

# Pannello Focus AmpliSeq™ for Illumina

Pannello mirato per DNA o RNA che consente di investigare 52 geni con rilevanza nota nei tumori solidi.

## Punti principali

### • Contenuto del gene rilevante

Mira ai biomarcatori su 52 geni rilevanti nei tumori solidi

### • Flusso di lavoro veloce e ottimizzato

Le librerie pronte per il sequenziamento possono essere preparate in un solo giorno a partire da 1 ng di DNA o RNA di elevata qualità e da 10 ng di DNA e RNA ottenuto da tessuto in FFPE

### • Dati accurati

Rilevamento delle mutazioni somatiche fino al 5% della frequenza analizzando i dati in laboratorio o sul cloud

## Introduzione

Il pannello Focus AmpliSeq for Illumina è un saggio di risequenziamento mirato per l'analisi dei biomarcatori di 52 geni con rilevanza nota nei tumori solidi (Tabella 1). Grazie al pannello Focus i ricercatori possono analizzare contemporaneamente il DNA e l'RNA. Il pannello Focus da parte di un flusso di lavoro ottimizzato che include preparazione delle librerie basata sulla polimerizzazione a catena (Polymerase Chain Reaction, PCR) AmpliSeq for Illumina, la chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS) e la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) Illumina e l'analisi automatizzata.

Partendo da appena 1 ng di DNA e RNA di elevata qualità (sono raccomandati 10 ng di DNA e RNA da tessuto in FFPE), il pannello consente lo studio dei geni associati a diversi tipi di cancro, inclusi al polmone, al colon, al seno, alle ovaie, alla prostata e melanoma. Il basso requisito di input consente l'utilizzo di diversi tipi di campioni, inclusi i tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE). Il pannello Focus fa parte della soluzione di risequenziamento mirato AmpliSeq for Illumina e consente la valutazione veloce e accurata della variazione genomica per la ricerca in campo traslazionale e di oncologia clinica.

## Contenuto del gene rilevante

Il pannello Focus AmpliSeq for Illumina mira a centinaia di mutazioni sui 52 geni chiave associati ai tumori solidi (Tabella 2). Il contenuto del gene per questo pannello è stato selezionato in base a letteratura pubblicata, attuali linee guida (National Comprehensive Cancer Network [NCCN], Association for Molecular Pathology [AMP], College of American Pathologists [CAP], European Society for Medical Oncology [ESMO], ecc.) e rilevanti trial clinici. Grazie a questo pannello i ricercatori possono investigare le varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV), inserzioni/delezioni (Insertion/deletion, Indel) e variazioni del numero di copie (Copy Number Variation, CNV) in campioni di DNA o fusioni geniche in campioni di RNA. Questo pannello pronto all'uso consente ai ricercatori di risparmiare tempo e sforzi nell'identificazione di target, nella progettazione degli ampliconi e nell'ottimizzazione delle prestazioni.

**Tabella 1: Panoramica del pannello Focus AmpliSeq for Illumina**

Parametro	Specifica
N. di geni	52
Target	Geni rilevanti nei tumori solidi
Dimensione cumulativa dei target	DNA: 29 kb, RNA: 26 kb
Tipi di varianti	SNV, Indel, CNV e fusioni geniche <sup>a</sup>
Dimensione amplicone	DNA: 107 bp (in media), RNA: 93 bp (in media)
N. di ampliconi	DNA: 269, RNA: 284
Requisito di DNA/RNA input	1-100 ng (sono raccomandati 10 ng per raggruppamento in pool)
N. di raggruppamenti in pool per pannello	Pannello DNA: 1 raggruppamento in pool, Pannello RNA: 1 raggruppamento in pool
Tipi di campione compatibili	Tessuti in FFPE
Percentuale di target coperti alla copertura minima di 500x alla processività raccomandata	> 95%
Uniformità di copertura (percentuale di target con più di 0,2x di copertura media)	> 95%
Percentuale di letture allineate sul target	> 80%
Durata totale del saggio <sup>b</sup>	5-6 ore
Interventi manuali	Meno di 1,5 ore
Durata da DNA/RNA ai dati	2,5 giorni

a. SNV: variante di singolo nucleotide; Indel: inserzione/delezione; CNV: variazione del numero di copie

b. La durata si riferisce solo alla preparazione delle librerie e non include la quantificazione, la normalizzazione o il raggruppamento in pool delle librerie.

Dati in archivio presso Illumina, Inc. 2017

**Tabella 2: Elenco dei geni per il pannello Focus AmpliSeq for Illumina**

Raggruppamento in pool di DNA				
AKT1	EGFR	FGFR4	JAK3	MYCN
ALK	ERBB2	GNA11	KIT	NRAS
AR	ERBB3	GNAQ	KRAS	PDGFRA
BRAF	ERBB4	HRAS	MAP2K1	PIK3CA
CCND1	ESR1	IDH1	MAP2K2	RAF1
CDK4	FGFR1	IDH2	MET	RET
CDK6	FGFR2	JAK1	MTOR	ROS1
CTNNB1	FGFR3	JAK2	MYC	SMO
DDR2				
Raggruppamento in pool di RNA				
ABL1	EGFR	ETV5	NTRK1	PPARG
ALK	ERBB2	FGFR1	NTRK2	RAF1
AKT3	ERG	FGFR2	NTRK3	RET
AXL	ETV1	FGFR3	PDGFRA	ROS1
BRAF	ETV4	MET		

## Flusso di lavoro semplice e ottimizzato

Il pannello Focus AmpliSeq for Illumina fa parte di una soluzione dal DNA/RNA alla variante che offre contenuto ottimizzato, semplice preparazione delle librerie, sistemi di sequenziamento di facile utilizzo e semplice analisi dei dati.

La preparazione delle librerie si attiene a un protocollo ottimizzato basato sulla PCR che può essere completato in appena 5 ore (DNA) o 6 ore (RNA), con meno di 1,5 ore (DNA) o meno di 2 ore (RNA) di interventi manuali. Le librerie ottenute possono essere normalizzate, raggruppate in pool, quindi caricate su una cella a flusso per il sequenziamento. Le librerie preparate vengono sequenziate mediante la comprovata chimica SBS Illumina su un sistema di sequenziamento Illumina compatibile (Tabella 3).

I dati ottenuti possono essere analizzati in laboratorio mediante Local Run Manager o facilmente trasferiti a BaseSpace™ Sequence Hub. Local Run Manager e BaseSpace Sequence Hub possono accedere al flusso di lavoro di analisi DNA Amplicon per l'allineamento e l'identificazione delle varianti. BaseSpace Sequence Hub consente di accedere a BaseSpace Variant Interpreter per convertire i dati delle identificazioni delle varianti in risultati annotati.



Maggiori informazioni sui [sistemi di sequenziamento Illumina](#)



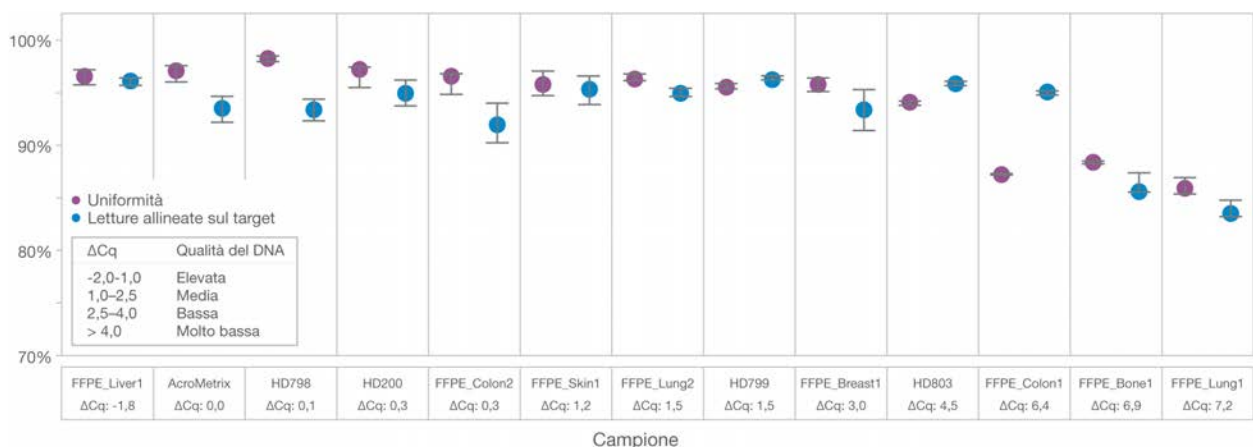
Maggiori informazioni sui [sistemi informatici AmpliSeq for Illumina](#)

**Tabella 3: Sistemi di sequenziamento Illumina raccomandati per il pannello Focus AmpliSeq for Illumina**

Strumento	N. di campioni per corsa	Durata della corsa
Sistema iSeq™ 100	8	17 ore
Sistema MiniSeq™ (Mid-Output)	16	17 ore
Sistema MiniSeq (High-Output)	48	24 ore
Sistema MiSeq (chimica Micro v2)	8	19 ore
Sistema MiSeq (chimica v2)	30	24 ore
Sistema MiSeq (chimica v3)	48	32 ore

## Dati accurati

Il pannello Focus AmpliSeq for Illumina consente ai ricercatori di analizzare i biomarcatori su 52 geni chiave dei tumori solidi utilizzando DNA e RNA.



**Figura 1: Elevata uniformità di copertura e allineamento sul target:** il DNA è stato estratto da campioni HD e in FFPE di diversa qualità utilizzando il pannello Focus AmpliSeq for Illumina e sequenziato sullo strumento. Le barre degli errori indicano la variabilità dei replicati tecnici. Il valore ΔCq è un indicatore della qualità del DNA isolato da tessuti in FFPE.

## Copertura e sensibilità

Per dimostrare la funzionalità e la sensibilità del saggio, sono stati valutati un campione di controllo AcroMetrix, campioni Horizon Discovery (HD) e tessuti in FFPE utilizzando il pannello Focus sui sistemi MiniSeq™ e MiSeq™. I risultati hanno mostrato elevata uniformità di copertura e percentuale di letture allineate sul target, anche con diversi tipi di tessuto e qualità del campione (Figura 1). Sono stati inoltre analizzati campioni HD di diversa qualità per valutare l'accuratezza dell'identificazione delle varianti. I dati hanno mostrato elevata concordanza tra la frequenza della variante prevista e rilevata (Figura 2).

## Rilevamento della fusione genica

Per dimostrare la capacità del pannello Focus AmpliSeq for Illumina di riconoscere le varianti strutturali nei trascritti di RNA, i campioni HD e il riferimento Seraseq Fusion RNA Mix v2 sono stati valutati mediante il pannello sui sistemi MiniSeq e MiSeq. I risultati hanno mostrato una percentuale di identificazione del 100% per le fusioni geniche in questi campioni (Tabella 4).

**Tabella 4: Elevata percentuale di identificazione per le fusioni geniche**

Fusione	N. di campioni NON rilevati	N. di campioni rilevati	Percentuale di identificazione
<b>Fonte di RNA: HD784</b>			
<i>CCDC6-RET</i>	0	16	100%
<i>EML4-ALK</i>	0	16	100%
<i>SLC34A2-ROS1</i>	0	16	100%
<i>SLC34A2-ROS1</i>	0	16	100%
<b>Fonte di RNA: Seraseq Fusion RNA Mix v2</b>			
<i>CD74-ROS1</i>	0	16	100%
<i>EML4-ALK</i>	0	16	100%
<i>ETV6-NTRK3</i>	0	16	100%
<i>FGFR3-BAIAP2L1</i>	0	16	100%
<i>FGFR3-TACC3</i>	0	16	100%
<i>KIF5B-RET</i>	0	16	100%
<i>LMNA-NTRK1</i>	0	16	100%
<i>NCOA4-RET</i>	0	16	100%
<i>PAX8-PPARG</i>	0	16	100%
<i>SLC34A2-ROS1</i>	0	16	100%
<i>SLC45A3-BRAF</i>	0	16	100%
<i>TPRSS2-ERG</i>	0	16	100%
<i>TPM3-NTRK1</i>	0	16	100%

Sono stati utilizzati due campioni di RNA con fusioni positive, HD784 e Seraseq Fusion RNA Mix v2, per generare le librerie di RNA mediante il pannello Focus AmpliSeq for Illumina e sequenziati sui sistemi MiniSeq e MiSeq.

## Informazioni per gli ordini

I prodotti AmpliSeq for Illumina possono essere ordinati online alla pagina Web [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

Prodotto	N. di catalogo
Pannello Focus AmpliSeq for Illumina (24 reazioni)	20019164
Library PLUS AmpliSeq for Illumina (24 reazioni)	20019101
Library PLUS AmpliSeq for Illumina (96 reazioni)	20019102
Library PLUS AmpliSeq for Illumina (384 reazioni)	20019103
CD Indexes AmpliSeq for Illumina - set A (96 indici, 96 campioni)	20019105
cDNA Synthesis AmpliSeq for Illumina (96 reazioni)	20022654
Pannello Sample ID AmpliSeq for Illumina	20019162
Direct FFPE DNA AmpliSeq for Illumina	20023378
Library Equalizer AmpliSeq for Illumina	20019171

## Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni sul [pannello Focus AmpliSeq for Illumina](#)

Per maggiori informazioni sulla [soluzione di sequenziamento mirata AmpliSeq for Illumina](#)

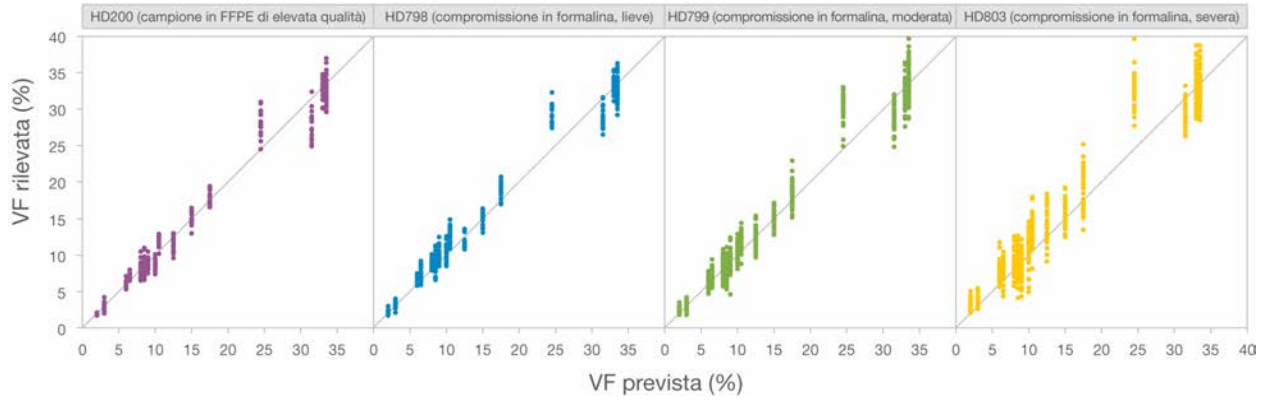


Figura 2: Elevata concordanza tra la frequenza della variante prevista e rilevata: il DNA ottenuto da è stato preparato utilizzando il pannello Focus AmpliSeq for Illumina e sequenziato sui sistemi. I risultati mostrano che è stato rilevato il 100% delle SNV previste. I valori  $\Delta Cq$  sono elencati nella Figura 1.