

Pannello TruSight™ Hereditary Cancer

Contenuto definito da esperti che mira ai geni associati a una predisposizione per diversi tipi di cancro offerto sulla tecnologia di sequenziamento di nuova generazione.

Punti principali

- **Contenuto completo per la valutazione delle mutazioni della linea germinale**

Il pannello include 113 geni selezionati da esperti associati con la predisposizione ereditaria al cancro

- **Flusso di lavoro veloce con Nextera™ Flex for Enrichment**

Un semplice protocollo consente di preparare e arricchire le librerie in 6,5 ore con due ore di interventi manuali

- **Opzioni flessibili con i sistemi Illumina**

La compatibilità con tutti i sequenziatori da banco Illumina consente una processività che compresa tra 2-256 campioni per corsa

- **Elevata qualità dei dati di sequenziamento**

L'arricchimento mediante cattura ibrida consente una buona uniformità di copertura per il rilevamento accurato di SNV, Indel e CNV

intrinseche fiancheggianti per ogni gene target. Il saggio utilizza la chimica di cattura ibrida integrata con Nextera Flex for Enrichment, la più recente chimica di preparazione delle librerie Illumina.¹ Nextera Flex for Enrichment è dell'85% più veloce rispetto alla preparazione delle librerie e all'arricchimento standard Illumina e utilizza un'innovativa chimica basata sulle microsferi con una singola fase di ibridazione semplificata. Nextera Flex for Enrichment è compatibile anche con i sequenziatori da banco Illumina, per offrire flessibilità nella progettazione sperimentale con un'ampia gamma di processività di campioni (Tabella 1). Unendo la velocità di Nextera al sistema MiSeq™, l'intero flusso di lavoro (Figura 1) può essere completato, dal campione ai dati, in 48 ore.

Tabella 1: Specifiche del pannello TruSight Hereditary Cancer

Parametro	Dettagli
Systema	Systema iSeq™ 100, sistema MiniSeq™, sistema MiSeq, sistema NextSeq™ 550, sistema NextSeq 550Dx (in modalità di ricerca)
Dimensione del pannello	403 kb, 113 geni (che coprono tutti gli esoni), 125 SNP (48 ID SNP e 77 SNP per il punteggio del rischio poligenico)
N. di sonde	10,341 sonde oligonucleotidiche
Tipo di campione	DNA genomico, sangue, ^a o saliva ^a
Input di DNA	50-1.000 ng di DNA
Durata totale del saggio	48 ore dal DNA ai dati
Durata della preparazione delle librerie	6,5 ore di durata totale, 2 ore di interventi manuali
Rendimento dei campioni	384 indici disponibili per una processività compresa tra 2-256 campioni per corsa a una copertura media di 300x (copertura minima 100x)
Campioni per provetta	8 arricchimenti (fino a 12 campioni per arricchimento)

a. L'estrazione direttamente da sangue o saliva richiede l'utilizzo di Flex Lysis Reagent Kit (prodotto accessorio).

Introduzione

Le nostre conoscenze sul ruolo delle varianti genetiche nella predisposizione al cancro sono in continua evoluzione e i ricercatori hanno bisogno di valutare i geni nei quali risiedono queste varianti. Il pannello TruSight Hereditary Cancer consente ai laboratori di eseguire questa valutazione. Sviluppato in collaborazione con esperti nella genomica del cancro, il pannello TruSight Hereditary Cancer Panel è un pannello di sequenziamento mirato e progettato per valutare le mutazioni della linea germinale su 113 geni e 125 polimorfismi di singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) a scopi di identificazione e per ottenere i punteggi di rischio poligenico.

Il saggio utilizza sonde oligonucleotidiche pre-progettate e pronte all'uso che coprono tutte le regioni esoniche e 20 bp di regioni



Figura 1: Flusso di lavoro NGS veloce e flessibile: il pannello TruSight Hereditary Cancer è stato sviluppato con la chimica di preparazione delle librerie Nextera Flex che integra le fasi di preparazione e arricchimento delle librerie. Un flusso di lavoro ottimizzato, semplice e veloce consente di ottenere librerie completamente arricchite in appena 6,5 ore. TruSight Hereditary Cancer è anche compatibile con i sistemi della serie iSeq 100, MiniSeq, MiSeq e NextSeq.

*L'estrazione direttamente da sangue o saliva richiede l'utilizzo di Flex Lysis Reagent Kit (prodotto accessorio).



Figura 2: Range di processività disponibile con il pannello TruSight Hereditary Cancer su quattro sistemi di sequenziamento Illumina.

Tabella 2: Batch di campioni e variazione di output tra gli strumenti e i kit di reagenti

Sistema di sequenziamento ^a	Kit	Letture unidirezionali	Output	Durata	Plex campioni ^b
Sistema iSeq 100	100 i1	4 milioni	1,2 Gb	19 ore	2
	v2 Micro	4 milioni	1,2 Gb	19 ore	2
Serie MiSeq	v2 standard	15 milioni	4,5 Gb	24 ore	9
	v3 standard	25 milioni	7,5 Gb	28 ore	16
Sistema MiniSeq	Output medio	8 milioni	2,4 Gb	17 ore	5
	Output elevato	25 milioni	7,5 Gb	24 ore	16
Serie NextSeq	Output medio	130 milioni	39 Gb	26 ore	80
	Output elevato	400 milioni	120 Gb	39 ore	256

a. Gli output e le durate teorici per i sistemi iSeq 100 e MiniSeq si basano sulle specifiche dello strumento. Per il pannello TruSight Hereditary Cancer è stata eseguita una verifica interna solo sui sistemi MiSeq e NextSeq.

b. La processività dei campioni si basa su una copertura media del campione di 300x.

Processività flessibile con i sistemi di sequenziamento Illumina

Il pannello TruSight Hereditary Cancer è compatibile con diversi sistemi di sequenziamento Illumina, offrendo flessibilità e controllo sulla progettazione sperimentale. Gli utenti possono selezionare gli strumenti o i kit di reagenti in base alle esigenze del laboratorio. La processività dei campioni è di 2-256 campioni per corsa (Figura 2, Tabella 2).

Progettazione del contenuto completa

Il pannello TruSight Hereditary Cancer include un ampio elenco di geni comunemente associati alla predisposizione ereditaria di cancro al seno, al colon, alle ovaie e allo stomaco. Il contenuto è stato sviluppato con input e feedback da parte di opinion leader sulla valutazione del rischio genetico. Il pannello include 10.341 sonde che mirano a 113 geni (Tabella 3) relativi alla predisposizione al cancro, raccomandati nelle linee guida principali (Figura 3) e valutati su studi di popolazione di casi rispetto ai controlli. Sono inclusi anche 48 SNP allo scopo di determinare l'identità e il sesso e 77 SNP per il punteggio di rischio poligenico di BOADICEA.^{2,3} L'analisi consente il rilevamento di varianti di singolo nucleotide (SNV), inserzioni/delezioni (Indel) e varianti del numero di copie (CNV) in un singolo saggio.

Tipo di cancro	Geni raccomandati per lo screening
 Seno	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53
 Colon	APC, AXIN2, BMPR1A, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3, MUTYH, NTLH1, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53
 Ovaie	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, STK11, TP53
 Stomaco	CDH1
 Altro	MEN1, NF2, RB1, RET, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, TSC1/2, VHL, TP53, WT1

Figura 3: Geni inclusi nelle linee guida principali associate nella riduzione del rischio

Tabella 3: Geni contenuti nel pannello TruSight Hereditary Cancer

<i>ACD</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>GREM1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SDHD</i>
<i>AIP</i>	<i>EPCAM</i>	<i>HOXB13</i>	<i>PMS2</i>	<i>SLX4</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>KIF1B</i>	<i>POLD1</i>	<i>SMAD4</i>
<i>APC</i>	<i>ERCC2</i>	<i>KIT</i>	<i>POLE</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>ATM</i>	<i>ERCC3</i>	<i>LZTR1</i>	<i>POT1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>BAP1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>MAX</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>SMARCE1</i>
<i>BARD1</i>	<i>ERCC5</i>	<i>MEN1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SPINK1</i>
<i>BLM</i>	<i>FAM175A</i>	<i>MET</i>	<i>PTEN</i>	<i>SPRED1</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>FANCA</i>	<i>MITF</i>	<i>RAD50</i>	<i>STK11</i>
<i>BRCA1</i>	<i>FANCB</i>	<i>MLH1</i>	<i>RAD51</i>	<i>SUFU</i>
<i>BRCA2</i>	<i>FANCC</i>	<i>MRE11A</i>	<i>RAD51B</i>	<i>TERF2IP</i>
<i>BRIP1</i>	<i>FANCD2</i>	<i>MSH2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>TERT</i>
<i>CASR</i>	<i>FANCE</i>	<i>MSH3</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TMEM127</i>
<i>CDC73</i>	<i>FANCF</i>	<i>MSH6</i>	<i>RB1</i>	<i>TP53</i>
<i>CDH1</i>	<i>FANCG</i>	<i>MUTYH</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TSC1</i>
<i>CDK4</i>	<i>FANCI</i>	<i>NBN</i>	<i>RET</i>	<i>TSC2</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>FANCL</i>	<i>NF1</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>VHL</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FANCM</i>	<i>NF2</i>	<i>RINT1</i>	<i>WT1</i>
<i>CEBPA</i>	<i>FH</i>	<i>NSD1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>XPA</i>
<i>CHEK2</i>	<i>FLCN</i>	<i>NTHL1</i>	<i>SDHA</i>	<i>XPC</i>
<i>CTRC</i>	<i>GALNT12</i>	<i>PALB2</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>XRCC2</i>
<i>DDB2</i>	<i>GATA2</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SDHB</i>	
<i>DICER1</i>	<i>GPC3</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>SDHC</i>	

Per l'elenco completo degli SNP inclusi nel pannello, visitate la pagina Web www.illumina.com/TruSightHereditaryCancer.

Veloce flusso di lavoro per la preparazione delle librerie e l'arricchimento

Il pannello TruSight Hereditary Cancer utilizza Nextera Flex for Enrichment, che consente di completare il flusso di lavoro di preparazione delle librerie in 6,5 ore con sole due ore di interventi manuali. Una componente chiave della soluzione Nextera Flex for Enrichment è la tagmentazione su microsfere che utilizza i trasposomi legati alle microsfere per mediare una reazione uniforme di tagmentazione (Figura 4). Questa strategia elimina la necessità di eseguire fasi separate per la frammentazione del DNA. Per input di gDNA tra 10-50 ng, la normalizzazione del DNA basata sulla saturazione elimina anche la necessità di singole fasi di quantificazione e normalizzazione prima dell'arricchimento. L'arricchimento mirato avviene con la comprovata chimica mediante cattura ibrida, consentendo il rilevamento affidabile di varianti rilevanti per SNV, Indel e CNV. Le librerie vengono ibridate su sonde marcate con biotina specifiche per le regioni target di DNA. I target vengono catturati con l'aggiunta di microsfere coniugate con la streptavidina alle sonde biotinilate, quindi i frammenti legati vengono sottoposti a pull-down dalla soluzione. Dopo che i frammenti catturati vengono eluiti dalle microsfere, la libreria mirata è pronta per il sequenziamento.

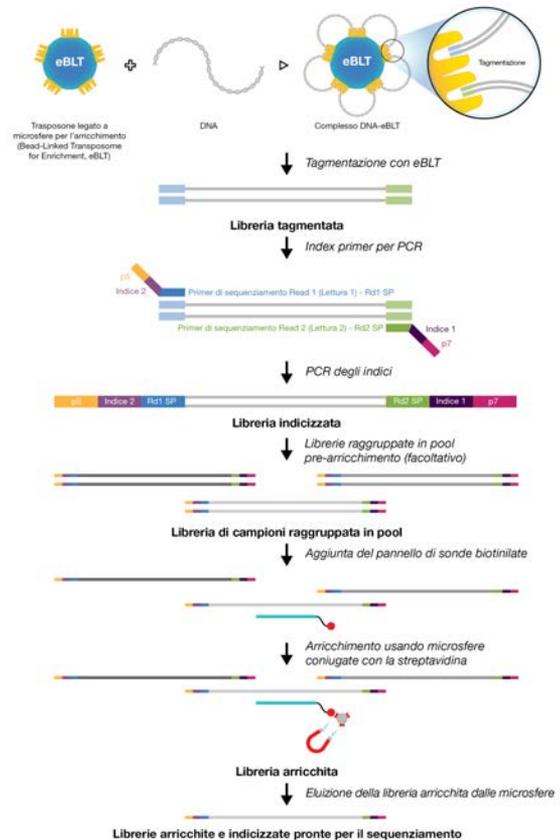


Figura 4: Flusso di lavoro Nextera Flex for Enrichment: una reazione di tagmentazione uniforme mediata da eBLT seguita da una singola reazione di ibridazione consente un flusso di lavoro veloce e flessibile.

Dati accurati

Il pannello TruSight Hereditary Cancer è in grado di valutare 113 geni per campione e fornisce un'elevata processività di campioni, mantenendo al contempo eccellente specificità e uniformità. Per dimostrare le prestazioni del saggio, sono state analizzate le metriche di sequenziamento ottenute da due sistemi di sequenziamento utilizzando i campioni dei collaboratori di ricerca. Sono stati preparati 50 ng di input di DNA di otto campioni in duplicati utilizzando Nextera Flex for Enrichment con arricchimenti di 8 plex e sequenziati sul sistema MiSeq e sul sistema NextSeq. I dati sono stati valutati mediante l'app BaseSpace Enrichment versione 3.1.0 e i risultati hanno mostrato un'elevata percentuale di uniformità di copertura (Figura 5).

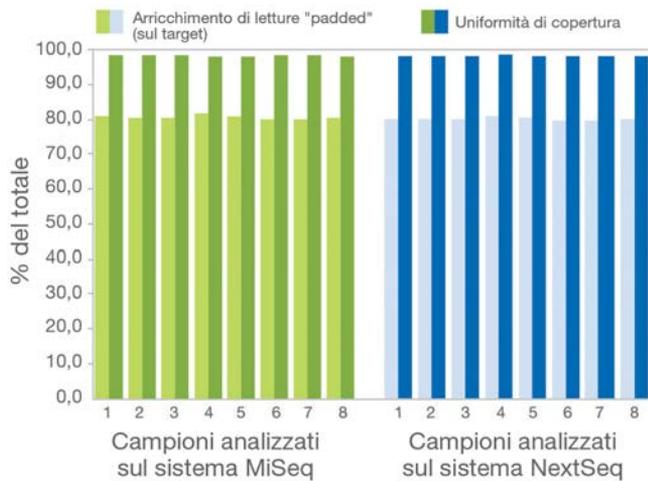


Figura 5: Allineamento sul target e uniformità di copertura: il DNA estratto da campioni suggeriti da collaboratori è stato preparato con il pannello TruSight Hereditary Cancer e sequenziato sul sistema MiSeq (sinistra) e sul sistema NextSeq (destra). Per ogni campione sono mostrati i valori medi ottenuti da due replicati tecnici.

Identificazione delle varianti

Per dimostrare le prestazioni nell'identificazione delle varianti a diversi livelli di input, sono stati preparati 16 campioni con input di DNA di 10 ng, 25 ng e 50 ng. I set di campioni comprendevano quattro replicati ciascuno di campioni Horizon Discovery (HD) BRCA Germline I standard di riferimento gDNA HD793 e standard di riferimento BRCA Germline II gDNA HD794. Dopo la preparazione con Nextera Flex for Enrichment con arricchimenti di 8 plex, ciascun livello di input è stato sequenziato in 16 plex. Il sequenziamento è stato eseguito sul sistema MiSeq e i dati ottenuti valutati sull'app DRAGEN Enrichment. I risultati concordavano con l'elenco pubblicato per Horizon Discovery per i campioni HD793 e HD794, dimostrando risultati riproducibili su tutti i livelli di input analizzati (Tabella 4).

È stata eseguita un'ulteriore analisi sui campioni dei collaboratori di ricerca contenenti varianti sconosciute. Sono stati preparati 50 ng di input di DNA di otto campioni in duplicati con Nextera Flex for Enrichment con arricchimenti di 8 plex e sequenziati sul sistema MiSeq. L'analisi dei dati è stata eseguita con l'app DRAGEN Enrichment e sono state rilevate varianti da diverse classi (SNV, Indel e CNV) (Tabella 5), che erano correlate con i genotipi precedentemente riportati dai nostri collaboratori. L'app DRAGEN Enrichment o l'app BaseSpace Enrichment può essere utilizzata per l'identificazione delle varianti e fornisce risultati in formato VCF. I clienti possono selezionare qualsiasi piattaforma di analisi di terzi per annotare e interpretare le varianti.

Riepilogo

Il pannello TruSight Hereditary Cancer consente ai ricercatori di accedere a un set di contenuti definiti da esperti per l'analisi della variazione nei geni in precedenza legati a una predisposizione al cancro. Il set di sonde ottimizzate fornisce copertura completa di regioni target con elevata uniformità di copertura per identificare diverse varianti. Unendo questo contenuto con il metodo Nextera Flex for Enrichment si ottiene un flusso di lavoro semplice e veloce con un basso requisito di input di campione e la flessibilità offerta da qualsiasi sistema di sequenziamento da banco Illumina. Il pannello TruSight Hereditary Cancer è una soluzione di sequenziamento mirata altamente efficiente che consente di accelerare il rilevamento di varianti associate alla predisposizione al cancro.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni sul pannello TruSight Hereditary Cancer, visitate la pagina Web

www.illumina.com/TruSightHereditaryCancer

Bibliografia

1. Illumina (2018). Scheda tecnica di Nextera Flex for Enrichment.
2. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(5). pii:djv036. doi: 10.1093/jnci/djv036.
3. BOADICEA-Centre for Cancer Genetic Epidemiology. ccge.medschl.cam.ac.uk/boadicea/. Consultato il 17 novembre 2019.

Tabella 4: Rilevamento delle varianti in campioni Horizon Discovery con il pannello TruSight Hereditary Cancer e l'app DRAGEN Enrichment

Campione	Gene	Variante	Tipo di variante	Conseguenza	MAF prevista	MAF osservata a diversi input di DNA		
						50 ng	25 ng	10 ng
HD793	<i>BRCA1</i>	P871L	SNV	mutazione missenso	100%	100%	100%	99,8%
	<i>BRCA1</i>	S1613G	SNV	mutazione missenso	50%	49,8%	47,7%	45,8%
	<i>BRCA1</i>	K1183R	SNV	mutazione missenso	50%	45,0%	43,9%	44,9%
	<i>BRCA1</i>	K820E	SNV	mutazione missenso	50%	48,1%	43,6%	45,6%
	<i>BRCA1</i>	D435Y	SNV	mutazione missenso	50%	42,8%	46,3%	44,6%
	<i>BRCA2</i>	V2466A	SNV	mutazione missenso	100%	99,9%	100%	100%
	<i>BRCA2</i>	N289H	SNV	mutazione missenso	50%	39,2%	40,5%	40,5%
	<i>BRCA2</i>	N991D	SNV	mutazione missenso	50%	48,6%	48,1%	48,0%
	<i>BRCA2</i>	N1784fs	Delezione	mutazione frameshift	50%	42,2%	35,7%	38,9%
	<i>BRIP1</i>	S919P	SNV	mutazione missenso	100%	99,7%	99,9%	100%
HD794	<i>NBN</i>	E185Q	SNV	mutazione missenso	50%	41,1%	35,1%	38,5%
	<i>BARD1</i>	R378S	SNV	mutazione missenso	50%	50,5%	49,9%	48,0%
	<i>BRCA2</i>	V2466A	SNV	mutazione missenso	100%	99,9%	99,9%	99,8%
	<i>BRCA2</i>	I2675fs	Inserzione	mutazione frameshift	50%	41,0%	40,9%	40,3%
	<i>BRIP1</i>	S919P	SNV	mutazione missenso	100%	99,9%	100%	100%
	<i>NBN</i>	E185Q	SNV	mutazione missenso	100%	100%	100%	100%

Il sequenziamento è stato eseguito sul sistema MiSeq. L'allineamento e l'identificazione delle varianti sono stati eseguiti con l'app DRAGEN Enrichment. I valori di frequenza dell'allele minore (Minor Allele Frequency, MAF) osservati sono valori medi ottenuti da quattro replicati tecnici.

Tabella 5: Rilevamento delle varianti in campioni selezionati dai collaboratori con il pannello TruSight Hereditary Cancer e l'app DRAGEN Enrichment

Campione	Gene	Allele di riferimento	Allele variante	Tipo di variante	Conseguenza	Rip 1 MAF	Rip 2 MAF
1	Sovrapposizione <i>PALB2</i>			CNV	modifica numero di copie (perdita degli esoni 7-13)	Rilevato	Rilevato
2	<i>RB1</i>	T	TTCAAAA	Inserzione	Inserzione inframe	54,1%	53,6%
	<i>TSC2</i>	C	T	SNV	Ottenuto arresto	49,8%	47,5%
3	<i>POLE</i>	C	T	SNV	Variante missenso	44,1%	47,0%
4	<i>CHEK2</i>	A	G	SNV	Variante missenso	40,8%	44,9%
5	<i>MSH6</i>	GA	G	Delezione	Variante frameshift	50,9%	45,0%
6	<i>BRCA2</i>	CG	C	Delezione	Variante frameshift	29,9%	36,3%
7	<i>MLH1</i>	C	T	SNV	Ottenuto arresto	31,0%	31,9%
8	<i>BRCA1</i>	T	C	SNV	Variante missenso	39,6%	35,1%

Il sequenziamento è stato eseguito sul sistema MiSeq. L'allineamento e l'identificazione delle varianti sono stati eseguiti con l'app DRAGEN Enrichment. Le identificazioni delle varianti osservate sono correlate con i genotipi precedentemente riportati dai nostri collaboratori (dati non mostrati).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Categoria	N. di catalogo
TruSight Hereditary Cancer - solo oligonucleotidi per l'arricchimento	Oligonucleotidi per l'arricchimento (8 reazioni di arricchimento, fino a 12 campioni per arricchimento)	20029551
Preparazione delle librerie Nextera DNA Flex Pre-Enrichment e reagenti di arricchimento	Preparazione delle librerie e reagenti di arricchimento (96 campioni, reazioni di arricchimento di 8 x 12 plex)	20025524
Preparazione delle librerie Nextera DNA Flex Pre-Enrichment e reagenti di arricchimento	Preparazione delle librerie e reagenti di arricchimento (16 campioni, reazioni di arricchimento di 16 x 1 plex)	20025523
Reagenti per la preparazione delle librerie Nextera DNA Flex Pre-Enrichment	Reagenti per la preparazione delle librerie e per l'arricchimento (96 campioni)	20025520
Reagenti per la preparazione delle librerie Nextera DNA Flex Pre-Enrichment	Reagenti per la preparazione delle librerie e per l'arricchimento (16 campioni)	20025519
IDT per Illumina Nextera DNA Unique Dual Indexes Set A	Adattatori indice (96 indici, 96 campioni)	20027213
IDT per Illumina Nextera DNA Unique Dual Indexes Set B	Adattatori indice (96 indici, 96 campioni)	20027214
IDT per Illumina Nextera DNA Unique Dual Indexes Set C	Adattatori indice (96 indici, 96 campioni)	20027215
IDT per Illumina Nextera DNA Unique Dual Indexes Set D	Adattatori indice (96 indici, 96 campioni)	20027216
Reagente iSeq 100 i1	Un kit da 300 cicli	20021533
Reagente iSeq 100 i1, confezione da 4	Quattro kit da 300 cicli	20021534
MiSeq Reagent Micro Kit v2	Kit da 300 cicli	MS-103-1002
MiSeq Reagent Kit v2	Kit da 300 cicli	MS-102-2002
MiSeq Reagent Kit v3	Kit da 600 cicli	MS-102-3003
MiniSeq Mid Output Kit	Kit da 300 cicli	FC-420-1004
MiniSeq High Output Kit	Kit da 300 cicli	FC-420-1003
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5	Kit da 300 cicli	20024905
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5	Kit da 300 cicli	20024908
Flex Lysis Reagent Kit	96 reazioni	20018706

Illumina, Inc. • Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) • Tel. +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2019 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitate la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html. Pubbl.n. 1170-2019-012-A ITA QB9117

