



イルミナ Sequencing By Synthesis (SBS) ケミストリーのご紹介

小林 孝史
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

本日のウェビナーの概要

キャピラリーシーケンサー 合成→分離→読み取り



- 鋳型DNAから1塩基違いの相補鎖DNAを合成
- キャピラリー内でゲル電気泳動で分離しながら読み取り
(サンガー法)
- 一度に少数 (96) のDNA断片しか同時に解析できない

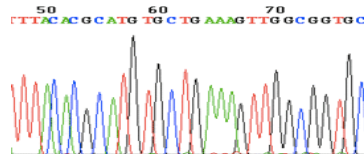
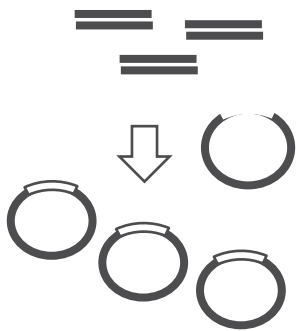
次世代シーケンサー (イルミナ) 合成→読み取り



- 相補鎖DNAを合成しながら読み取りを行う **(SBS法)**
- 分離は行わない
- 一度に多数 (30億) のDNA断片を同時に解析できる

イリミナシーケンサーワークフロー

サンガー法



改良

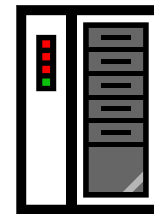
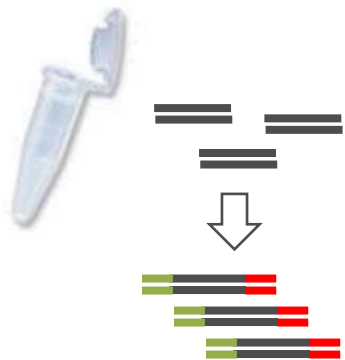


イリミナシーケンサーSBS法



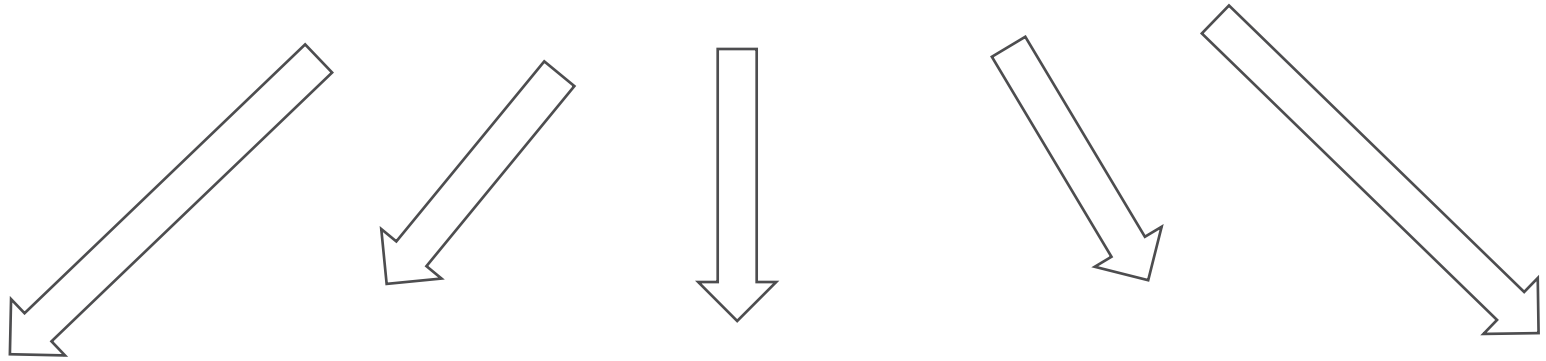
ライブラリー作製

クラスター形成



はじめに

Sequencing By Synthesis (SBS)法



MiSeq

GA_{IIx}

HiScanSQ

HiSeq
1000/1500

HiSeq
2000/2500



イルミナシーケンサーのワークフロー

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

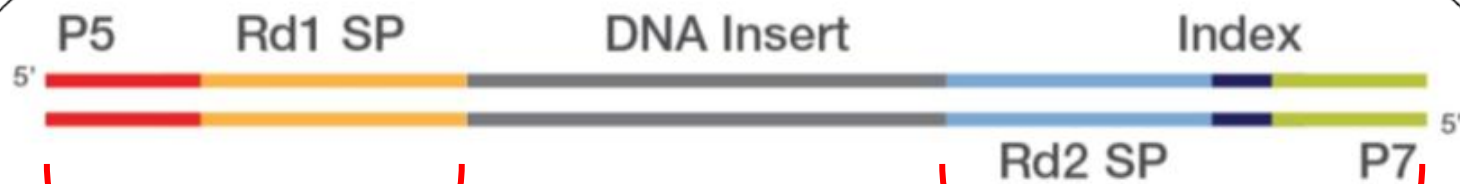
3. シーケンシング：
塩基配列（蛍光）を読み取る

4. データ解析：
データを総合して塩基配列を得る

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

DNAライブラリー

(イルミナシーケンサー解析用DNAサンプル) の構造



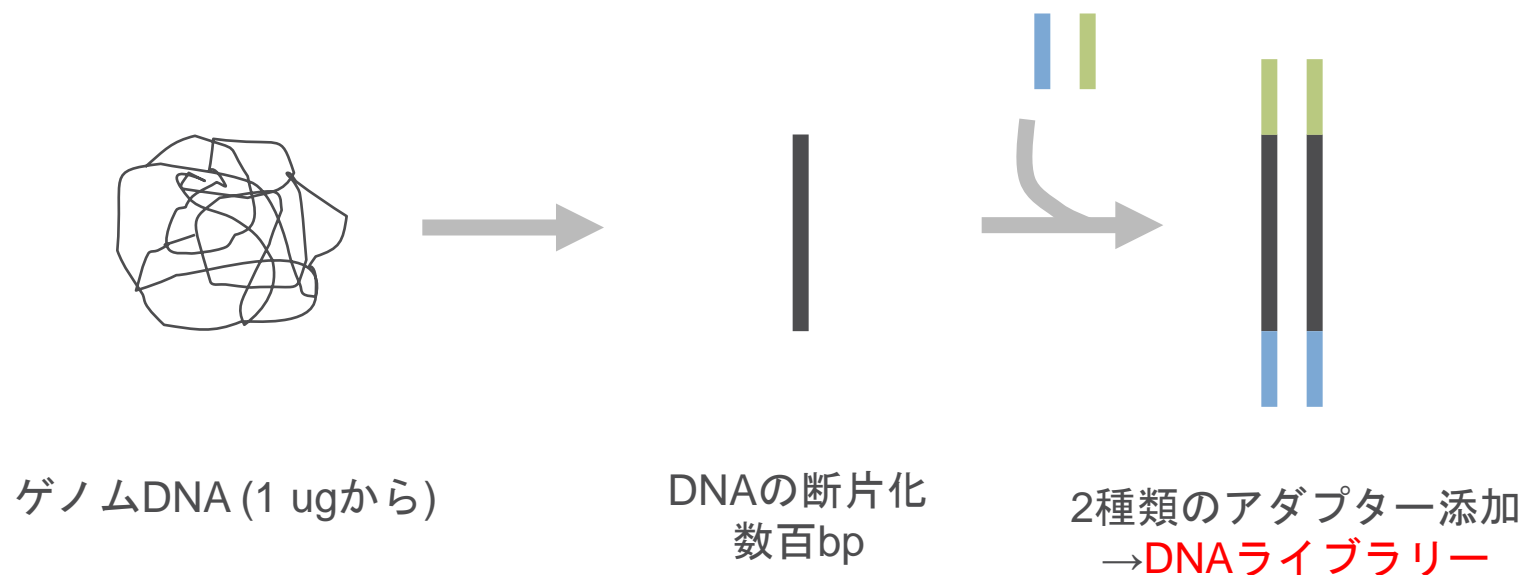
イルミナシーケンサー専用オリゴヌクレオチドアダプター

- | | |
|------------|------------------------|
| 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

DNAライブラリーの調製方法例 (TruSeq DNA prepの場合)

- ▶ 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



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

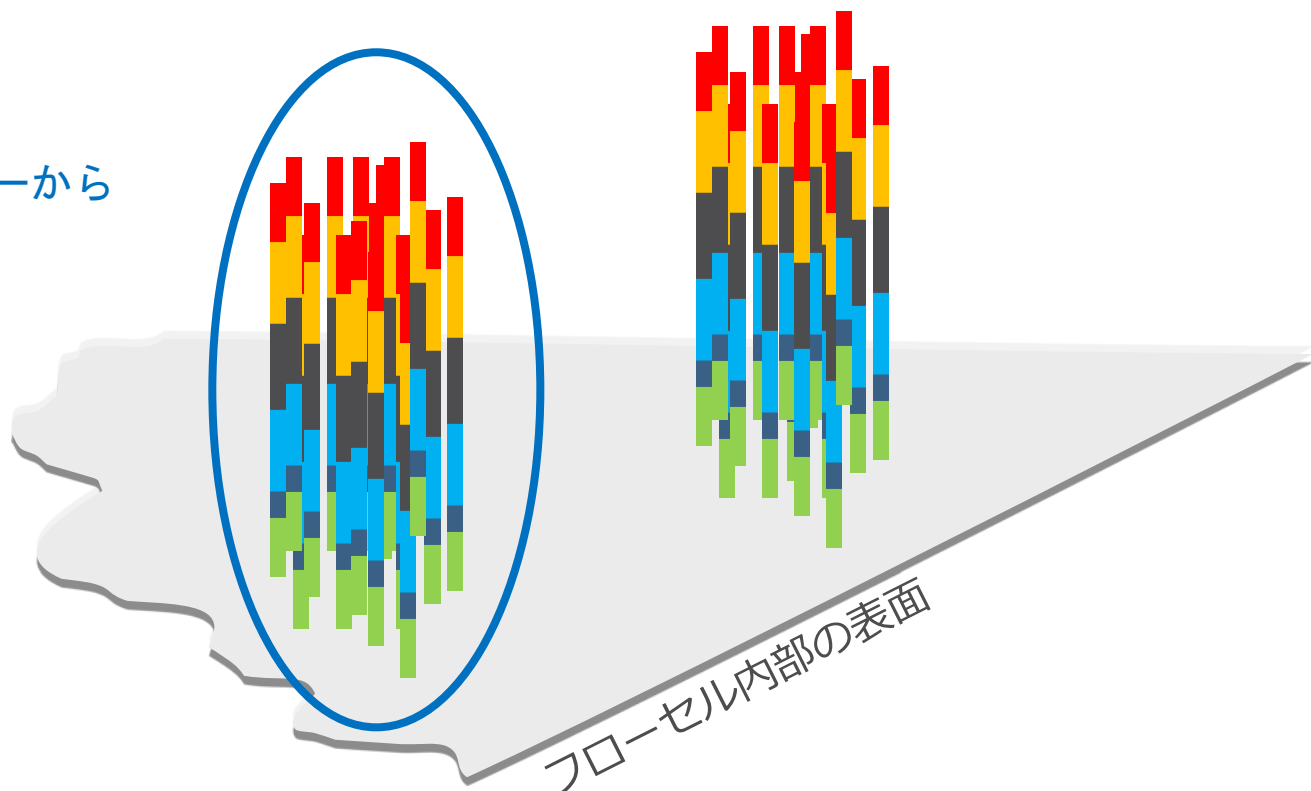
主なサンプル調製キット（2013年7月現在）

Kit	Details
Nextera Nextera XT	DNA、トランスポゾムを使用 最多96種類のindex 少量のDNAから適応
TruSeq DNA TruSeq nano TruSeq PCR-Free	DNA、超音波破碎 24(LT), 96(HT)種類の インデックス 低コスト
TruSeq RNA (v2) TruSeq Stranded RNA	mRNA、最多24種類のインデックス ストランド情報 (Stranded) が得られる
TruSeq Small RNA	Small RNA, 最多48種類のインデックス
Nextera Rapid Capture (Exome/Custom)	ターゲット領域を濃縮
Nextera Mate Pair	メイトペアシーケンス、 長断片に対応
TruSeq Amplicon (Custom/Cancer)	アンプリコンを作製し ライブラリー作製



2. クラスター形成： DNAを増幅する

1つのDNAライブラリーから
増幅したクラスター



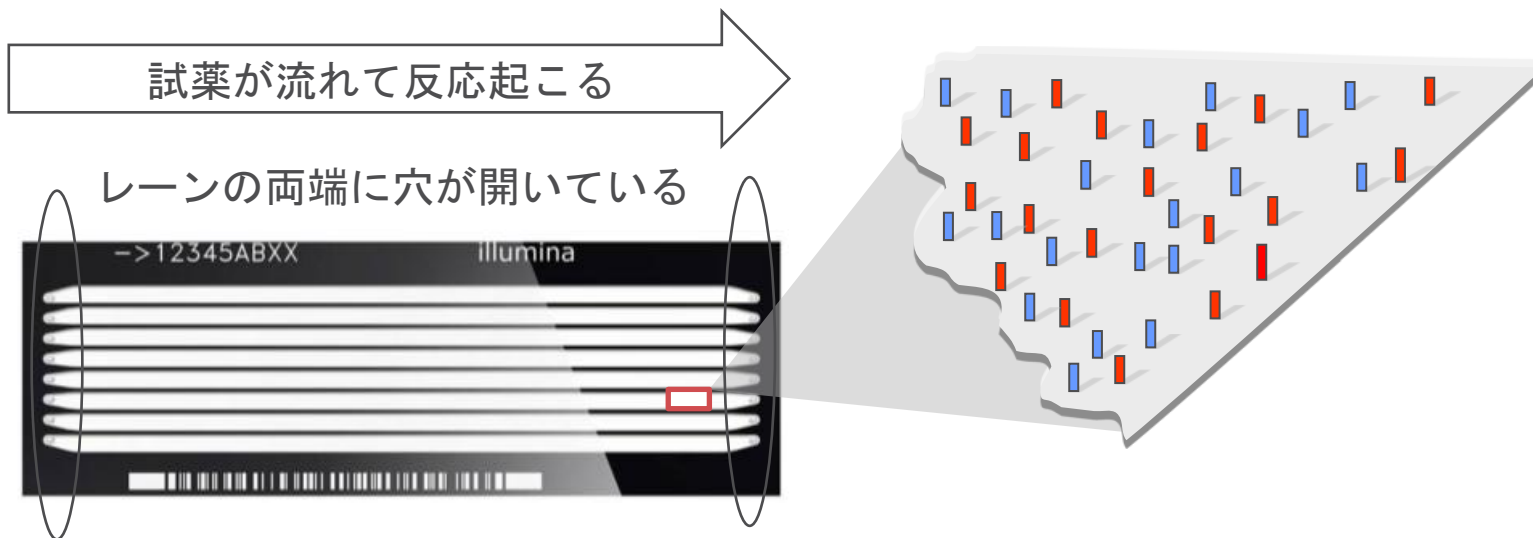
クラスター形成は、調製したDNAライブラリーをシーケンスの際に**検出可能な充分量に増やす**目的で行う**増幅工程**

2. クラスター形成： DNAを増幅する

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

1~8レーンの試薬が流れる穴が開いている。

フローセルのレーンの上下面にはオリゴヌクレオチド(P5/P7)が林立している
クラスター形成時やシーケンス解析時には試薬が流れる



図はHiSeqシリーズのHighOutputフローセル（1枚につき8レーン）

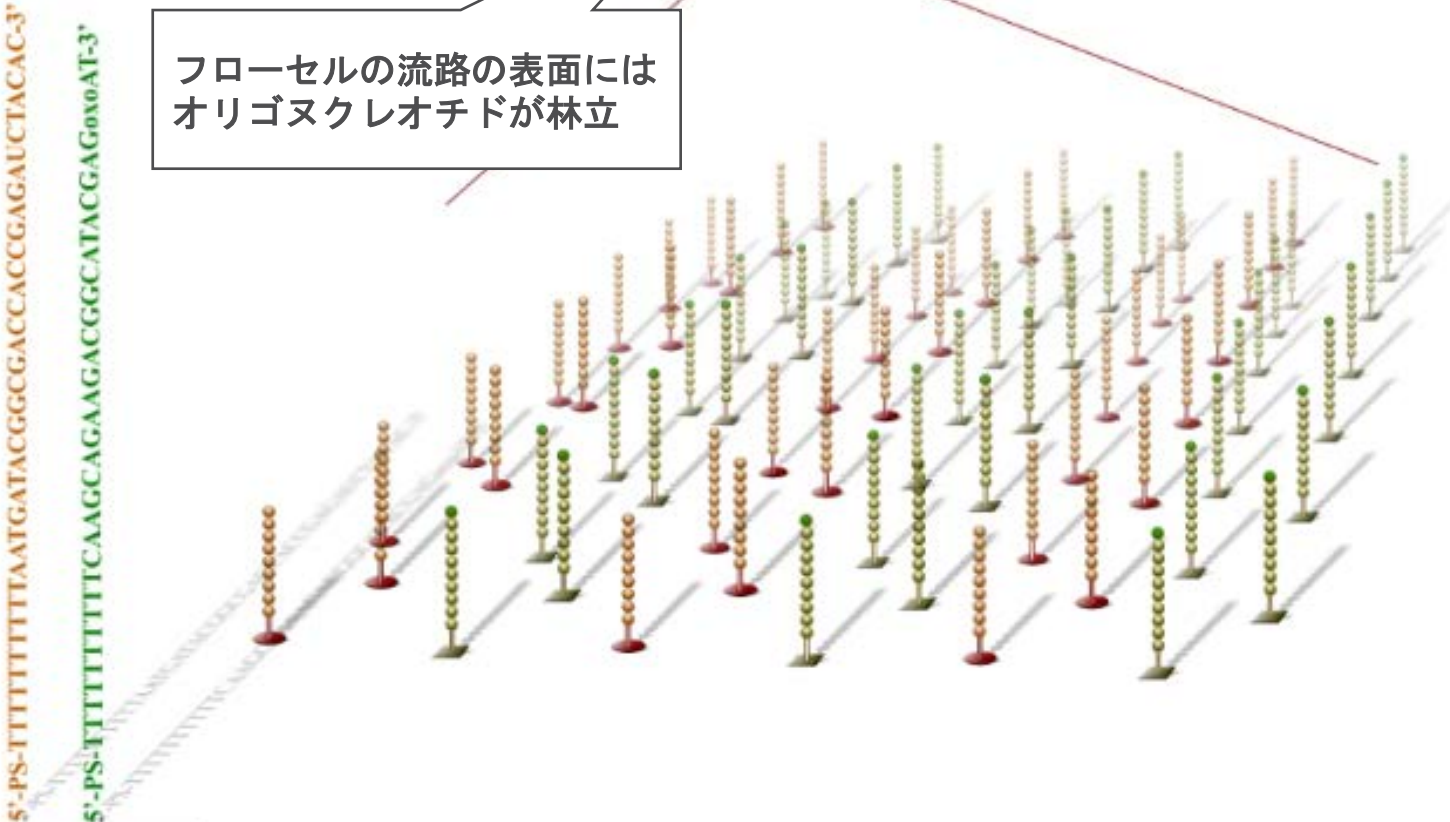


2. クラスター形成： DNAを増幅する



1つのフローセルで8レーン

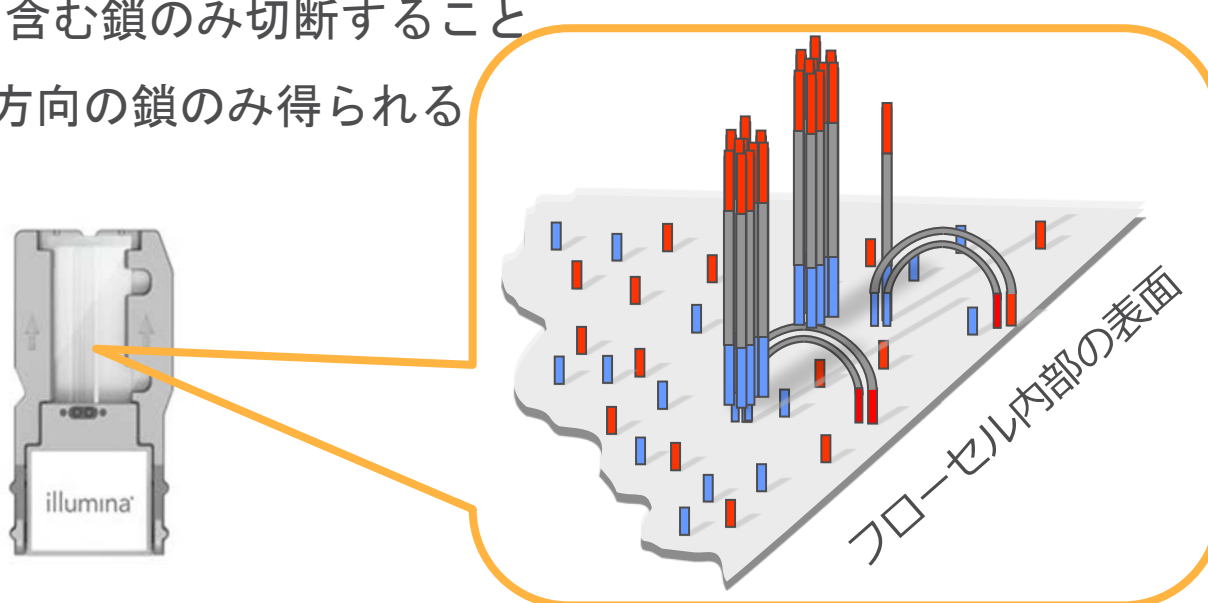
フローセルの流路の表面には
オリゴヌクレオチドが林立



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～1000分子形成される
- ▶ 4. P7を根元を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

変性した1本鎖
DNAライブラリー

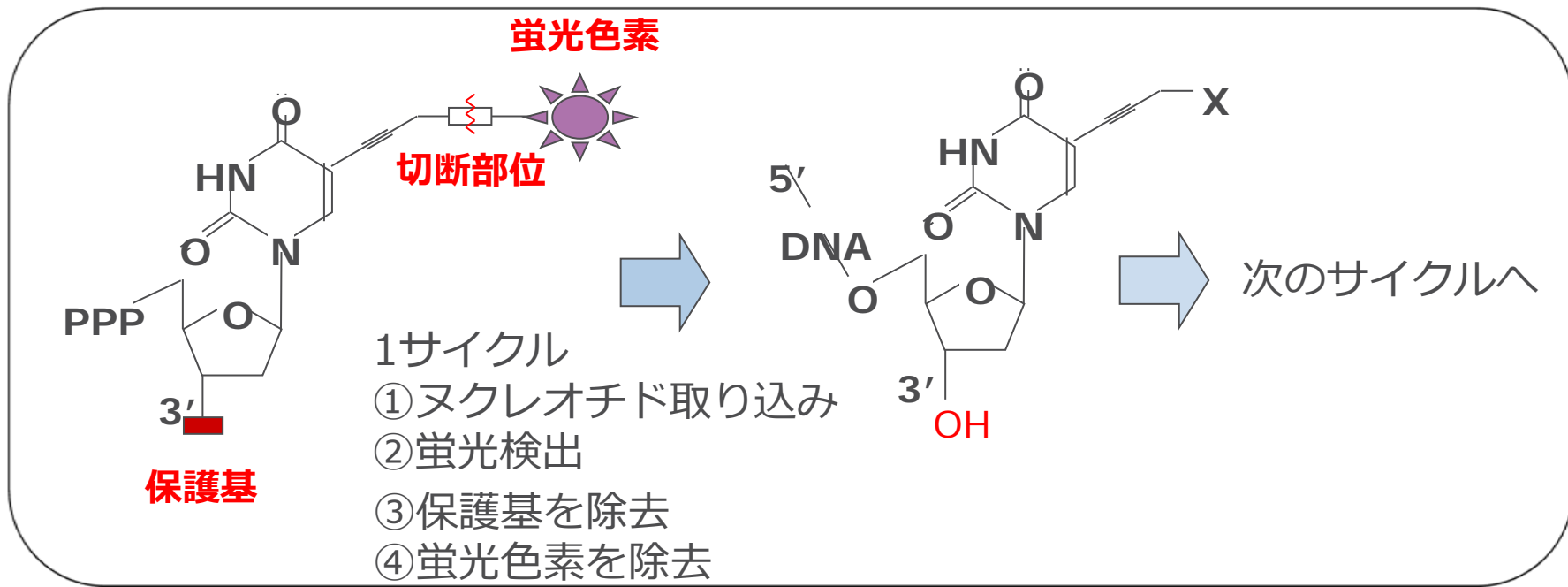


図はMiSeqのフローセル（1枚につき1レーン）

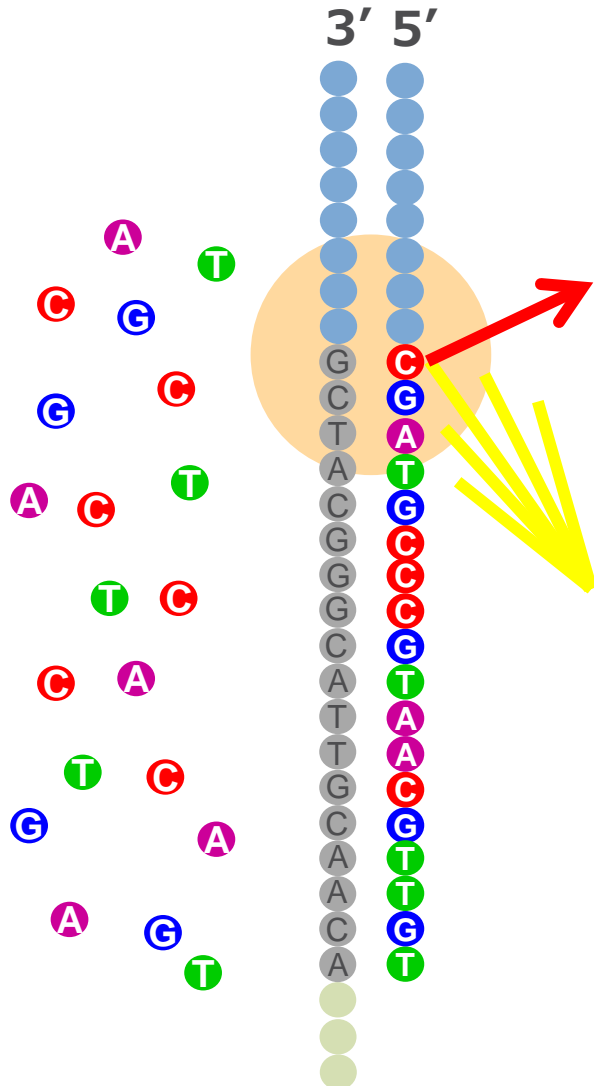
3. シーケンシング： 塩基配列（蛍光）を読み取る

Sequencing By Synthesis (SBS) 法（サンガー法の改良法）

- ▶ 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

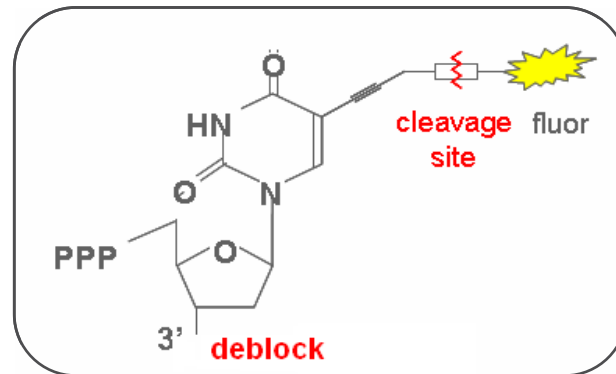


3. シーケンシング： 塩基配列（蛍光）を読み取る



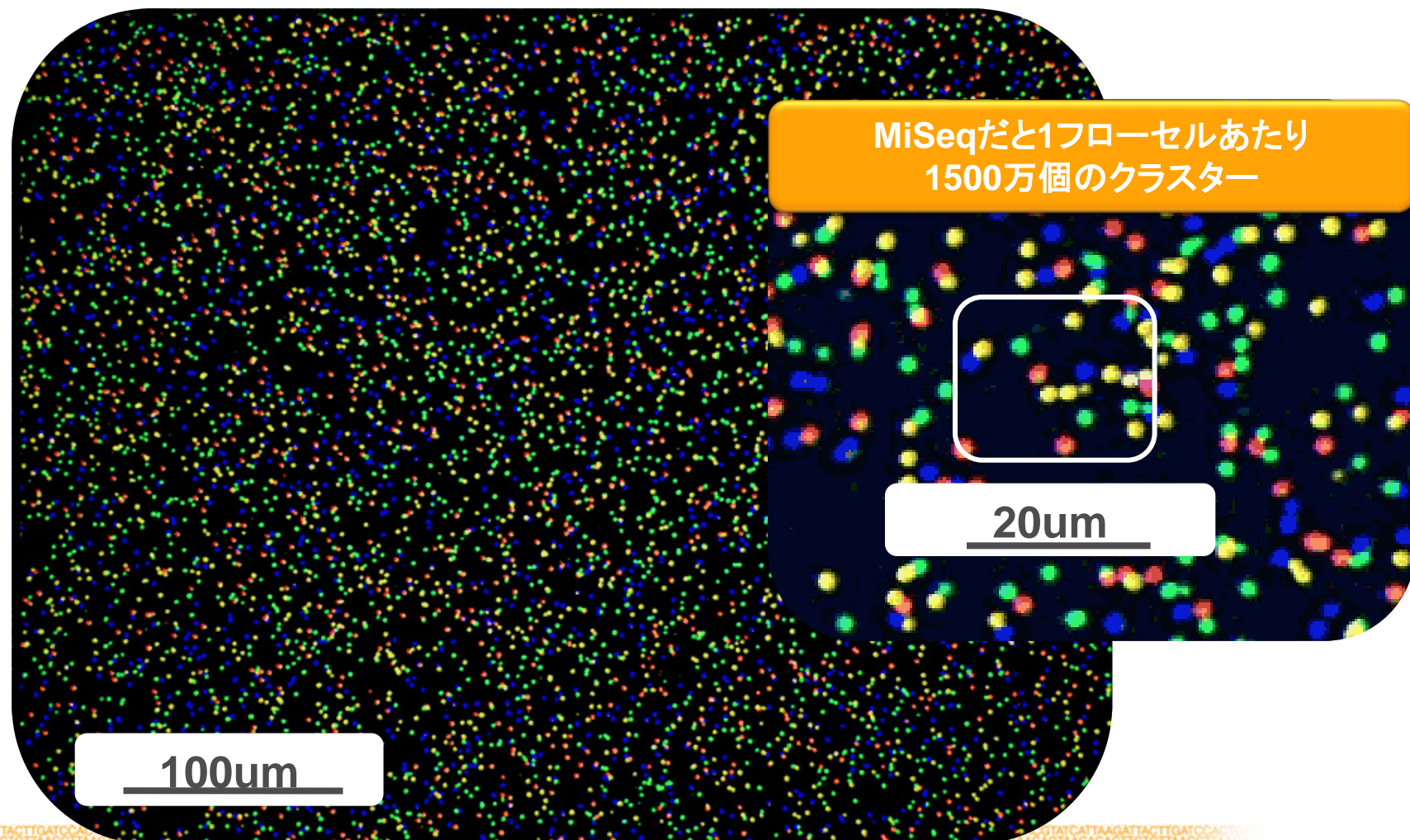
Cycle 1

- ▶ シーケンス試薬の添加
- ▶ 1塩基伸長反応
- ▶ 未反応試薬の除去
- ▶ 蛍光シグナルの取り込み
- ▶ 保護基と蛍光の除去



4. データ解析： データを総合して塩基配列を得る

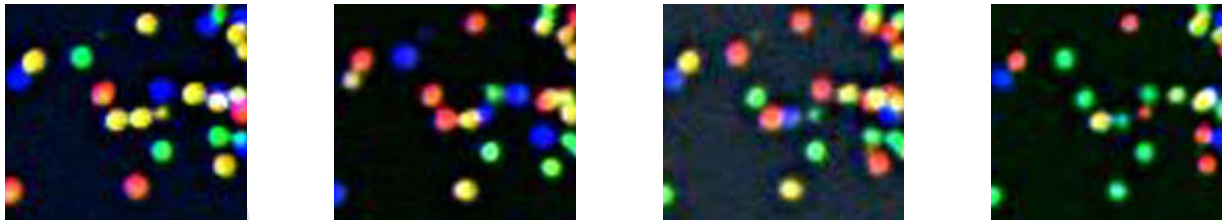
- ▶ 1回のサイクル終了後のイメージ



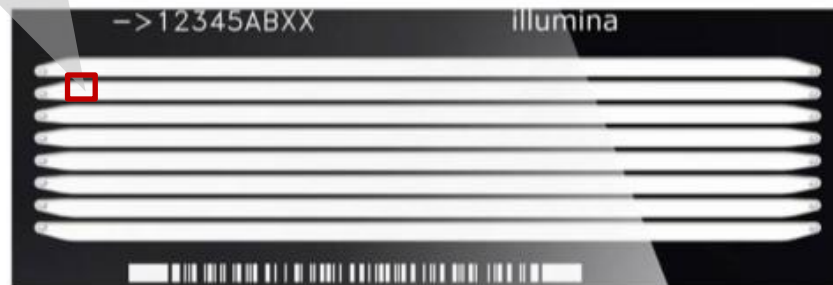
4. データ解析： データを総合して塩基配列を得る

- ▶ 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

サイクル 1-4



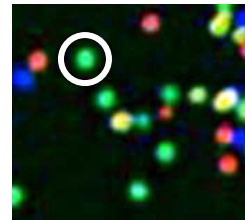
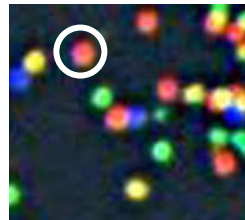
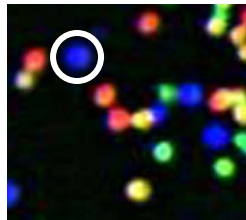
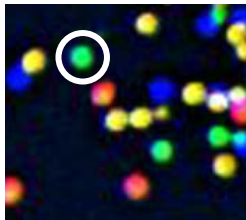
= 28 clusters



4. データ解析： データを総合して塩基配列を得る

- ▶ Quality scores (Q Scores) がすべての塩基に割り当てられる

サイクル 1-4



= **TGCT**

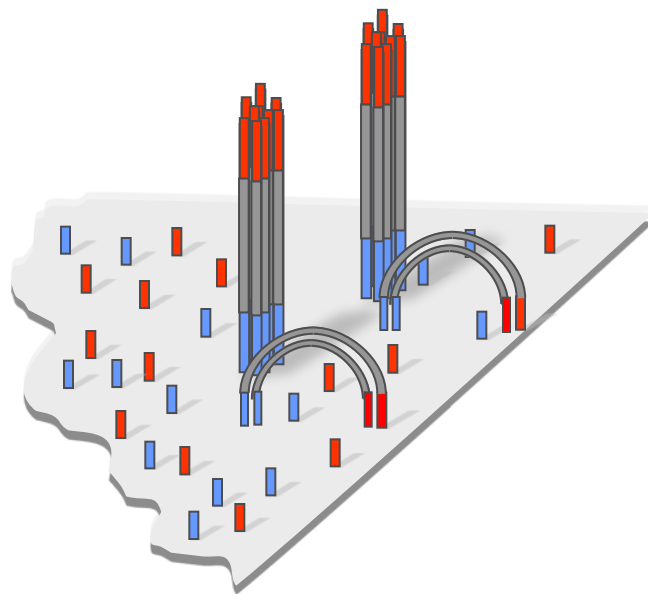
- ▶ Q scores はそれぞれの塩基が不正確にBaseCallされる可能性を示す

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



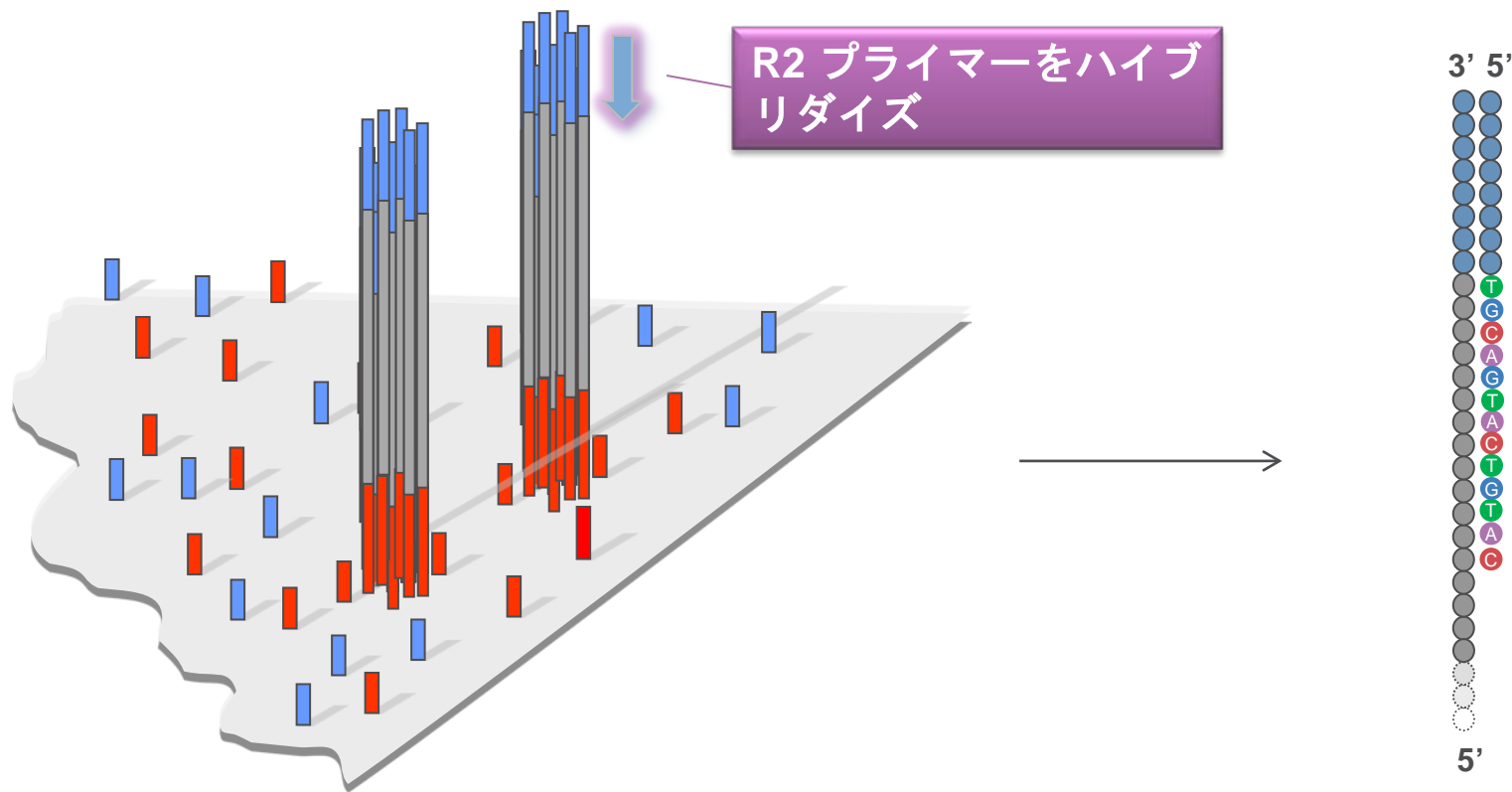
イルミナシーケンサーでアウトプット量を大きくするための工夫

Read1が終わった後、クラスターの再形成を行う



クラスターを再合成する

逆側からのシーケンス = Read2

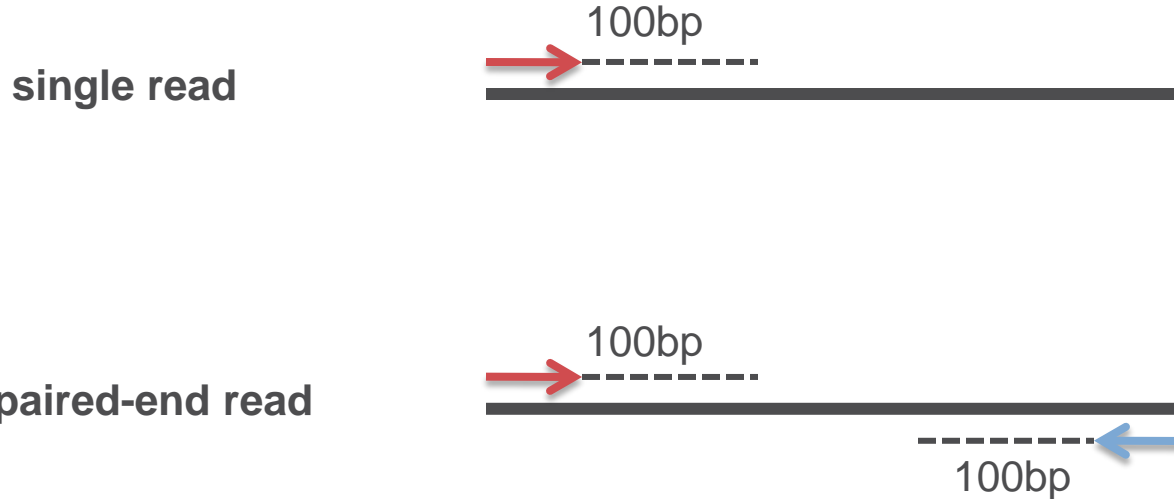


フローセル上のクラスター

1分子での例

ペアエンドリードの利点：両端からユニークリードが得られる

ということはアウトプット量が2倍に！



その2：多サンプル解析（マルチプレックス解析）

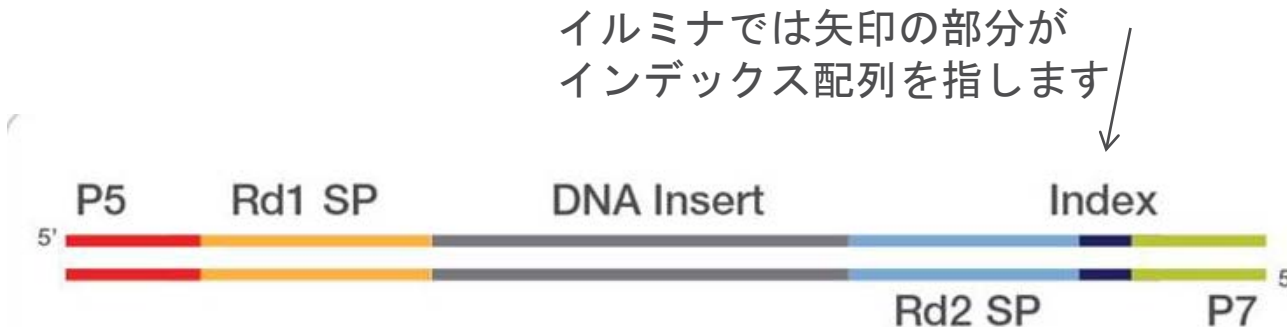
Indexシーケンシングとはなにか？

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

ということとは？

→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ればよい（de-multiplex）→**多サンプル解析(multiplex analysis)**が可能

インデックスを持つDNAライブラリーの例



Indexシーケンシングとはなにか？

最多24サンプルか96サンプルの多サンプルの同時解析が可能です！

ということは？

→ 1サンプル当たり、より経済的に安価に解析が可能です！

より具体的には、

1サンプルにつきデータ量がたくさん要らないサンプルについて
まとめて多くのサンプルを解析できる

別なサンプル
必要なデータ量: 1Gbases

別なサンプル
必要なデータ量: 1Gbases

必要なデータ量: 1Gbases

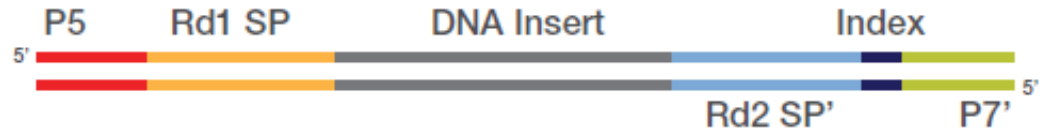
MiSeq Output: max 8Gbases

残った部分のデータは
実質捨ててしまう

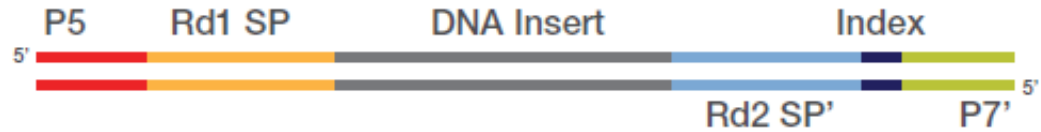
マルチプレックス解析がどのように行われるか



マルチプレックス解析がどのように行われるか



マルチプレックス解析がどのように行われるか

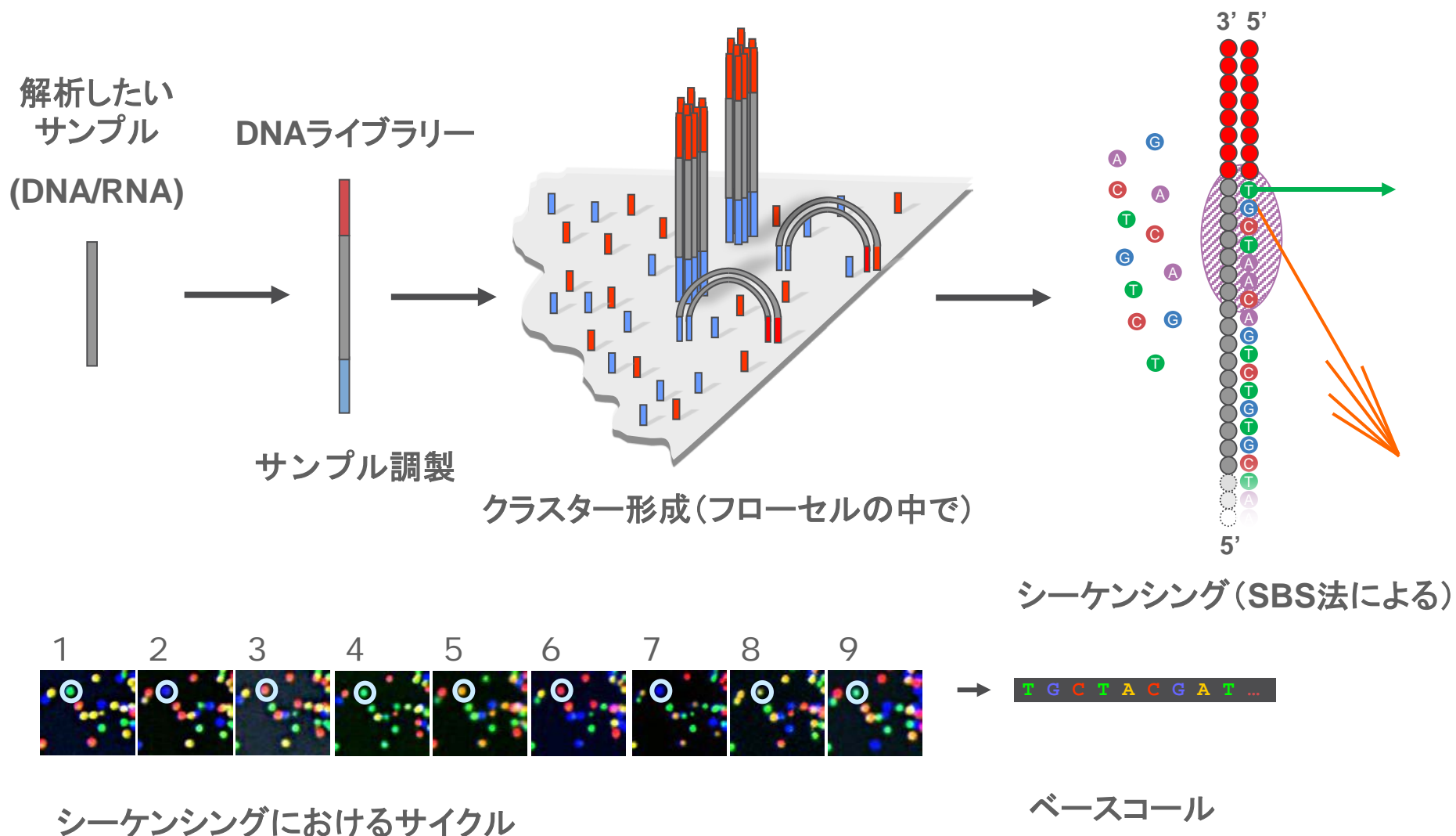


多サンプル解析に関してもっと知りたい場合には

サポートウェビナー：Dual Indexを持つLibraryのシーケンサーセットアップ
(pdfのダウンロードのみも可能です)

2013/8/2 15:00-15:45	サポートウェビナーシリーズ 2013: 「MiSeqを使用した実験計画：サンプル調製とワークフロー」 イルミナ株式会社 シニア テクニカル アプリケーション サイエンティスト 酒井名朋子	Register Now	
2013/7/19 15:00-15:45	サポートウェビナーシリーズ 2013: 「イルミナ SBS (Sequencing By Synthesis) ケミストリーのご紹介」 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 小林孝史	Register Now	
2013/4/19 15:00-15:45	サポートウェビナーシリーズ 2013: 「塩基に偏りのある配列をMiSeqでシーケンスするには」 イルミナ株式会社 シニア テクニカル アプリケーション サイエンティスト 酒井名朋子	WebEx 録画	PDF ダウンロード
2013/4/5 15:00-15:45	サポートウェビナーシリーズ 2013: 「カスタムLibraryをデザインするには」 イルミナ株式会社 シニア テクニカル アプリケーション サイエンティスト 酒井名朋子	WebEx 録画	PDF ダウンロード
2013/3/22 15:00-15:45	サポートウェビナーシリーズ 2013: 「PhiXを使用してRun Qualityを改善する」 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 渡辺真子	WebEx 録画	PDF ダウンロード
2013/3/1 15:00-15:45	サポートウェビナーシリーズ 2013: 「Dual Indexを持つLibrary のシーケンサーセットアップ」 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 小林孝史	WebEx 録画	PDF ダウンロード
2013/2/15	サポートウェビナーシリーズ 2013:		

本日のまとめ：イルミナシーケンサーのワークフロー



参考文献

- ▶ 細胞工学別冊：「次世代シーケンサー 目的アドバンストメソッド」
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/applications/sequencing.ilmn>から
シーケンスサンプル調製キットセクター（目的のアプリケーションに沿ったキット）
 - <http://www.illumina.com/support/training.ilmn>（ウェブ上でトレーニング、英語）
 - MyIllumina（弊社サイト内）からユーザーガイドのダウンロード
 - サポートメールニュース、イルミナからのお知らせメール（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