

Einfacher und schneller Workflow zur Bestimmung von RNA- Fusionen in der Krebsforschung

mit Illumina RNA Prep with
Enrichment für das TruSight™
RNA Fusion Panel und das
TruSight RNA Pan-Cancer Panel



Einleitung

RNA-Transkripte werden dynamisch exprimiert und bergen zahlreiche wichtige Informationen auf Zellebene zu Aktivität und Zustand von Geweben. Die gezielte RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) von Tumorproben ist eine leistungsstarke Methode zur Quantifizierung exprimierter RNA-Transkripte sowie zum Nachweis für die Krebsforschung relevanter Genfusionen. In Krebszellen finden sich zahlreiche genetische Veränderungen. Jedoch wirken sich in der Regel nur wenige davon auf die Tumorprogression aus.¹⁻³ Die Bestimmung von Genexpressionsmustern mithilfe von RNA-Seq hilft bei der Unterscheidung zwischen diesen Treibermutationen und Begleitmutationen.¹⁻³ Die Erkennung von Genfusionen ist in der Krebsforschung von Bedeutung, da 20 % aller Tumoren bei Menschen Translokationen und Genfusionen aufweisen.⁴⁻⁶ Die meisten Genfusionen haben signifikanten Einfluss auf die Tumorgenese und weisen einen engen Zusammenhang mit dem morphologischen Phänotyp auf, was sie als potenzielle Biomarker nutzbar macht.⁴⁻⁶

Durch die Konzentration auf eine Untergruppe relevanter Gene lässt sich die RNA-Seq auch auf Tischsequenziersystemen mit hoher Sensitivität und effizienter Analyse durchführen. Die Anreicherung bzw. die Hybrid-Capture-Sequenzierung ist ein zuverlässiges und umfassendes Verfahren für die eingehendere Untersuchung komplexer Genomdaten. Dieses Verfahren zeichnet sich durch die Bestimmung größerer Target-Regionen und seine hohe Sensitivität aus, was die Bestimmung einer breiten Palette genetischer Veränderungen ermöglicht, darunter bekannte und unbekannte Fusionen, Spleißvarianten und andere wichtige Biomarker. Darüber ist die Anreicherung auch bei schwierigen Probenotypen wirksam, einschließlich formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) Proben und anderer beeinträchtigter DNA-Quellen.

Das TruSight RNA Fusion Panel und das TruSight RNA Pan-Cancer Panel dienen zur anreicherungs-basierten RNA-Seq, die in der klinischen Forschung die Bestimmung der Genexpression und den Nachweis von krebsrelevanten Genfusionen ermöglicht.^{7,8} Das TruSight RNA Fusion Panel deckt 507 fusionsassoziierte Gene ab. Das TruSight RNA Pan-Cancer Panel untersucht zur Beurteilung krebsbezogener RNA-Transkripte 1.385 Gene (Tabelle 1). Beide Panel benötigen eine Gesamtzugabemenge von lediglich 10 ng RNA mit hoher Qualität oder von 20 ng RNA aus FFPE-Proben.

Einfacher, schneller Workflow

Der Einsatz von Illumina RNA Prep with Enrichment gemeinsam mit dem TruSight RNA Fusion Oligo Panel und dem TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel ergibt einen schnellen Workflow für die Ermittlung fokussierter Ergebnisse zur Genexpression mit Krebsassoziation sowie den Nachweis von Fusionen (Abbildung 1). Das optimierte Bibliotheksvorbereitungsprotokoll umfasst weniger Schritte, kürzere Inkubationszeiten und zahlreiche sichere Haltepunkte. Die Gesamtassayzeit beträgt lediglich 9 Stunden.⁹ Illumina RNA Prep with Enrichment nutzt On-Bead-Tagmentierung zur Vermittlung einer einheitlichen Tagmentierungsreaktion, wodurch separate Fragmentierungsschritte entfallen, was Zeit spart.⁹ Anschließend erfolgt eine vereinfachte Hybridisierung in einem einzigen Zyklus für die Anreicherung auf Basis eines Sondenpanels. Die Anreicherung kann im 1- oder 3-Plex-Format erfolgen. Ein PCR-Programm mit begrenzter Anzahl von Zyklen amplifiziert die angereicherten Fragmente exponentiell, was das Bibliotheksvolumen erhöht. Die Sequenzierung erfolgt auf einem Tischsequenziersystem von Illumina. Die Daten werden mit BaseSpace™ Sequence Hub analysiert.

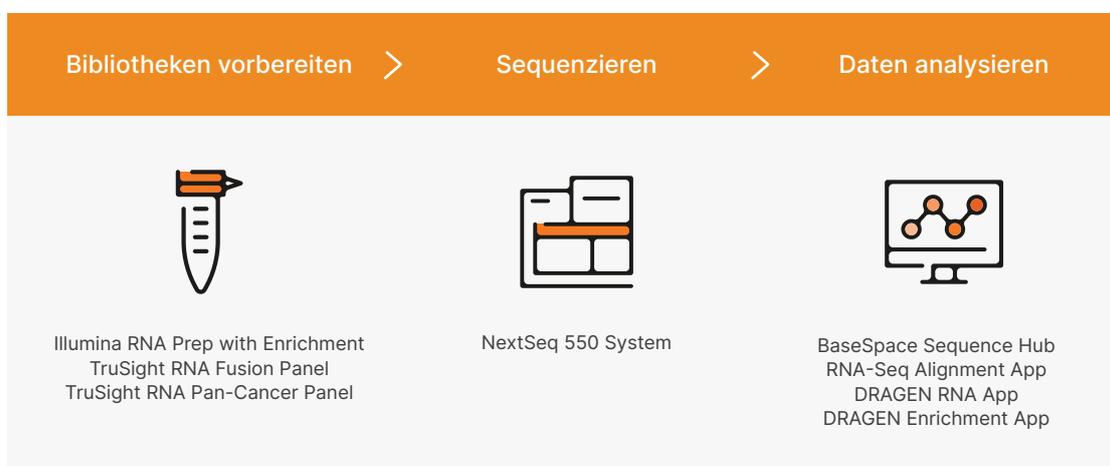


Abbildung 1: Workflow der TruSight RNA-Panels mit Illumina RNA Prep with Enrichment: Die gezielte RNA-Seq für die Krebsforschung mit dem TruSight RNA Fusion Panel und dem TruSight RNA Pan-Cancer Panel sowie Illumina RNA Prep with Enrichment erfolgt anhand eines optimierten umfassenden Workflows, der Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Datenanalyse umfasst.

Tabelle 1: Inhalt der TruSight RNA-Panels

Panel-Name	Anzahl der Sonden	Anzahl der Zielgene	Anzahl der exonischen Zielregionen
TruSight RNA Fusion Panel	21.283	507	7.690
TruSight RNA Pan-Cancer Panel	57.010	1.385	21.043

Dieser Anwendungshinweis umfasst Anleitungen und Performancedaten für den Einsatz von Illumina RNA Prep with Enrichment gemeinsam mit dem TruSight RNA Fusion Panel und dem TruSight RNA Pan-Cancer Panel zur Bestimmung der krebsassoziierten RNA-Genexpression und von entsprechenden Fusionsereignissen.

Methoden

Bibliotheksvorbereitung

TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, Katalog-Nr. 20046101) und TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina, Katalog-Nr. 20046104) wurden mit RNA-Proben von hoher Qualität (Tabelle 2) und FFPE-RNA-Proben (Tabelle 3) getestet, sowohl mit 1-Plex- als auch mit 3-Plex-Anreicherung.

Die für die 1-Plex-Anreicherungsstudie verwendeten RNA-Proben in hoher Qualität waren Universal Human Reference (UHR) RNA (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. QS0639), Gesamt-RNA aus der Human-Leukämiezelllinie K562 (ATCC, Katalog-Nr. CCL-243) und Human Brain Reference RNA (HBRR) (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. QS0611), sowohl bei der Zugabe von 10 ng als auch bei der Zugabe von 100 ng. Die für die 1-Plex-Anreicherungsstudie verwendeten FFPE-Proben waren die Kolonkarzinomprobe „FFPE A“, die Lungenkarzinomprobe „FFPE B“, die Probe mit der unbekannt primären Krebserkrankung „FFPE C“ und die Lymphomprobe „FFPE D“, jeweils mit einer Zugabemenge von 20 ng. Von jedem Probenotyp wurden mindestens drei Replikatbibliotheken generiert und für 1-Plex-Anreicherungsreaktionen verwendet. Das TruSight RNA Fusion Oligo Panel und das TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel wurden für jeden Probenotyp mit 1-Plex-Anreicherung getestet.

Die für die 3-Plex-Anreicherungsstudie verwendeten RNA-Proben waren Universal Human Reference RNA und Gesamt-RNA K562 in hoher Qualität bei der Zugabe von 10 ng und die Kolonkarzinomprobe „FFPE E“ bei der Zugabe von 20 ng. Von jedem Probenotyp wurden drei Replikatbibliotheken generiert und für 3-Plex-Anreicherungsreaktionen verwendet. Das TruSight RNA Fusion Oligo Panel und das TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel wurden für jeden Probenotyp mit 3-Plex-Anreicherung getestet.

Tabelle 2: RNA-Proben von hoher Qualität

Beschreibung	Hinweis	Zugabemenge
Universal Human Reference RNA	Aus einem proprietären Mix aus 10 Human-Zelllinien gewonnen	10 ng, 100 ng
Gesamt-RNA aus K562	Aus einer Zelllinie mit chronischer myeloischer Leukämie gewonnen	10 ng, 100 ng
Human Brain Reference RNA	Aus einem Pool mit mehreren Spendern von Human-Hirngewebe gewonnen	10 ng, 100 ng

Tabelle 3: FFPE-RNA-Proben

Probe	Gewebe	Diagnose	DV ₂₀₀ ^a	Zugabemenge
FFPE-A	Zellpellet	Dickdarmkrebs	81,9	20 ng
FFPE-B	Lunge	Lungenkarzinom	45,5	20 ng
FFPE-C	Unbekannt	Unbekannte oder nicht spezifizierte primäre Krebserkrankung	36,5	20 ng
FFPE-D	Unbekannt	Lymphom	56,1	20 ng
FFPE-E	Unbekannt	Dickdarmkrebs	59,7	20 ng

a. DV₂₀₀ ist der prozentuale Anteil der RNA-Fragmente mit > 200 Nucleotiden. Die DV₂₀₀-Werte stammen aus dem Proben-Repository.

Die Bibliotheken wurden gemäß dem Referenzhandbuch Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, Dokument-Nr. 1000000124435 v03) unter Verwendung des TruSight RNA Fusion Panel und des TruSight RNA Pan-Cancer Panel für die Anreicherungsschritte vorbereitet.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden gemäß dem NextSeq™ 550 System Denature and Dilute Libraries Guide (Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für das NextSeq™ 550 System) (Illumina, Dokument-Nr. 15048776 v18) auf eine endgültige Ladekonzentration von 1,8 pM verdünnt und auf dem NextSeq 550 System mit einer Read-Länge von 2 × 74 bp unter Verwendung des NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20024907) mit einer Tiefe von ≥ 3 Mio. Reads pro Probe sequenziert. Beachten Sie, dass 3 Mio. Reads pro Probe die minimale Sequenzierungstiefe darstellten. Diese wurde für die Studie zur Untersuchung von Metriken an der unteren Performancegrenze ausgewählt. Zahlreiche Kundenanwendungen profitieren von einer höheren Sequenzierungstiefe von bis zu 30 Mio. Reads pro Probe.

Datenanalyse

Die Ergebnisse von Transkript-Coverage und Alignment wurden mit der Illumina RNA-Seq Alignment App v2.0.2 in BaseSpace Sequence Hub generiert. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse wurden mit der DRAGEN™ RNA App v4.2.4 generiert. Die Ergebnisse der Padded-Read-Anreicherung (PRE, Padded Read Enrichment) und der

Padded-Unique-Read-Anreicherung (PURE, Padded Unique Read Enrichment) wurden mit der DRAGEN Enrichment App v4.2.4 generiert. Der Nachweis von Fusionen wurde sowohl mit der RNA-Seq Alignment App v2.0.2 als auch mit der DRAGEN RNA App v4.2.4 überprüft. Die Daten wurden zur Normalisierung von Abweichungen, die sich aus dem Ladevorgang ergeben, einem Downsampling auf 1 Mio. Reads pro Probe (für die 1-Plex-Anreicherung) bzw. auf 4 Mio. Reads pro Probe (für die 3-Plex-Anreicherung) unterzogen.

Ergebnisse

Depletion abundanter Transkripte

Die Ausgabe der RNA-Seq Alignment App umfasst eine Schätzung des Anteils der RNA aus hochgradig abundanten Transkriptspezies wie ribosomaler RNA (rRNA), die in der Regel nur geringen Informationswert aufweisen. Diese abundanten Transkriptspezies wurden während der Anreicherungsphase des Illumina RNA Prep with Enrichment-Workflows depletiert. Sowohl bei der 1-Plex- als auch bei der 3-Plex-Vorbereitung werden abundante Transkriptspezies auf weniger als 20 % (häufig sogar auf weniger als 10 %) der Reads reduziert (Abbildung 2).

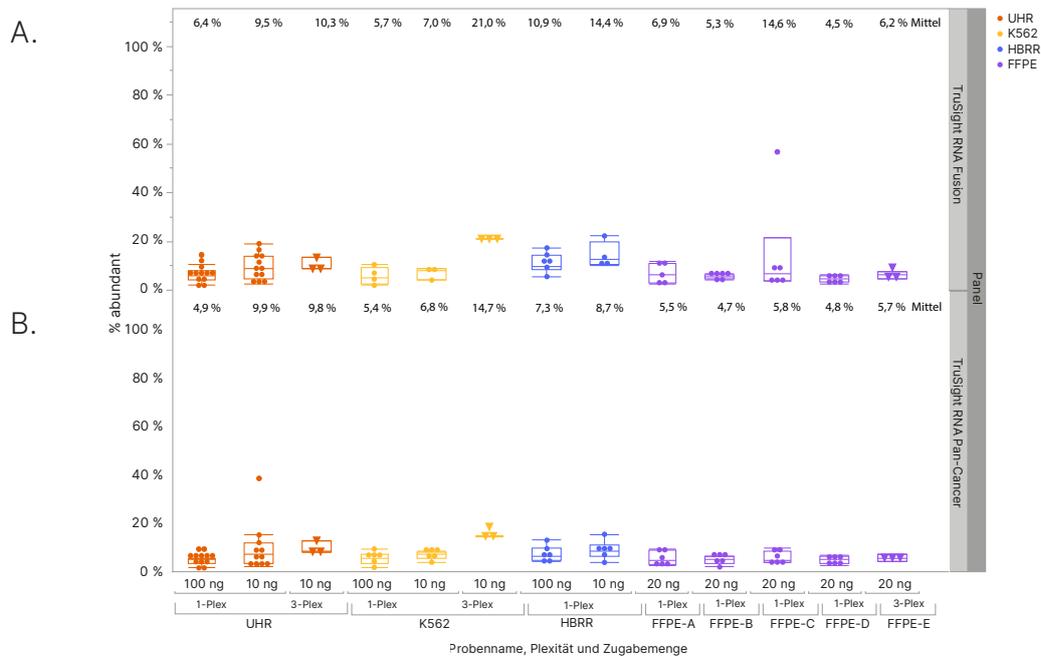


Abbildung 2: Effektive Depletion zahlreicher RNA-Spezies mit Illumina RNA Prep with Enrichment: Bei Verwendung des (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel und des (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel zur Anreicherung waren weniger als 20 % der sequenzierten RNA-Transkripte rRNA oder andere abundante Transkripte. UHR: Universal Human Reference (universelle Referenz, human) RNA; HBRR: Human Brain Reference RNA (Hirnreferenz-RNA, human).

Prozentualer Anteil an Duplikaten

Der prozentuale Anteil doppelter Reads gibt den prozentualen Anteil an Reads insgesamt an, die Duplikaten eindeutiger Probenfragmente entsprechen (häufig PCR-Duplikate). Geringere prozentuale Anteile an Duplikaten sind im Allgemeinen wünschenswert und deuten auf die effiziente Nutzung der Sequenzierungsbandbreite hin. In dieser Studie wurden die Reads auf 3 Mio. Reads pro Probe normalisiert, wobei ein geringerer prozentualer Anteil an Duplikaten einem höheren Anteil an Inhalten mit eindeutigen Reads entspricht. Die Duplizierungsraten korrelieren hier mit der Qualität der RNA-Probe und der Größe des Oligo-Panels (**Abbildung 3**). Das kleinere TruSight RNA Fusion Panel erzeugt mehr Duplikate pro Probe als das TruSight RNA Pan-Cancer Panel, da bei Letzterem mehr eindeutige Targets erfasst werden können. Bei Bibliotheken mit 1-Plex-Anreicherung weisen die RNA-Proben von hoher Qualität weniger Duplikate auf als die meisten FFPE-Proben. Dies ist auf die Qualität der Zugabeprobe zurückzuführen. Bei Bibliotheken mit 3-Plex-Anreicherung ergibt sich bei UHR-Proben eine mittlere Duplikationsrate von $\leq 32\%$, während die K562-Zelllinie und die FFPE-E-Proben höhere Duplikationsraten aufweisen, was auf einen geringeren Anteil eindeutiger Reads am Inhalt der endgültigen Bibliothek schließen lässt.

Read-Anreicherung

Hohe Read-Anreicherungs-werte deuten darauf hin, dass die Panelsonden die Zielbibliotheken während der Anreicherung effizient erfasst haben, was den Anteil sequenzierter unerwünschter Off-Target-Regionen verringert. Die Anreicherung kann als PRE und PURE gemessen werden. PRE gibt den prozentualen Anteil der Reads an, die auf Target-Regionen des Panels oder deren unmittelbarer Umgebung (Padded-Regionen) gemappt werden, einschließlich doppelter Reads. Die PURE-Metrik schließt doppelte Reads aus und erscheint bei einem hohen Anteil doppelter Reads entsprechend niedriger (**Abbildung 4**). PRE gilt bei bestimmten RNA-Seq-Anwendungen als die nützlichere Metrik.

Bei der 1-Plex-Anreicherungsstudie betrug die Anreicherung der RNA-Proben von hoher Qualität nach beiden Metriken im Allgemeinen $> 70\%$, was auf eine erfolgreiche Anreicherung schließen lässt. Dies galt sowohl für Proben mit hoher als auch mit niedriger Zugabemenge. Die Wirksamkeit der Anreicherung von FFPE-Proben war für die Metrik PRE bei allen Proben hoch. Für die Metrik PURE war sie hochgradig variabel, lag im Durchschnitt jedoch $> 50\%$. Diese Variabilität korreliert mit der Anzahl doppelter Reads pro Probe, wie durch den Farbgradienten im Plot angegeben (**Abbildung 4**). Bei der 3-Plex-Anreicherungsstudie lag PRE für RNA in hoher Qualität $> 70\%$ und für FFPE $> 90\%$, was darauf schließen lässt, dass die Anreicherung mit dem TruSight RNA Fusion Panel und dem TruSight RNA Pan-Cancer Panel ausreichend ist (**Abbildung 4**).

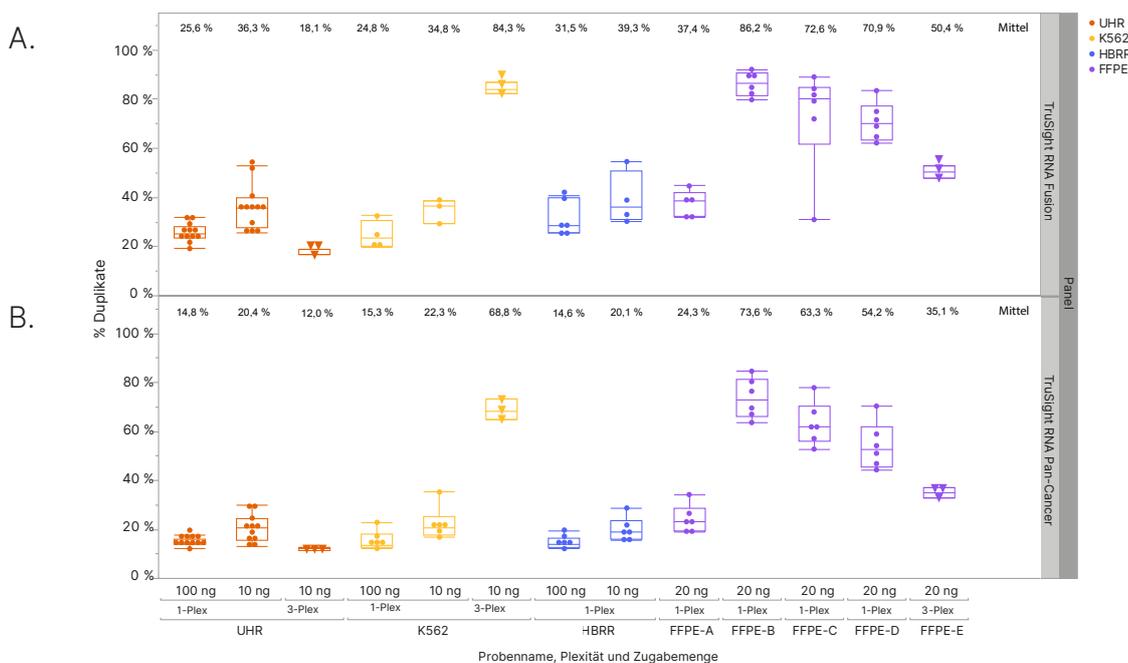


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Duplikate mit TruSight RNA-Panels und Illumina RNA Prep with Enrichment: Bei Anreicherung unter Verwendung des (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel und des (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel korrelieren die Duplikationsraten mit der Qualität der zugegebenen RNA-Probe und der Größe des Oligo-Panels.

Nachweis von Genfusionen

Das TruSight RNA Fusion Panel und das TruSight RNA Pan-Cancer Panel ermöglichten den zuverlässigen Nachweis von Genfusionen (Tabelle 4). Die RNA-Probe aus der Zelllinie K562 mit der *BCR-ABL1*-Fusion wurde als geeigneter Probentyp für den Test des Nachweises bei Verwendung von Illumina RNA Prep with Enrichment verwendet. Die Ergebnisse ergaben eine Call-Rate von 100 % für die *BCR-ABL1*-Genfusion in der K562-Zelllinie bei sechs Replikaten (10 ng und 100 ng, 1-Plex-Anreicherung) und drei Replikaten (10 ng, 3-Plex-Anreicherung), sowohl bei der Analyse mit der DRAGEN RNA App v4.2.4 als auch mit der BaseSpace Sequence Hub RNA-Seq Alignment App v2.0.2.

Exon-Coverage

Die Datenanalyse mit der DRAGEN Enrichment App ergab für Illumina RNA Prep with Enrichment eine Coverage von > 85 % der Basen passend zur codierenden Sequenz und den untranslatierten Regionen (UTR) der RNA. Diese Ergebnisse zeigen eine hochgradig effiziente Erfassung durch Fokussierung der Sequenzierung auf die hochwertigen Inhalte codierender RNA-Regionen (Abbildung 5).

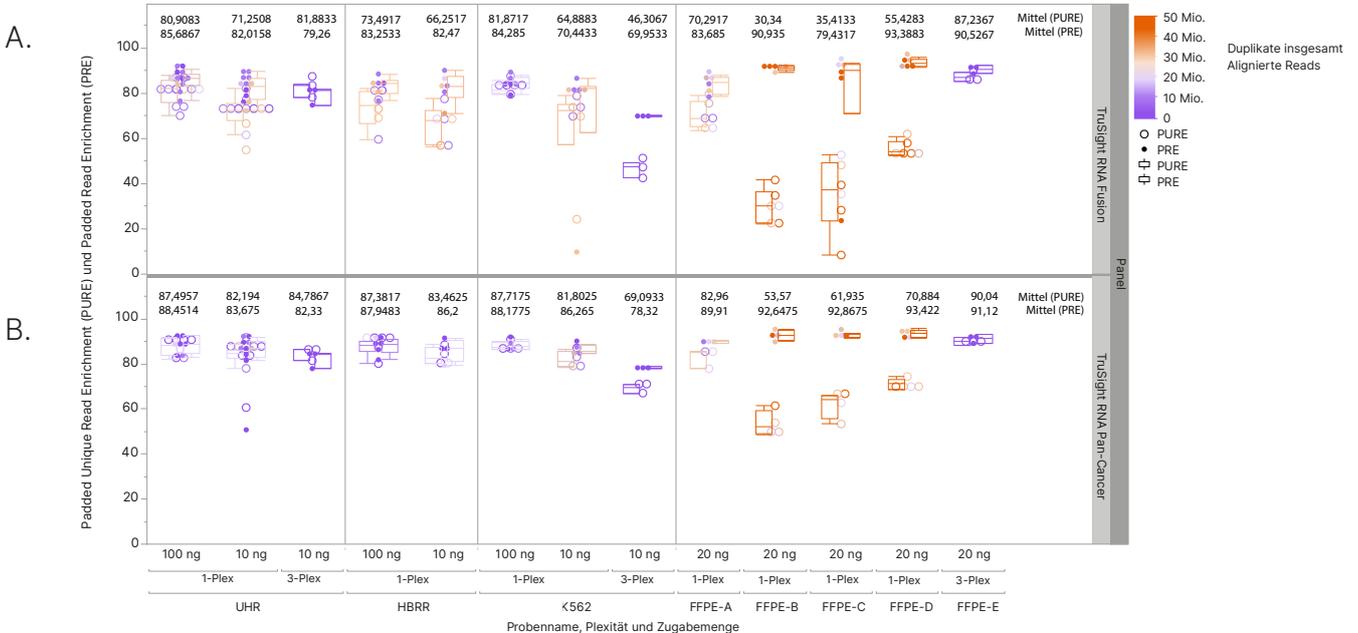


Abbildung 4: Hocheffiziente Anreicherung mit TruSight RNA-Panels und Illumina RNA Prep with Enrichment: Die Anreicherung mit dem (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel und dem (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel ergab mit PRE, einer Metrik, die Duplikate umfasst, eine hohe Effizienz für Probentypen. PURE, eine Metrik, bei der Duplikate ausgeschlossen werden, ist für RNA-Seq-Anwendungen weniger nützlich. Bei Proben mit hohen Duplikatraten zeigt sich für PURE eine hohe Variabilität. Hier wird die Anzahl doppelter Reads farbcodiert von 0 (violett) bis 50 Mio. (orange) dargestellt. Die DRAGEN Enrichment-Analyse wird ohne Entfernung doppelter Reads durchgeführt (d. h., das Kontrollkästchen „Mark Duplicates“ (Duplikate kennzeichnen) sollte in der App nicht aktiviert sein). Um eine Anreicherungsanalyse für das TruSight RNA Fusion Panel und das TruSight RNA Pan-Cancer Panel mit der DRAGEN Enrichment App durchzuführen, müssen die BED-Dateien für die einzelnen Panels in BaseSpace Sequence Hub manuell hochgeladen werden.

Tabelle 4: Erkennung von Genfusionen mit TruSight RNA-Panels und Illumina RNA Prep with Enrichment

Fusion (Quelle)	Panel	Anreicherung	RNA-Zugabe	Detection RNA-Seq Align v2.0.2	Detection DRAGEN RNA v4.2.4
<i>BCR-ABL1</i> (K562)	TruSight RNA Fusion	1-Plex	10 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
			100 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
	TruSight RNA Pan-Cancer	3-Plex	10 ng	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
			10 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
		1-Plex	100 ng	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
			3-Plex	10 ng	3/3 (100 %)

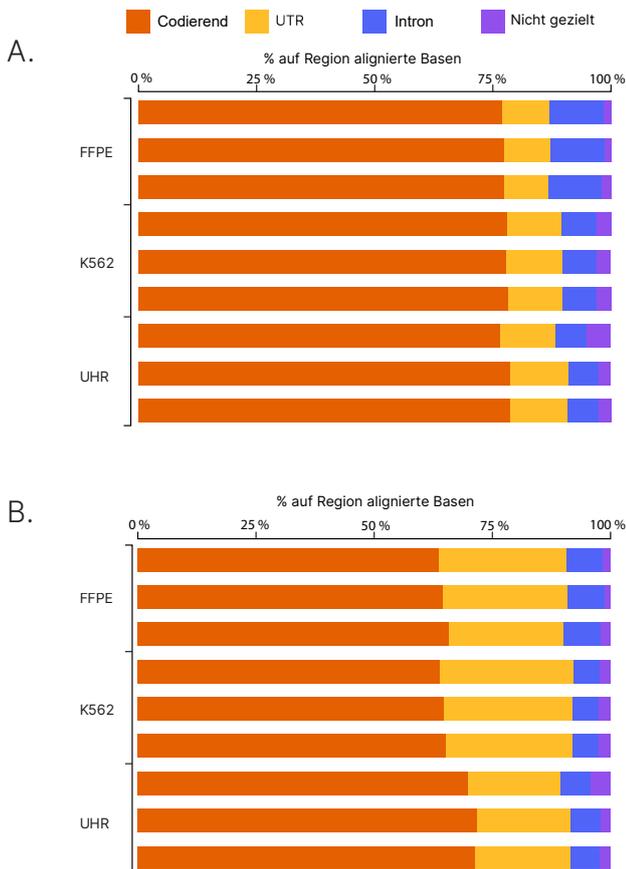


Abbildung 5: Coverage der codierenden Regionen mit TruSight RNA-Panels und Illumina RNA Prep with Enrichment: Die Anreicherung unter Verwendung des (A) TruSight RNA Fusion Oligo Panel und des (B) TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel ergibt High-Capture-Effizienzen passend zur codierenden Sequenz und den untranslatierten Regionen (UTR).

Zusammenfassung

Durch die Fokussierung auf wichtige Gene von Interesse ermöglicht die zielgerichtete RNA-Sequenzierung Forschern die Untersuchung hochwertiger Inhalte, die mit krebsassoziierten Transkripten angereichert wurden. Illumina RNA Prep with Enrichment und das TruSight RNA Fusion Panel oder das TruSight RNA Pan-Cancer Panel zeigen hochgradig reproduzierbare Ergebnisse mit der für den Nachweis seltener Transkripte und Fusionen erforderlichen analytischen Sensitivität. Bei beiden Panels zeigte sich mit dem Workflow eine hohe Performance, selbst bei geringen RNA-Zugabemengen oder RNA von geringerer Qualität. Die Krebsforschung profitiert von einem schnellen und einfachen Workflow für gezielte RNA-Analysen.

Weitere Informationen

[TruSight RNA Fusion Panel](#)

[TruSight RNA Pan-Cancer Panel](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSight RNA Fusion Oligo Panel	20046101
TruSight RNA Pan-Cancer Oligo Panel	20046104
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples)	20040537
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660

Quellen

1. Pon JR, Marra MA. **Driver and passenger mutations in cancer.** *Annu Rev Pathol.* 2015;10:25-50. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040312
2. Green MR, Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, et al. **Transient expression of BCL6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma.** *Nat Commun.* 2014;5:3904 doi:10.1038/ncomms4904.
3. Piskol R, Ramaswami G, Li JB. **Reliable identification of genomic variants from RNA-seq data.** *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):641-651.
4. Mertens F, Tayebwa J. **Evolving techniques for gene fusion detection in soft tissue tumours.** *Histopathology.* 2014;64(1):151-162. doi:10.1111/his.12272
5. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. mitelmandatabase.isb-cgc.org/. Aktualisiert am 15. Oktober 2024. Aufgerufen am 20. November 2024.
6. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. **The emerging complexity of gene fusions in cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):371-381.
7. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-rna-prep-enrichment-data-sheet-m-gl-02145/illumina-rna-prep-enrich-data-sheet-m-gl-02145.pdf. Veröffentlicht 2020. Aktualisiert 2023. Aufgerufen am 7. September 2024.
8. Illumina. TruSight RNA Fusion Panel. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf. Veröffentlicht 2017. Aufgerufen am 7. September 2024.
9. Illumina. TruSight RNA Pan-Cancer Panel. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-pan-cancer-data-sheet-1170-2015-004.pdf. Veröffentlicht 2020. Aufgerufen am 7. September 2024.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-03103 DEU v1.0