illumina®

MiSeqシステムに最適化された Nextera™ サンプル調製キット

微生物ゲノムの高品質な*de novo*アセンブリを可能にする最速の次世代シーケンサーサンプル調製キット

はじめに

小さなゲノムサイズの生物種のリシーケンスと*de novo*アセンブリにおいて、次世代シーケンサーは重要なツールになりつつあります。NexteraサンプルSeqシステムの一体化されたシーケンスワークフローに不可欠な要素です。Nexteraを使えば、研究者は次世代シーケンサー用のライブラリーを90分で調製でき、またハンズオン時間はわずか15分しかかかりません（図1）。NexteraとMiSeqシステムを組み合わせることで、50ngのサンプルDNAからデータ解析までをわずか8時間で完了できます。このアプリケーションノートでは、トランスポソームを介する独自の断片化とアダプターリゲーションを用いてNextraテクノロジーがどのように迅速かつ効率的なサンプル調製を行うのか、また、より長いペアエンドリードを使った*de novo*アセンブリにおいて最高品質のシーケンスをもたらすのかについて説明しています。

結果

十分に特性が明らかにされている大腸菌MG1655株から抽出したゲノムDNAをスタート材料にし、Nexteraサンプル調製キットでシーケンスライブラリー調製を行いました。MiSeqのシーケンスランでは、まず調製済みのライブラリーをアプライした試薬カートリッジとフローセルとMiSeqをシステムにセットしました。その後、クラスター形成、シングルまたはペアエンドのシーケンス、および一次データ解析はMiSeqで行いました。

MiSeqで行うリシーケンスの場合、データ解析はシステムに搭載されているコンピューターで終了し、追加のサーバーや計算機を必要としません。Nexteraを使ってサンプル調製した1x35bpのランは8時間で完了しました。今回のランにおける主な測定基準を表1に示しています。Nexteraサンプル調製キットは高いクラスター密度、優れたクオリティ値と高いゲノムカバレッジを誇るシーケンス結果をもたらすことがわかりました。

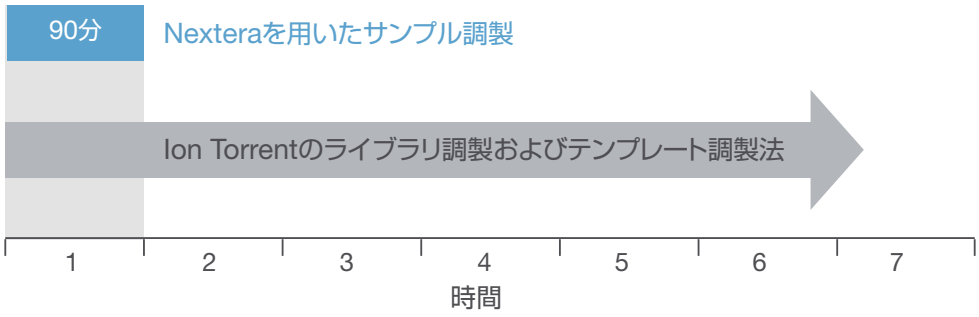
表1：1 x 35bpで行ったシーケンスランの結果

項目	MiSeqシステム
合計時間*	8時間
フィルタパス後のリード数（百万）	5.82
Q30以上の塩基の割合（%）（精度99.9%）	94.5
平均カバレッジ深度	41x
ゲノムカバレッジ率（%）	97.89
ギャップ数	345
平均ギャップサイズ	296
ギャップ合計（Kb）	102
SNP合計	32

* 合計時間にはゲノムDNAからNexteraを使ったサンプル調製、1×35bpのシングルリードシーケンスラン、MiSeqで行う自動データ解析を含みます。

*de novo*シーケンスに関しては、Nexteraサンプル調製キットを使って調製した大腸菌ライブラリーを用い、MiSeqでリード長150bpのペアエンドシーケンスを行いました。比較のため、イルミナのTruSeq™サンプル調製キットを使用して調製した大腸菌MG1655株のシーケンスもMiSeqで同様にリード長150bpのペアエンドシーケンスを実施しました[1]。いずれのアセンブリもVelvet v1. 1.05を使用して行いました[2]。NexteraおよびTruSeqを使って調製した両サンプルの*de novo*アセンブリ結果を表2に示しています。いずれのサンプル調製法も優れた*de novo*アセンブリ結果をもたらしました。

図1：Nexteraは迅速に効率よくライブラリーを作製します



Nexteraサンプル調整の所要時間はわずか90分、ハンズオン時間は15分です。他のパーソナルシーケンスシステム[3]とは異なり、標準的なサーマルサイクラー以外の補助装置を必要としません。

特定のシーケンスアプリケーションに必要なゲノムカバレッジの量によっては、MiSeqシーケンスのリード長が適切なスピードと品質の組み合わせをもたらすと判明することもあります。表3は大腸菌MG1655株に関するさまざまなリード長でのMiSeqのデータ産出量を示しています。予想された通り、リード長を増やしてペアエンド法で解析すると、平均カバレッジ深度とギャップは低下し、良好な結果が得られます。MiSeqで可能な最長のペアエンドリード長（2x150bp）は99.83%という最高のゲノムカバレッジをもたらしました。

結論

Nexteraを使った微生物ゲノムDNAサンプルの調製からMiSeqでのシーケンスとデータ解析は、わずか１日（8時間）に終了できます。短鎖シーケンスリードでも小さなゲノムの高品質なアセンブリが十分に得られ、リード長を増やしたペアエンド法では、データ品質はわずかに向上しました。Nexteraは実験の時間と質に応じて、リード長やシーケンスラン（シングルリードとペアエンド法）を選択でき、高い柔軟性を提供するサンプル調製キットです。どのような小さなゲノムのシーケンスプロジェクトに対しても、NexteraとMiSeqは最高品質のシーケンスで結果を迅速に提供します。

表2：2 x 150bpで行った*de novo*アセンブリの結果

項目	Nextera サンプル調製キット	TruSeq サンプル調製キット
アセンブリサイズ（Kb）	4.57	4.57
最大コンティグ長（Kb）	314	312
N50（Kb［コンティグ］）	175 (11)	149 (11)
平均コンティグ長（Kb）	38.0	36.6
コンティグ数	120	125
ゲノムカバレッジ率（%）	99.96	99.93

表3：さまざまなリード長におけるシーケンスランの結果

項目	2 x 150bp	2 x 50bp	2 x 35bp	1 x 35bp
ゲノムカバレッジ	99.83	99.70	99.61	97.89
平均カバレッジ深度	356	117	81	41
ギャップ数	55	121	259	345
平均ギャップサイズ	373	258	161	296
ギャップ合計（Kb）	20.5	31.1	41.6	102.1

参考文献

1. *De novo* bacterial sequencing on the MiSeq system. 2011 Illumina Application Note.
2. Zerbino DR and E Birney (2008) Velvet: Algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res 18:821–9.
3. Ion Torrent Workflow Brochure, 2011 http://www.iontorrent.com/lib/images/PDFs/co31580_workflow.pdf

詳細情報

革新的なデスクトップ型次世代シーケンサーMiSeqの詳細については、弊社http://www.illuminakk.co.jp/product/system/miseqをご参照ください。

イルミナ株式会社

〒108-0014
東京都港区芝5-36-7　三田ベルジュビル22階
Tel (03)4578-2800　Fax (03)4578-2810
www.illuminakk.co.jp

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc の商標または登録商標です。
その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 770-2011-J018 25JAN12