流动槽一起，上样到MiniSeq仪器上。我们通过Local Run Manager设置自动化的簇生成和2 x 150的读长，并开展测序，且无需用户干预。测序运行大约需要24小时。运行过程可在BaseSpace上监控（图8），而最终的运行指标也可在BaseSpace上查看。

数据分析

我们在MiniSeq系统上开展图像分析和碱基检出。之后通过BaseSpace TruSeq Amplicon App开展多重分离、比对和变异检出。最后，我们通过VariantStudio（可通过BaseSpace接入）开展变异过滤和注释。生成的总结表能报告命中目标百分比、覆盖均一性及其他的变异检出统计数据（图9）。对于这个经过验证的流程，全部6个高度降解的FFPE样本都实现了93.28%的目标覆盖度（Read 1和Read 2比对序列百分比的平均值）和94.3%的覆盖均一性。

结语

MiniSeq系统的靶向重测序方案为分析感兴趣的特定基因或区域提供了一个高度灵敏且准确的方法。利用NGS测序的宽动态范围，研究人员可对感兴趣的特定基因或区域进行更加灵敏而准确的测定。无论是追求固定试剂盒的速度，还是追求定制试剂盒的灵活性，MiniSeq系统的靶向重测序方案都在更普及、更经济的平台上带来了高质量的NGS数据。

了解更多

了解更多DesignStudio的信息，请访问：www.illumina.com/informatics/research/experimental-design/designstudio.html。

了解更多靶向基因集的信息，请访问：www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/targeted-panels.html。

了解更多扩增子测序的信息，请访问：www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/amplicon-sequencing.html。

参考文献

1. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. Nat Genet. 2011;43:1066-73.
2. McEllistrem MC. Genetic diversity of the pneumococcal capsule: implications for molecular-based serotyping. Future Microbiol. 2009;4:857-865.
3. Lo YMD, Chiu RWK. Next-generation sequencing of plasma/serum DNA: an emerging research and molecular diagnostic tool. Clin Chem. 2009;55:607-608.
4. Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. Nat Methods. 2011;9:72-74.

Amplicon Summary

Number of Amplicon Regions	Total Length of Amplicon Regions
144	18,423 bp

Read Level Statistics

Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
1	580,920	94.11%
2	570,605	92.44%

Base Level Statistics

Read	Percent Q30	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Mismatch Rate
1	93.51%	86,900,526	95.00%	0.32%
2	88.82%	85,290,937	93.11%	0.33%

Small Variants Summary

	SNVs	Insertions	Deletions
Total Passing	22	0	4
Percent Found in dbSNP	63.64%	-	25.00%
Het/Hom Ratio	3.4	-	-
Ts/Tv Ratio	3.4	-	-

Variants by Sequence Context

	SNVs	Insertions	Deletions
Number in Genes	22	0	4
Number in Exons	11	0	3
Number in Coding Regions	9	0	3
Number in UTR Regions	2	0	0
Number in Splice Site Regions	0	0	0

Genes include exons, introns and UTR regions. Exons include coding and UTR regions. UTR regions include 5' and 3' UTR regions. Splice site regions include regions annotated as splice acceptor, splice donor, splice site or splice region.

Coverage Summary

Amplicon Mean Coverage	Uniformity of Coverage
9089.1	94.3%

Coverage by Amplicon Region

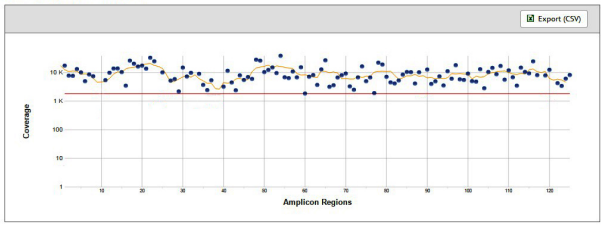

图9：BaseSpace Cloud中靶向重测序的数据分析 – BaseSpace中的TruSeq Amplicon App简化了数据分析，以直观的方式获得结果。图中显示了MiniSeq系统测序运行的比对序列百分比、变异检出和覆盖均一性。

5. BaseSpace Isaac Enrichment App (www.illumina.com/informatics/research/sequencing-data-analysis-management/basespace/basespace-apps/isaac-enrichment-1253252.html). Accessed 15 Dec 2015.
6. Raczy C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultrafast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. Bioinformatics. 2013;29:2041-2043.
7. BaseSpace TruSeq Amplicon App (www.illumina.com/informatics/research/sequencing-data-analysis-management/basespace/basespace-apps/truseq-amplicon-2005003.html). Accessed 04 January 2016.
8. Genome Analysis Toolkit (GATK) (www.broadinstitute.org/gatk/).
9. Somatic Variant Caller (www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_somatic_variant_caller.pdf). Accessed 06 January 2016.
10. TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Reference Guide (support.illumina.com/downloads/truseq-custom-amplicon-low-input-library-prep-reference-guide-1000000002191.html). Accessed 30 December 2015.

仅供研究使用。不得用于诊断。

订购信息

Sequencing System	Catalog No.
MiniSeq System	SY-420-1001
Sequencing Kits	
MiniSeq High Output Kit (75 Cycles)	FC-420-1001
MiniSeq High Output Kit (150 Cycles)	FC-420-1002
MiniSeq High Output Kit (300 Cycles)	FC-420-1003
MiniSeq Mid Output Kit (300 Cycles)	FC-420-1004
Custom Targeted Sequencing Kits	
Nextera® Rapid Capture Custom Kits (48 samples)	FC-140-1007
Nextera® Rapid Capture Custom Kits (96 samples)	FC-140-1008
Nextera® Rapid Capture Custom Kits (288 samples)	FC-140-1009
TruSeq Custom Amplicon v1.5 (96 samples)	FC-130-1001
TruSeq Custom Amplicon Low Input (96 samples)	FC-134-2001
TruSeq Custom Amplicon Low Input (16 samples)	FC-134-2002
TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kit	FC-121-9999
TruSeq Custom Amplicon Index Kit (96 indexes, 384 samples)	FC-130-1003
TruSeq Index Plate Fixture Kit	FC-130-1005
TruSeq Index Plate Fixture and Collar Kit (2 each)	FC-130-1007
Predesigned Targeted Sequencing Kits	
TruSight One (9 samples)	FC-141-1006
TruSight One (36 samples)	FC-141-1007
TruSight Cardio (12 samples)	FC-141-1010
TruSight Cardio (48 samples)	FC-141-1011
TruSight Inherited Disease Panel (4 enrichments)	FC-121-0205
Predesigned Targeted Sequencing Kits for Cancer	
TruSight Tumor 15 (24 samples)	OP-101-1002
TruSight Myeloid Sequencing Panel (96 samples)	FC-130-1010
TruSight Cancer Panel (4 enrichments)	FC-121-0202
TruSeq Amplicon Cancer Panel (96 samples)	FC-130-1008

通过 Illumina 提供的服务、培训和咨询，最大限度的提高性能和生产力

无论是在仪器运行过程中需要立即协助，还是在复杂的流程中需要深度咨询，Illumina 都能帮助您。Illumina 的服务和支持团队提供了一整套应急有效且定制的方案，从初期培训，到仪器支持，再到 NGS 的日常咨询。

Illumina Professional Care Services Packs

Illumina 提供 Professional Care Services Packs ——积分可用于优惠兑换 Illumina 的专业服务。服务包的优点包括：

- 一次性投资——无需额外的售后支出
- 降低风险——保留积分，用于意想不到的未来服务
- 节省资金——比按项目收费更加经济高效

专业服务

产品保养服务

- 分级式仪器服务计划 + 附加服务
- 仪器合规服务
- 仪器按需服务

Illumina 大学培训

- 在您选定的地点进行讲师带领的培训
- 在 Illumina 培训中心进行讲师带领的培训
- 在线课程
- 在线研讨会

Illumina 咨询

- 仪器和文库制备检测的原理验证服务
- 协助设计和产品优化的专人服务
- 个性化协助的 IT 和生物信息学计时咨询

关于 Illumina 支持产品的更多信息，请访问：
www.illumina.com/services/instrument-services-training.html

仅供研究使用。不得用于诊断。

@Illumina @Illumina_china

Illumina China

上海办公室 · 电话：+86-21-60321066 · 传真：+86-21-60906279
北京办公室 · 电话：+86-10-84554866 · 传真：+86-10-84554855
2017年2月印刷
Illumina · 1.800.809.4566 toll-free (US) · +1.858.202.4566 tel · techsupport@illumina.com · www.illumina.com
Illumina China · 技术支持热线 400.635.9898 · techsupport@illumina.com · www.illumina.com.cn

仅供研究使用。不得用于诊断。

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved. Illumina, Basespace, TruSeq, TruSight, MiniSeq, MiSeq, NextSeq, and the pumpkin orange color are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. Pub. No. 770-2015-047 Current as of 12 January 2016

illumina®