



WYDANIE SPECJALNE – Luty 2016 MiniSeq

Nowy system do sekwencjonowania w ofercie Illumina

Z uwagi na fakt, że w połowie stycznia koncern Illumina wprowadził na rynek najnowszy system NGS, przygotowaliśmy wydanie specjalne newslettera w całości poświęcone sekwencjatorowi MiniSeq. Ten niezwykle prosty w użyciu, niewielkich rozmiarów aparat wykorzystuje wiarygodną i powszechnie uznaną technologię sekwencjonowania przez syntezę (SBS). MiniSeq to również możliwość automatycznej analizy bioinformatycznej uzyskanych danych bez konieczności korzystania z dodatkowego serwera czy specjalistycznego oprogramowania. MiniSeq jest odpowiedzią producenta na potrzebę ekonomicznego, przyjaznego użytkownikowi sekwencjatora o średniej i małej przepustowości, którą zgłaszali od dłuższego czasu specjaliści diagnostyki molekularnej oraz badacze realizujący projekty nie wymagające badań całogezomowych oraz te zakładające analizę ograniczonej ilości prób.

Obok opisu nowego aparatu, pozwalamy sobie przedstawić wybrane szlaki przygotowania bibliotek NGS dedykowanych do analizy na MiniSeq. Podpowiadamy także, skąd można pobrać oryginalne dokumenty Illumina, w których opisano szczególnie parametry: sekwencjatora, sterującego nim oprogramowania jak również zestawów odczytników kompatybilnych z MiniSeq.

Gościwie polecamy ostatni dział periodyku. Stanowi on zaproszenie do wzięcia udziału w trwającym do końca marca 2016 konkursie Illumina „Go Mini ...”

Życzymy przyjemnej lektury,

Zespół OpenExome

Produkty - ważne informacje

[MiniSeq](#)

[MiniSeq dla onkologii](#)

[MiniSeq w projektach badawczych](#)

[Porównanie sekwencjatorów typu "bench-top"](#)

Wydarzenia

[Konkurs "Go MINI..."](#)

[MiniSeq - szkolenia internetowe](#)

Nowy system do sekwencjonowania w ofercie Illumina

MiniSeq = precyzja analizy + łatwość obsługi systemu + dostępność ekonomiczna

Sekwencjator MiniSeq jest optymalnym rozwiązaniem dla laboratoriów, gdzie konieczne jest wydawanie wyniku analizy NGS w krótkim czasie, przy braku zaplecza bioinformatycznego. Urządzenie to z pewnością zda także egzamin w jednostkach, które mają zamiar wdrożyć technologię sekwencjonowania następnej generacji i nie mają jeszcze doświadczenia w tego rodzaju analizach. MiniSeq to bardzo prosty w obsłudze, niewielkich rozmiarów sekwencjator NGS, który wyposażony jest w intuicyjne oprogramowanie służące do kontrolowania parametrów reakcji oraz do

analizy uzyskanych wyników. Kolejnym niewątpliwym atutem najnowszego systemu NGS firmy Illumina jest fakt, że zakup MiniSeq wiąże się z małym nakładem inwestycyjnym.

Urządzenie MiniSeq pozwala na sekwencjonowanie małych genomów i samodzielnie przygotowanych bibliotek amplikonowych, a także na wykonanie celowanego sekwencjonowania DNA i RNA (w oparciu o gotowe, zdefiniowane panele NGS lub z wykorzystaniem projektowanych samodzielnie paneli DNA lub RNA) z użyciem niewielkich ilości wyjściowego materiału genetycznego.

Zasada działania MiniSeq opiera się o znaną i sprawdzoną technologię sekwencjonowania przez syntezę (SBS), która zapewnia uzyskanie wysokiej jakości danych dla bibliotek NGS różnego rodzaju. Użytkownik ma możliwość decydowania o skali przepustowości sekwenatora. Zależnie od wymagań bieżących projektów może sięgnąć po odczynniki do sekwencjonowania dedykowane do MiniSeq w jednym z dwóch trybów pracy: High Output lub Mid Output. Komplet odczynników do sekwencjonowania i niezbędne bufony producent dostarcza w gotowych do użycia kasetach (kartridżach) wraz z adekwatnym naczyniem przepływowym (ang. flow cell). W chwili przystąpienia do analizy użytkownik dodaje jedynie przygotowaną uprzednio bibliotekę do sekwencjonowania, a następnie umieszcza w aparacie kasetę z odczynnikami i naczyniem przepływowe (flow cell). Po czym uruchamia proces sekwencjonowania o zadanych parametrach.

Zależnie od potrzeb użytkownika oraz wymagań danego laboratorium odnośnie zachowania bezpieczeństwa danych, analiza wyników sekwencjonowania może być prowadzona: w środowisku BaseSpace (na serwerze „w chmurze” lub na stacjonarnym serwerze BaseSpace OnSite), na wskazanym przez użytkownika lokalnym komputerze/serwerze lub na pokładzie aparatu MiniSeq (z wykorzystaniem funkcjonalności programu Local Run Manager).

Local Run Manager jest instalowanym fabrycznie oprogramowaniem, które zawiaduje pracą sekwenatora MiniSeq oraz dodatkowo pozwala na wykonanie analiz danych z sekwencjonowania na pokładzie urządzenia. Korzystając z oprogramowania Local Run Manager użytkownik zapisuje charakterystykę próbki, specyfikę biblioteki oraz parametry reakcji sekwencjonowania przed rozpoczęciem reakcji. Po zakończeniu procesu sekwencjonowania, automatycznie uruchamiana jest (zdefiniowana wcześniej przez użytkownika) analiza bioinformatyczna uzyskanych danych. Szczegółowe informacje na temat właściwości oraz zastosowań programu Local Run Manager podano [tu](#).

Szczegółowy opis urządzenia MiniSeq zawiera [ulotka](#).

Odczynniki do reakcji sekwencjonowania w urządzeniu MiniSeq opisano [tutaj](#).

Przykładowe protokoły przygotowania bibliotek NGS kompatybilnych z MiniSeq...

...do zastosowania w onkologicznej diagnostyce molekularnej

TruSight RNA Pan-Cancer Panel –wszechstronny panel nowotworowy do wszystkich typów prób

Sekwencjonowanie RNA może dostarczać kluczowych informacji na temat funkcjonalności genów w procesie nowotworowym. Nowy panel TruSight RNA Pan-Cancer umożliwia detekcję genów fuzyjnych, wariantów oraz zmian w ekspresji w obrębie 1385 genów ([pełna lista genów](#)). Precyzyjna analiza może być wykonana już z 10ng całkowitego RNA lub z zaledwie 20ng RNA z prób FFPE. W przeciwieństwie do metod opartych na mikromacierzach, które charakteryzują się ograniczoną czułością, celowane sekwencjonowanie RNA z użyciem nowego panelu TruSight RNA Pan-Cancer to niezwykle czułe narzędzie do identyfikacji wariantów oraz detekcji nawet nisko ekspymowanych genów. Panel TruSight RNAPan-Cancer jest w pełni kompatybilny z systemami MiniSeq (badanie do 8 prób w ciągu jednego cyklu pracy) oraz MiSeq (do 8 prób w jednym cyklu pracy i NextSeq 500/550 (do 96 prób w jednym cyklu pracy urządzenia).

Więcej informacji podano na [stronie internetowej producenta](#).

TruSight Myeloid Sequencing Panel

TruSight Myeloid to zestaw do przygotowania bibliotek NGS opracowany przez konsorcjum ekspertów z dziedziny hematoonkologii, który pozwala na identyfikację puli mutacji somatycznych opisywanych, jako podłoże poniższych jednostek chorobowych:

- Ostra białaczka szpikowa (AML)
- Zespoły mielodysplastyczne(MDS)
- Nowotwory mieloproliferacyjne (MPN)
- Przewlekła białaczka szpikowa (CML)
- Przewlekła białaczka mielomonocytoza (CMML)
- Młodzięcza białaczka mielomonocytoza (JMML)

Biblioteka przygotowana szlakiem TruSight Myeloid pozwala, wychodząc od próbki zawierającej 50 ng DNA, przeanalizować pełną sekwencję egzomową 15 genów oraz podatnych na powstawanie mutacji regionów w obrębie dodatkowych 39 genów pacjenta. Sekwencjonowanie bibliotek TruSight Myeloid może być wykonane na aparatach MiniSeq (do 8 próbek w jednym cyklu pracy

sekwenatora), MiSeq (4-8 prób zależnie od wybranego zestawu z odczynnikami do sekwencjonowania) lub NextSeq500/550 (do 42 prób w trybie Mid-Output oraz do 96 prób w trybie High-Output). Szczegółowy opis produktu wraz z listą badanych genów dostępny jest [tutaj](#).

TruSight Tumor 15 – najczęstsze warianty somatyczne w próbkach FFPE

Nowy panel TruSight Tumor 15 wykorzystując technologię sekwencjonowania następnej generacji dostarcza kompleksową informację na temat 15 genów podlegających najczęściej mutacjom w nowotworach litych. Panel obejmuje sekwencje genów: AKT1, BRAF, EGFR, ERBB2, FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET oraz TP53, precyzyjnie wykrywając warianty o niskiej częstości z nawet 20ng wyjściowego DNA. TruSight Tumor 15 jest zoptymalizowany do analizy prób FFPE, a procedura wykonania została uproszczona do minimum. Panel jest w pełni kompatybilny z systemami MiniSeq (do 8 prób w jednym cyklu pracy urządzenia, MiSeq (do 8 prób w cyklu pracy) oraz NextSeq (do 48 bibliotek w jednym cyklu pracy).

Więcej informacji przedstawiono [tutaj](#).

TruSight Cancer

TruSight Cancer to zestaw odczynników pomocny w identyfikacji mutacji germinalnych, na podstawie obecności których można ocenić predyspozycje pacjenta do chorób nowotworowych. Dzięki wykorzystaniu niemal 4 000 specyficznych sond biblioteka przygotowana szlakiem TruSight Cancer obejmuje aż 255 kb informacji genetycznej, a tym samym badanie NGS obejmie sekwencje 94 genów oraz około 280 SNP uznawanych za powiązane z zapadalnością na choroby nowotworowe (zarówno te najczęściej występujące jak nowotwór piersi czy jelita grubego, jak również inne rzadziej obserwowane w populacji). Biblioteki przygotowane szlakiem TruSight Cancer są kompatybilne z sekwenatorami: MiniSeq (do 28 bibliotek w trybie Mid Output lub do 80 bibliotek w trybie High Output), MiSeq (do 48 bibliotek w jednym cyklu pracy aparatu) i NextSeq 500/550 (do 96 bibliotek w jednym cyklu pracy urządzenia).

Więcej materiałów na temat tego panelu TruSight Cancer podano [tutaj](#)

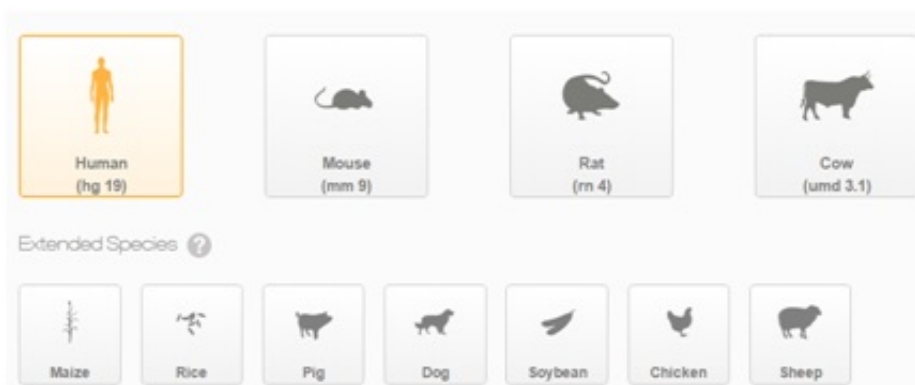
...do zastosowania w diagnostyce oraz w projektach badawczych

TruSeq Custom Amplicon Low Input

Niejednokrotnie spotykamy się z sytuacją, gdy zdefiniowane przez producenta zamknięte panele genowe nie pasują do danego projektu lub nie uwzględniają niektórych sekwencji istotnych w konkretnym przypadku. Aby zaprojektować panel w pełni odpowiadający indywidualnemu projektowi badawczemu, nasi klienci używają programu DesignStudio i projektują „szyty na miarę” panel w technologii TruSeq Custom Amplicon (TSCA). Badacz opracowujący autorski panel w jednym z pierwszych etapów projektowania, wskazuje typ sekwenatora, na którym miałyby być przeprowadzona właściwa reakcja sekwencjonowania (panele TSCA kompatybilne są z: MiniSeq, MiSeq oraz NextSeq500/550). Po weryfikacji stopnia pokrycia pożądaných sekwencji projektujący ma możliwość wprowadzenia zmian do projektu lub ostatecznego zatwierdzenia parametrów panelu. Następnie system DesignStudio generuje kosztorys odczynników z wyszczególnieniem ilości opakowań poszczególnych składowych niezbędnych do przeprowadzenia analizy prób w ilości wskazanej przez projektującego.

Dostępna od kilku miesięcy odmianą projektów TSCA jest TruSeq Custom Amplicon Low, czyli panel stanowiący ułatwienie dla osób, które planują analizę dla niewielkiej puli prób lub/i dysponują znikomą ilością wyjściowego DNA. Mimo, że panel TSCA Low Input zapewnia możliwość projektowania na zamówienie biblioteki obejmującej łączną sekwencję do 600 tys. pz (do 1 536 amplikonów w reakcji typu multipleks), okazuje się on kosztowo ekonomiczny także dla małych projektów dotyczących kilkunastu próbek. Ogromną zaletą TSCA Low Input jest możliwość pracy z małą ilością wyjściowego materiału. Dobrej jakości bibliotekę można przygotować z zaledwie 10 ng DNA izolowanego z tkanek świeżych, mrożonych lub z prób utrwalonych metodą FFPE.

Wykonanie projektu TSCA możliwe jest nie tylko dla materiału genetycznego człowieka, ale również pozwala projektować panele genowe dla zwierząt laboratoryjnych, gospodarskich, towarzyszących i dla wybranych gatunków roślin.



TruSeq Targeted RNA Expression

Podobnie jak w przypadku projektowalnych zestawów do DNA-Seq Illumina oferuje możliwość stworzenia panelu ekspresyjnego uwzględniającego autorski zestaw sekwencji genów docelowych.

Po wybraniu w programie DesignStudio funkcji TruSeq RNA Expression rozpoczynamy projekt panelu RNA-Seq. Możliwe jest to dla sekwencji RNA człowieka, myszy lub szczura.

Pojedynczy projekt TruSeq Targeted RNA Expression może uwzględniać od 12 do 1 000 sekwencji docelowych (dla transkryptów genów, izoform, wariantów splajsingowych czy genów fuzyjnych), a dostępny zestaw indeksów pozwala na wyznakowanie do 384 unikalnych prób. Na potrzeby przygotowania biblioteki RNA-Seq tym szlakiem potrzebne jest ok. 50 ng całkowitego RNA.

Notatka dotycząca analizy paneli TruSeq Targeted RNA dostępna jest [tutaj](#).

TruSeq Targeted RNA Fixed Panels – katalogowe zestawy RNA-Seq

Illumina oferuje również duży wybór gotowych i walidowanych zestawów TruSeq Targeted RNA uwzględniających sekwencję transkryptów wchodzących w skład określonych ścieżek przekazywania sygnałów w komórce. Są to szlaki sygnałowe, których zaburzenie wiąże się z różnymi stanami chorobowymi. Dostępne są między innymi panele wymienione w tabeli poniżej.

Stem Cell	Cardiotox
P53 Pathway	Apoptosis
Cytochrome P450	Neuro Panel
NFκB Pathway	Cell Cycle
Wnt Pathway	Hedgehog

Warto pamiętać, że zdefiniowane panele TruSeq Targeted Fixed RNA mogą być poddawane modyfikacjom i stanowić wyjściową bazę autorskiego projektu badacza przygotowywanego w DesignStudio (tzw. panele typu Add-On).

Biblioteki NGS przygotowane z użyciem katalogowych lub projektowanych przez użytkownika paneli TruSeq Targeted RNA mogą być poddawane analizie w sekwenatorach MiniSeq, MiSeq oraz NextSeq500/550.

Szerszy opis paneli TruSeq Targeted RNA katalogowych i typu Ad-On zamieszczono [tutaj](#).

TruSeq smallRNA

Dla osób zainteresowanych analizą krótkich cząsteczek RNA odpowiednim narzędziem do badań będzie zestaw odczynników do przygotowania bibliotek o nazwie TruSeq smallRNA Library Preparation. Końcowy produkt może być sekwencjonowany na pokładzie każdego modelu sekwenatora Illumina. W jednym cyklu pracy aparatu MiniSeq uzyskamy dane dla 4 prób (w trybie Mid Output) lub do 12 prób (w trybie High Output).

Więcej informacji podano na [stronie internetowej](#) producenta oraz w [broszurze](#).

Nextera XT

Biblioteki ampliconowe lub biblioteki małych genomów przygotowane wg powszechnie znanego [protokołu Nextera XT](#) są kompatybilne ze wszystkimi systemami NGS Illumina, także z aparatem MiniSeq.

Porównanie parametrów technicznych oraz możliwych zastosowań systemów NGS typu „bench-top” firmy Illumina

Zalety pracy z wybranym urządzeniem



MiniSeq	MiSeq	MiSeq DX	NextSeq 500 / 550
<ul style="list-style-type: none">• Niski koszt systemu• Łatwość wdrożenia metodyki w laboratorium	<ul style="list-style-type: none">• Szeroki wybór zastosowań• Elastyczność wyboru długości odczytu (od 1x50 do 2x300 pz)• Możliwość pracy z zestawami odczynników do zastosowań wymagających mniejszej przepustowości	<ul style="list-style-type: none">• Zastosowanie kliniczne i diagnostyczne• Możliwość pracy w trybie RUO	<ul style="list-style-type: none">• Wszelstronność• Regulowana przepustowość• Możliwość wykonywania analiz NGS oraz skanowania mikromacierzy

Zachęcamy do przyjrzenia się zestawieniu kluczowych parametrów sekwenatorów następnej generacji, które oferuje koncern Illumina. Główne cechy urządzeń przedstawia powyższy schemat, a parametry zestawiono w tabeli poniżej.

	MiniSeq	MiSeq	NextSeq 500	
				
polecany do sekwencjonowania	małych genomów, amplikonów, z wykorzystaniem paneli genowych DNA i RNA, smallRNA	małych genomów, amplikonów, z wykorzystaniem paneli genowych DNA i RNA, bibliotek wymagających długich odczytów	m. in. genomów, egzomów, transkryptomów, celowanego resekwencjonowania	
tryb pracy	n/d	n/d	Mid-Output	High-Output
liczba komórek przepływowych na pojedynczą reakcję	1	1	1	1
zakres przepustowości	1,8 -7,5 Gb	0,3 -15 Gb	20-39 Gb	30-120 Gb
czas trwania reakcji	4 - 24 godz.	5 – 55 godz.	12-26 godz.	12-30 godz.
liczba odczytów w jednej komórce przepływowej	8 – 25 milionów	1 - 25 milionów	do 130 milionów	do 400 milionów
maksymalna długość odczytu	2 x 150 bp	2 x 300 bp	2 x 150 bp	2 x 150 bp
dostępne modele systemu	MiniSeq	MiSeq MiSeq Dx MiSeq FGx	NextSeq 500 NextSeq 550	

W doborze właściwego systemu NGS do planowanego projektu badawczego lub testu diagnostycznego pomocna będzie również aplikacja pozwalająca na szczegółowe porównanie właściwości platform NGS : <http://www.illumina.com/systems/sequencing-platform-comparison.ilmn>

Szkolenia internetowe dotyczące systemu MiniSeq

Wszystkich czytelników zainteresowanych zasadą działania oraz możliwościami urządzenia MiniSeq zapraszamy do obejrzenia szkoleń internetowych, które producent przygotował i udostępnił na swojej [stronie internetowej](#). Po obejrzeniu krótkich (15-25 minutowych) prezentacji komentowanych przez specjalistę aplikacyjnego Illumina zapewne uzyskacie Państwo odpowiedź na znaczną część pytań, która nasuwa się w kontekście tego najnowszego sekwenatora.

Dostępne tematy prezentacji to:

- MiniSeq: System Overview
- MiniSeq: Preparing for Your Installation
- MiniSeq: How to Start a Run
- Local Run Manager Overview

MiniSeq konkurs – Go Mini and Win Big

Konkurs Go Mini and Win Big to szansa na wygranie sekwenatora MiniSeq oraz Mini Cooper. Aby wziąć udział, napisz w 500 słowach (lub mniej) jak wykorzystałbyś nowy sekwenator MiniSeq aby zwiększyć innowacyjność, rozszerzyć i przyspieszyć obecnie prowadzone badania. Tekst zostanie oceniony przez zespół naukowców z Illumina pod kątem wartości naukowej, innowacyjności oraz zgodności z systemem MiniSeq.

[Więcej informacji](#)



Komentarze i opinie czytelników newslettera

Drodzy Czytelnicy! Będziemy wdzięczni, jeśli zechcecie podzielić się z nami swoimi opiniami dotyczącymi newslettera OpenExome. Jeśli nasuwają się Państwu komentarze na temat treści kolejnych wydań newslettera lub sugestie tematów, które warto poruszyć w tym periodyku, prosimy o przesyłanie ich na adres: community@openexome.pl.

OpenExome s.c. | ul. Schroegera 82 | 01-828 Warszawa | (+48) 22 465 25 27 | community@openexome.pl

[Zrezygnuj z otrzymywania wiadomości](#)