

NGSの新たな利用法 Tailed PCR法を用いたライブラリー調製

June 13, 2014

本資料はwebinar後、下記リンク上にアップロードいたします。

http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss



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

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, 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®



ターゲットシーケンスとは？

全ゲノムシーケンス

特長

- ゲノム全領域をシーケンス
- ゲノム全体にわたる変異解析

考慮すべき点

- サンプルスループット
- カバレッジは通常 30x程度
- シーケンス費用がかかる

例

- ヒト全ゲノムシーケンス
- 微生物 de novo シーケンス
- 動植物リシーケンス など

ターゲットシーケンス

特長

- 領域を絞ってシーケンス
- 高いカバレッジの解析が可能
(低頻度変異の検出など)

考慮すべき点

- 領域外の変異情報のアクセス
- ゲノム網羅的解析（コピー数）が難しい
- カバレッジにむらがある
- 前処理（ライブラリー調製）に工夫が必要

例

- エクソームシーケンス
- 疾患別パネル
- 16S 菌叢解析 など

Tailed PCR法を選ぶか、TruSeq キットを選ぶか？

Tailed-PCR法

ターゲット領域が300bp~700bp (最終的なライブラリーサイズが430-830bp程度)

インデックスの数を96よりも (任意の配列で) 増やしたい

カスタムシーケンスプライマーを使用したい

断片の両端にプライマーを設計できる配列がある

フルサポートではないことをご了承いただける

TruSeq kitを使用 (COVARISによる断片化の行程をスキップする)

ターゲット領域が300bp~700bp (最終的なライブラリーサイズが430-830bp程度)

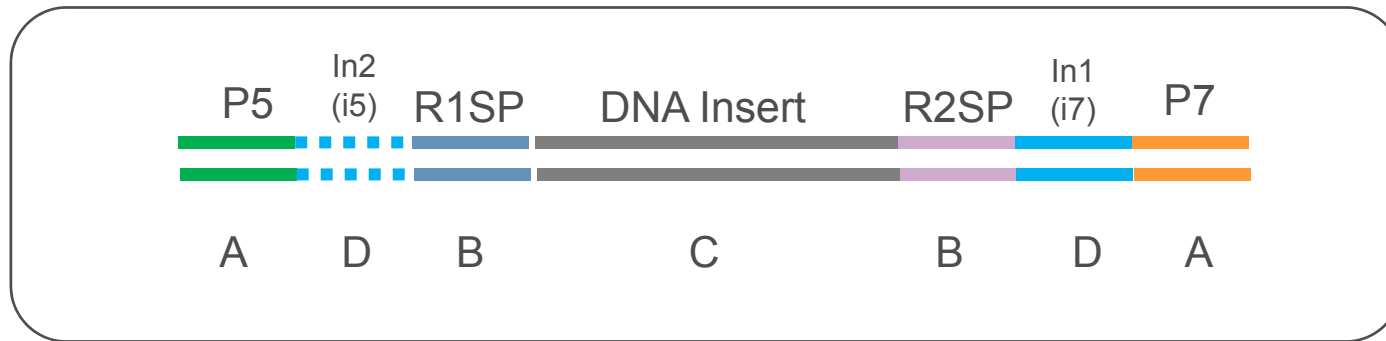
インデックスの数は96以下でよい

PCR断片としてサンプルを持っている

断片の両端の配列がランダム、変異がとても多いなどプライマー設計が難しい

フルサポートが可能である

イルミナシーケンサーで解析するのに必要な構造



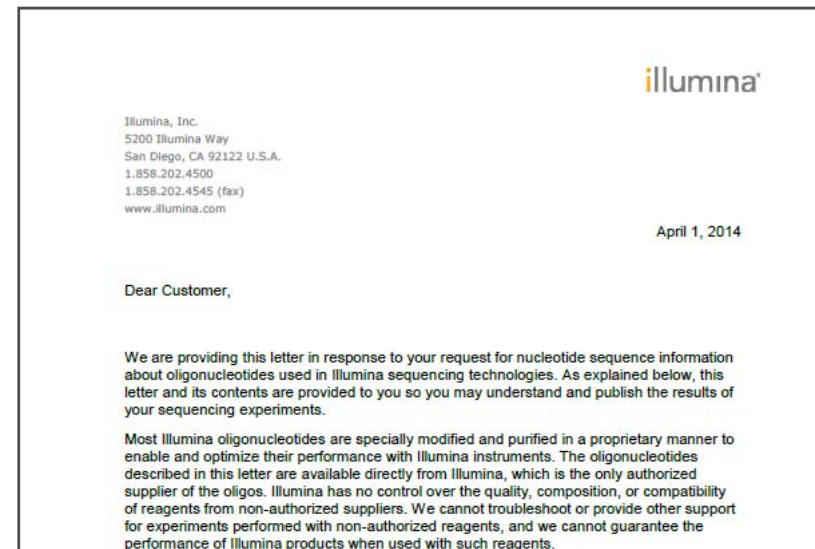
どれも必要な配列

- A: フローセルに結合するために必要な配列
- B: シーケンスプライマー結合配列
- C: 実際に解析される配列（インサート）
- D: インデックス配列（多サンプル解析に対応）

弊社キットのアダプターの配列は
下記のリンクで公表しております。

（MyIlluminaの登録が必要）

<http://support.illumina.com/downloads/illumina-customer-sequence-letter.ilmn>



どのアダプター配列を参照するか？

- 1) TruSeq adapter GAllx/HiSeq/NextSeq/MiSeqのすべてで使用できる
プライマーは自作

- 2) Nextera adapter GAllx, HiSeq (HighOutput, V3 kit)以外で使用できる
GAllx, HiSeq (HighOutput, V3 kit)使用の場合は
TruSeq Dual Index Primer Kitが必要

2-Step法を用いる場合はNextera XT Index kitを使用できる

- 3) Custom adapter 論文などを参照して設計する (プライマーは自作)

トラブルシュートが難しい

1) TruSeq adapter配列を参照する

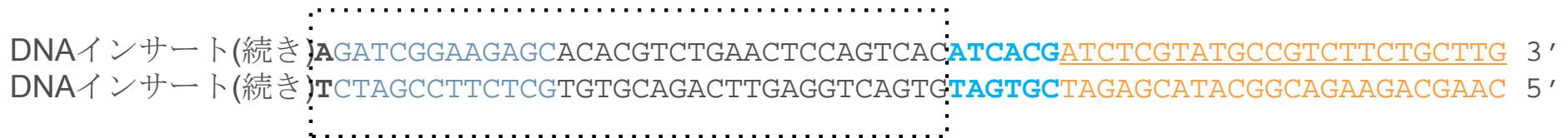
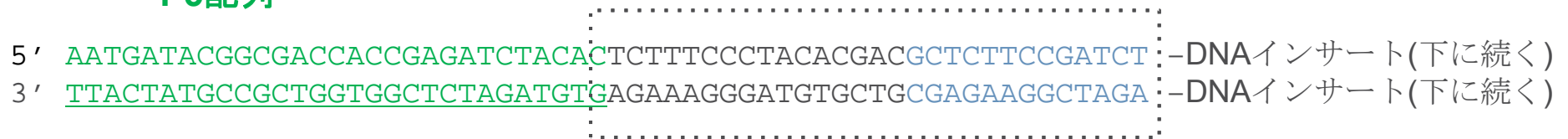
GTATCATACGATTAATTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
ACTGACACACTTGTGTTAAGGTTAGATTAATGTTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
GTTGCAACAGTAAAGAGACTTGGTTAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
CTTCAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
CAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
CTTCAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
CTTCAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT
GTATCATTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAACGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCCATTAAGGAGTACCGGTTCCAGCCGCAAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTACGCTTAAGCGAAGGTATCATTAAGATTACT

TruSeq Adapterを参考にする場合 (図はLTキットを参考にしたもの)

下記塩基配列が DNAインサート と書いた両端についたDNAを調製すれば解析可能

P5配列*

R1 Seq Primerが→向きに結合**



Index1 Seq Primerが →向きに結合**
R2 Seq Primerが ←向きに結合**

Index***

P7配列*

- *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鋳型増幅（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、MiSeqシーケンス後にサンプルごとにデータを分離できる



TruSeq Adapter) 設計されるべきプライマー配列の一例

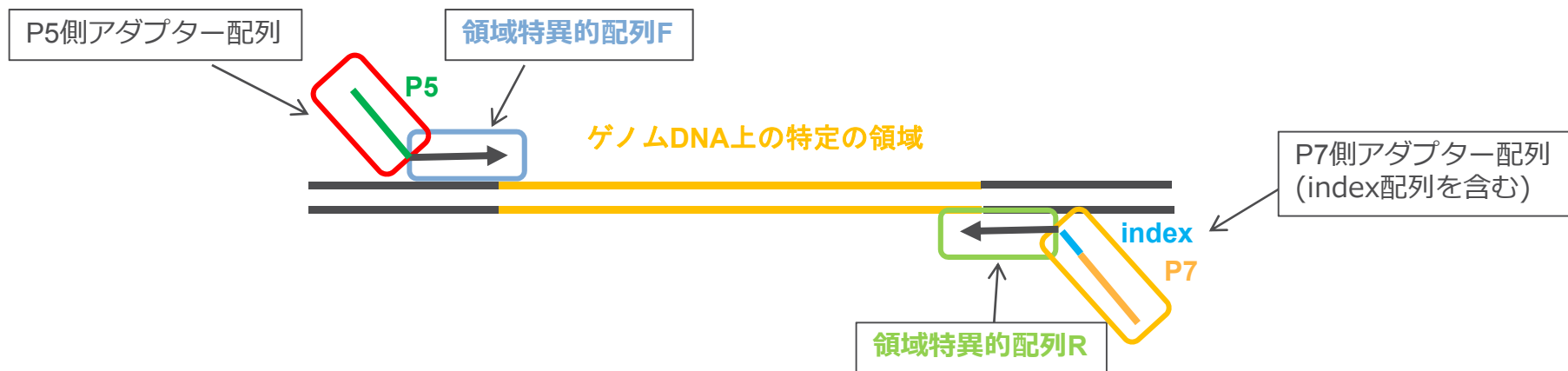
1-Step PCR

Tailed-PCR Forward Primer :
58 mer (P5側アダプター) + **領域特異的配列F** ⇒ 合計 ~ 80 mer ほど

5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT - (領域特異的配列F)

Tailed-PCR Reverse Primer :
64 mer (P7側アダプター) + **領域特異的配列R** ⇒ 合計 ~ 90 mer ほど

5' - CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [index] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT - (領域特異的配列R)



TruSeq Adapter) 設計されるべきプライマー配列の一例

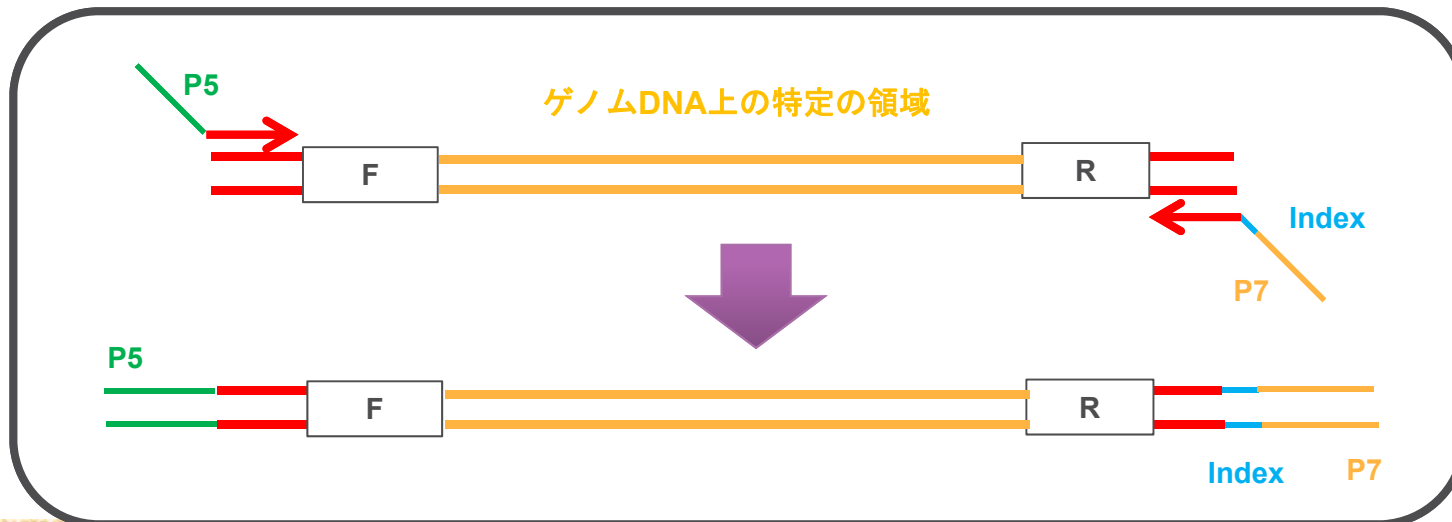
2-Step PCR

1) 1st round PCR

1 st PCR-F	5' - TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- (領域特異的配列F)
1 st PCR-R	5' - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- (領域特異的配列R)

2) 2nd round PCR (プロジェクト間で併用可能)

2 nd PCR-F	5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
2 nd PCR-R	5' - CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [<u>index</u>] <u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>



TruSeq Adapter) 1-Step PCRと2-Step PCRのどちらを選ぶか？

1-Step PCRを用いた方法

- ・ 実験ステップが少ない
- ・ PCRによるバイアスがより小さい
- ・ 長鎖のプライマーの作製が必要であるためコストが割高（HPLC精製以上）
- ・ 作製後にインデックスのスイッチができない

2-Step PCRを用いた方法

- ・ 実験ステップが多くなるためPCRによるバイアスがかかりやすくなる
- ・ プライマーが比較的短くなるためコストが割安
- ・ 1st round PCRの産物を取っておけば、インデックスを変えて再度解析可能

どちらもに共通する注意点

- ・ PCRでの増幅がうまくいかなかった際に、
①長鎖プライマーが原因か②領域が増幅しにくい配列かの切り分けが困難
(1-stepが顕著)

2) Nextera adapter配列を参照する

GTATCATACGATTAATTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT
ACTAACACACTTGTGTTAAGCTTAAAGATTGTTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT
GCTGCAACAGTAAAGAGACTTGGTTAAGCTTAAAGATTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT
CTTCCACCTTAAAGATTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT
CAACCTTAAAGATTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT
TTAAAGCTTAAAGATTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT
GTATCATACGATTAATTGATCCACTGATTCAGGCTTACCGGANDGTATCAATGAGACTAAATAATAAGGTATCATTAAGAGGCTACCGGTCCAAAGCCGAAAGAAATGATAAAGCTTAAACACACTTCTGTTACGCTTAAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTACT

16S Metagenomics Sequencing Library Preparationを参照して設計

▶ イルミナで公式にリリースした

16S rRNA 菌叢解析プロトコール

– 16S解析用のライブラリー調製プロトコール

2-Step PCRを用いた方法

Nextera XT Index kit V2でインデックス配列を付加することにより**384サンプルまでの同時解析が可能**。

(Nextera XT Index kit V2 Set A-Dの購入が必要)

サポートウェビナー開催しました！

2014/05/09

NGSの新たな利用法

「16S rRNA メタゲノム解析のポイント プロトコールのご紹介」

イルミナ株式会社 テクニカル アプリケーション サイエントリスト
小林孝史

16S rRNAメタゲノム解析とは、環境サンプルなどから含まれる生物種について網羅的に解析する方法です。イルミナ本社で2013年に公表されました16S rRNAメタゲノム解析について、そのプロトコールの詳細および特長などを解説します。

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System

Introduction	2
16S Library Preparation Workflow	5
Amplicon PCR	6
PCR Clean-Up	8
Index PCR	10
PCR Clean-Up 2	13
[Optional] Validate Library	15
Library Quantification, Normalization, and Pooling	16
Library Denaturing and MiSeq Sample Loading	17
MiSeq Reporter Metagenomics Workflow	20
Supporting Information	21

IMPORTANT NOTICE This document provides information for an application for Illumina technology that has been demonstrated internally and may be of interest to customers. This information is provided as-is and is not an Illumina product and is not accompanied by any rights or warranties. Customers using or adapting this information should obtain any licenses required and materials from authorized vendors. Illumina products mentioned herein are for research use only unless marked otherwise. While customer feedback is welcomed, this application is not supported by Illumina Technical Support and Field Application Scientists.

Part # 15044223 Rev. A

Page 1

プロトコール(pdf): <http://res.illumina.com/documents/products/appnotes/16s-metagenomic-library-prep-guide.pdf>

任意のターゲット領域を増幅させるためのプライマー

Forward Primer:

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG- {ターゲット領域特異的な配列}

オーバーハング突出配列

ターゲット領域特異的な配列

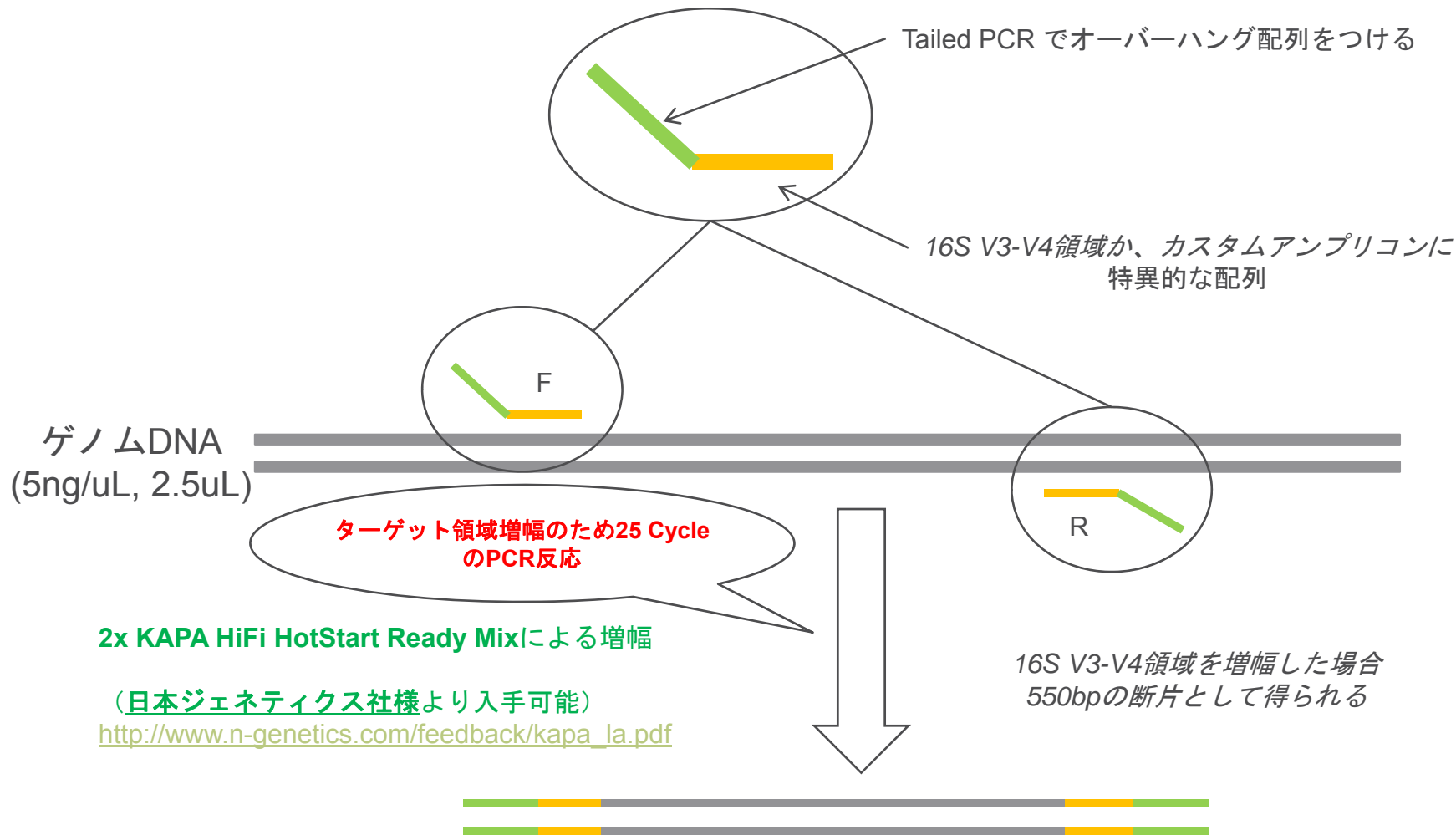
Reverse Primer:

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG- {ターゲット領域特異的な配列}

プライマーの5'末端に緑の配列を付加する。ターゲット領域は特定の領域を示す。
ターゲット領域<~550bp PCR断片

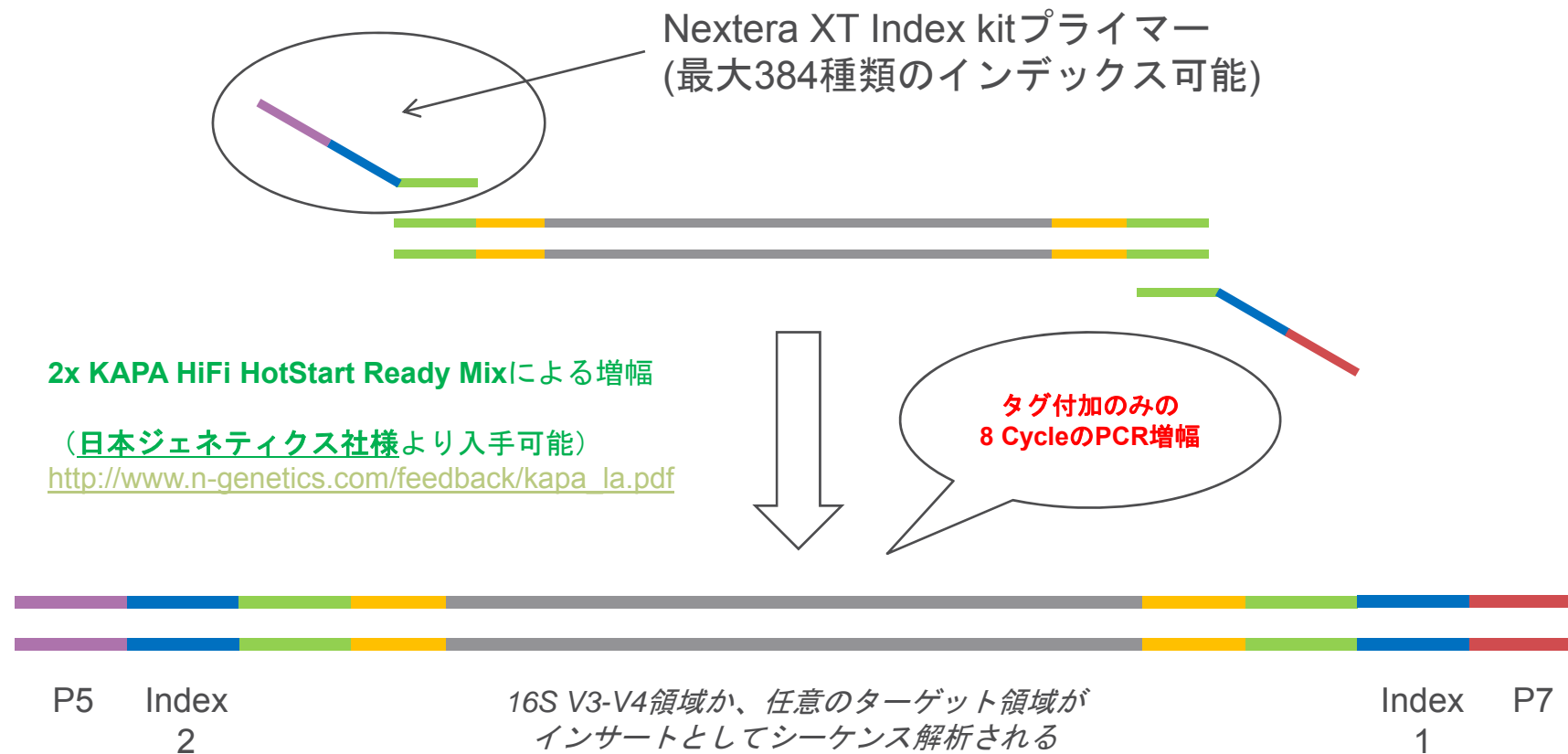
Step 1: 目的の領域を増幅する 1 番目のPCR

5'末端にオーバーハング配列を含むプライマーを使用



50uLのPCRプロダクト(余剰プライマーを除く AMPure Beads精製後)のうち、5uLを次のPCR反応に用いる

Step 2: イルミナNextera XT Index Kit を使用して、シーケンスに必要なアダプター配列を付加する



16S V3-V4領域を増幅した場合630bpのライブラリーが調製される

余剰プライマーを除くAMPure Beads精製後25uLの溶液として産物が得られるため、一部を変性してプールする。



3) Custom adapter配列を作製する

GTATCATAGATTAATTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGGTATCATTAAAGATTA
ACTGACACACTTGTGTTTAGCGTTAGAGATTGTTGTTCCACTGATTCGACGTAAAGGATTAAGTTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGG
CTGTCAGGTTAGAGACTTGTGTTTAGCGTTAGAGATTGTTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGG
CTTAAAGGTTAGAGACTTGTGTTTAGCGTTAGAGATTGTTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGG
CAAGGTTAGAGACTTGTGTTTAGCGTTAGAGATTGTTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGG
TTAAAGGTTAGAGACTTGTGTTTAGCGTTAGAGATTGTTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGG
GTATCATAGATTAAGGTTACTGATCCACTGATTCAGGTTACCGTAAAGAGGATTCATTAAGAGGTTACCGTTCCAGGCGGAAAGAAATGATAAAGATTAACGACACTTCTGTTAGCCTTAAGCGAAGGTTATCATTAAGGATTA

参考文献1：血漿DNAからのターゲットシーケンス



Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA

Tim Forshew *et al.*

Sci Transl Med 4, 136ra68 (2012);

DOI: 10.1126/scitranslmed.3003726

- ▶ ケンブリッジ大学Rosenfeldラボ他からの文献
- ▶ **tagged-amplicon deep sequencing (TAm-Seq)** という手法を開発。PCRでイリミナ次世代シーケンサー用のライブラリーを作製
- ▶ 癌患者に見られる血中癌細胞由来DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)のディープシーケンスを実施
- ▶ TP53, EGFR, BRAF, KRAS など合計5995塩基をターゲットとして、38名の患者から採取した血漿を解析
- ▶ TP53では 2% から 65% の変異を検出
- ▶ 一人の患者ではEGFRでは腫瘍の発見される15ヶ月前から血漿中のDNAに変異が検出

参考文献1：血漿DNAからのターゲットシーケンス

一般的な2-Step PCR

Table S1: Target-specific primers. Each target-specific primer consists of a universal 5' end and a target-specific 3' end as follows:

5' **ACACTGACGACATGGTTCTACA** [Target Specific-Forward]-3'.

5' **TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT** [Target Specific-Reverse]-3'

疾患に関連した遺伝子のターゲット領域に合わせたプライマーを設計

Gene name and Amplicon ID	Target Specific Primer – Forward	Target Specific Primer- Reverse	Chr	Amplicon Start	Amplicon End
PIK3CA_E00001077674 *	CAGAGGGGAAAAATATGACAAA	AACAGAGAATCTCCATTTTAGCAC	3	178935943	178936150
PIK3CA_E00001139987	TGAGCAAGAGGCTTTGGAGT	GGTCTTTCCTGCTGAGAGT	3	178952038	178952227

10 ng human genomic DNAをテンプレートにする

35 cycle のPCR (Step1)

FastStart High Fidelity Enzyme Blend (Roche)を使用。

(次ページ) Step2のPCRへ

ForsheW T, et al., Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012 May 30;4(136):136ra68.

参考文献1：血漿DNAからのターゲットシーケンス

Table S2: Unique sequencing barcodes. Platform-specific adaptors and barcodes are attached through PCR following the single-plex amplification step. The primers consisted of the PE1 and PE2 sequences for Illumina cluster generation, a 10-bp barcode, and the CS1 and CS2 adaptors, used in pairs: PE1-CS1 with PE2-BC-CS2, and PE1-CS2 with PE2-BC-CS1.

P5配列に相当 : AATGATACGGCGACCACCGAGATCT. AACTGACGACATGGTTCTACA
 P7配列に相当 : CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT. Barcode TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT

Barcode name	Barcode sequence	FLD0060	GCACGTAGCT	FLD0121	CAGAGCTAGT
FLD0001	GTATCGTCGT	FLD0061	TCACGCTATG	FLD0122	CGCAGAGCAT
FLD0002	GTGTATGCGT	FLD0062	CGTACTACGT	FLD0123	TGTACAGCGA
FLD0003	TGCTCGTAGT	FLD0063	CAGCTGAGTA	FLD0124	ACGTCAGTAT
		FLD0064	GAGATCAGTC	FLD0125	TCACAGCATA

384種類、10塩基のバーコード（インデックス）配列

15 cycle のPCR (Step2)

FastStart High Fidelity Enzyme Blend (Roche)を使用。

AMPure Beadsで精製 (PrimerやPrimer dimerを除く)

5'- AACTGACGACATGGTTCTACA |
 5'- TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT |

カスタムプライマーを設計し、シーケンスを行う

Forshe T, et al., Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012 May 30;4(136):136ra68.

参考文献2 : MiSeq/HiSeqを使用した16S metagenomics

- ▶ 16S V4 領域をカスタムプライマーで増幅
- ▶ インデックス配列は 2168 種類記載
- ▶ HiSeq, MiSeq に対応
- ▶ カスタムプライマーでシーケンス (別途合成が必要)
- ▶ MiSeq では PhiX コントロールを 約50% (この時は47%)混ぜてラン
- ▶ 実際のサンプルシートの作成方法やランの仕方 まで supplementに 記載されている。
- ▶ データ解析はMiSeq Reporterでは無く、著者らが開発したQIIMEというソフトウェアを使用

Open

The ISME Journal (2012), 1–4
© 2012 International Society for Microbial Ecology. All rights reserved. 1751-7362/12
www.nature.com/ismej

SHORT COMMUNICATION

Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms

J Gregory Caporaso¹, Christian I. Lauber², William A Walters³, Donna Berg-Lyons⁴, James Huntley⁴, Noah Fierer^{2,5}, Sarah M Owens⁶, Jason Betley⁷, Louise Fraser⁸, Markus Bauer⁹, Niall Gormley⁷, Jack A Gilbert¹⁰, Geoff Smith¹¹ and Rob Knight^{12,13}

¹Department of Computer Science, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA; ²Cooperative Institute for Research in Environmental Sciences, UCB 216, University of Colorado, Boulder, CO, USA; ³Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, UCB 347, University of Colorado, Boulder, CO, USA; ⁴Colorado Initiative in Molecular Biotechnology, UCB 347, University of Colorado, Boulder, CO, USA; ⁵Department of Ecology and Evolutionary Biology, UCB 334, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA; ⁶Argonne National Laboratory, Argonne, IL, USA; ⁷Illumina Cambridge Ltd., Chesterford Research Park, Saffron Walden, Essex, UK; ⁸Department of Ecology and Evolution, University of Chicago, Chicago, IL, USA; ⁹Department of Chemistry and Biochemistry, UCB 215, University of Colorado, Boulder, CO, USA and ¹⁰Howard Hughes Medical Institute, University of Colorado at Boulder, UCB 215, Boulder, CO, USA

DNA sequencing continues to decrease in cost with the Illumina HiSeq2000 generating up to 600 Gb of paired-end 100 base reads in a ten-day run. Here we present a protocol for community amplicon sequencing on the HiSeq2000 and MiSeq Illumina platforms, and apply that protocol to sequence 24 microbial communities from host-associated and free-living environments. A critical question as more sequencing platforms become available is whether biological conclusions derived on one platform are consistent with what would be derived on a different platform. We show that the protocol developed for these instruments successfully recaptures known biological results, and additionally that biological conclusions are consistent across sequencing platforms (the HiSeq2000 versus the MiSeq) and across the sequenced regions of amplicons.

The ISME Journal advance online publication: 8 March 2012; doi:10.1038/ismej.2012.8

Subject Category: microbial ecology and functional diversity of natural habitats

Keywords: illumina; barcoded sequencing; QIIME

DNA sequencing cost continues to decline: a vast price per sequence decrease on Illumina HiSeq2000 and MiSeq platforms further supports democratization of sequencing (Trings and Gupenholzer, 2009). Interest in amplicon sequencing on Illumina is growing (Bartram *et al.*, 2011; Caporaso *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011), largely due to lower cost per sequence than other platforms, enabling high-throughput microbial ecology at the greatest coverage yet possible. Although some technical issues exist with community sequencing, such as PCR primer biases and differential DNA extraction efficiency from different organisms in complex communities, these techniques continue to vastly expand our understanding of the microbial world.

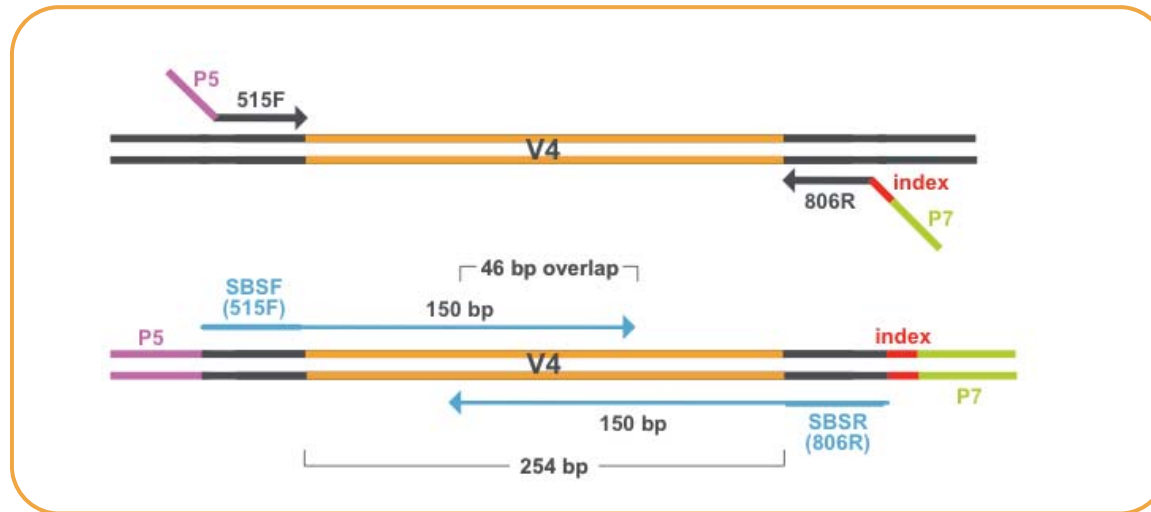
Here we present an amplicon sequencing protocol for the HiSeq2000 and MiSeq platforms, and apply this protocol to sequence host-associated and free-living microbial communities to verify that biological conclusions drawn from the data are consistent across platforms and sequence reads. The HiSeq and MiSeq platforms differ markedly in scale. The HiSeq2000 produces >50 Gb per day, and in the course of a 10.8 day run produces 1.6 billion 100-base paired-end reads. By contrast, the MiSeq is for single-day experiments, and generates 1.5 Gb per day from 5 million 150-base paired-end reads. Our results capture known differences between microbial communities on each platform; biological conclusions drawn are consistent across platforms and sequence reads. This protocol is therefore ready for widespread use in microbial community analysis, such as by the Earth Microbiome Project (Gilbert *et al.*, 2010), which has adopted it for amplicon sequencing. Details on the sequencing protocol are provided as Supplementary Methods.

Twenty-four samples were sequenced on three paired-end Illumina HiSeq2000 lanes, and in one paired-end MiSeq run. The samples represented soil (source: USA; n=8) and several host-associated environment types: human feces (source: USA;

Correspondence: R Knight, Howard Hughes Medical Institute, University of Colorado at Boulder, UCB 215, Boulder, CO 80309, USA.
E-mail: rsknight@colorado.edu
Received 12 September 2011; revised 13 January 2012; accepted 19 January 2012

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

参考文献2 : MiSeq/HiSeqを使用した16S metagenomics



<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/>

Forward Primer は 60 mer

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC _TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA

P5配列

16S V4領域を増幅する
ための配列
Mは A/C の MIX 塩基

Reverse Primer は 68 mer

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TCCCTTGTCTCC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT

P7配列

インデックス
1 2 塩基

16S V4領域を増幅する
ための配列
H は A/C/T の MIX 塩基
V は A/C/G の MIX 塩基
W は A/T の MIX 塩基



2 1 6 8 種類の組み合わせ



参考文献2 : MiSeq/HiSeqを使用した16S metagenomics

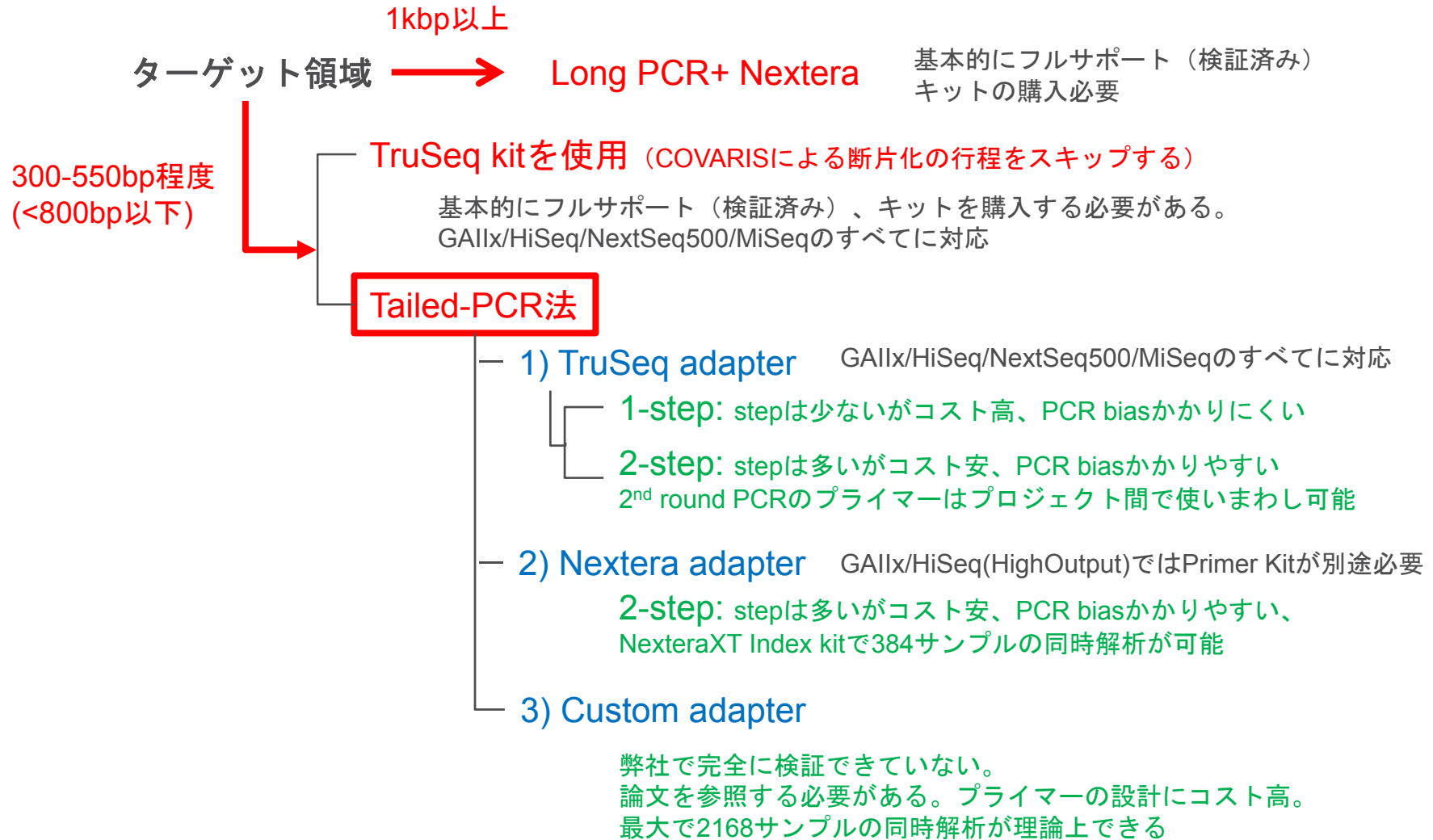
- ▶ **Read 1 sequencing primer:** TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
- ▶ **Read 2 sequencing primer:** AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
- ▶ **Index sequence primer:** ATTAGAWACCCBDGTAGTCC GG CTGACTGACT

MiSeq cartridgeプライマーとカスタムシーケンシングプライマーで解析

PhiX 50%で解析（現在は5%で解析可能）

解析後はQIIMEで情報処理

まとめ



多サンプル解析を実施する際の注意点

インデックスの組み合わせに注意
(カラーバランスが悪いと振り分けの効率が低下します)

サポートウェビナー参照ください！

2013/02/01

サポートウェビナーシリーズ 2013

「Library Poolの際のIndexの選び方」

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

これからイルミナシーケンサーで実験を始めていただく方を対象とした入門セミナーです。

Webinarでは、複数のライブラリーを混ぜる際の、インデックスの組み合わせの選択、Illumina Experiment Managerを用いたインデックスの設定方法などについてご紹介いたします。

変性方法などは右の資料（cBotのユーザーガイド）などを参照し、変性後等量ずつプールください。

（次ページを参照）ライブラリーによってPhiXを添加ください。

TruSeq Amplicon以外でMultiplex PCRは推奨できません。
→サンプル間のクラスター比率が大きく変わるため

Preparing Libraries
for Sequencing on the MiSeq®

FOR RESEARCH USE ONLY

Revision History	3
Introduction	4
Prepare HT1	6
Prepare a Fresh Dilution of NaOH	7
Denature and Dilute DNA	8
Prepare PhiX Control	11
Combine Sample Library and PhiX Control	13
Next Steps	14
Technical Assistance	

ILLUMINA PROPRIETARY
Part # 15039740 Rev. D
October 2013

illumina®

http://support.illumina.com/downloads/prepare_libraries_for_sequencing_miseq_15039740.ilmn

運用に際しての注意点

- ① Tailed-PCR法によるアンプリコンシーケンスはLow Diversityサンプルとなります。
→ サポートウェビナーを参考にPhiX添加(5-30%)、MCS2.2/HCS2.2.38以上をご使用ください。

サポートウェビナー開催しました！

2013/12/06 イルミナサポートウェビナー シリーズ2013
「Low Diversityサンプルを解析するためのテクニック」
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
偏った塩基配列を持つサンプルを解析する際のテクニックについてご紹介するセミナーです。

- ② キットで作製されたライブラリーを解析する場合に比べてサポート範囲が限られます。
下記のようなお問い合わせは基本的にサポートが難しいです。

例) 自作のプライマーの配列が注文した配列と異なった。
シーケンスプライマーがG/C-richでTmが高くなり上手く解析できなかった。
増幅のためのPCR酵素がうまく働かずライブラリーが作製できなかった。
論文のプロトコールについて詳細を教えてください。

- ③ お問い合わせをいただく場合には、細かく実験条件をお知らせください。



ご清聴頂き誠にありがとうございました。
しばらくご質問をいただく時間を設けます。

過去のサポートウェビナー資料は、
下記リンクからダウンロードできます(Recording/Document)。
http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss