

ターゲットサイトに絞った カスタムライブラリーのシークエンス

November 20, 2015



崎川 真里
イルミナ株式会社
テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDx, MiSeq FGx, NeoPrep, NextBio, Nextera, NextSeq, Powered by Illumina, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the US and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

illumina®

ターゲットサイトに絞ったシーケンスとは？

▶ 全ゲノムシーケンス

特徵

- ・全ゲノムを包括的に解析可能
 - ・構造変異を含む様々なタイプの変異を検出できる

考慮すべき点

- ・コストが割高
 - ・カバレッジは通常×30程度
 - ・データ量が多く解析が煩雑

例

- ・ヒト全ゲノムシーケンス
 - ・微生物de novoシーケンス など

▶ ターゲットシーケンス

特徵

- ・興味のある領域のみを高いカバレッジで解析可能
 - ・多サンプルを一度に解析できる

考慮すべき点

- ・ターゲット領域外の変異情報は検出できない
 - ・ターゲットとする遺伝子について既知の情報が必要

例

- ・エクソームシーケンス
 - ・疾患別パネル
 - ・16S 菌叢解析 など

illumina®

こんなことでお困りではないでしょうか

- ▶ カスタムライブラリーを作製したいが、どのようにデザインすればよいのかわからない
 - ▶ カスタムプライマーを作製したものの、シーケンスでのデータが得られない
 - ▶ カスタムライブラリーをシーケンスする際のランの設定がわからない
 - ▶ ランは完了したがDemultiplexingがうまくいかない

illumina®

本セッションのご注意事項

- ▶ 本セッションはカスタムライブラリーのラン成功を保証するものではありません
 - ご留意いただく点をお伝えするセッションになります。
 - カスタムライブラリー（弊社ライブラリー調製キットを使用されないライブラリー）の作製については、サポート外とさせていただいております。
 - 考慮すべき点が多く、各ライブラリーについて弊社で検証を行っていないためです。
 - カスタムライブラリーを使用されたランの装置のトラブルシュートはお手伝い致します。
 - ▶ 本セッションの内容は、以下の資料をもとに作成しています
 - David R. Bentley et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456
 - Supplementary informationを中心にご参照ください。
 - Illumina Adapter Sequences Document
 - 弊社HPよりダウンロードできます。
<https://support.illumina.com/downloads/illumina-customer-sequence-letter.html>

illumina®

本日の内容

- ▶ カスタムライブラリーのデザイン
 - ▶ カスタムライブラリーを使用したMiSeqランのセットアップ

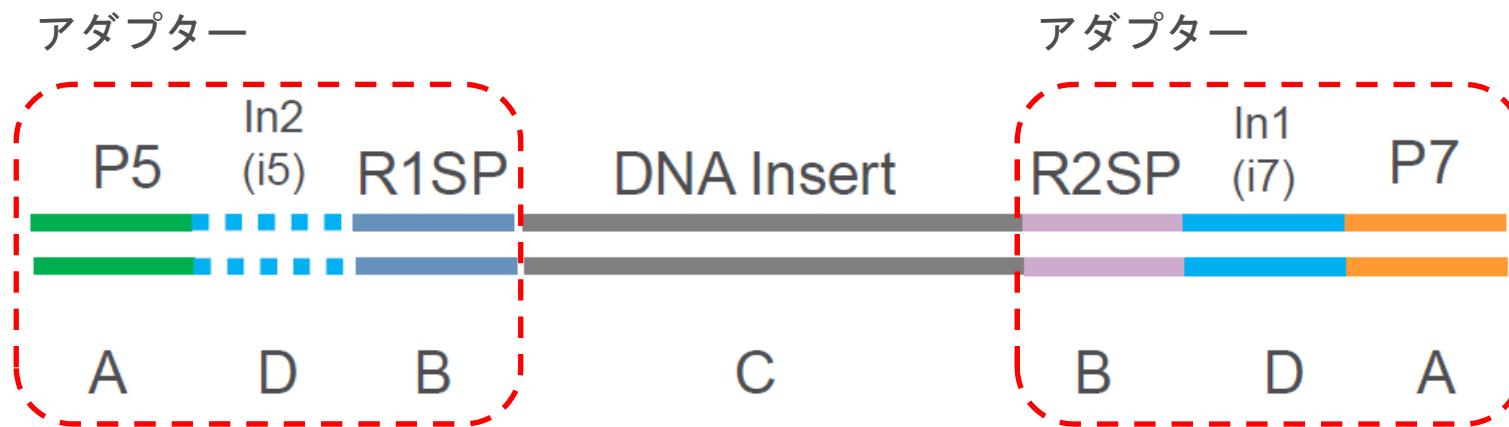
illumina®

本日の内容

- ▶ カスタムライブラリーのデザイン
 - ▶ カスタムライブラリーを使用したMiSeqランのセットアップ

illumina®

ライブラリーのデザインにあたり、必要な配列

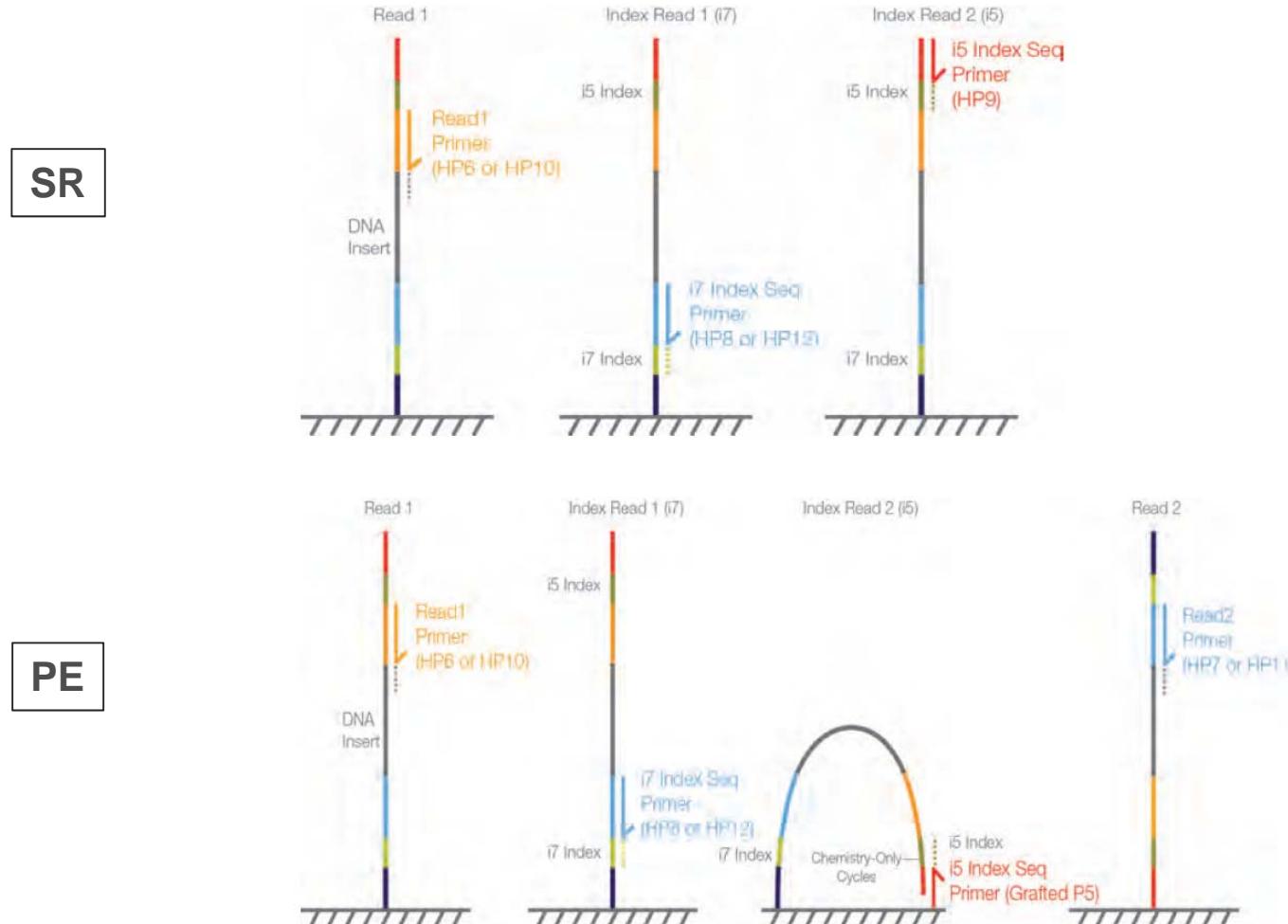


- A : フローセル (FC) に結合するために必要な配列
 - B : シーケンスプライマー (Seq Primer) が結合する配列
 - C : シーケンスされるDNA (インサート)
 - D : Index (サンプルを区別するためのバーコード配列)
 - どれも必要な配列です。

illumina®

シーケンスの流れ

- Single Read(SR)とPaired End(PE)の違い



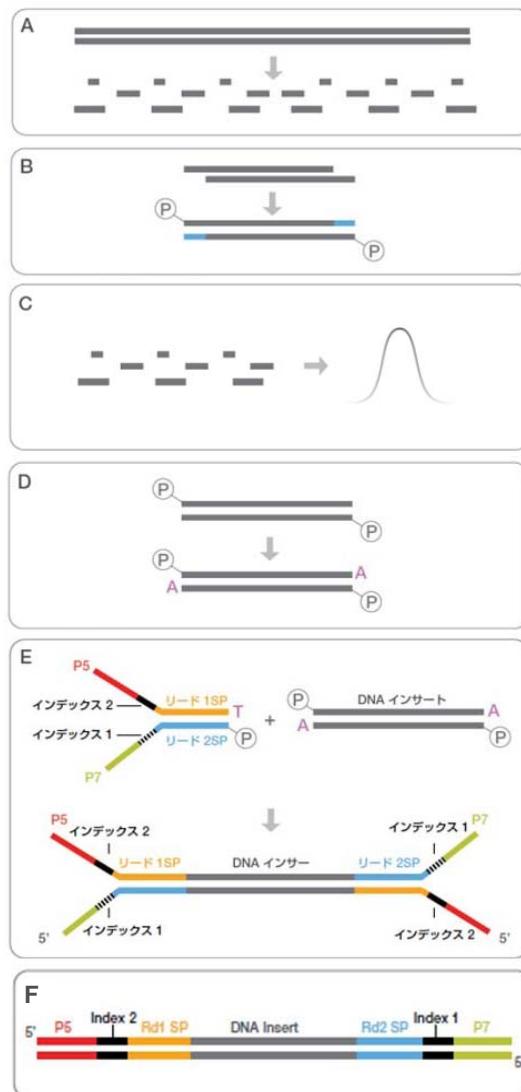
SBS (Sequencing By Synthesis) ケミストリーとは何か？

http://www.illuminakk.co.jp/documents/pdf/2015_techsupport_session9.pdf

illumina®

ライブラリーの調製

- TruSeqライブラリーの場合（例 TruSeq Nano DNA kit）



- A) DNAの断片化
 - B) 末端の平滑化、5'末端リン酸化
 - C) サイズ選択
 - D) A付加
 - E) インデックス付アダプターのライゲーション
 - F) PCR

illumina®

TruSeqライブラリーの配列とは

▶ アダプター配列

Index2(i5) Adapters - D501-508

5' **AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTACAC** [TATAGCCT] ACAC TTTCCCTACACGAC **GCTCTTCCGATC** T
P5配列 i5

Index1(i7) Adapters - D701-712

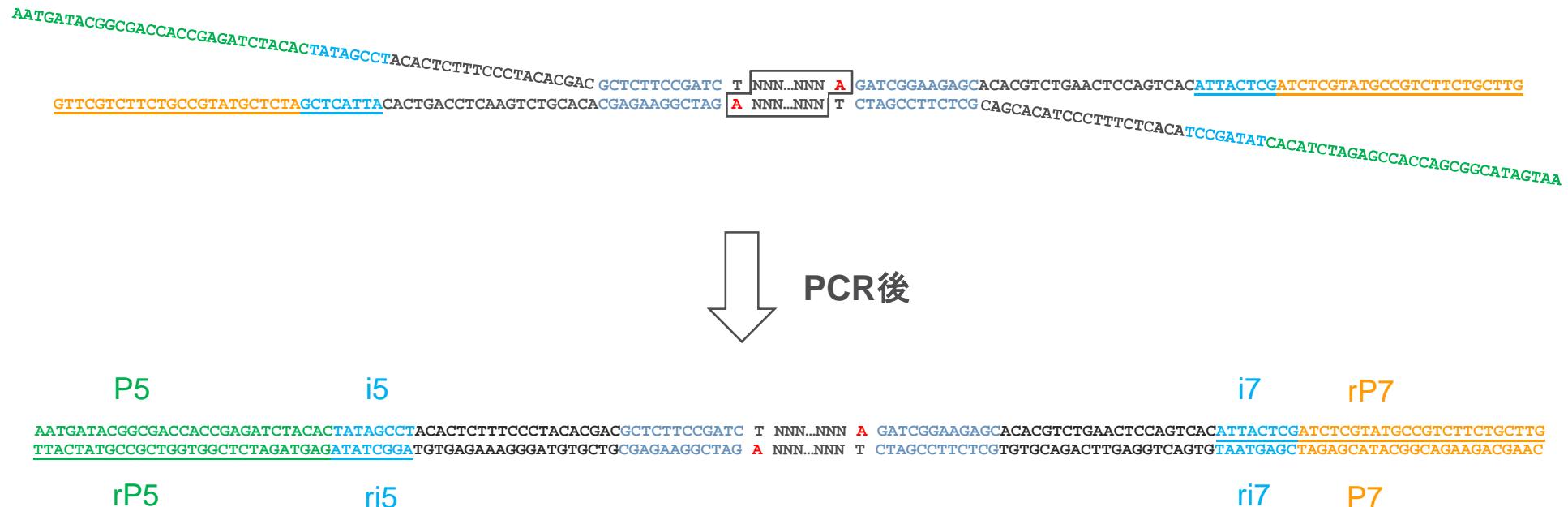
5' GATCGGAAGAGC ACACGTCTGAAC TCCAGTCAC ATTACTCG ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTTG
Y字形成用配列 i7 rP7配列

AATGATA CGGC ACCAC GAGATCTAC ACTATAGCCTACACTCTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCT
i5
GTTCGTCTTCTGCCGTATGCTCTAGCTCATTAA CACTGACCTCAAGTCTGCACA CGAGAAGGCTAG
i7

illumina®

TruSeqライブラリー調製キットで作製されるライブラリー

- ## ▶ Y字アダプターライゲーション後の二本鎖DNAの構造



※TruSeq DNA PCR-Freeライブラリー調製キットでは、アダプターライゲーション後にPCRを行わない。

illumina®

Read1 配列を読むときのライブラリー構造



► Read1

- FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態

FC | 5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAAT-GTGACTGGAGTTAGACGTGTGCTCTTCCGATC-T [NN]A-GATCGGAAGAGCGTCGTAGGGAAAGAGTGT-AGGCTATA-GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTACATT
<=T-CTAGCCTCTCGCAGCACATCCCTTCTCACA [possible R1 Sequence Primer]

<=TCTAGCCTCTCGCAGCACATCCCTTCTCACA [possible Read1 Sequence Primer]

TruSeq HT Kits

Includes TruSeq DNA PCR-Free HT, TruSeq Nano HT, TruSeq Stranded mRNA HT, and TruSeq Total RNA HT

D501–D508 Adapters

[possible Read1 Sequence Primer]

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [15] AACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCGATCT

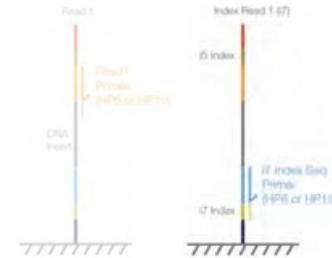
D701–D712 Adapters

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTCAC [i7] ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTTG

※Illumina Adapter Sequences Document 15ページ

illumina®

Index1 配列を読むときのライブラリー構造



► Index1 Read (i7)

- FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態

P7配列 ri7 ri5 rP5
FC | 5' -CAAGCAGAACAGGCATACGAGATCGAGTAAT-GTGACTGGAGTTCAAGACGTGTGCTTCCGATC-T [NN]A-GATCGGAAGAGCGTCGTAGGGAAAGAGTGT-AGGCTATA-GTGTAGATCTCGTGGTCGCCGTACATT
<=CACTGACCTCAAGTCTGCACACGAGAAGGCTAG [possible Index1 Sequence Primer]
GCTCATT<=CACTGACCTCAAGTCTGCACACGAGAAGGCTAG [possible Index1 Sequence Primer]

TruSeq HT Kits

Includes TruSeq DNA PCR-Free HT, TruSeq Nano HT, TruSeq Stranded mRNA HT, and TruSeq Total RNA HT

D501–D508 Adapters

AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACAC [15] ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

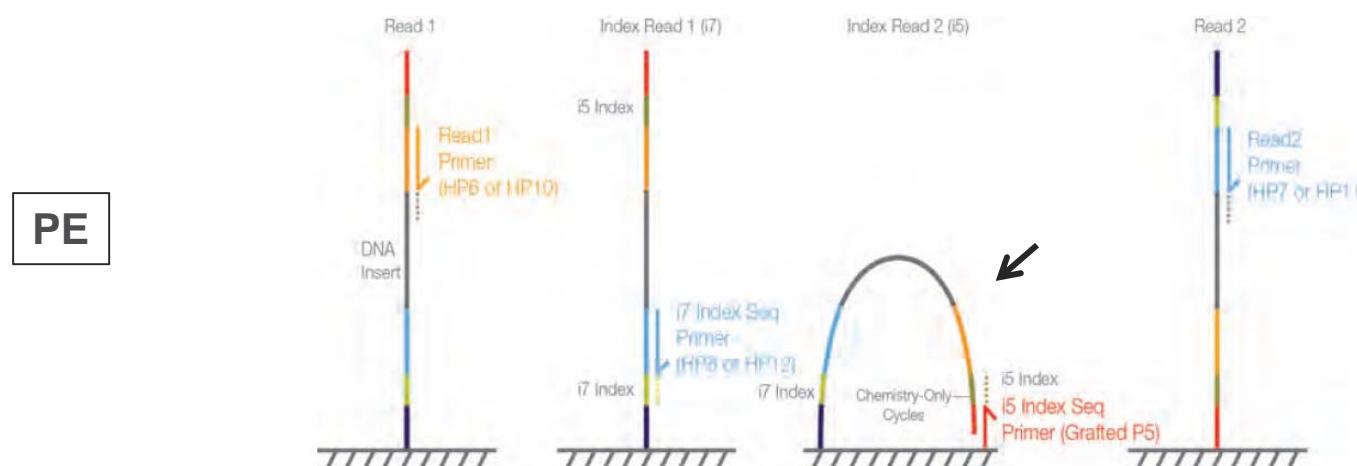
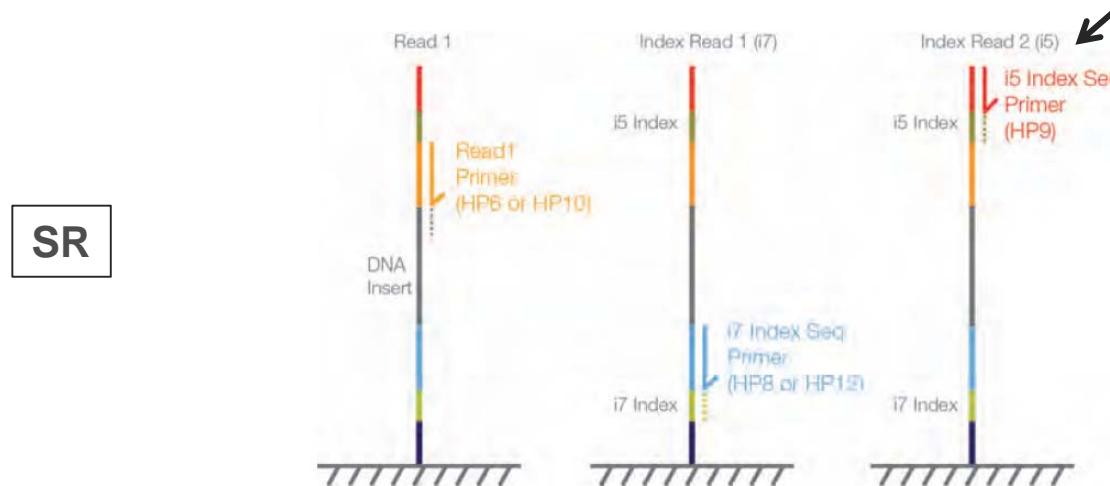
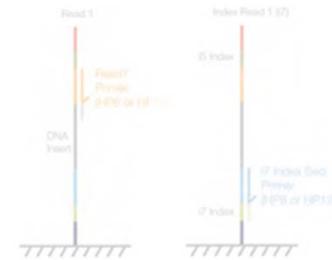
D701–D712 Adapters

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTCAC*17*] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
[possible Index1 Sequence Primer]

i7 Index Name	i7 Bases for Sample Sheet
D701	ATTACTCG

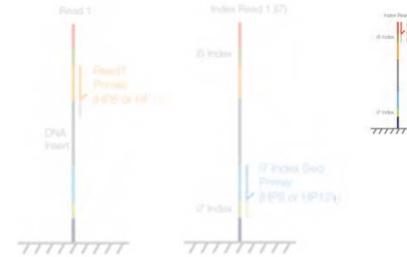
※サンプルシートにはこのまま入力する

Dual Index, Index2の読み方 SRとPEで異なる



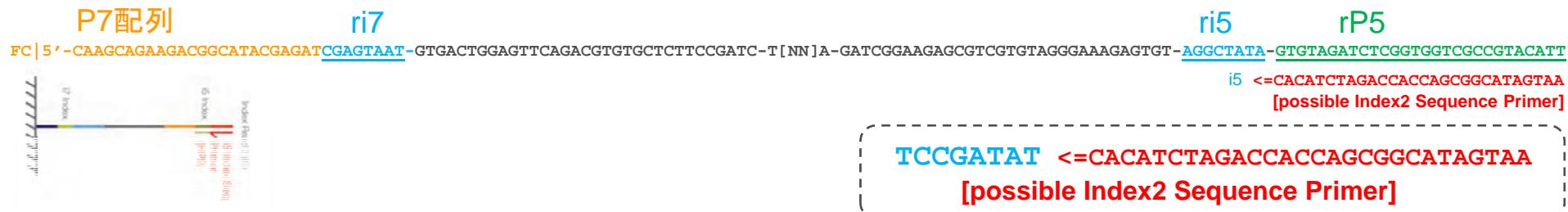
illumina®

Index2 配列を読むときのライブラリー構造



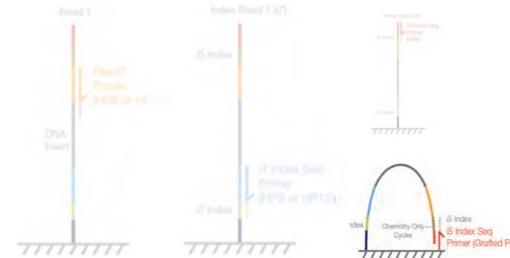
► Index2 Read (i5)

– SRの場合: FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態



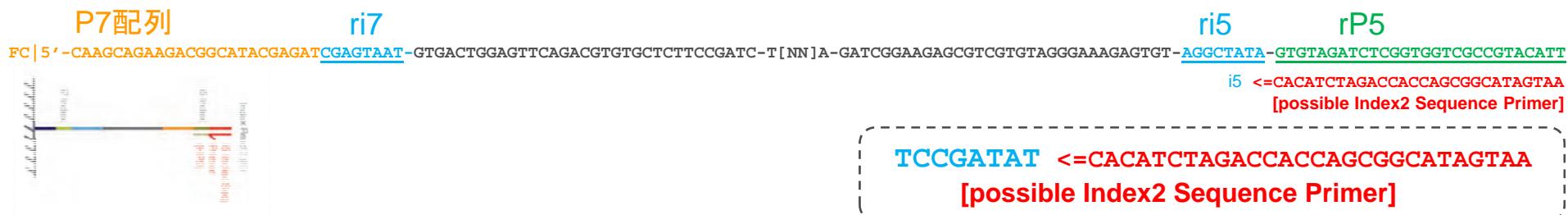
illumina®

Index2 配列を読むときのライブラリー構造



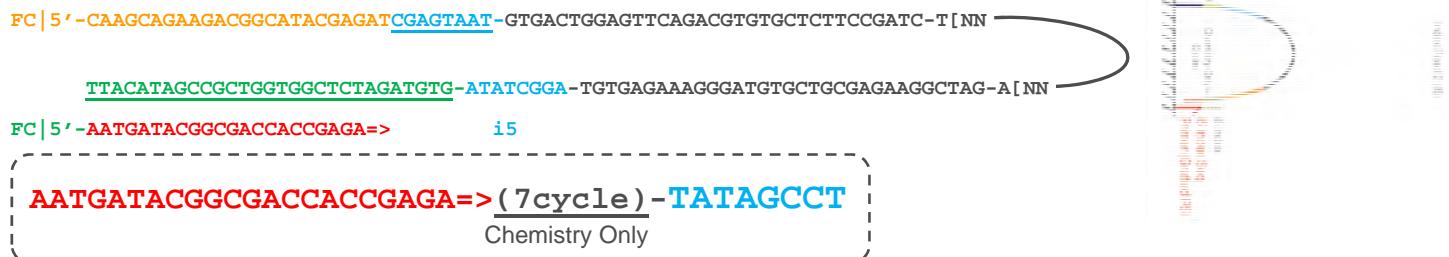
► Index2 Read (i5)

– SRの場合: FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態



- PEの場合: FC上のP5配列にクラスターがハイブリ、ブリッジを形成している状態

P7配列



D501–D508 Adapters

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC*[i5]* AACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGATCT
Inaccessible Index? Sequence Primer

possible index2 Sequences

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTCAC [i7] ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTT

15. In-class Name:

D501

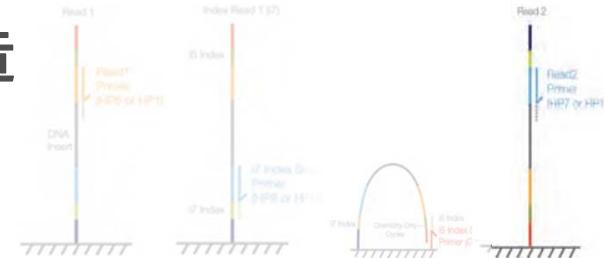
i5 Bases for Sample Sheet HiSeq 2000/2500 and MiSeq

TATAGCCT

※サンプルシートにはこのまま入力する

illumina®

Read2 配列を読むときのライブラリー構造



► Read2

- FC上にP5配列を下にしてクラスターが立っている状態

P5配列

j5

17

rP7配列

FC | 5' -AATGATAACGGGACCCAGGAGAUCATACAC-TATAGCCT-ACACTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- [NN]A-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTCACATTACTCGATCTCGTATGCCGTCTCTGCTTG
<=T-CTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTAGTG
[possible Read2 Sequence Primer]

<=TCTAGCCTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTG
[possible Read2 Sequence Primer]

TruSeq HT Kits

Includes TruSeq DNA PCR-Free HT, TruSeq Nano HT, TruSeq Stranded mRNA HT, and TruSeq Total RNA HT

D501–D508 Adapters

AATGATACTGGCGACCAACCGAGATCTACAC [15] ACACCTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

D701–D712 Adapters

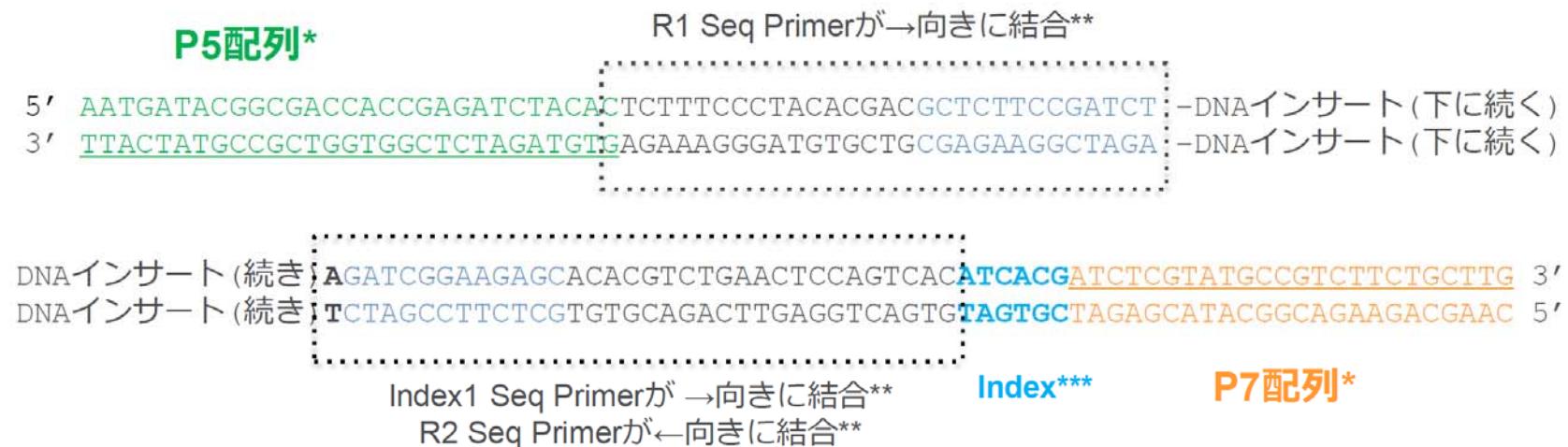
GATCGGAAGAGGCACACGCTCTGAACCTCCAGTCAC [17] ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTTG

[possible Read2 Sequence Primer]

illumina®

カスタムライブラリーに必要な配列のまとめ

- ▶ MiSeqで使用するアダプター＆プライマー配列
 - DNAインサートの両端に下記塩基配列がついたDNAを調製すれば解析可能



*P5, P7配列はフローセル上への結合とフローセル上でのDNA鑄型増幅(ブリッジPCR)に必要

** 実際のプライマー結合部位は多少前後する可能性がある。

***このインデックス配列をサンプルごとに変えることで実際のフレーム、結合部位はダラ前後する可能性がある。

このトランザクションをラップすることによって、MiSeqシークエンス後にサンプルごとにデータを分離できる

illumina®

本日の内容

- ▶ カスタムライブラリーのデザイン
 - ▶ カスタムライブラリー使用したMiSeqランのセットアップ
 - Seq Primer
 - サンプルシートの作成

illumina®

MiSeqのランで使用するSeq Primerは？

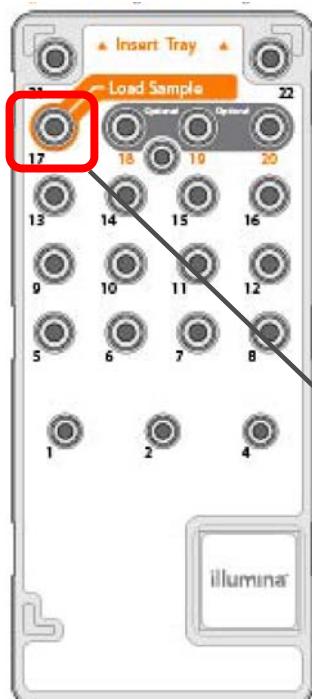
- ▶ イルミナのSeq Primerを使用
 - イルミナのアダプター配列と同じ配列をもつライブラリー (TruSeq、Nextera)
 - 試薬カートリッジにセットされた通常のプライマー
 - ▶ カスタムのSeq Primerを使用
 - カスタムのアダプター配列をもつライブラリー
 - MiSeqのSeq Primerアニーリング温度を考慮したプライマーの設計が必要
 - MiSeqの場合は65°C

<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/q15y583ofUi3U5DU3e45cw/sequencing-primer-annealing-temperatures-on-illumi>

illumina®

1) イルミナのSeq Primerを使用する

- ▶ 試薬カートリッジ内の通常のプライマーでシーケンス可能
 - Read1 Primer Mix(12番)、Index Primer Mix（13番）、Read2 Primer Mix（14番）
 - **17番ポート**に変性・希釈済みのサンプルを入れるだけ

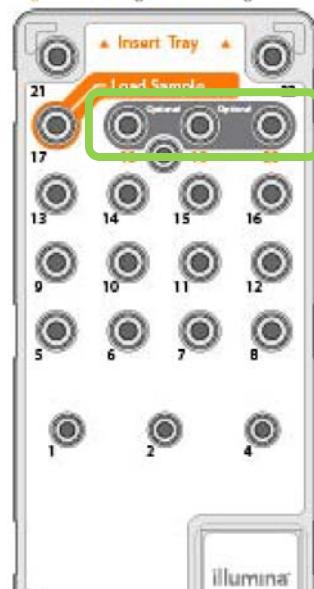


Position	Reagent Name	Description
1	IMF	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMF	Cleavage Mix
5	AMX1	Amplification Mix
6	AMX2	Read 2 Amplification Mix
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Water
16	PW1	Water
17	Sample	Your sample libraries
18	Optional	Optional use for custom sequencing primers
19	Optional	Optional use for custom sequencing primers
20	Optional	Optional use for custom sequencing primers
21	PW1	Water
22	Empty	Empty

illumina®

2) カスタムのSeq Primerを使用する カスタムライブラリーのみを流す場合

- ▶ 試薬カートリッジの専用ポートにカスタムプライマーを投入
– Read1 (18番)、Index (19番) 、Read2 (20番)



Position	Reagent Name	Description
1	IMF	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMF	Cleavage Mix
5	AMX1	Amplification Mix
6	AMX2	Read 2 Amplification Mix
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Water
16	PW1	Water
17	Sample	Your sample libraries
18	Optional	Optional use for custom sequencing primers
19	Optional	Optional use for custom sequencing primers
20	Optional	Optional use for custom sequencing primers
21	PW1	Water

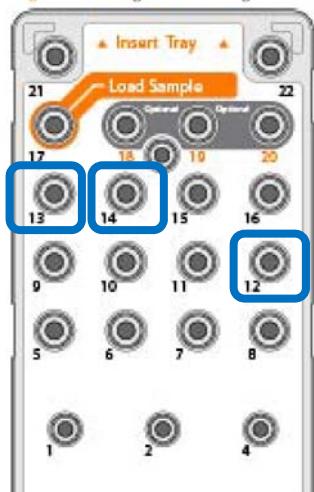
各ポートには0.5 uMに希釀したカスタムプライマーを600 uL加える

- 必ずサンプルシートで使用するポートを指定すること

illumina®

3) カスタムのSeq Primerを使用する カスタムライブラリーにPhiXをスパイクインする場合

- ▶ 通常のプライマー（12番、13番、14番）にカスタムプライマーを混合



Position	Reagent Name	Description
1	IMF	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMF	Cleavage Mix
5	AMX1	Amplification Mix
6	AMX2	Read 2 Amplification Mix
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Water
16	PW1	Water
17	Sample	Your sample libraries
18	Optional	Optional use for custom sequencing primers

- 12: Read1 – 680uL入りのため100 uMのRead1カスタムプライマーを3.4 uL添加
- 13: Index – 680uL入りのため100 uMの Index カスタムプライマーを3.4 uL添加
- 14: Read2 – 680uL入りのため100 uMのRead2カスタムプライマーを3.4 uL添加

Caporaso JG, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012 Mar 8.

- プライマー溶液までチップをつけるために、パストールピペットの使用をお勧めします

illumina®

MiSeqランのためのサンプルシート

- ▶ Illumina Experiment Manager(IEM)を使用してサンプルシートを作成

NGSをはじめよう！

サンプルシート作成ソフト Illumina Experiment Manager(IEM)の使い方



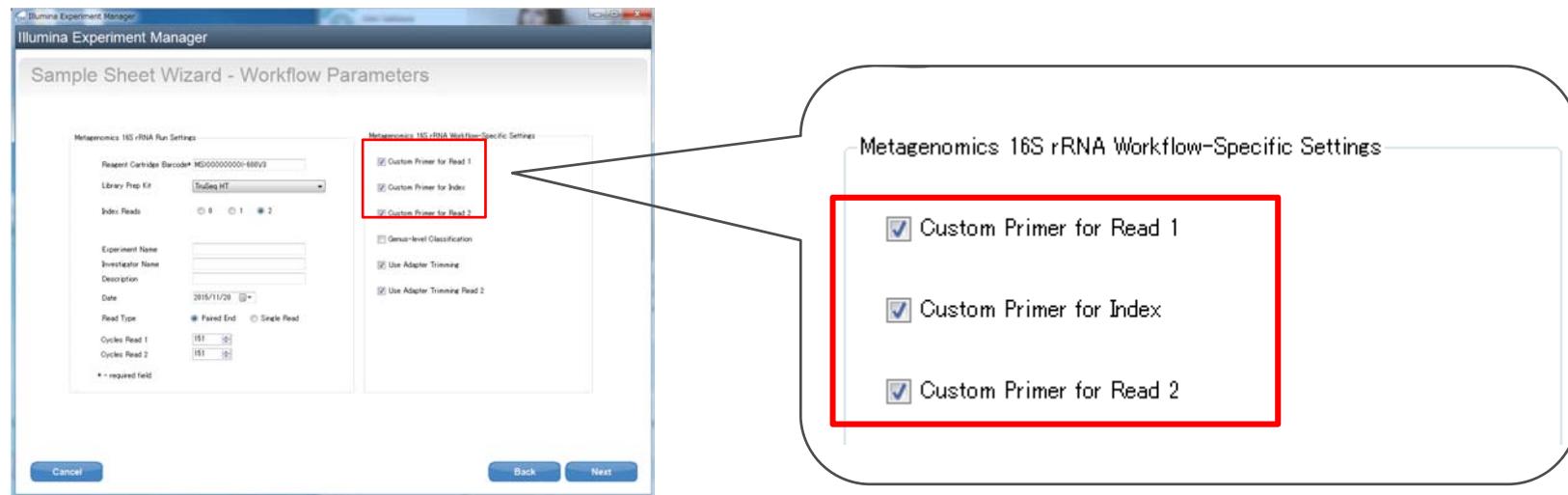
http://www.illuminakk.co.jp/documents/pdf/2015_techsupport_session1.pdf

- ▶ カスタムSeq Primerを使用した場合
 - 試薬カートリッジの該当するポートを指定
 - ▶ カスタムライブラリーでイルミナのキットにないindexを使用した場合
 - 作成したサンプルシートのindex配列をNotePad等のテキストエディタで編集

illumina®

カスタムSeq Primerを使用するランの設定

- ▶ IEMにてInstrument Selection>MiSeq Application Selection>Workflow Parameters

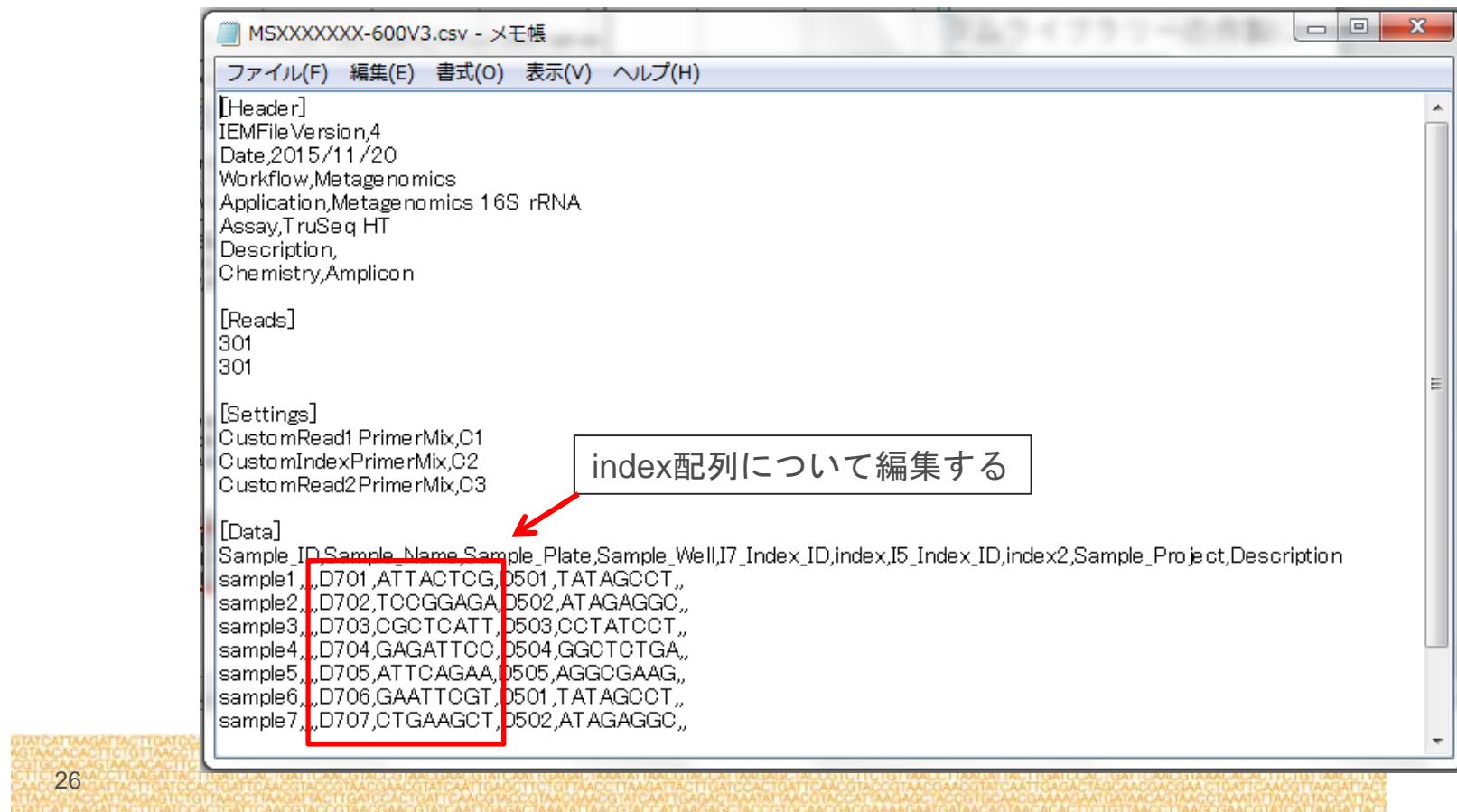


- ▶ カスタムSeq Primerの専用ポートの選択
 - 試薬カートリッジの18、19、20番を使用する場合は、各項目にチェックを入れる。
 - PhiXをスパイクインする場合は、カスタムSeqPrimerは通常のプライマーのポートに混合するので、チェックは入れないこと。

illumina®

カスタムで作製したindex配列を設定したい

- ▶ サンプルシートをNotePad（メモ帳）で開くと、以下のような内容が表示される。
 - 表示項目のうち、各サンプルのindex名とindex配列を、カスタムライブラリーの作製に使用したReverseプライマー情報等を参照しながら書き換える。
 - 書き換え部分周辺のカンマ(,)は消さないこと。構成が崩れると、サンプルシートが正しく機能しなくなる。



illumina®

カスタムで作製したindex配列を設定したい

- ▶ カスタムライブラリー作製時に使用したプライマーの情報をもとに、全てのサンプルに対して情報の書き換えを実施する
 - 書き換えが終わったら上書き保存して編集を終了する。

MSXXXXXXXXX-600V3.csv - ×モ帳

ファイル(F) 報告(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)

[Header]

IBMPfleVersion,4

Date,2015/11/20

Workflow,Metagenomics

Assay,Metagenomics 16S rRNA

Assay,TruSeq q RT

Description,

Chemistry,Amplicon

[Reads]

301

301

[Settings]

CustomRead1,PrimerMix,C1

CustomIndex,PrimerMix,C2

CustomRead2,PrimerMix,C3

[Data]

Sample_ID,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,index,I5_Index_ID,index2,Sample_Project,Description

sample1,...,D701,ATTACTCTG,D501,TATAGCCT

sample2,...,D702,TCGGAGA,D502,ATAGAGGG

sample3,...,D703,GGCTCATTD503,CCCTACCTCC

sample4,...,D704,GAAGATTCC,D504,GGCTCTGAA

sample5,...,D705,ATTCTAGAA,D505,AGGCGAAG

sample6,...,D706,GAATTCTGT,D501,TATAGCCT

sample7,...,D707,GTGAAGGT,D502,ATAGAGGG

- 出来上がったサンプルシートは、MCSが参照する所定のフォルダに配置する
 - サンプルシートの参照先を変更していなければ、以下の場所に保管すれば良い



illumina®

今日のまとめ

- ▶ カスタムライブラリーデザインの際には以下の点に注意する
 - P5/P7配列の並び
 - Seq Primerがハイブリするサイト
 - ▶ 一度でうまくいくとは限らない
 - うまくいかない場合はCorresponding Authorにお問い合わせ
 - ▶ ラン条件の設定に注意する
 - 試薬カートリッジへのカスタムプライマーの投入
 - サンプルシート作成

illumina®

サポート資料

- ▶ David R. Bentley et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456
 - ▶ Illumina Adapter Sequences Document
 - <https://support.illumina.com/downloads/illumina-customer-sequence-letter.html>
 - ▶ Using Custom Primers on the MiSeq (15041638B)
 - https://support.illumina.com/downloads/using_customprimers_miseq_15041638.html
 - ▶ Support Bulletins
 - Sequencing Primer Annealing Temperatures on Illumina Sequencing Platforms
<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/q15y583ofUi3U5DU3e45cw/sequencing-primer-annealing-temperatures-on-illumi>
 - Using Custom Primers on Illumina Sequencing Platforms
<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/8EkhELfE-EqVqVOg9bKqMg/using-custom-primers-on-illumina-sequencing-platfo>
 - Considerations for Library when Switching Between Illumina Sequencing Platforms
<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/W1xgT4kJbkWgW30jATEy4g/considerations-for-library-when-switching-between>

illumina®

Questions?

illumina®