

Nextera™ DNA Flex Library Preparation Kit によるヒト全ゲノムシーケンス

血液、唾液、ゲノムDNAなど、ヒト由来サンプルから柔軟かつ迅速にライブラリーを調製し、均一なカバレッジのヒト全ゲノムシーケンス（WGS）を実現

特長

- 迅速で簡単なワークフロー
少ないステップ数と少ない操作でライブラリー調製時間を短縮
- 最適化されたライブラリー調製
ノーマライゼーションの必要がなく、ゲノムDNAや血液、唾液から安定した結果を取得
- サンプル調製の統合
さまざまなサンプルに対して、DNA抽出も統合したワークフローによる効率性とデータの一貫性を向上
- 高品質なデータ
機械的断片化法と遜色ないバイアスの少ないシーケンスデータ



図 1: Nextera DNA Flex Library Prep Kitを用いたヒトWGS-Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは均一なカバレッジをもたらし、ヒトWGSアプリケーションのために信頼できる結果を生み出します。

はじめに

WGSは、320億塩基のヒトゲノムを調べるうえで最も網羅的なバイアスのない方法です。^{1,2}シーケンスコストを大幅に抑え、迅速に大量のデータ出力を可能にするWGSの能力は、ヒトゲノム研究のためのパワフルなツールとなっています。しかし、多くの研究室では次世代シーケンス（NGS）ワークフローのライブラリー調製段階で問題を抱えています。この問題は、ライブラリー調製前後に必要な複数のステップが主な原因です。ライブラリー調製前のステップにはDNA抽出、定量、および断片化があり、ライブラリー調製後のステップにはライブラリー品質確認、ライブラリー定量およびノーマライゼーションがあります。

Nextera DNA Flex Library Preparation KitはNexteraシリーズの中で最新の進化を遂げています。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、ライブラリー調製前後の複数のステップを統合したユニークなケミストリーを特徴としており、イルミナのライブラリー調製製品ラインナップ中で最も少ないステップで最も短時間のワークフローを実現します（図2）。スピードと効率性の向上に加えて、サンプルタイプ、インプット量、およびヒトWGSを含めた幅広い対応アプリケーションに非常に優れた柔軟性を提供します（図1）。

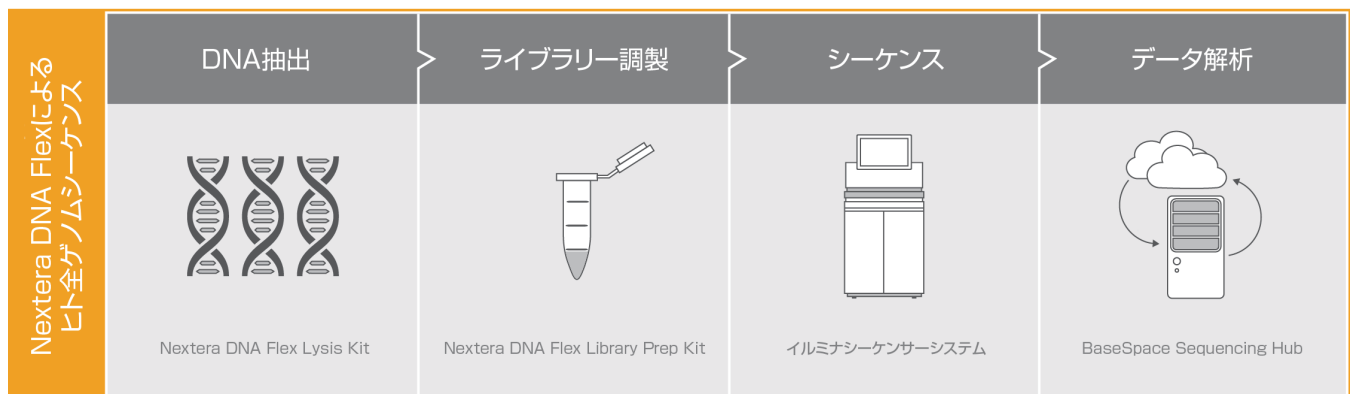


図 2: Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー-Nextera DNA Flexライブラリー調製は使いやすく、血液や唾液の前処理工程を統合し、シーケンスおよびデータ解析を含むスリム化したワークフローの一部です。

TruSeq™ Nano

DNA抽出	DNA定量	DNA断片化	アダプターライゲーションとインデックスタグ付けによるライブラリー調製	ライブラリー定量	手作業によるノーマライゼーションとプール	合計 ~11時間
1時間	0.5時間	1時間	6時間	0.5時間	2時間	

Nextera XT

DNA抽出	DNA定量	Nexteraのタグメンテーションによるライブラリー調製	ビーズ法によるノーマライゼーションとプール	合計 ~5.5時間
1時間	0.5時間	2.5時間	1.5時間	

Nextera DNA Flex

DNA抽出	DNA定量	Nexteraのタグメンテーションと統合されたノーマライゼーションによるライブラリー調製	合計 ~4時間
1時間	0.5時間	2.5時間	

Nextera DNA Flex (血液、唾液)

Flex Lysis Kit	Nexteraのタグメンテーションと統合されたノーマライゼーションによる定量不要なライブラリー調製	合計 ~3時間
0.5時間	2.5時間	

図 3: Nextera DNA Flexによる最短のワークフロー - 16サンプルをマルチチャンネルピペットで一度に処理した場合の時間を算出しています。TWT=DNA抽出からライブラリーノーマライゼーションおよびプールまでの合計ワークフロー時間。具体的な方法を想定し計算されたワークフローステップ時間：DNA抽出 (QIAamp DNA Mini Kit または、Flex Lysis Kit)、DNA定量 (Qubit)、DNAの断片化 (Covaris)、手作業によるライブラリーのノーマライゼーションとプール (Bioanalyzer)。所要時間は、使用機器、サンプル数、自動化法、使用者の経験度によって異なる場合があります。グレーで示したワークフローステップは、ライブラリー調製キットのステップに含まれていません。

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、全てのイルミナシーケンサーと互換性があり、世界の90%以上のシーケンサーデータを生み出している実証された精度のあるイルミナシーケンシング by synthesis (SBS) ケミストリーによって均一なゲノムカバレッジをもたらします*。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、ライブラリー調製、シーケンスおよびBaseSpace™ Sequence Hubによる簡単なデータ解析を含む統合されたNGSワークフローの一部であり (図2)、Nextera DNA Flex Library Preparation KitはヒトWGSアプリケーションにおいて信頼できる結果をもたらします。

最適化されたライブラリー調製

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitの主な進歩は、ビーズ上のタグメンテーションであり、ビーズに結合したトランスポソーム (BLT) を用いて、DNA断片化とイルミナシーケンスプライマーのタグ付けを同時に行います (図 4)。

ビーズ上のタグメンテーションによって、さまざまな重要な利点が得られます：

- 幅広いDNAのインプット量 (100~500 ng) に対し、スタート時のDNAサンプルを正確に定量する必要がなく、時間の節約およびDNA定量とノーマライゼーションの試薬、キット、および機器に関連するコストを削減します。
- 個別のDNA断片化ステップの必要がなく、時間の節約と個別の周辺機器または酵素系キットに関連するコストを削減します。
- 幅広いDNAのインプット量 (100~500 ng) に対し、プールとシーケンス前の個別のライブラリー定量とノーマライゼーションの必要がありません。

さらに、使いやすいワークフローは操作ステップの数を減らし、自動ライブラリー調製用の自動液体分注システムをサポートします。これらのワークフローの利点を統合したことで、Nextera DNA Flexがイルミナのライブラリー調製製品のラインナップ中で最も迅速で少ないステップのワークフローとなっています (図 3)。

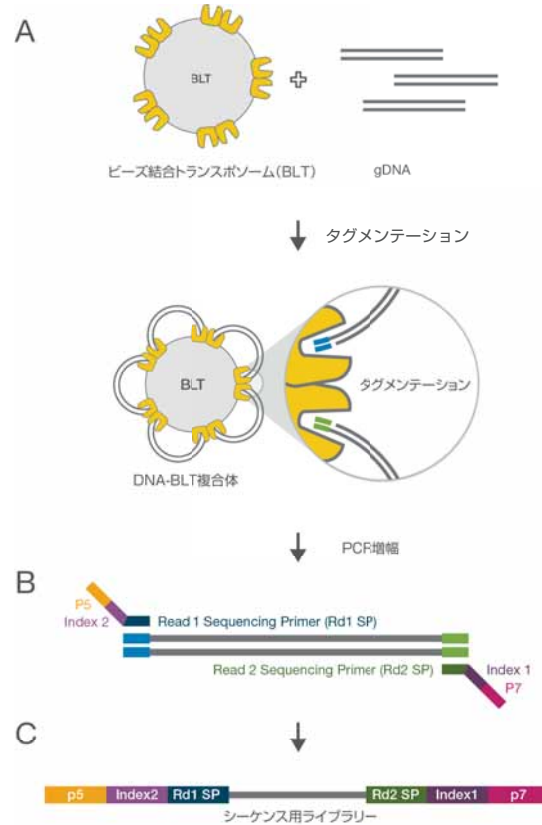


図 4: Nexteraのビーズ上のタグメンテーションケミストリー - (A) BLTによるタグメンテーション。(B) 少ないサイクルのPCRによってシーケンス用DNA断片を増幅し、インデックスとアダプターを付加します。(C) シーケンス用ライブラリーを洗浄しプールします。

*ファイル上で算出されたデータIllumina, Inc., 2015.

サンプル調製の統合

Nextera DNA Flex Lysis Kitを用いることで、採取したばかりの血液や唾液サンプルから直接DNAを抽出でき、時間の節約とコストを削減する一方で、データの一貫性が改善されます。Nextera DNA Flex Lysis Kitは、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit用に最適化され、実証されています。溶解プロトコールは、便利なビーズ法を採用した試薬を用いて行い、必要な操作時間は30分未満であり、Nextera DNA Flexのタグメンテーション反応に直接用います。

最適化されたNextera DNA Flexライブラリー調製の性能を示すために、ヒトの血液および唾液からデュプリケートの8サンプルを回収し、4℃で保存し、回収後24時間以内に処理を行いました。Fragment Analyzerによる品質確認の結果、調製したライブラリーの安定したサイズと濃度を示しています（図5および表1）。

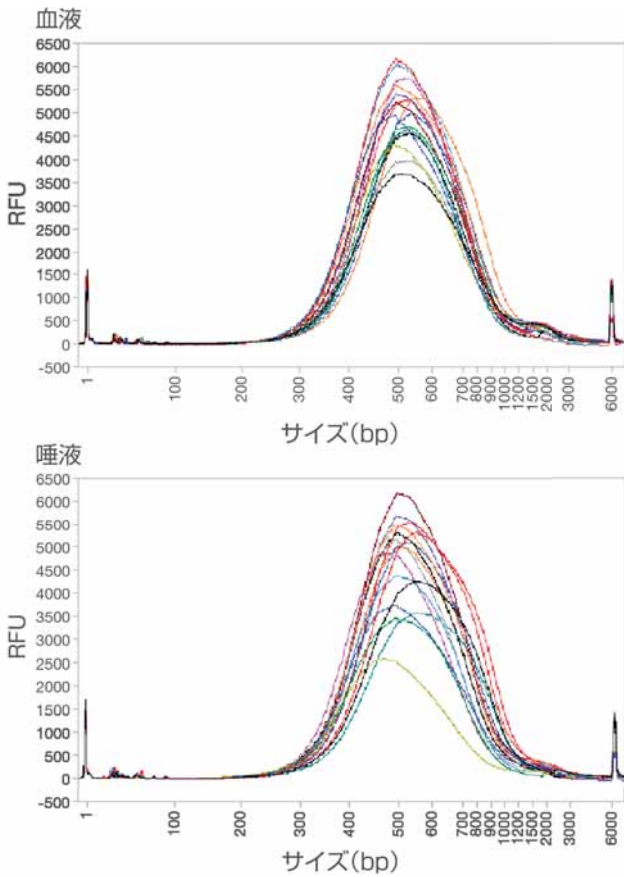


図5: Nextera DNA Flex Librariesの品質確認 -デュプリケートの8サンプル（合計16サンプル）の全血液成分および唾液から調製したライブラリーをFragment Analyzerによって解析します。

表 1: ヒト血液および唾液サンプルに対する定量とライブラリー断片サイズ

	血液	唾液
平均収量（16サンプル） ^a	9.99 ng/μl	8.96 ng/μl
フラグメントサイズ	324	317

a. 定量はQubit dsDNA HS Kitを用いて実施。

高品質なデータ

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、TruSeq Nano DNA Library Preparation Kitに相当するレベルで、バイアスを抑えることでヒトゲノムの均一なカバレッジをもたらす（図6）、かつシーケンスが困難な領域について他にはないカバレッジをもたらします（図7）。Nextera DNA Flex Library Preparation KitはTruSeq Nano DNA Library Preparation Kitで用いられる方法のような、機械的断片化法と同程度の結果をもたらします（表2）。さまざまなパラメーターでデータ品質を更に評価することによって、あらゆるイルミナのシーケンサーにおいて、複数の異なるサンプルタイプから高品質なライブラリーを作製するNextera DNA Flex Library Preparation Kitの性能を示しています（表3）。

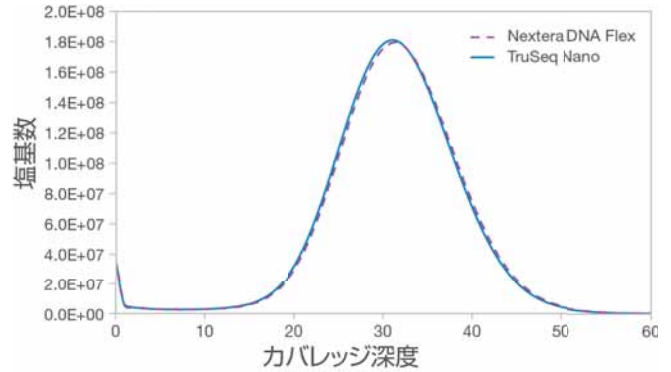


図6: ヒト全ゲノムのカバレッジの均一性 -Nextera DNA Flex Library Preparation KitはTruSeq Nano DNA Library Prep Kitと同様に、ゲノムに均一なカバレッジをもたらします。

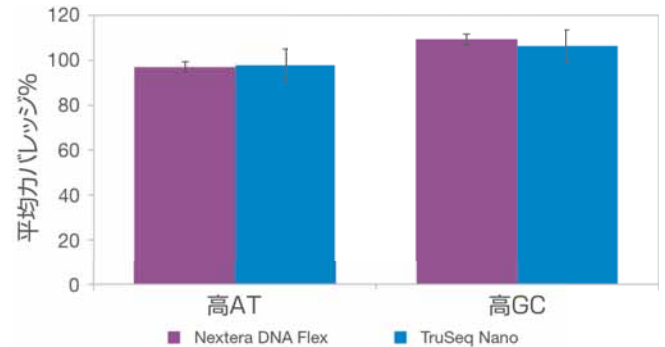


図7: 困難な領域での優れたカバレッジ -Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、TruSeq Nano DNA Library Prep Kitと同様に、高ATコンテンツおよび高GCコンテンツの領域など、困難なゲノムコンテンツについて素晴らしいカバレッジをもたらします。高ATおよび高GCは、それぞれ $\geq 75\%$ のATまたはGCコンテンツのある100塩基として定義しています。

表 2: Nextera DNA FlexおよびTruSeq Nano DNA Library Prep Kitの性能比較

パラメーター ^a	Nextera DNA Flex Library Prep Kit	TruSeq Nano DNA Library Prep Kit
サンプル数	20	20
ラン数	5	4
ペアエンドリードPFの合計数	3.7×10 ⁸	3.7×10 ⁸
常染色体コール率	96.5%	96.9%
エクソンコール率	98.4%	98.4%
> 10×の常染色体率	98.5%	98.6%
SNVコール率	98.7%	98.7%
SNV精度	99.8%	99.7%
Indelコール率	93.7%	92.9%
Indel精度	97.0%	94.9%

a. データは、それぞれのライブラリー調製キットを用いた平均20サンプルのラン。

略語：PF、パスフィルター；SNV、シングルヌクレオチドバリエーション；Indel、挿入/欠失

表 3: サンプルタイプによるNextera DNA Flex性能^a

	HiSeq X™ gDNA	NovaSeq™ gDNA	NovaSeq Blood	NovaSeq Saliva
常染色体コール率 ^b	94.95	95.28	95.40	95.49
常染色体エクソンコール率 ^b	97.33	98.20	98.00	98.20
15×での常染色体カバレッジ率	95.12	95.12	95.30	95.38
15×でのエクソンカバレッジ率	98.20	98.86	98.56	98.77
平均カバレッジ	29.95	29.92	30.12	30.79
インサートサイズ (bp)	338	308	310	311
パスフィルターリード数	732,982,146	764,427,030	754,207,938	931,648,654

a. データ解析は、BaseSpace Sequence Hub Whole Genome Sequencing v5.0 Appを用いて実施。

HiSeq X™ gDNA	NovaSeq™ gDNA	NovaSeq Blood	NovaSeq Saliva
---------------	---------------	---------------	----------------

b. 「PASS」ジェノタイプコールによる非N参照配列位置の割合。コール率は、ジェノタイプコールを行うために必要な品質パラメーターを通過したデータ内のベースコールの割合。塩基品質、アライメントクオリティ、および最小カバレッジ値は考慮されています。

略語：gDNA、ゲノムDNA；bp、塩基対。

まとめ

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、DNA抽出、定量、断片化およびライブラリーのノーマライゼーションを組み合わせた革新的なワークフローを特徴とし、イルミナのライブラリー調製製品のラインナップ中で最短かつ最小ステップ数のワークフローを実現します。ビーズ上のタグメンテーションケミストリーによって、幅広いDNAインプット量、さまざまなサンプルタイプ、幅広いアプリケーションに対するサポートが可能になります。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、機械的断片化法と同等の最小バイアスでゲノムシーケンスの結果をもたらします。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、簡単に使いやすいワークフローで最適化された性能を持ち、ヒトWGSのための理想的なソリューションです。

製品情報

製品名	カタログ番号
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (24 samples)	20018704
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (96 samples)	20018705
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
Nextera DNA CD Indexes (24 indexes, 24 samples)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (96 indexes, 96 samples)	20018708

詳細はこちらから

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitに関するより詳細な情報については、jp.illumina.com/nextera-dna-flexをご覧ください。

参考文献

- Wang K, Yuen ST, Xu J, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet.* 2014;46(6):573-582.
- Zahir FR, Mwenifumbo JC, Chun HE, et al. Comprehensive whole genome sequence analyses yields novel genetic and structural insights for Intellectual Disability. *BMC Genomics.* 2017;18(1):403.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

jp.illumina.com

www.facebook.com/illuminakk

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, Design Studio, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Innium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NovaSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。

その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub.No. 770-2017-018-A-JPN