

Nexteraによるライブラリー調整

-実験の流れ、注意点、応用例について-

小椋義俊

宮崎大学

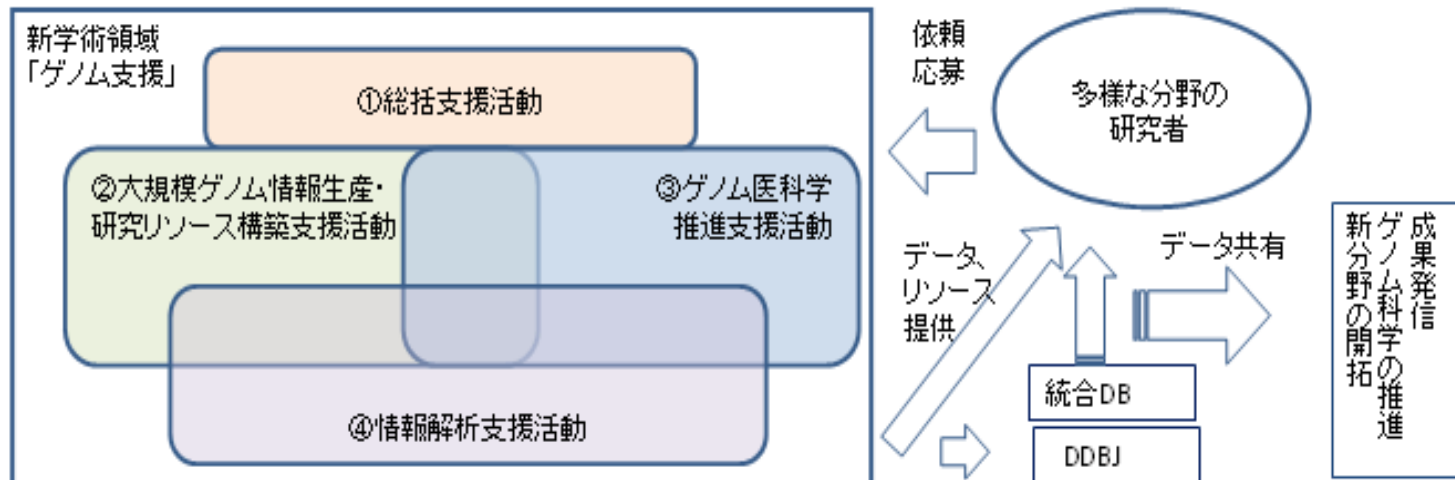
フロンティア科学実験総合センター
医学部 感染症学講座 微生物学分野



当研究室とゲノム研究

- 2001年に病原性大腸菌O157の全ゲノム解読を発表
- これまでに多数の微生物ゲノムプロジェクトに参加
(未来開拓、ゲノム特定)
- 2010年より新学術領域「ゲノム支援」に参加
(シーケンス拠点の一つとして病原微生物のシーケンスを担当)

新学術領域「ゲノム支援」



宮崎大学のシーケンス設備

Roche 454 GS FLX +



Roche 454 GS junior



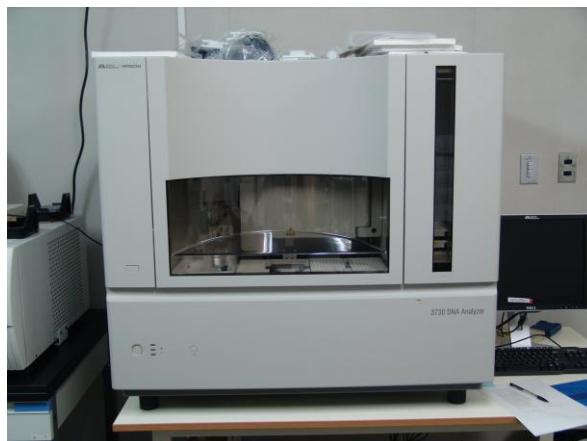
Illumina MiSeq



AB 3130xl



AB 3730



解析用サーバー

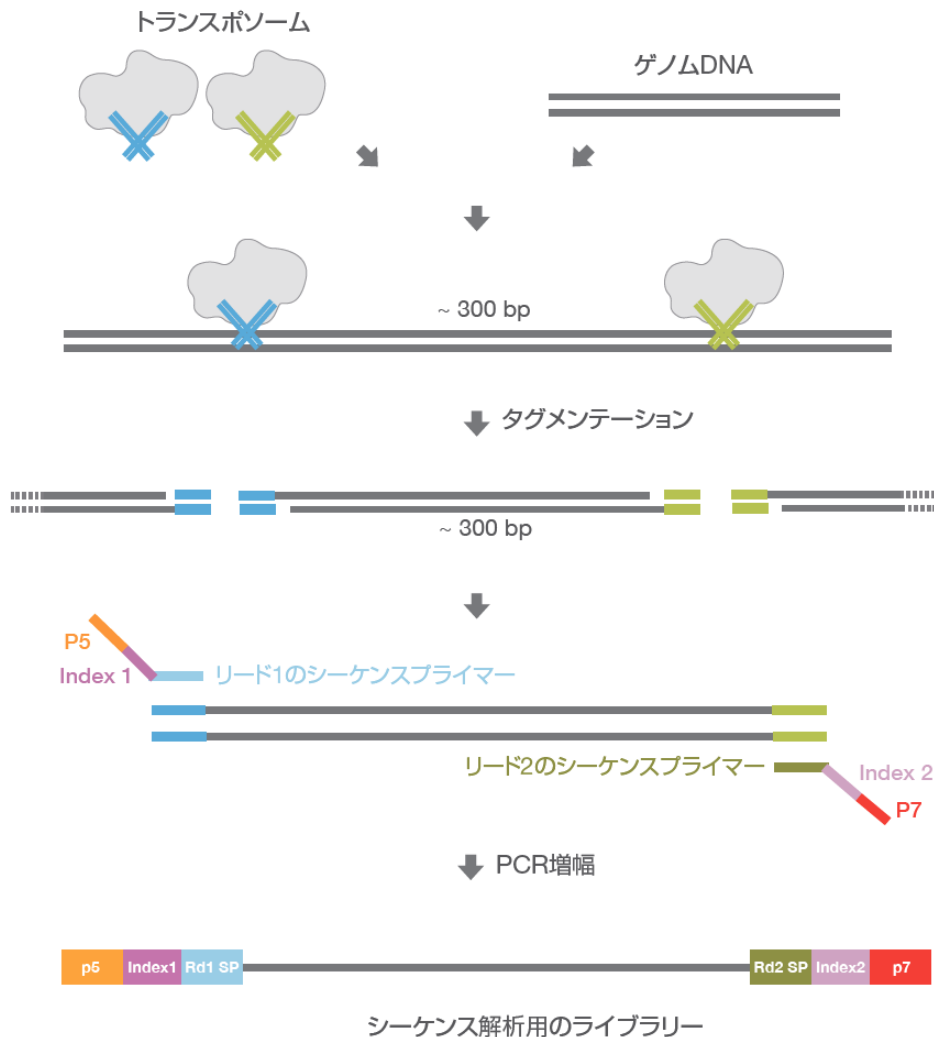


ライブラリー調整キットの比較

	TruSeq	Nextera	Nextera XT
Start DNA量	1 μ g	50 ng	1 ng
Throughput	Low		High
断面化装置	必要		不要
所要時間	2日		半日
価格/sample	約8,000円	約1万2,000円	約5,000円
PCR cycles	10	5	12
Library size (bp)	500 – 600		250 – 1,000

トランスポゾームによるタグメンテーション

Nexteraによるライブラリー調整の流れ



タグメンテーション

=断片化&タグ付け

トランスポゾーム反応

1回だけ 速い 高効率

DNA量とトランスポゾームの分子数で断片化サイズが決まる

反応時間、反応温度、バッファーなどによるコントロールは難しい

ポイント：DNA濃度は正確に測る
[必ず、picogreenやQubit等を使用する]

Input DNAについて

- できるだけカラムで精製する
- RNase処理を行う
- PCR productの場合は、dNTPやprimerを除去する
- ゲノムDNAは、電気泳動で断片化の程度を確認する
- nanodrop等を用いてODで測定した濃度とpicogreenやQubitで測定した濃度は10倍程度の差がある

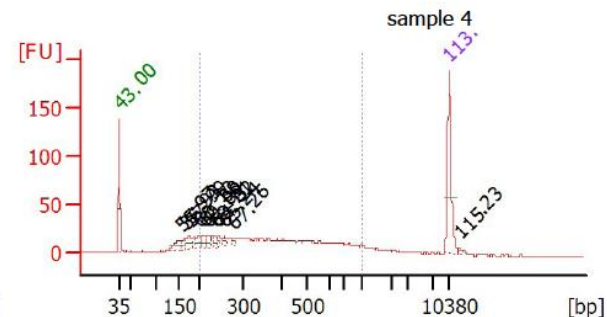
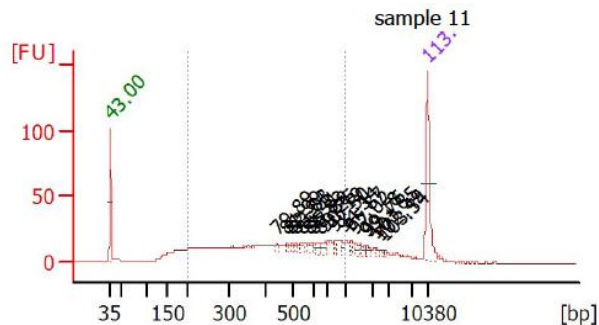
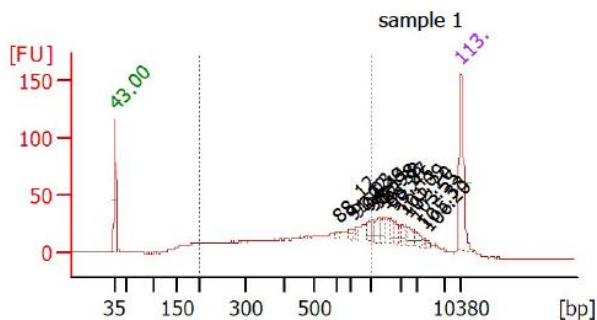
サンプルによるライブラリーサイズの変動

タグメンテーション後 (PCR前)

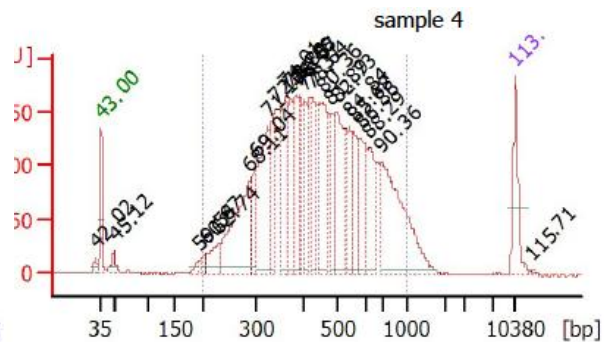
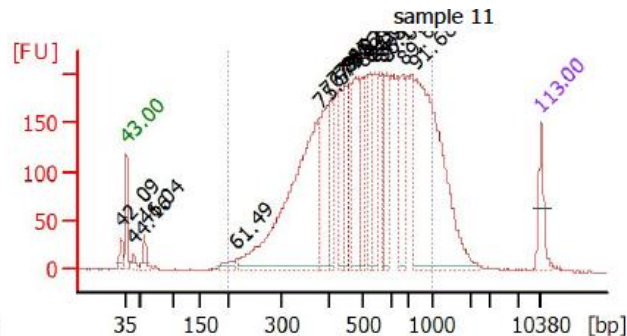
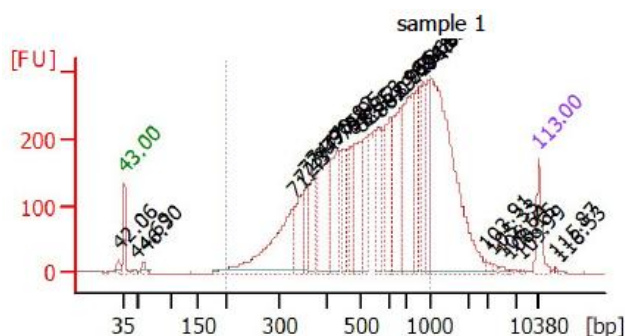
0.625 ng/ μ l

0.625 ng/ μ l

0.625 ng/ μ l



ライブラリー最終産物 (PCR後)



印象としては、DNA濃度測定の影響や希釈の正確性による影響が大きいと思われる。
現在、当ラボでは、0.5 ng/ μ lの濃度で安定して使用できている。

ライブラリー長とsequence quality

(TruSeqライブラリー)

	150x150		250x250		
	400 bp	900 bp	400 bp	400 bp	900 bp
Density(K/mm ²)	835	918	585	1,228	703
Cluster PF(%)	92	90	85	75	<u>63</u>
% >= Q30[Total]	86	<u>73</u>	76	68	<u>61</u>

Nexteraでは、input DNA量が多すぎると1,000 bp以上のフラグメントの割合が多くなるが、ライブラリーサイズが900 bp以上になるとsequence qualityが悪化する。

ポイント：ライブラリーサイズは、1,000 bp以下にする。

ライブラリー長とsequence quality

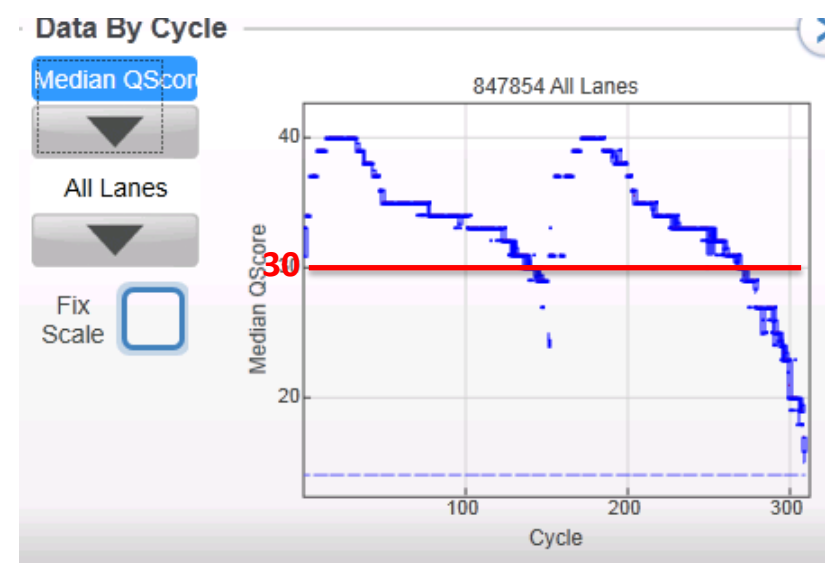
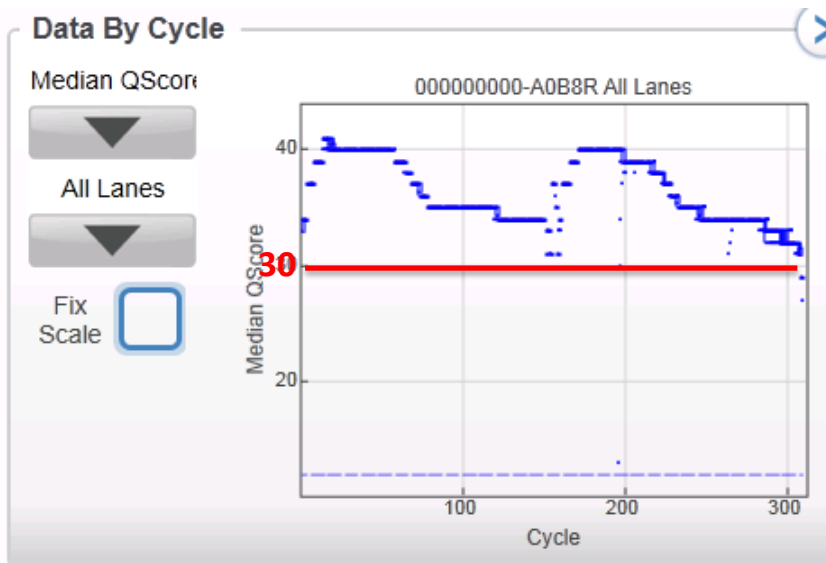
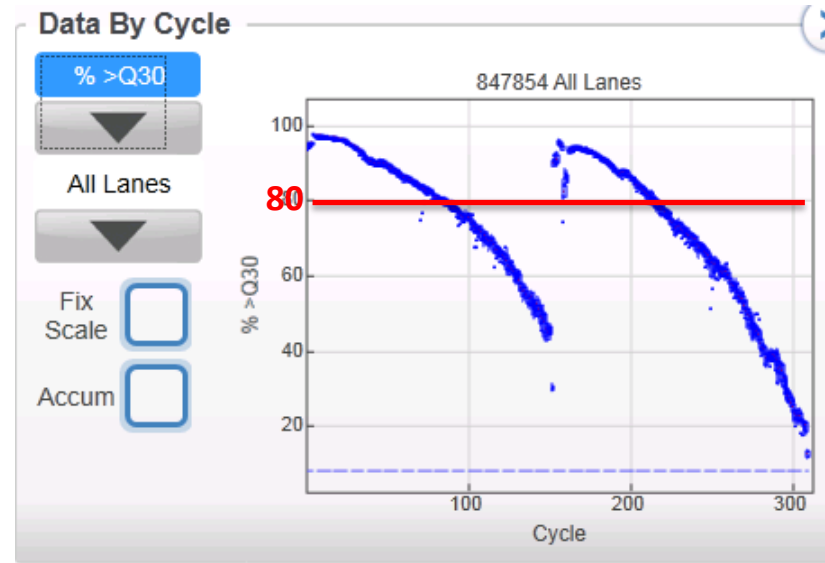
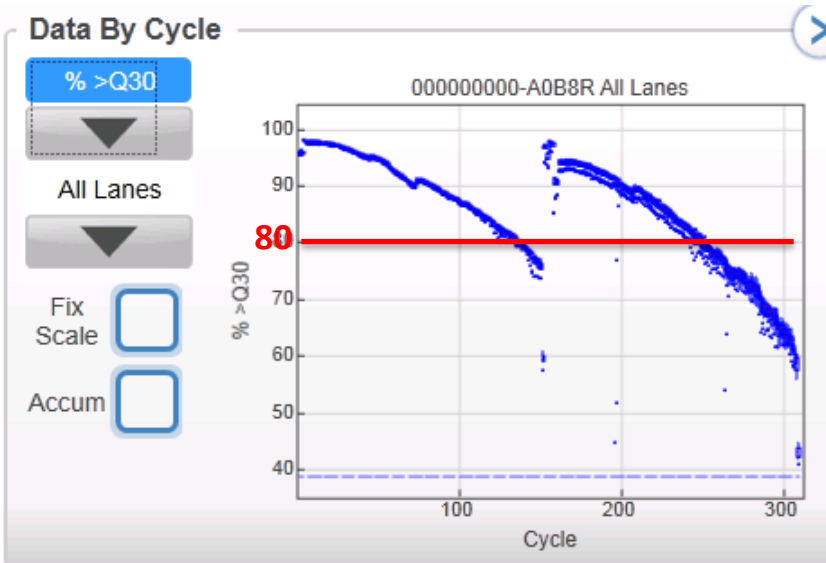
150x150

400 bp

900 bp

%>Q30

Median Qscore

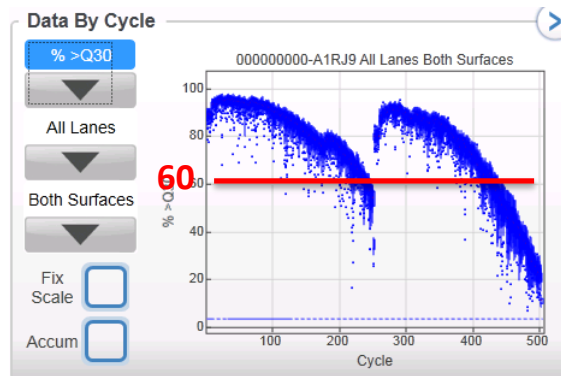


ライブラリー長とsequence quality

250x250

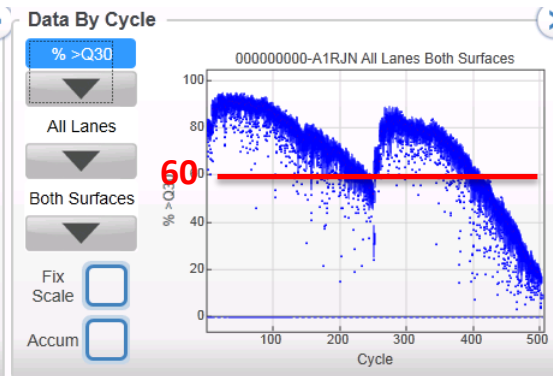
400 bp

(cluster: 585 k/mm²)



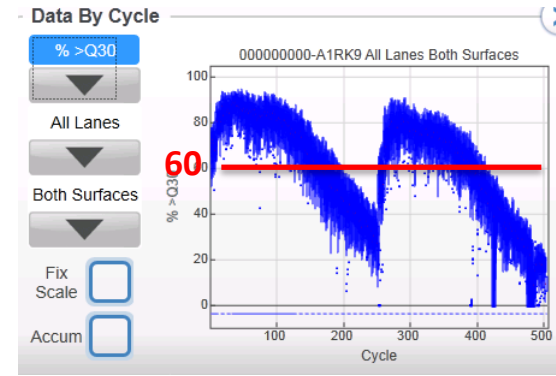
400 bp

(cluster: 1,228 k/mm²)



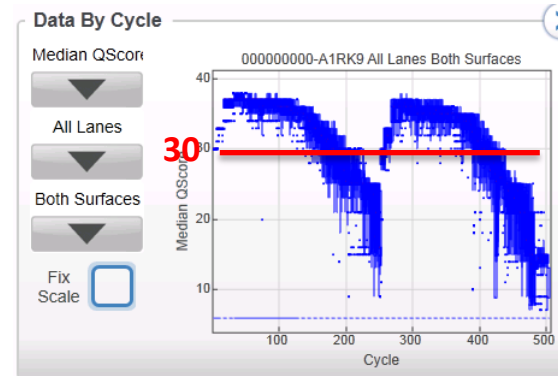
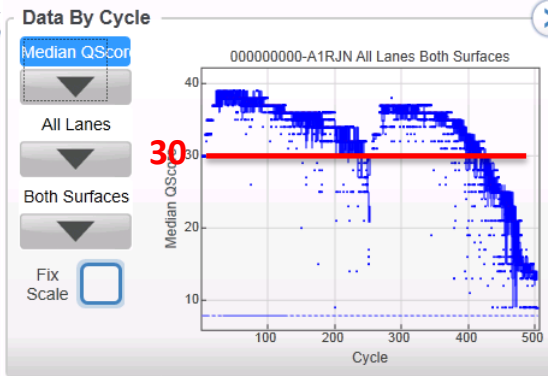
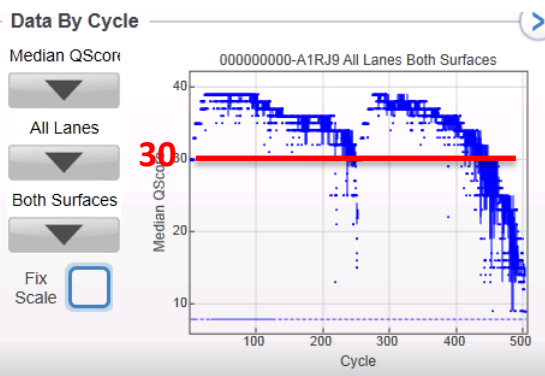
900 bp

(cluster: 703 k/mm²)



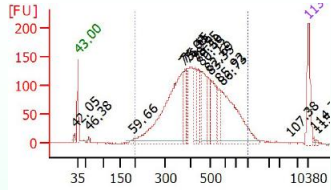
%>Q30

Median Qscore

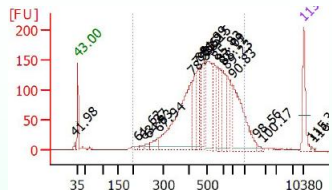


Nexteraで作成したライブラリープールのゲル切り出し

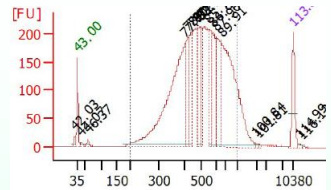
Strain1



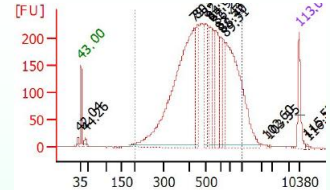
Strain2



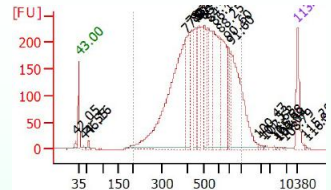
Strain3



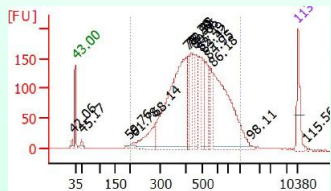
Strain4



Strain5

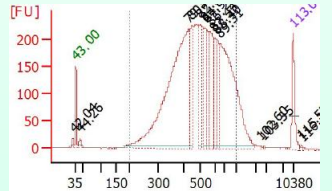


Strain6



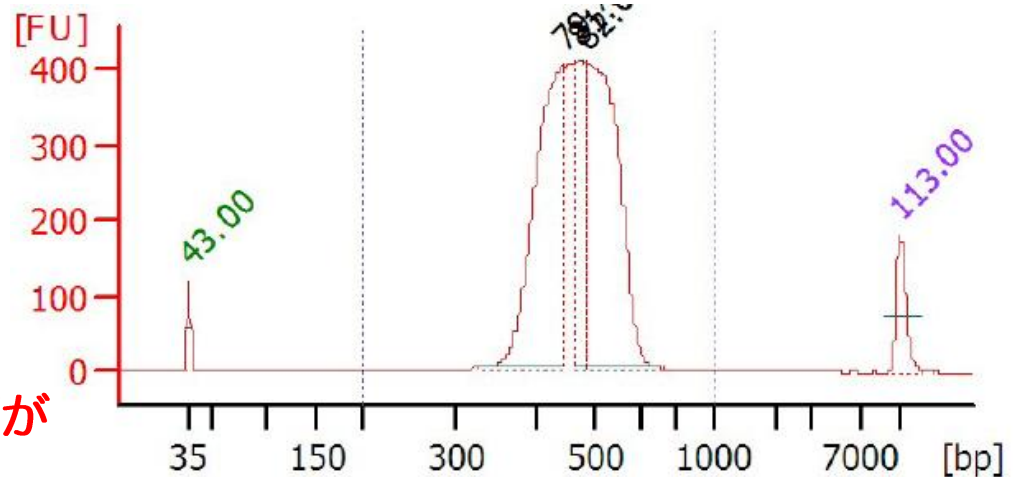
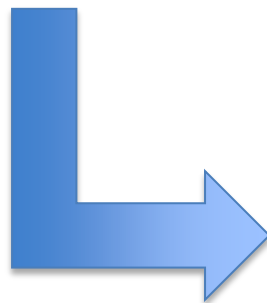
.....

Strain12



Nexteraで作成した12株
のライブラリーをプール

500 bp前後のサイズ
をゲル切り出し



ポイント：各ライブラリーのサイズが揃っている必要がある

ゲル切り出しによるsequence qualityの向上

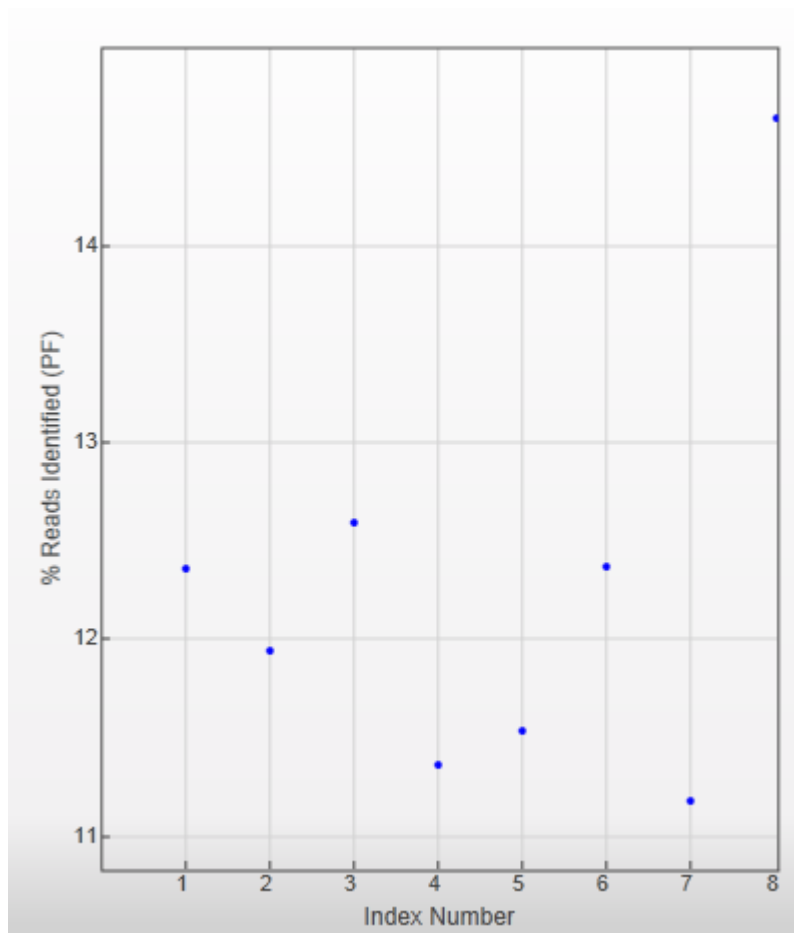
250x250 [%>=Q30]

	phiX	TruSeq(400 bp)	TruSeq(900 bp)	Nextera	Nextera (Gel cut)
Read1	84.4	82.7	66.4	69.9	78.9
Read2	75.9	69.0	55.0	53.4	62.6
Total	80.2	75.9	60.7	61.5	71.4

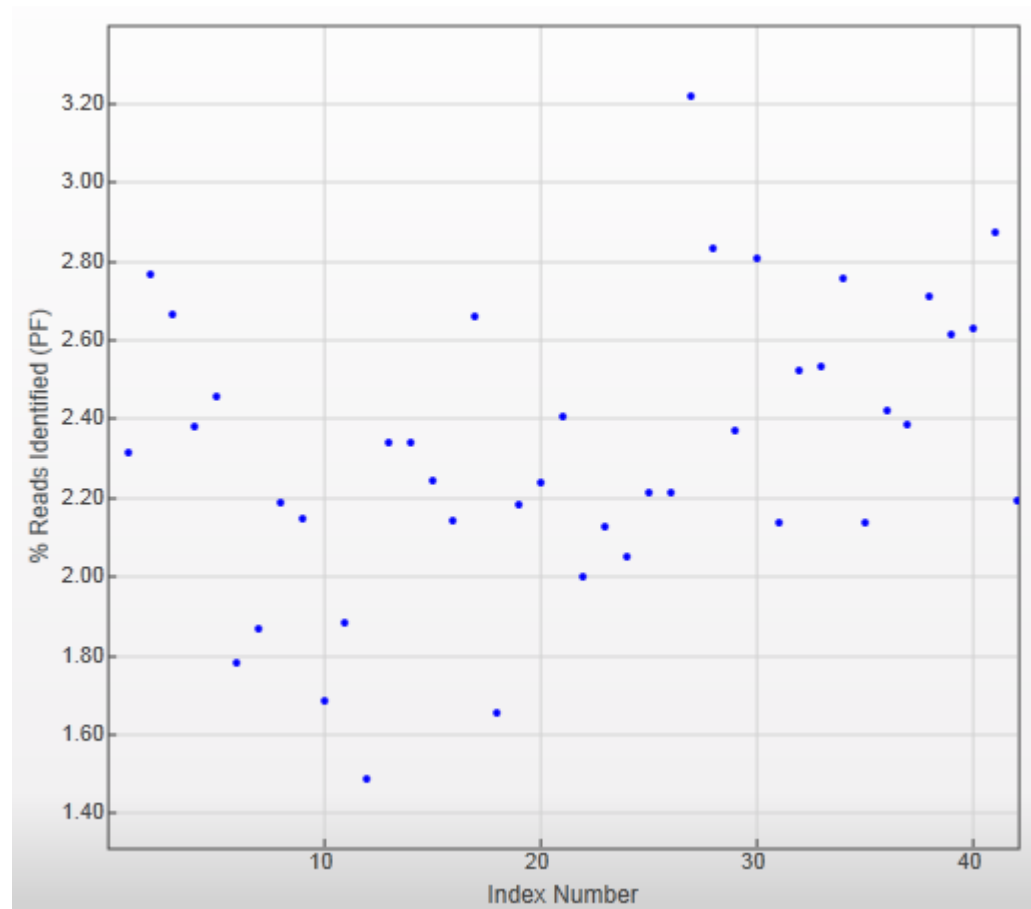
Nexteraライブラリーでは、大きすぎるフラグメントが含まれてしまうため、TruSeqで作成したライブラリーよりqualityは落ちるが、ライブラリーをプール後にゲル切り出しすることで、qualityはある程度向上する。

サンプル間のリード数のバラツキ

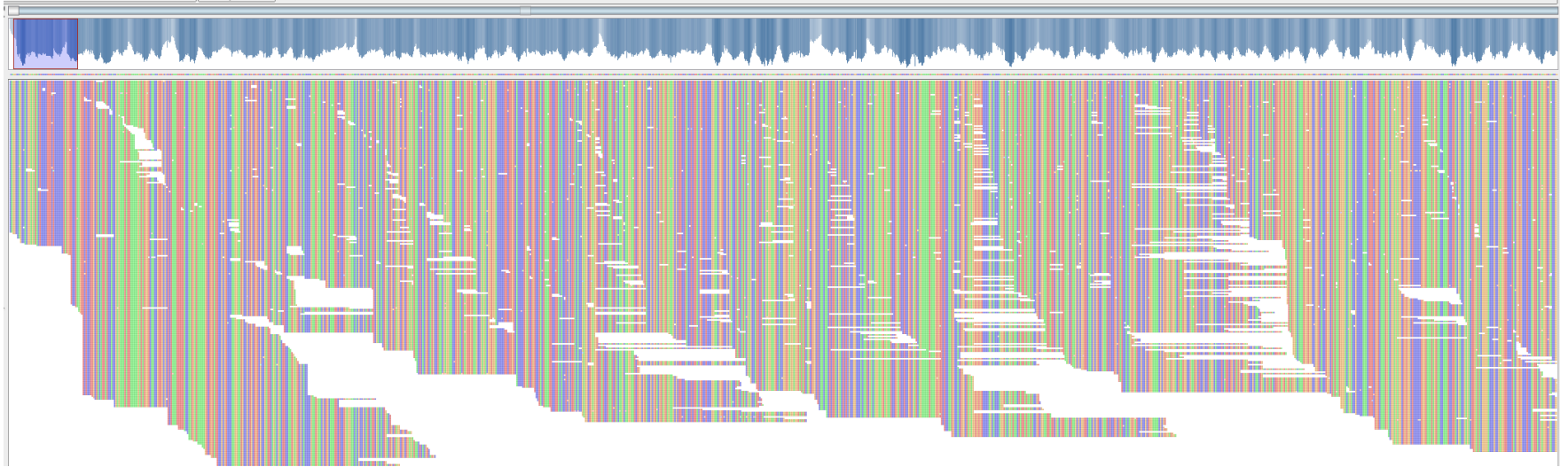
8ライブラリー



42ライブラリー



Nexteraリードのマッピングイメージ



タグメンテーションの目立ったムラはみられない

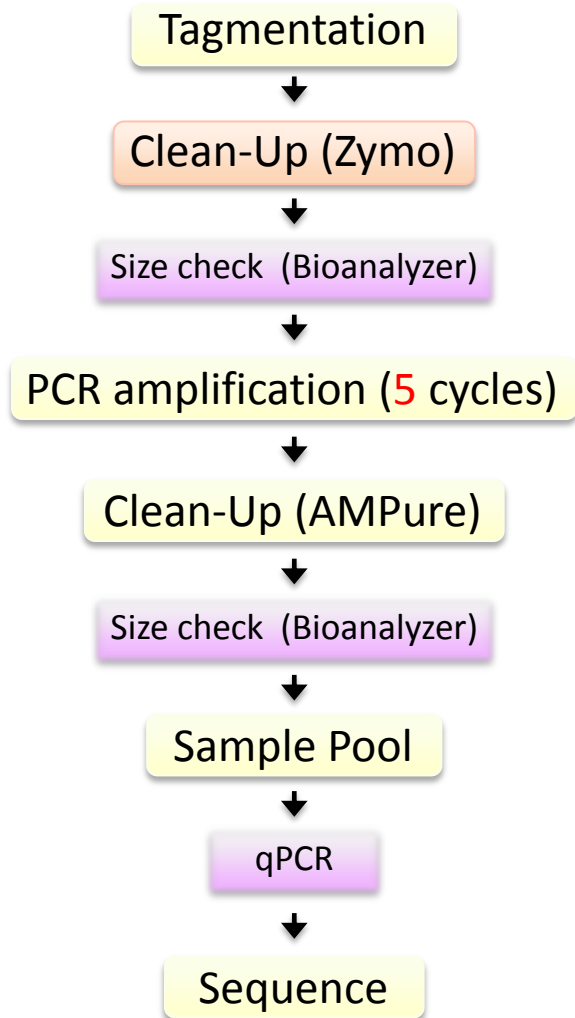
Nexteraリードのアセンブル結果

12株のNexteraライブラリーをMiSeq (250x250) で1ランしたデータをvelvetでアセンブルした結果のstats

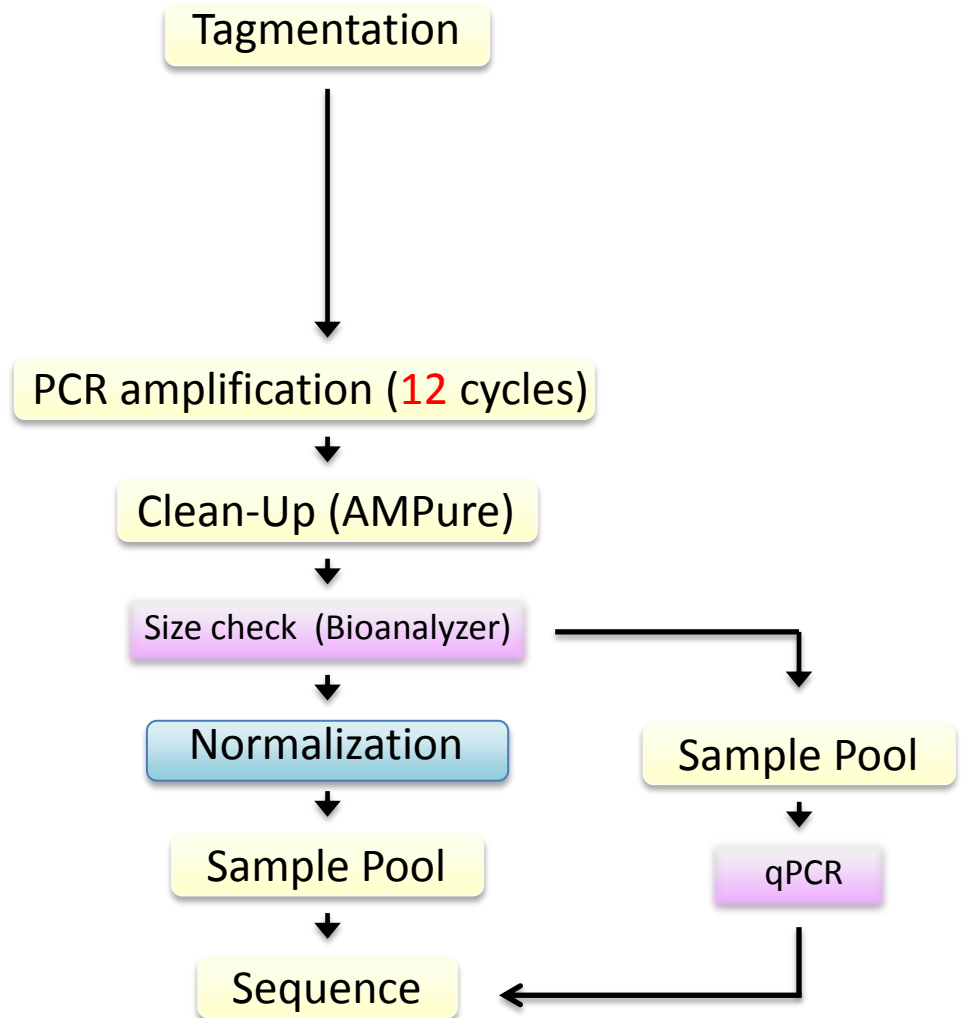
	contigs	maxlength	n50	n50, n	total	No. of reads	coverege
Strain01	229	312,616	111,792	18	5,812,118	1,853,968	x80
Strain02	174	469,774	195,746	11	5,791,769	2,487,288	x107
Strain03	282	333,318	84,013	23	5,946,690	1,961,896	x82
Strain04	783	91,321	25,637	53	4,716,727	1,528,380	x81
Strain05	168	356,025	158,060	13	5,941,784	2,097,758	x88
Strain06	387	236,521	73,528	21	5,098,418	2,012,332	x99
Strain07	341	224,908	63,024	29	5,806,643	1,598,554	x69
Strain08	245	287,221	95,039	20	5,652,992	1,991,090	x88
Strain09	414	354,720	109,122	17	6,034,614	1,898,706	x79
Strain10	451	361,636	89,583	23	6,346,919	2,147,302	x85
Strain11	318	133,166	52,095	35	5,292,036	1,373,032	x65
Strain12	504	226,530	50,295	29	4,533,105	1,528,112	x84

Nextera & Nextera XT

Nextera

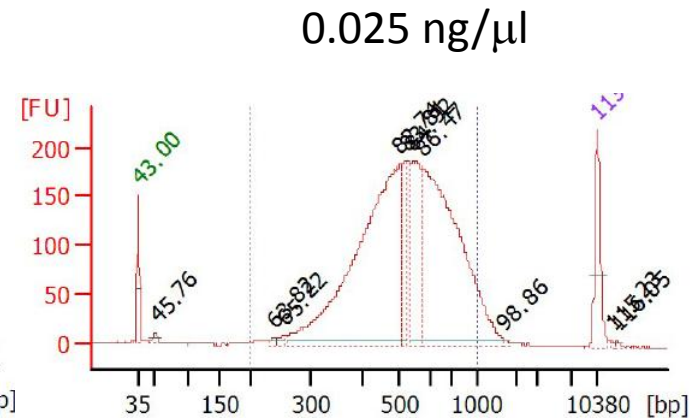
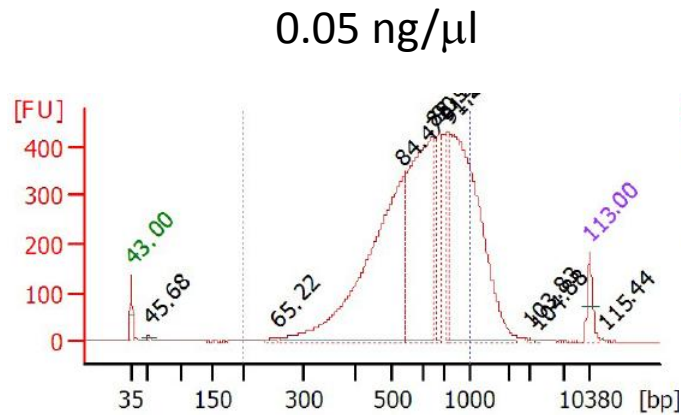
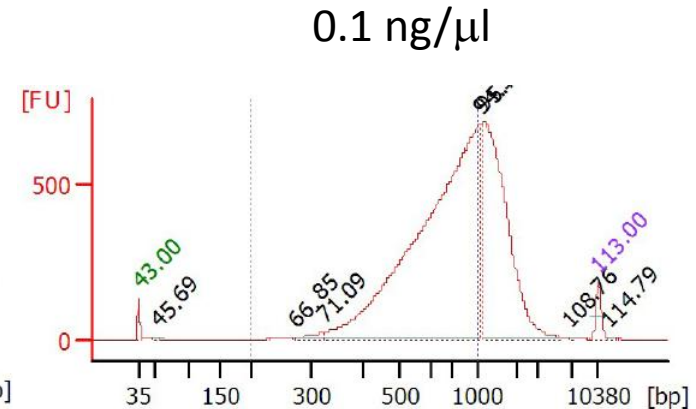
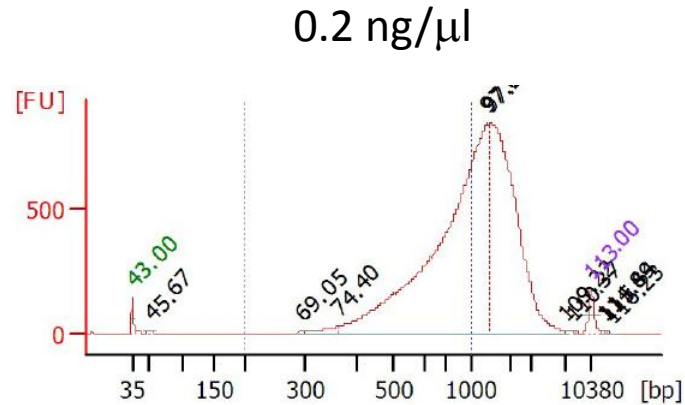
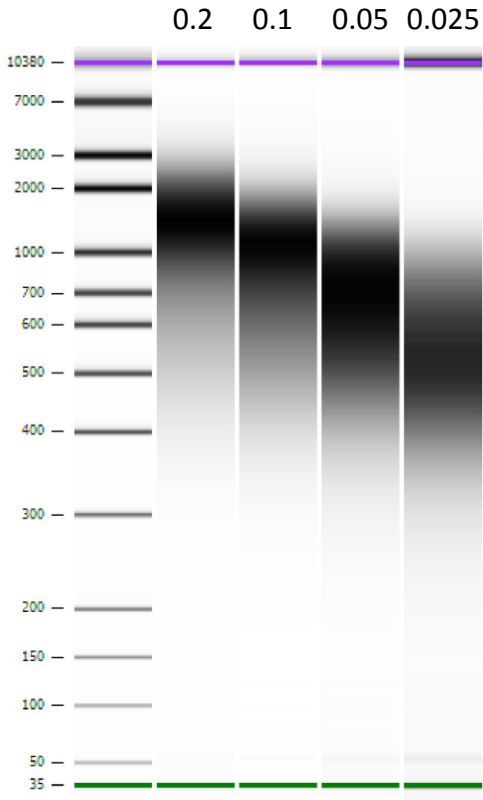


Nextera XT



DNA量とライブラリーサイズ(Nextera XTの場合)

ライブラリー最終産物のサイズ分布



ポイント：最適DNA濃度は、標準プロトコールよりも低め

当研究室におけるライブラリー調整キットの使い分けとNexteraの応用例

- Complete genome or high quality draft genomeの取得

TruSeq <Scaffoldingやgap fillingには、ライブラリーサイズが揃っていた方が有利>

- Draft genomeの取得

Nextera or Nextera XT

- 変異解析(SNPsとShort in-delsの解析)

Nextera or Nextera XT

- PCR productやFosmidの配列決定

Nextera or Nextera XT <Finishingにも便利>

- 感染症メタゲノム診断

Nextera or Nextera XT <微量な検体でも可能。迅速>

- Fosmidの大量配列決定

Fosmid mix → Nextera XT → MiSeq(>500 clone) or HiSeq(>50,000 clone)

<FosmidやBacのend sequenceより低コスト?>