

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

July 10, 2015



渡邊 大
イllumina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

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.
Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIix, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, VeraCode, the pumpkin orange color, and the Genetic Energy streaming bases design are trademarks or registered trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.

illumina®

Sequencing By Synthesis (SBS) とは何か？

全てのイルミナシーケンサーで用いられている**シーケンス手法**



MiSeq | MiSeqDx



NextSeq 500



HiSeq 2500



HiSeq X

SBSシーケンスの特徴



キャピラリーシーケンサー 合成→泳動→読み取り

- 1塩基ずつ長さが異なるDNAを合成
- キャピラリー内で電気泳動により分離しながら読み取り
- 1日で2-3Mbのアウトプット



次世代シーケンサー（イルミナ） 合成→読み取り

- DNAを合成しながら読み取りを行う（SBS法）
- 泳動は行わない
- 3日で1.6Tb以上のスループット

イルミナシーケンシングのワークフロー

1. サンプル調製:

シーケンサー解析用のDNAサンプルを作る

2. クラスタ形成:

DNAを増幅する

3. シーケンシング:

塩基配列(蛍光)を読み取る

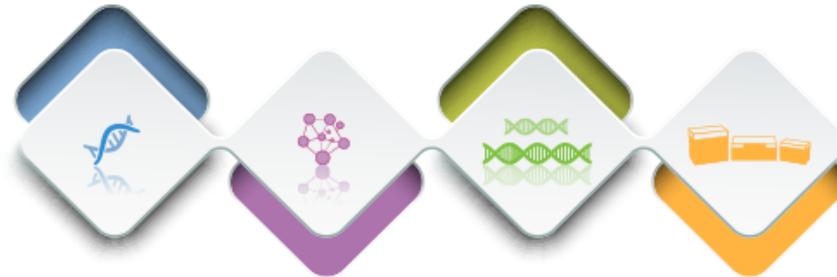
4. データ解析:

イメージデータから塩基配列を得る

1. サンプル調製:

シーケンサー解析用のDNAサンプルを作る

- ▶ アプリケーションごとに最適化された試薬キットの提供



Library Prep and Array Kit Selector

This tool will help you determine the best kit for your needs based on your project type, starting material, and the method or application.

Please select your project type :

Research Use Only



Molecular Diagnostics

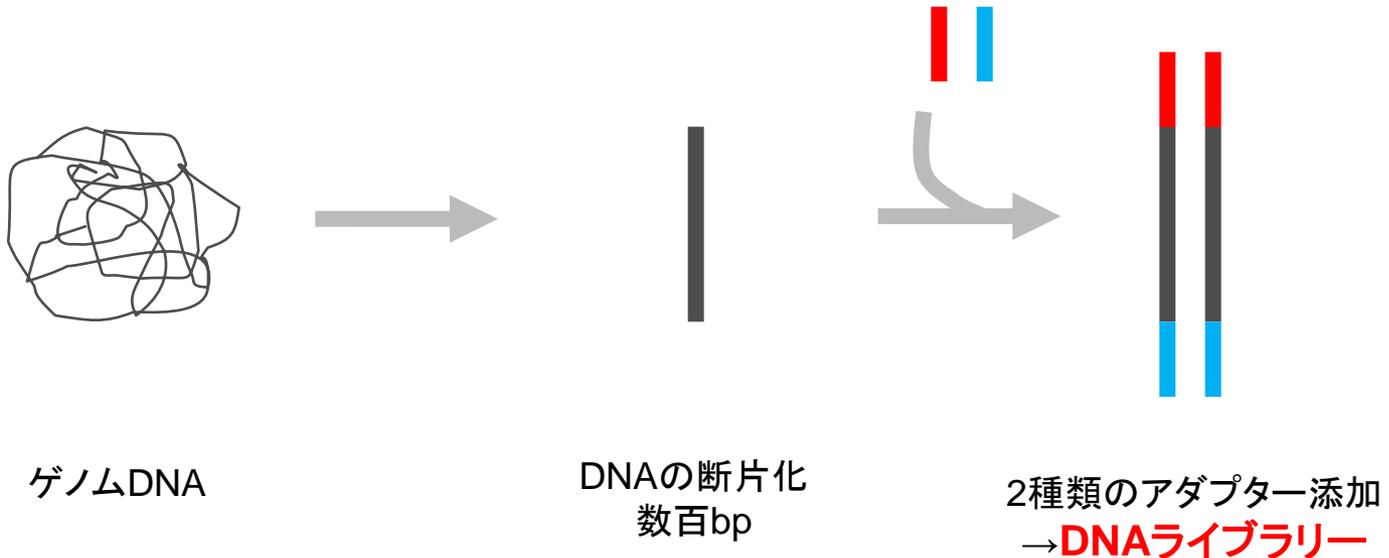


<http://www.illumina.com/library-prep-array-kit-selector.html>

当社サイトからアクセス可能

1. サンプル調製: シーケンサー解析用のDNAサンプルを作る

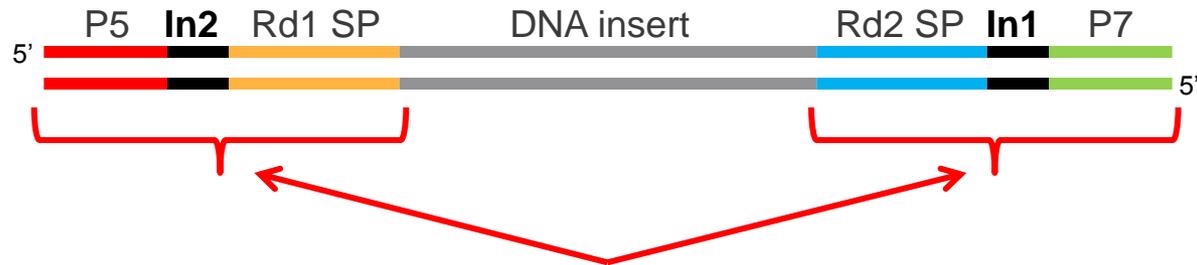
DNAライブラリーの調製方法例 (TruSeq DNA sample prep kitの場合)



1. サンプル調製:

シーケンサー解析用のDNAサンプルを作る

イルミナシーケンサー解析用DNAサンプルの構造



イルミナシーケンサー専用オリゴヌクレオチドアダプター

DNA Insert

数百bpに断片化したDNA(解析する配列)

▪ P5, P7

フローセルへの結合部位→DNA増幅

▪ SP

シーケンスプライマー結合部位→シーケンス

▪ Index

複数サンプル解析用のバーコード

1. サンプル調製:

シーケンサー解析用のDNAサンプルを作る

Indexの役割とは？

DNAライブラリーの端に、識別のためのインデックスが付加されてある

→それぞれのDNA断片がどのサンプル由来か同定が可能・簡単

→サンプルを混ぜて(pooling)解析して、後でクラスターをそれぞれのサンプルに振り分けることが可能(de-multiplex)

→多サンプル解析(multiplex analysis)が可能



2. クラスター形成: DNAを増幅する

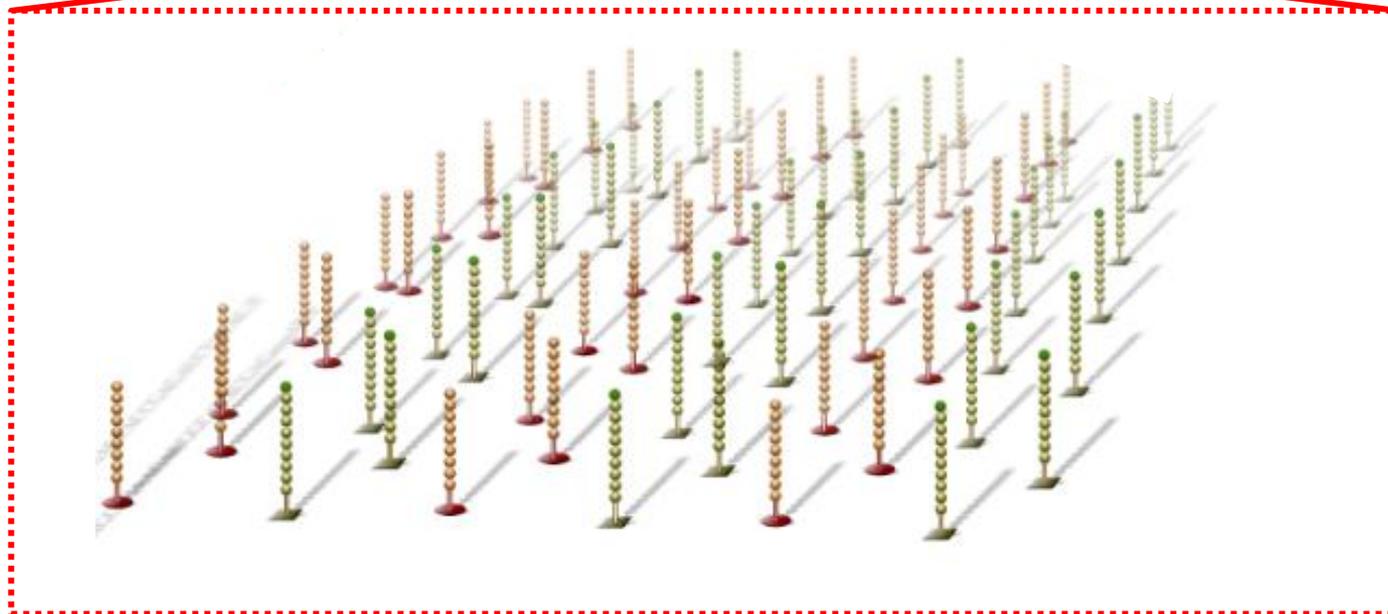
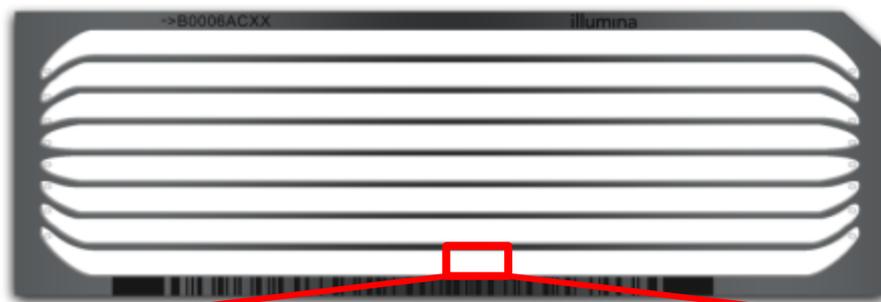
クラスター形成は、調製したDNAライブラリーをシーケンスの際に**検出可能な充分量に増やす**目的で行う増幅工程

イルミナシーケンサーでは、クラスター作製は「**フローセル**」と呼ばれるガラス基板上で行われる



HiSeqシリーズのHighOutputフローセル

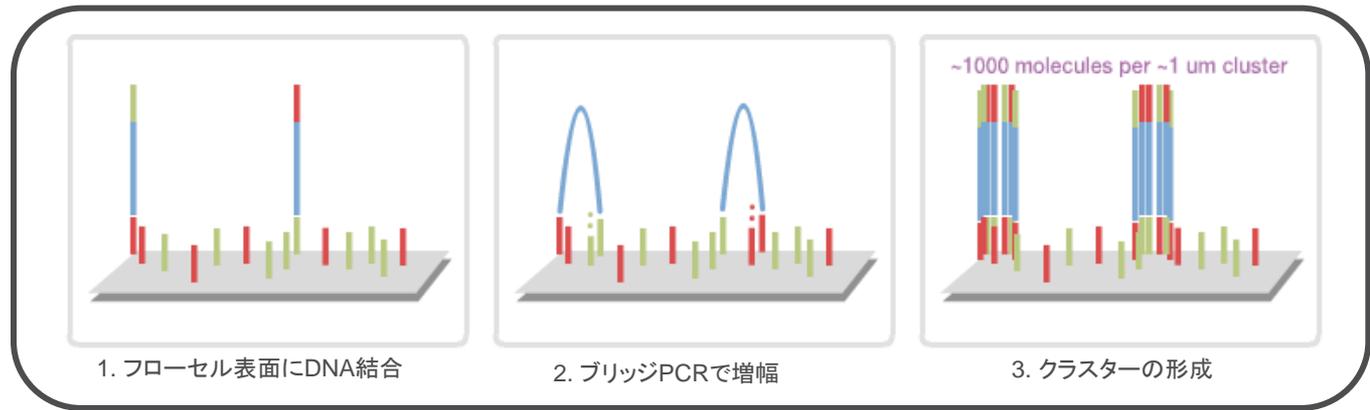
2. クラスタ形成: DNAを増幅する



無数のオリゴヌクレオチドがフローセル上に林立

2. クラスター形成: DNAを増幅する

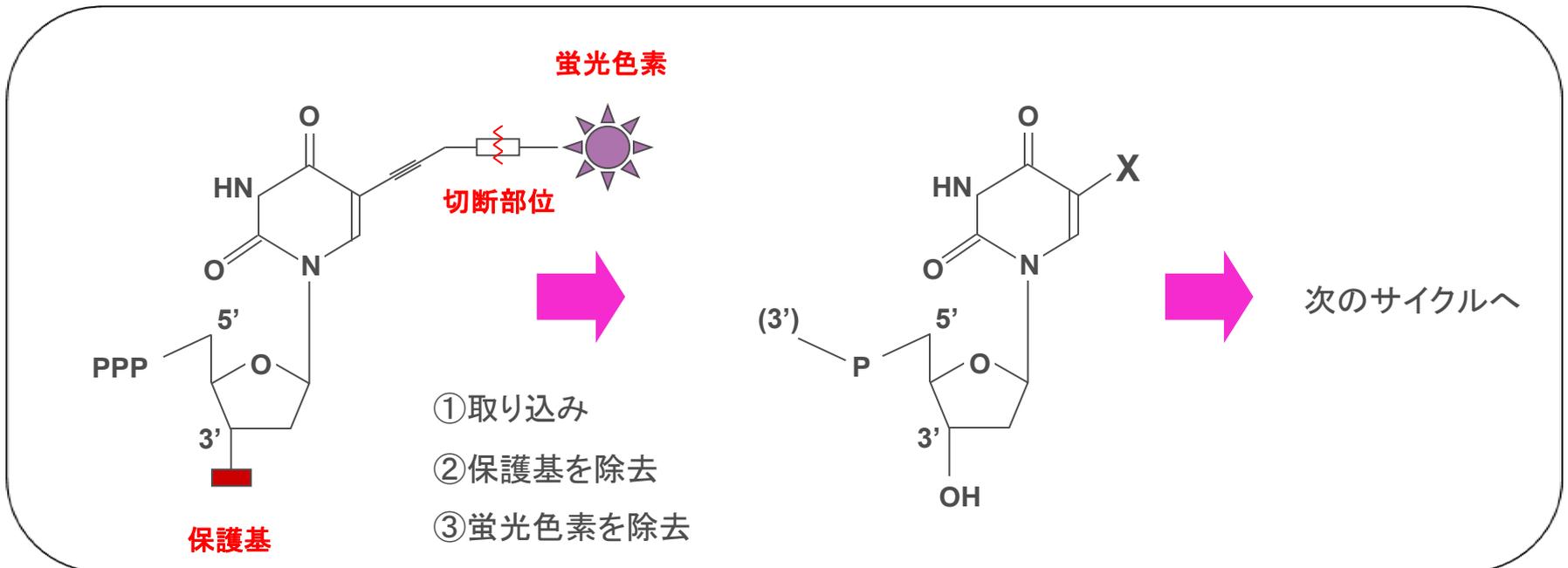
- ▶ 1. 変性された一本鎖DNAライブラリーが、フローセル内部のオリゴヌクレオチドと結合
- ▶ 2. 近傍の別なオリゴヌクレオチドとブリッジPCRすることにより一本鎖DNAが増幅
- ▶ 3. クラスター形成のために数千分子形成される
- ▶ 4. P5を根元に含む鎖のみ切断することにより、1方向の鎖のみ得られる



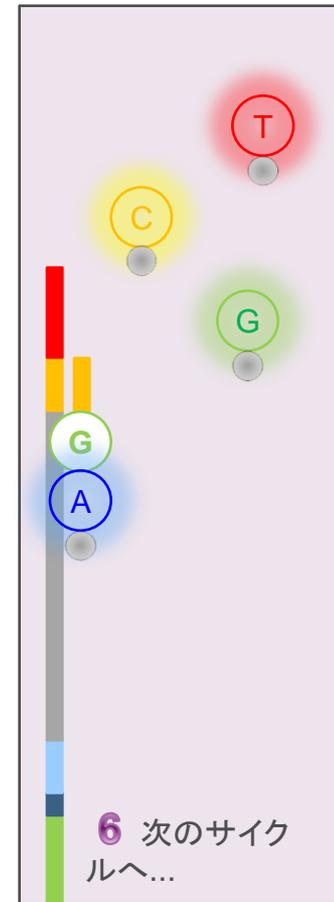
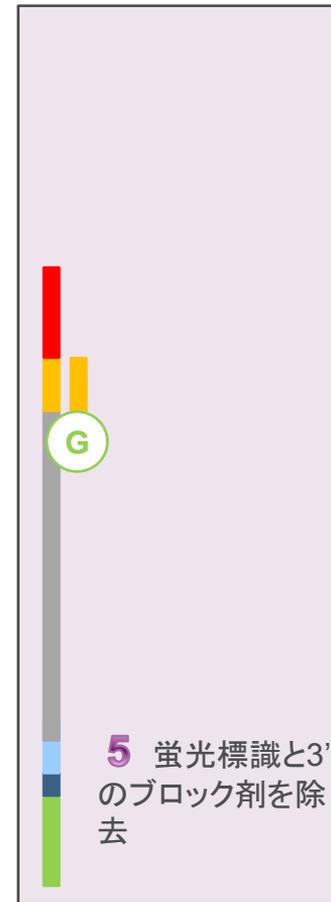
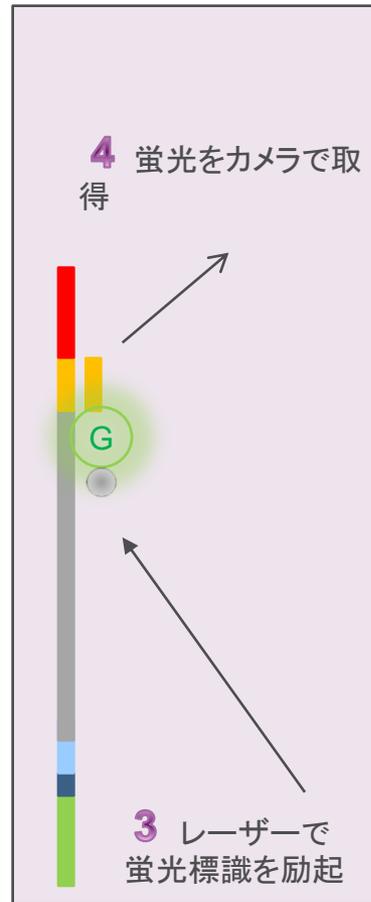
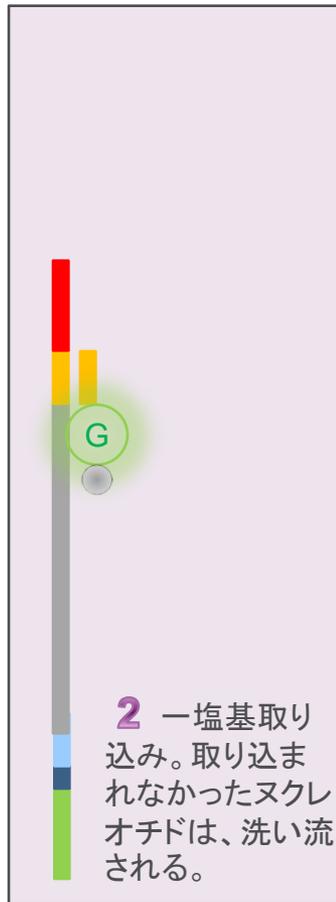
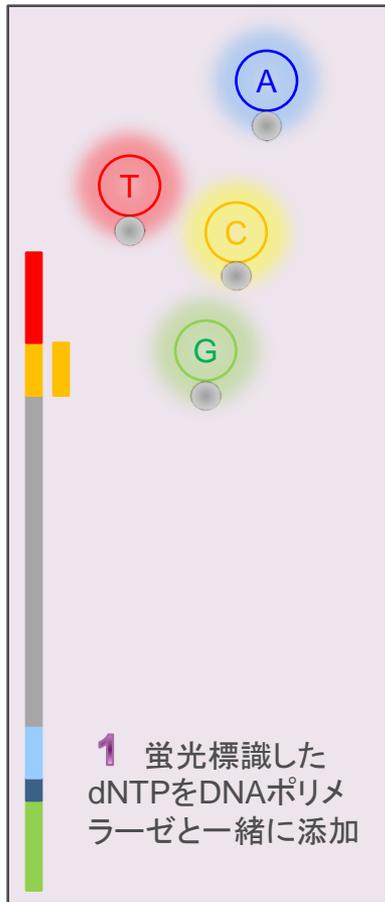
3. シーケンシング: 塩基配列(蛍光)を読み取る

Sequencing By Synthesis (SBS) 法

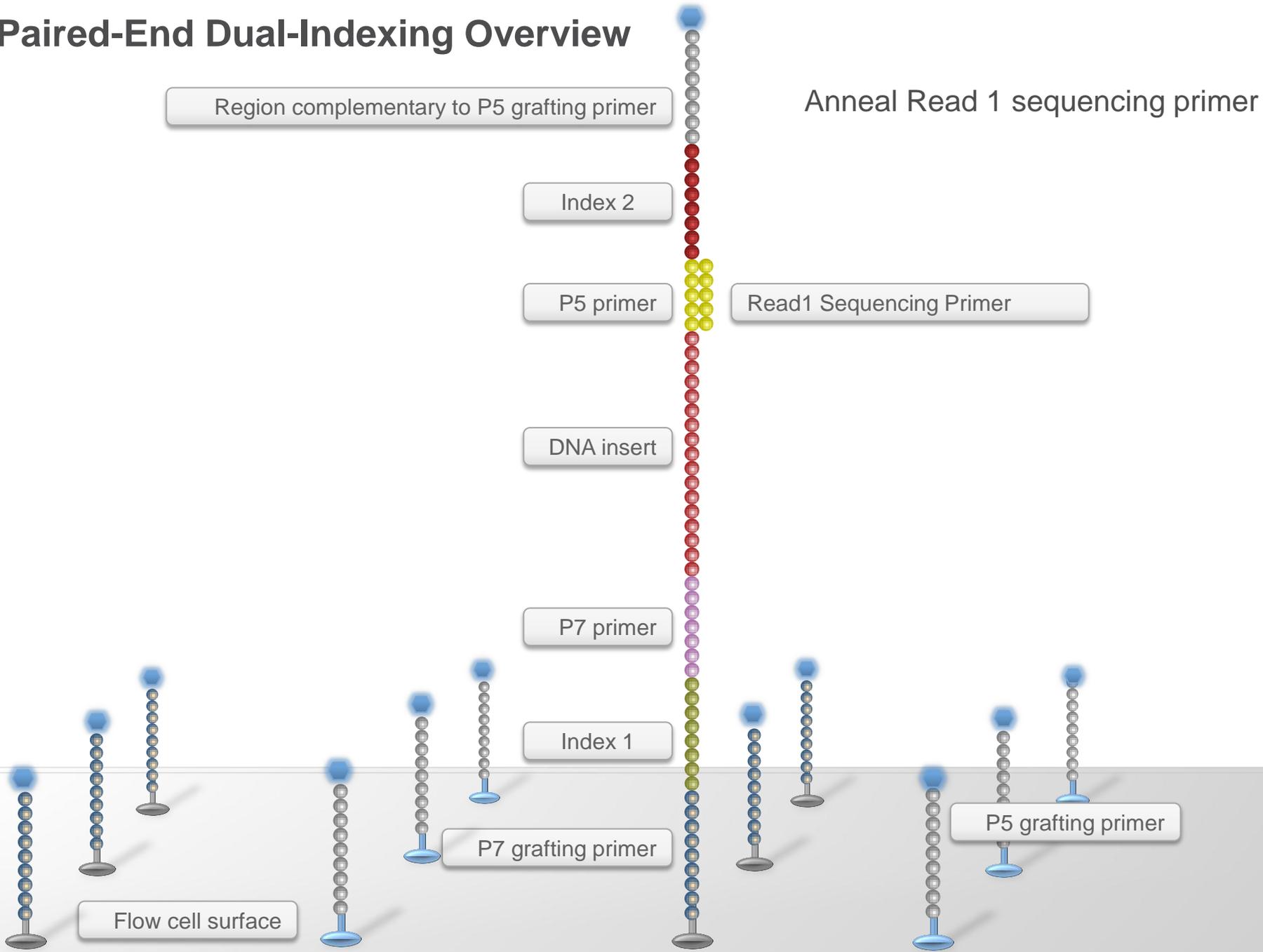
- ▶ 可逆的ターミネーターを用いて一塩基ずつシーケンスする
- ▶ 3'末端に保護基があるためDNA合成が一塩基ずつストップしながら行われる
- ▶ 1反応に蛍光ラベルされた4ヌクレオチドを加える(蛍光の種類で塩基を特定)
- ▶ 高精度で信頼があり、ホモポリマー領域も正確に解析可能



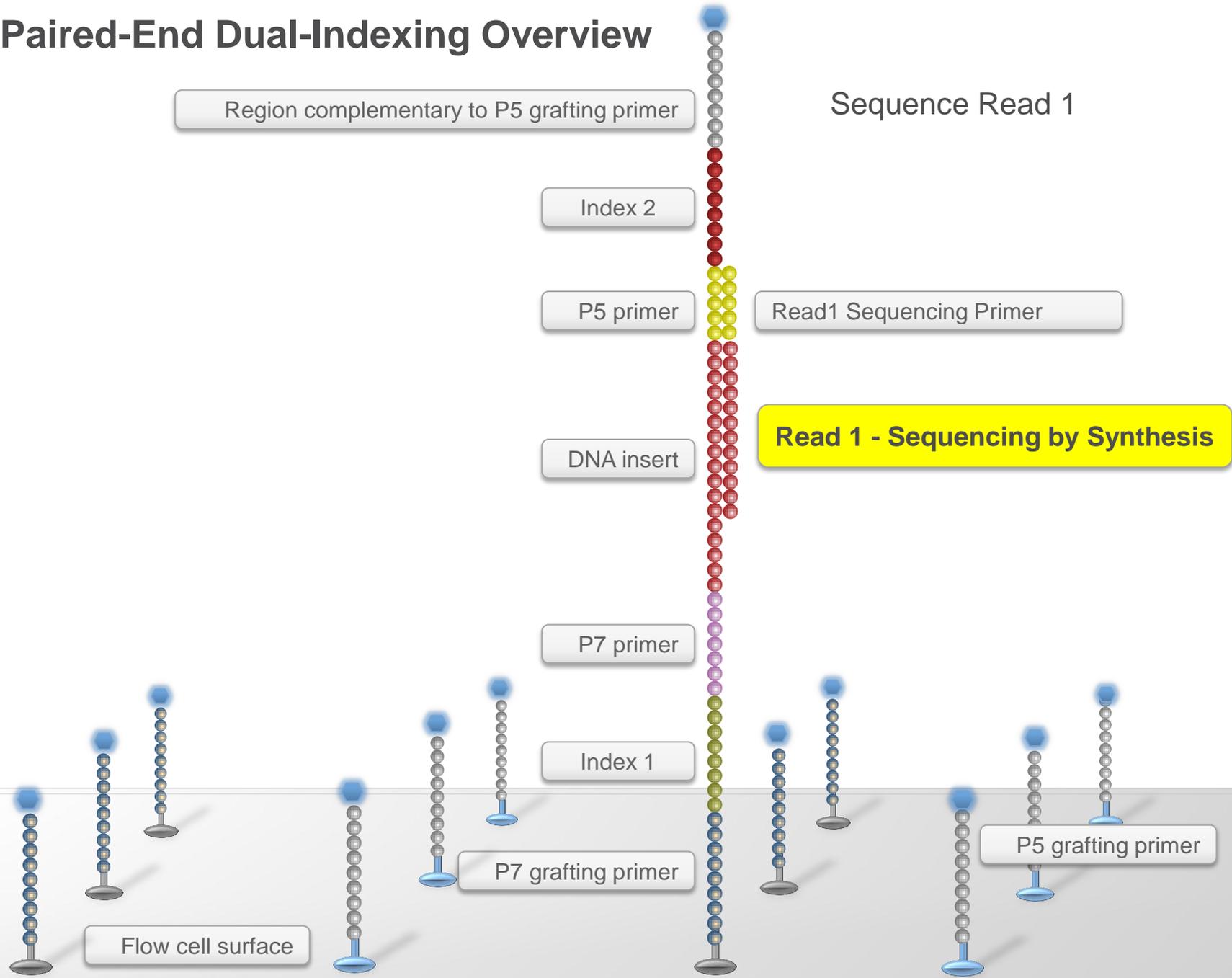
3. シーケンシング: 塩基配列(蛍光)を読み取る



Paired-End Dual-Indexing Overview



Paired-End Dual-Indexing Overview



Paired-End Dual-Indexing Overview

Region complementary to P5 grafting primer

Remove read 1 product

Index 2

P5 primer

DNA insert

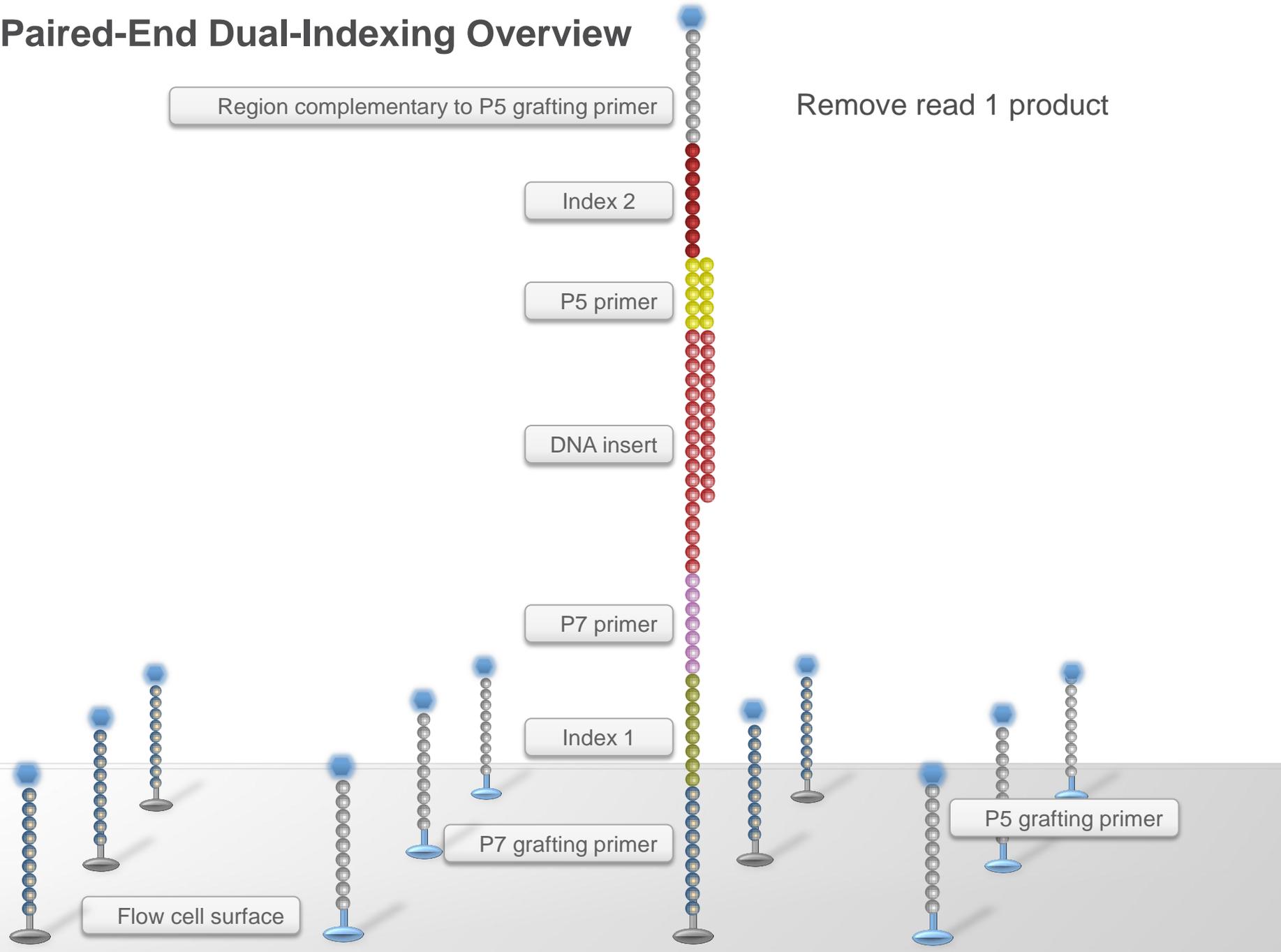
P7 primer

Index 1

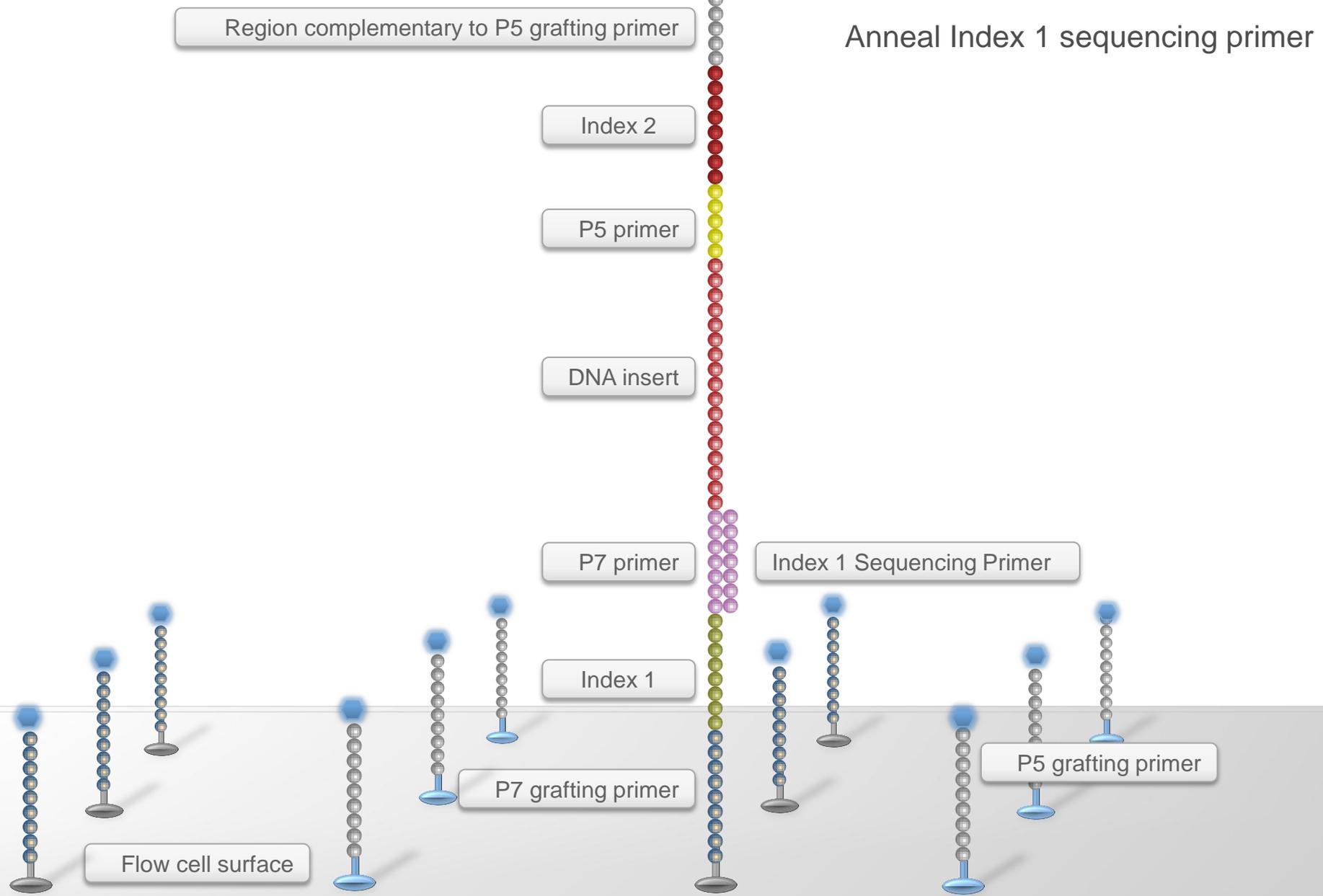
P7 grafting primer

P5 grafting primer

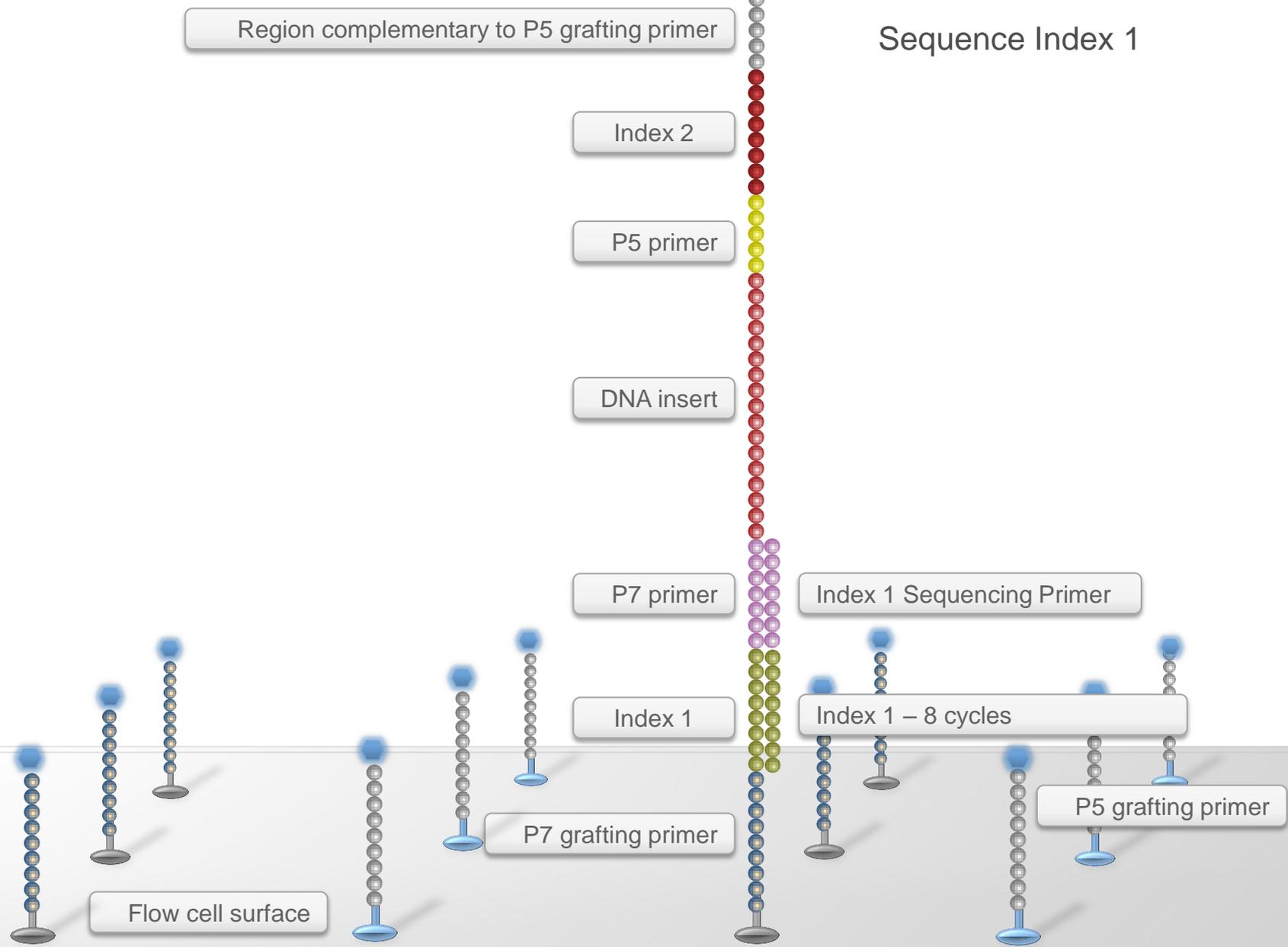
Flow cell surface



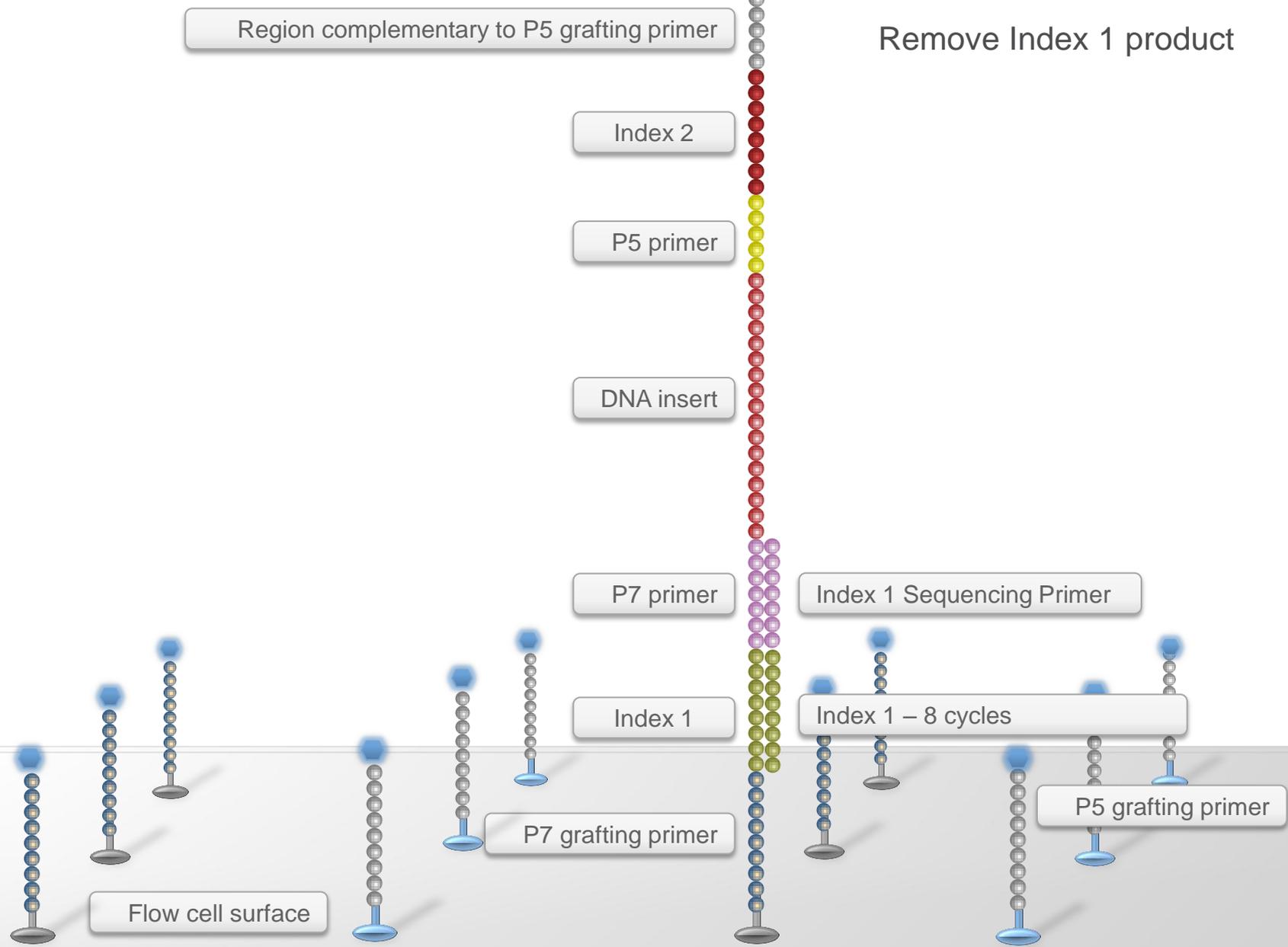
Paired-End Dual-Indexing Overview



Paired-End Dual-Indexing Overview

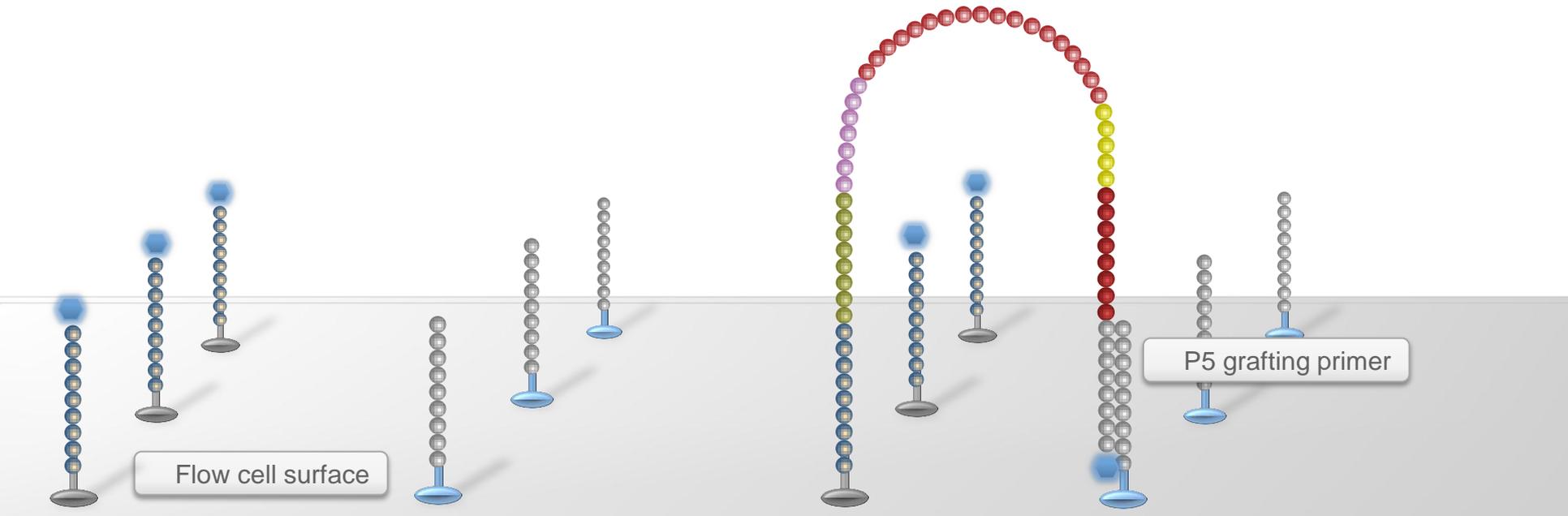


Paired-End Dual-Indexing Overview



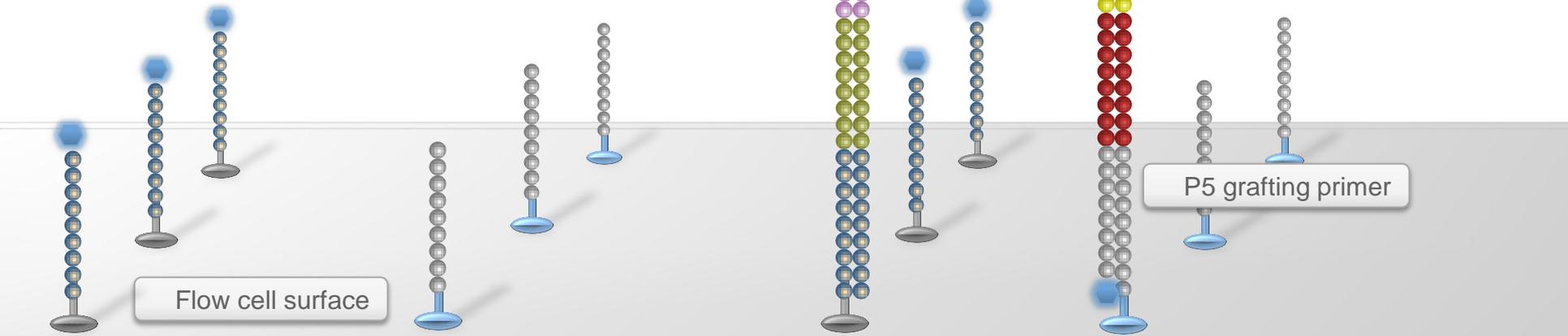
Paired-End Dual-Indexing Overview

Deblock and anneal to P5 grafting primer



Paired-End Dual-Indexing Overview

Synthesize new strands



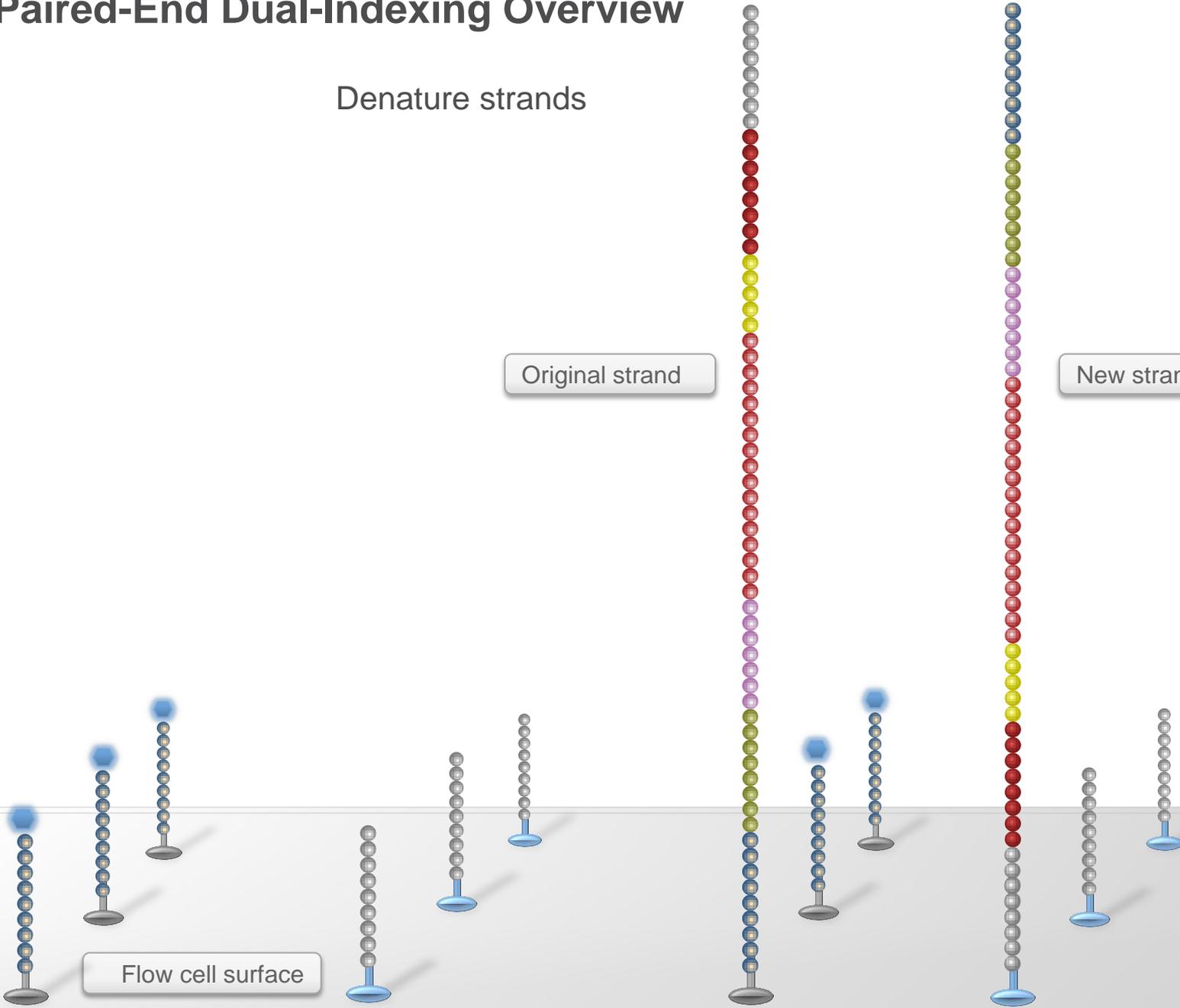
Paired-End Dual-Indexing Overview

Denature strands

Original strand

New strand

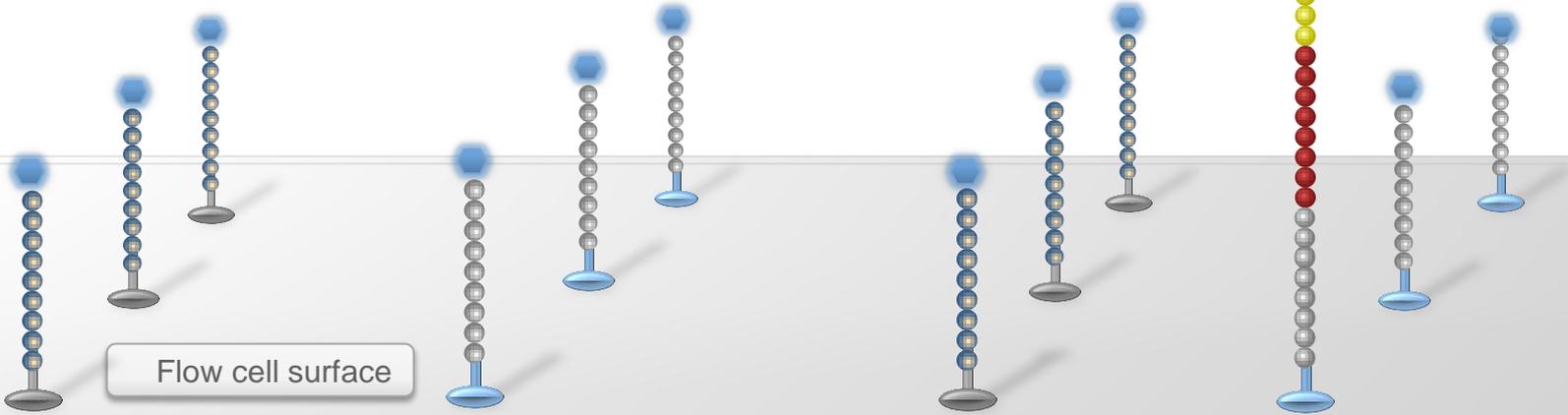
Flow cell surface



Paired-End Dual-Indexing Overview

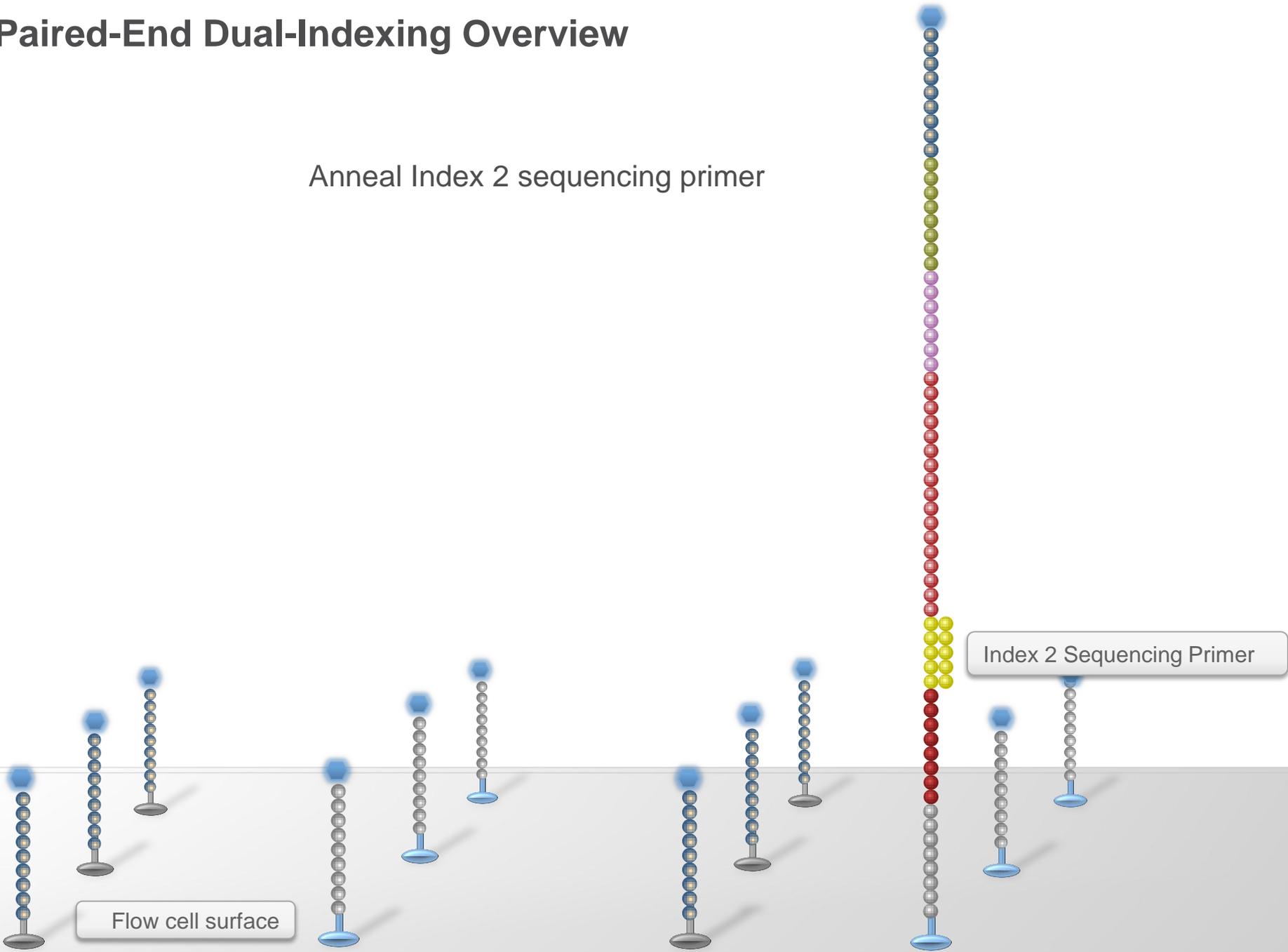
Remove original strand and reblock P5

New strand



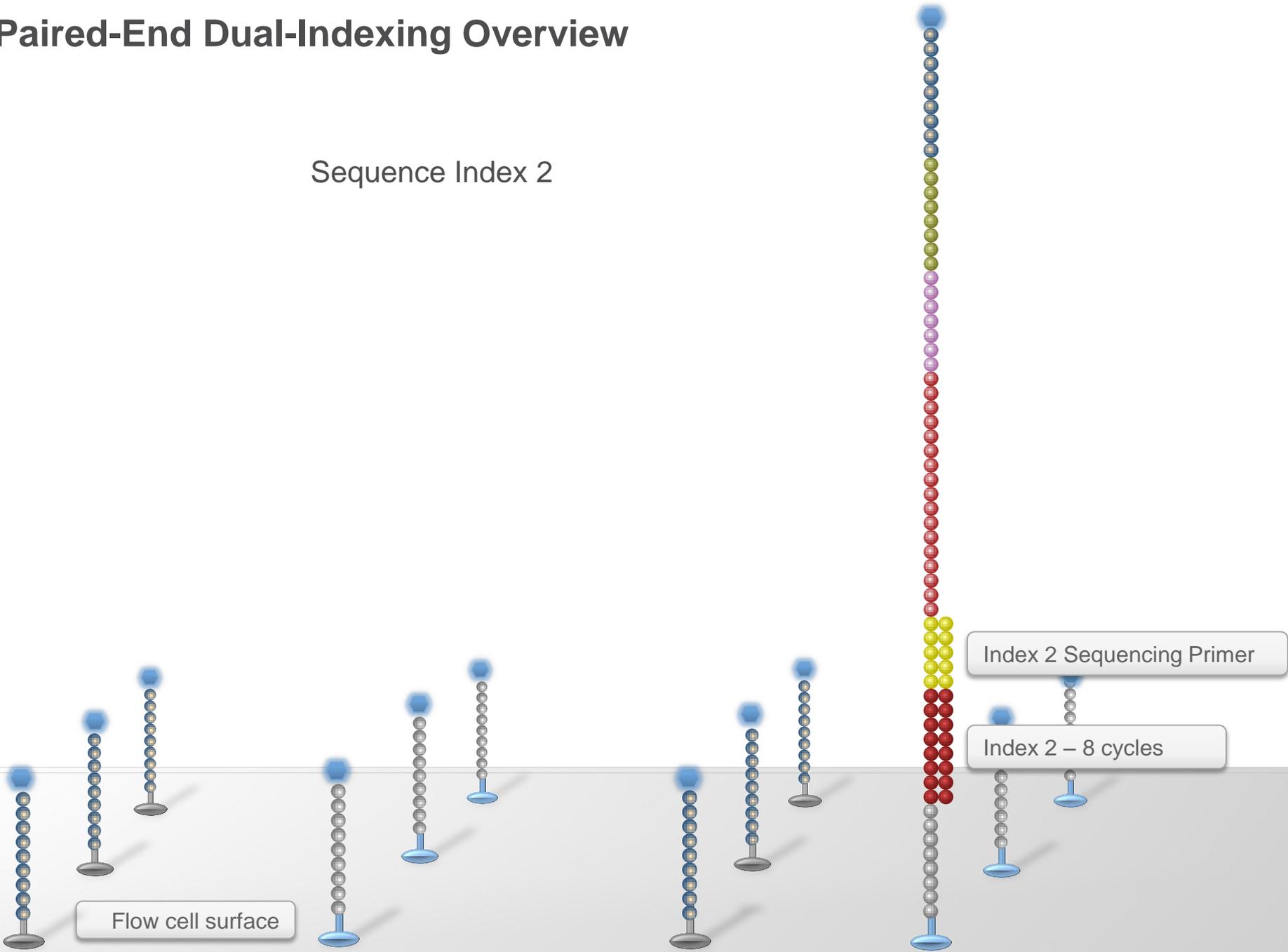
Paired-End Dual-Indexing Overview

Anneal Index 2 sequencing primer



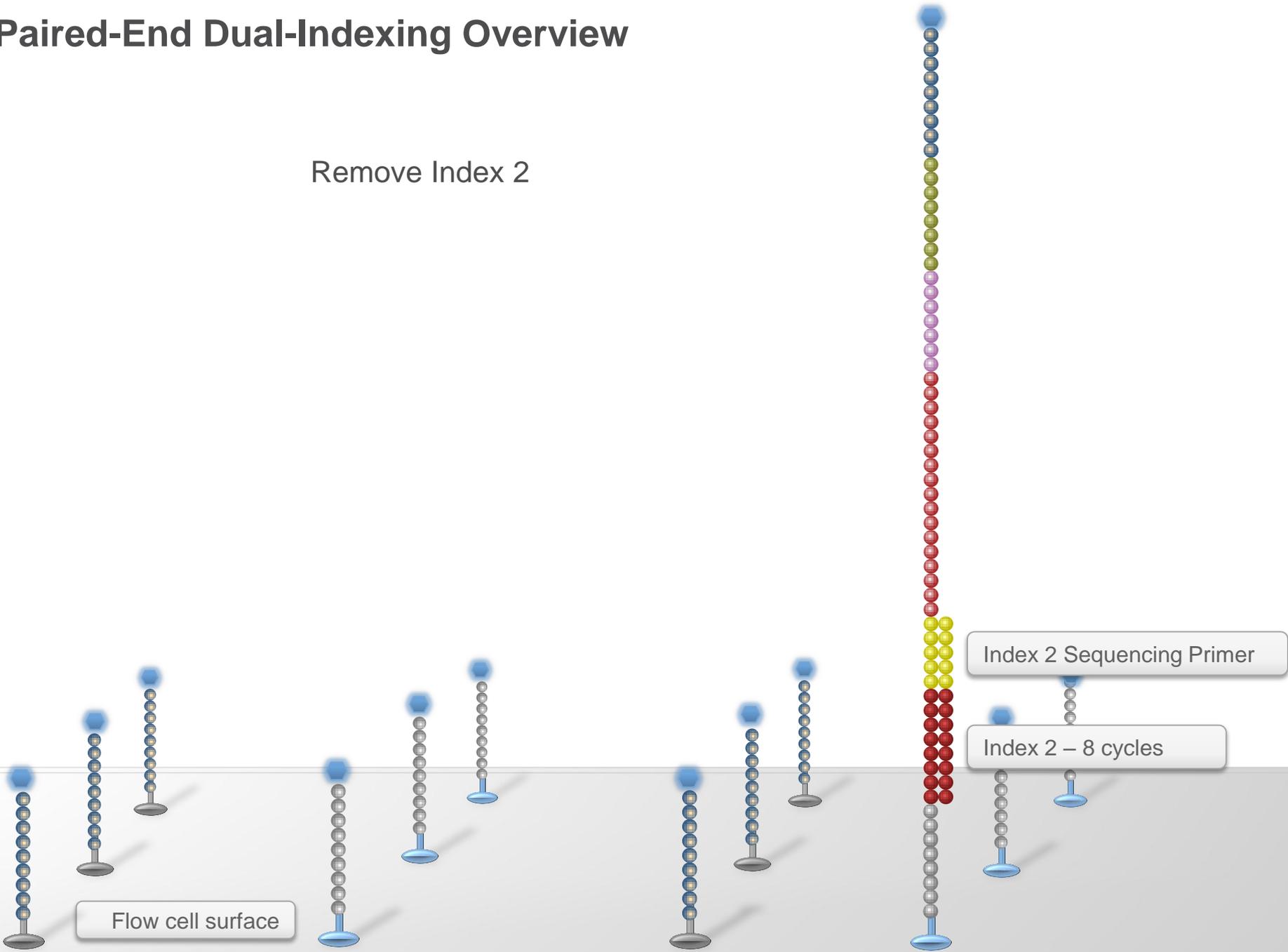
Paired-End Dual-Indexing Overview

Sequence Index 2



Paired-End Dual-Indexing Overview

Remove Index 2



Flow cell surface

Index 2 Sequencing Primer

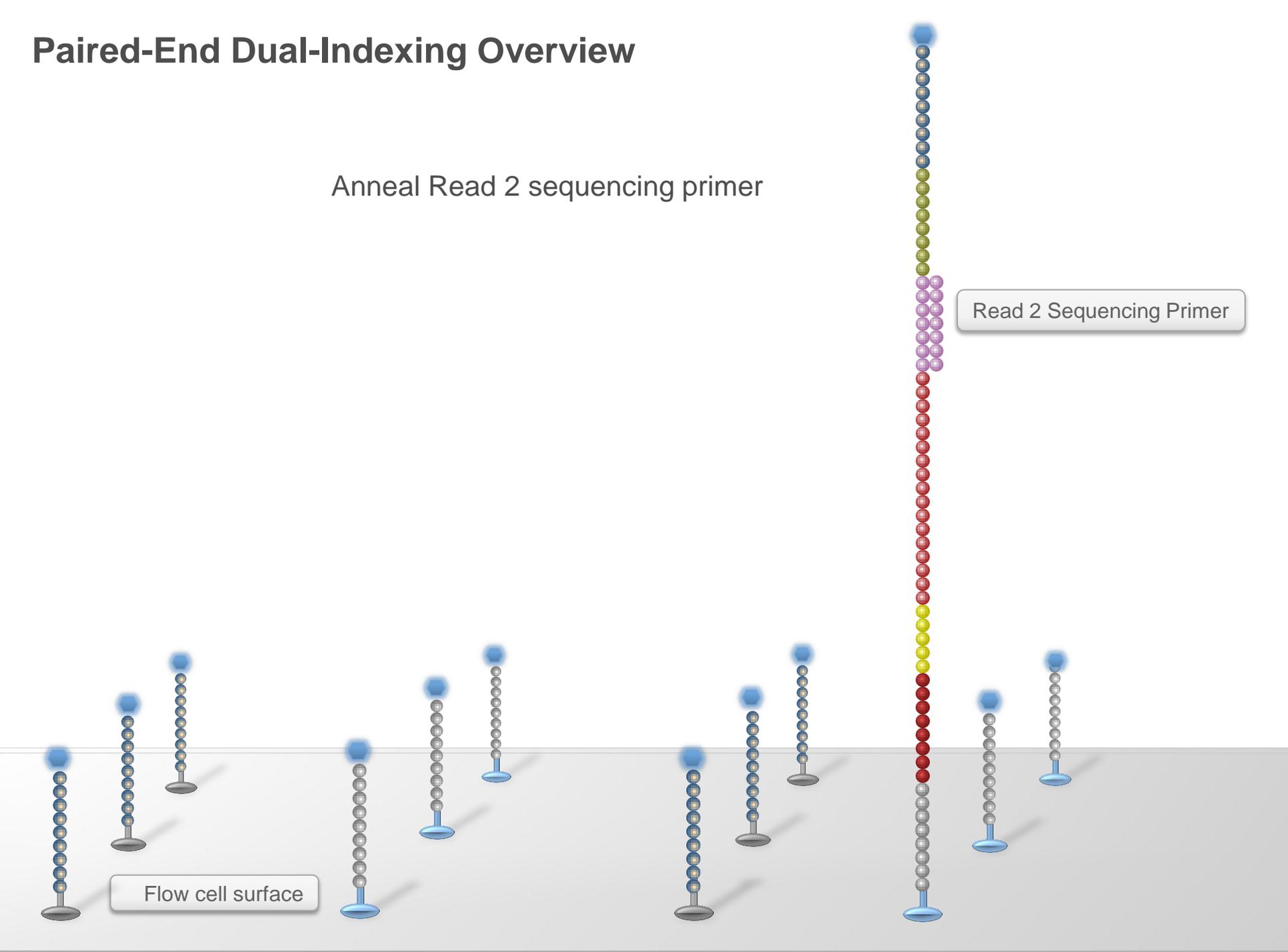
Index 2 - 8 cycles

Paired-End Dual-Indexing Overview

Anneal Read 2 sequencing primer

Read 2 Sequencing Primer

Flow cell surface



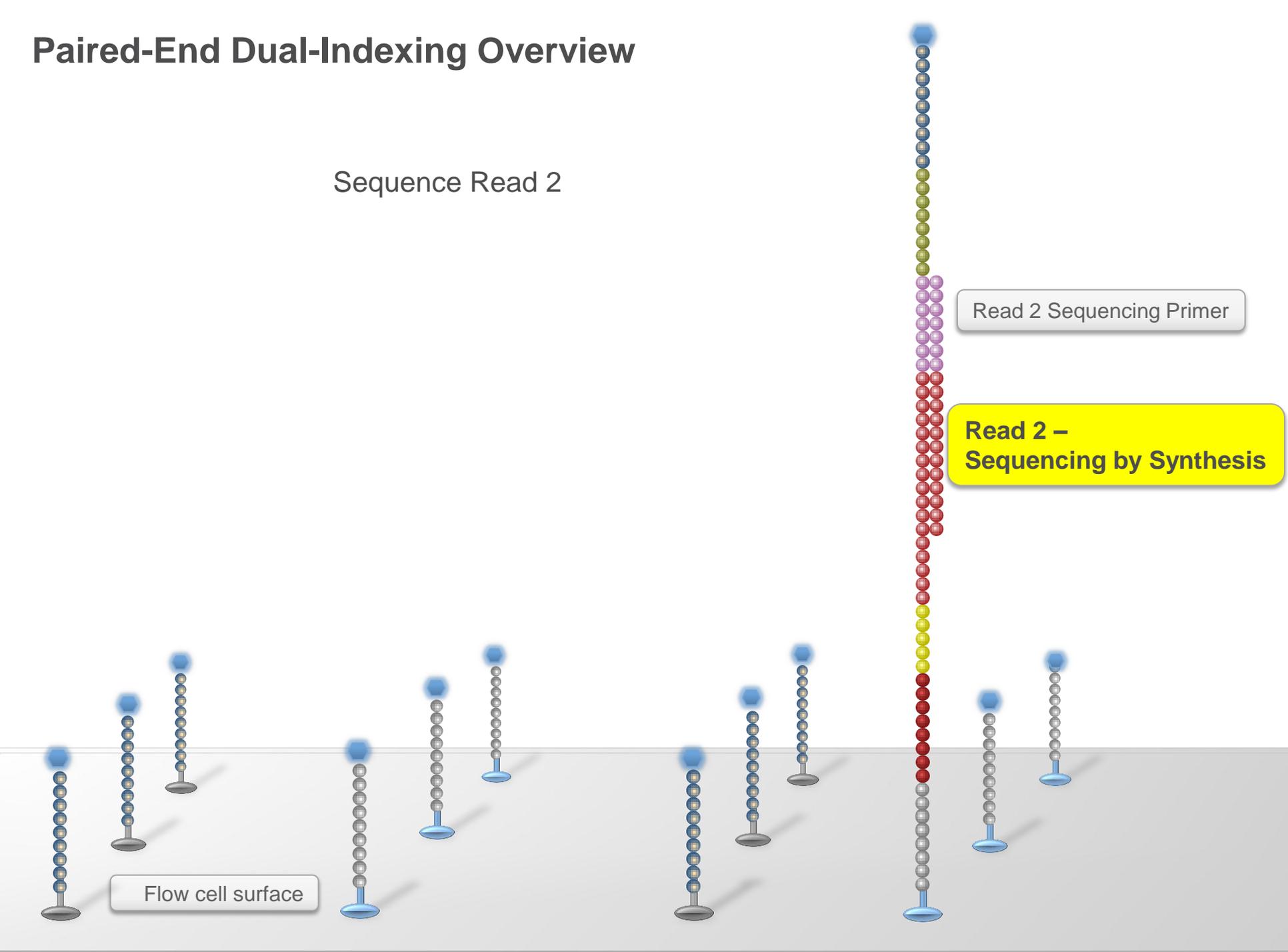
Paired-End Dual-Indexing Overview

Sequence Read 2

Read 2 Sequencing Primer

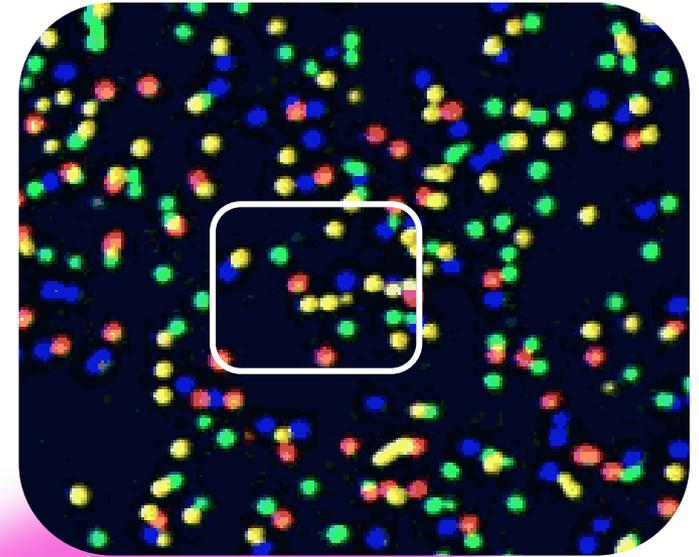
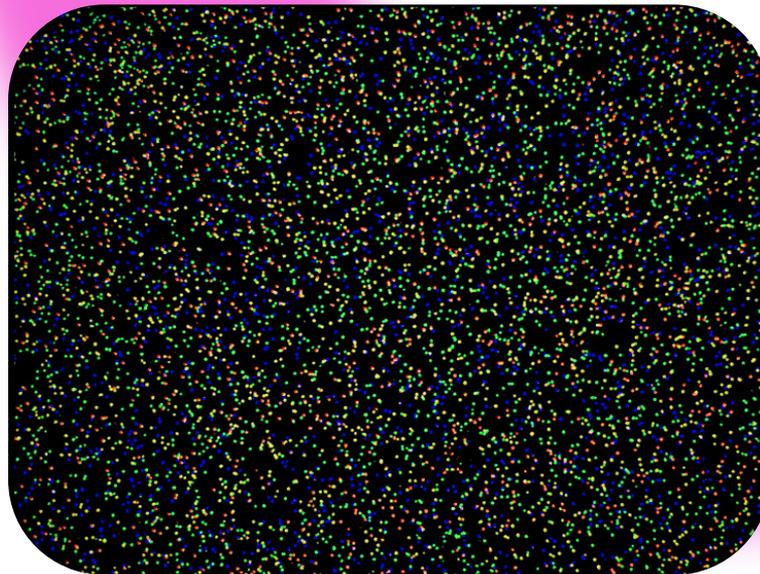
**Read 2 –
Sequencing by Synthesis**

Flow cell surface



4. データ解析: イメージデータから塩基配列を得る

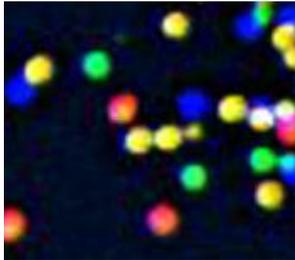
- ▶ 1回のサイクル終了後のイメージ



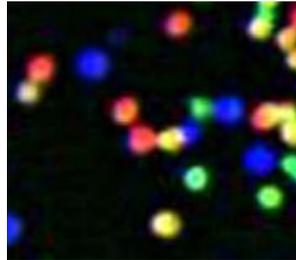
4. データ解析: イメージデータから塩基配列を得る

- ▶ それぞれのサイクルにおけるFC上の画像から塩基情報が抽出される
- ▶ まずクラスターの認識、位置づけ、そしてカウントが行われる

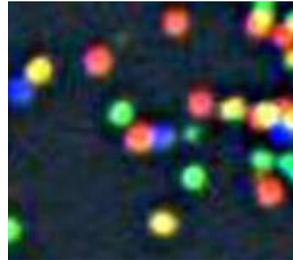
Cycle 1



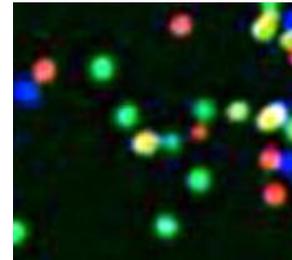
Cycle 2



Cycle 3



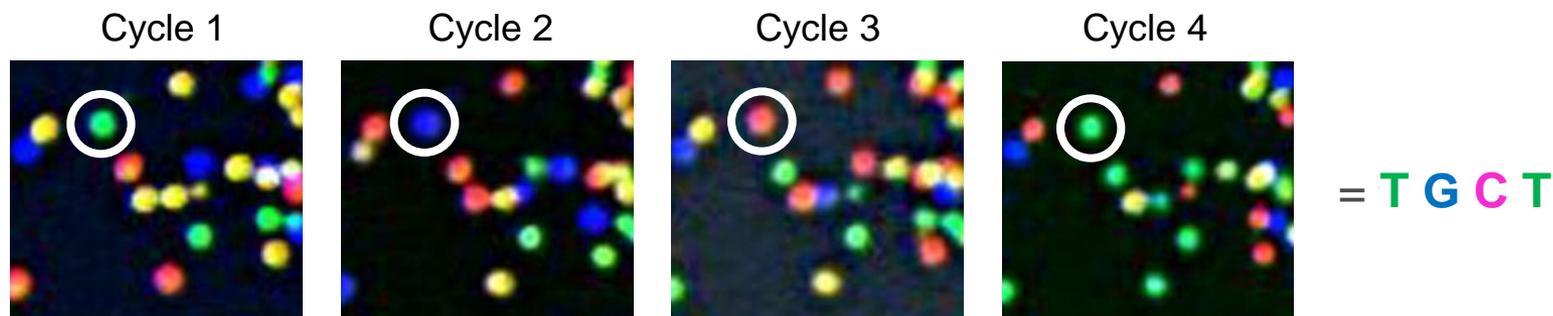
Cycle 4



= **28** clusters

4. データ解析： イメージデータから塩基配列を得る

- ▶ 各クラスターの蛍光色の順番を記録しベースコールに用いる。
- ▶ Quality scores (Q Scores) がすべての塩基に割り当てられる



- ▶ Q scores はそれぞれの塩基が不正確にBaseCallされる可能性を示す

Q Score	Probability of error
Q30	1 in 1000
Q20	1 in 100

4. データ解析: イメージデータから塩基配列を得る

		135	563	168.9	347.7	739.1	24966.8	202.2	299.7	207.0	21984.4
1	7	180	621	231.5	341.9	457.7	21423.8	229.3	382.9	16319.2	20217.5
1	7	245	626	218.4	356.8	501.6	21362.3	165.5	319.7	467.9	19749.5
1	7	241	509	187.7	382.7	537.4	20767.7	1489.2	10304.1	161.0	482.7
1	7	214	595	173.5	372.1	686.1	20302.4	8387.1	12746.0	158.4	540.8
1	7	155	544	172.2	339.5	538.3	19608.9	307.6	418.8	364.9	17172.9
1	7	301	507	353.8	672.1	782.0	26448.1	1881.2	12332.1	191.9	743.0
1	7	175	606	210.4	333.4	523.2	19248.3	164.4	308.7	535.9	20587.5
1	7	242	522	267.9	513.0	606.8	19056.7	6265.6	10442.1	1884.7	2440.8
1	7	196	522	220.2	455.9	486.6	18895.4	189.5	352.8	12299.4	14331.7
1	7	237	612	167.0	457.7	531.0	18835.2	713.8	992.0	416.4	18774.3
1	7	160	528	172.6	400.7	651.9	18686.9	1265.7	8500.6	241.3	524.1
1	7	164	543	205.7	385.0	488.4	18480.5	1410.3	9968.3	76.7	-343.0
1	7	179	581	207.2	372.9	560.1	18462.2	140.7	282.9	314.4	16462.8
1	7	226	623	218.3	400.6	474.6	18392.9	7333.1	10759.6	158.2	640.2
1	7	139	583	241.0	358.9	563.7	18183.9	226.9	302.0	11925.1	15357.5
1	7	220	618	223.1	496.8	553.2	18176.5	1338.5	10208.8	315.3	594.6
1	7	360	507	194.0	339.0	660.3	24628.4	294.7	590.6	620.8	26846.9
1	7	334	512	249.8	590.6	638.9	24101.4	6787.9	11276.9	602.5	177.3
1	7	155	517	218.7	345.4	554.6	17715.4	1415.3	8446.5	177.4	523.2
1	7	343	541	183.5	375.9	678.6	23803.5	6715.9	11488.7	189.9	684.9
1	7	241	608	208.6	361.2	457.0	17245.5	6250.2	9519.9	112.1	34.4
1	7	176	520	226.3	338.6	457.9	17172.1	179.5	300.5	387.3	16274.9
1	7	371	592	298.6	566.4	626.1	23249.9	6698.6	10982.2	146.3	210.1
1	7	271	508	175.8	391.5	567.5	23181.2	1502.2	11095.5	158.9	605.8
1	7	195	503	236.4	389.5	485.4	16827.3	6096.1	8300.3	189.5	5778.0
1	7	301	592	181.8	378.8	553.6	22568.7	8013.1	13222.2	889.6	1211.8
1	7	248	548	197.7	525.1	543.6	16512.2	1560.8	10651.3	175.3	508.9
1	7	242	532	208.7	386.0	508.1	16468.5	1355.0	8900.2	155.7	283.8

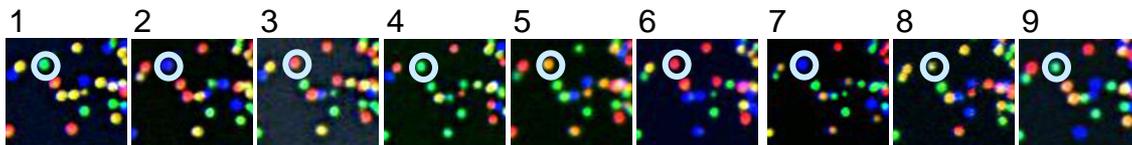
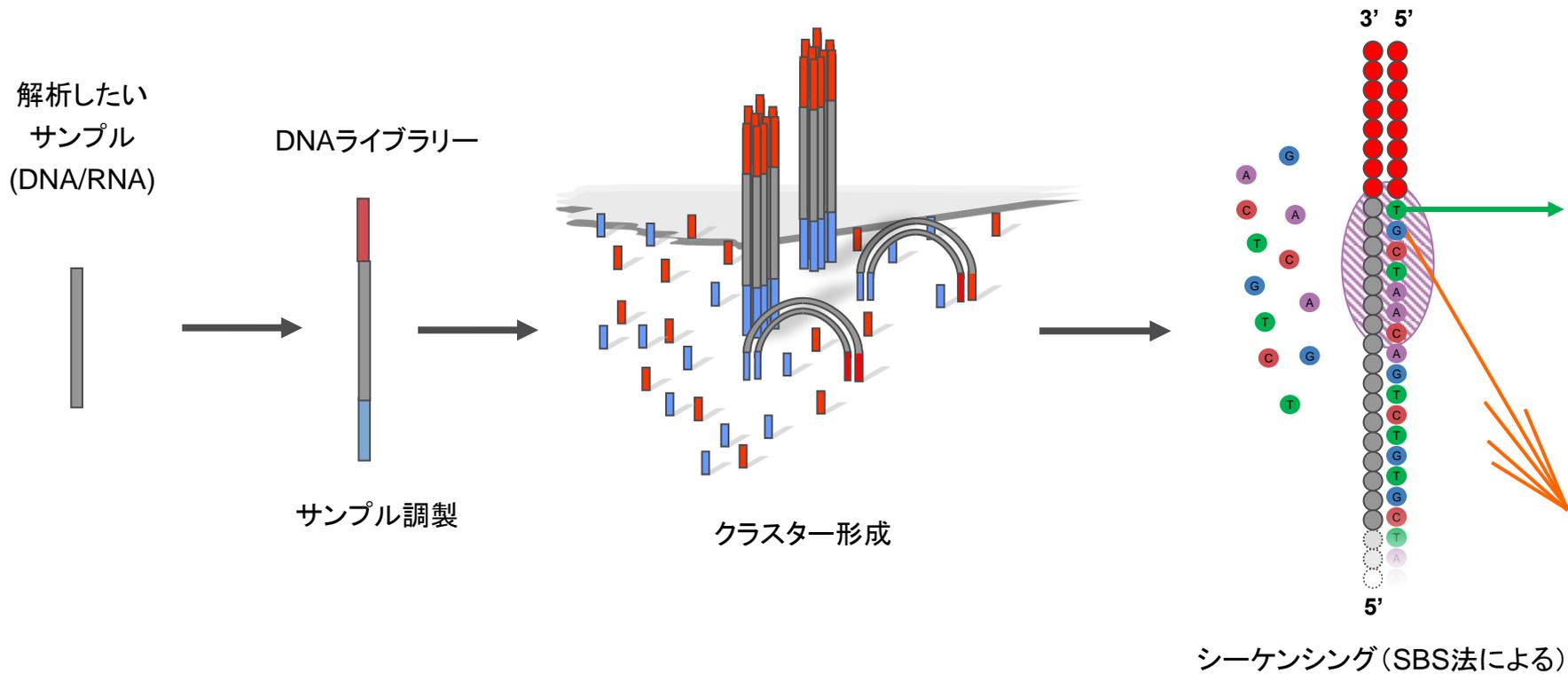
座標 各蛍光強度

		135	563	TTTGAACAAGCATATTGATAGCAGCAC
1	7	180	621	TGTTTTTTTTTTTTTTTGTAGACAGAG
1	7	245	626	TTTGATCATGTTTTCTGCTGCTGAAGC
1	7	241	509	TCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCT
1	7	214	595	TACAAAATCCCTGCCCATATGGAGCTT
1	7	155	544	TTATCTGCATCCGGTGCAAGTTTTAGC
1	7	301	507	TCCTGCTTATTGACTCTTTTTTATT
1	7	175	606	TTGGAATCGGGGTTAAGGAAAGAGAT
1	7	242	522	TAATAATATACAGGATATGTTCAAAA
1	7	196	522	TGTCACAGGAGGGAAACAGCGCTGCAT
1	7	237	612	TTGCTGCAAGCTCAGAAGAACACTTTC
1	7	160	528	TCTGATTTTACACAGTAAACAGAAAAC
1	7	164	543	TCTCAGAGAAACGTGCGTGATTCAGG
1	7	179	581	TTCTGAAATTAAGTACTGCTGCTATTGG
1	7	226	623	TATTACAGGCATGAGCCACTGCACCCA
1	7	139	583	TGTGGGTATGGGACACACAGGGAAGCT
1	7	220	618	TCCGAAAGTTGTTTAAAAAATAGACAA
1	7	360	507	TTATTTGTGAGTAAATGTTTCCAATTA
1	7	334	512	TAGTTGGTTGACCTAAATGGGAGATC
1	7	155	517	TCCACAAAAAAGAAAAAGAGAGAGA
1	7	343	541	TATGTTCCATGTGCTAATGAATAGAAT
1	7	241	608	TATTAGCCAGGTGTGGTGGTGTACACC
1	7	176	520	TTTTTTAGTAGAGATGGGATTTACCA
1	7	371	592	TATTGCTATAGGAACAGCCAGTAGGGG
1	7	271	508	TCTCTGGGAAATATTAGCTTAGCCAGA
1	7	195	503	TACATGATGTGGGCCCTGGTGATCTTG

座標 塩基

最終的にクラスター位置を座標で表し、そのクラスターに含まれている DNAの塩基配列を示したものが出力される

本日のまとめ: イルミナシーケンサーのワークフロー



シーケンシングにおけるサイクル

→ T G C T A C G A T ...

ベースコール

参考文献

- ▶ 細胞工学別冊:「次世代シーケンサー 目的アドバンスメソッド」
菅野純夫/鈴木穰 監修
- ▶ イルミナのホームページから得られる情報
 - <http://www.illumina.com/library-prep-array-kit-selector.html>から
(シーケンスサンプル調製キットセレクター。目的のアプリケーションに沿ったキットを選択可能)
 - <http://www.illumina.co.jp/support/training.ilmn>
(ウェブトレーニング。英語をお勧めしますが、日本語版もございます)
 - ユーザーガイドのダウンロード、テクニカルアップデートメールの配信が可能。
※メール配信には別途MyIlluminaへの登録が必要
- ▶ イルミナシーケンサーの原理について:
 - Bentley et al. (2008) **Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry**. Nature 456: 53-59
 - “**Intro to Sequencing by Synthesis: Industry-leading Data Quality**” YouTube内動画
SBSシーケンスについて説明

サポートウェビナーにご参加いただき ありがとうございました。

本日のセッション終了後のご質問は、
techsupport@illumina.com
で承ります。

テクニカルサポート直通のフリーダイヤルも
ご利用くださいませ。

[0800-111-5011](tel:0800-111-5011)