

# Nextera™ DNA Flex Library Preparation Kit による微生物全ゲノムシーケンス

迅速で柔軟なライブラリー調製によって、ウイルス、細菌、その他の微生物に対する均一なゲノムカバレッジとアセンブリーの改良を実現

## 特長

- 迅速で簡単なワークフロー  
少ないステップ数と最短の操作時間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  
幅広いDNAインプット量や少ないDNAインプット量（1 ng）であっても、優れた一貫性のある結果を取得
- 均一なカバレッジ  
ウイルス、細菌、その他の微生物種に対する均一なカバレッジのシーケンスデータを取得



## はじめに

全ゲノムシーケンス（WGS）は、細菌、ウイルス、その他微生物などの小さなゲノム（≤5 Mb）のリシーケンスおよび *de novo* アセンブルのために、微生物学にとって重要なツールとして確立してきました。微生物WGSによって、新規生物のゲノムマッピング、既知生物のゲノム完全解読、そしてサンプル間のゲノム比較が可能になっています。タグメンテーションケミストリーおよびNextera XT DNA Library Prep Kitの誕生により、DNA断片化とアダプターのタグ付けステップを1回の反応に集約し、プールおよびシーケンス前のライブラリー定量の必要がなくなりました。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitの登場でライブラリー調製に最新の進化をもたらすことによって、微生物学のゲノム研究を前進させるための準備が整いました（図1）。

図1: Nextera DNA Flex Library Preparation Kitを用いた微生物WGS—Nextera DNA Flex Library Preparation Kitによって、均一なカバレッジと高い精度で微生物種のゲノムアセンブリーが実現します。

## 迅速で簡単なワークフロー

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のラインナップ中で最速でステップ数の少ないワークフローになっています。スピードと効率の向上に加え、サンプルタイプ、インプット量、および幅広くサポートされたアプリケーションに対して非常に優れた柔軟性を提供します。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、8種の異なる細菌種を37°Cの血液寒天培地上で一晩増殖した細菌コロニーから直接DNA抽出を行うことができるため、追加の培養時間とコストを削減し、かつデータの一貫性を改善しています。<sup>2-4</sup>

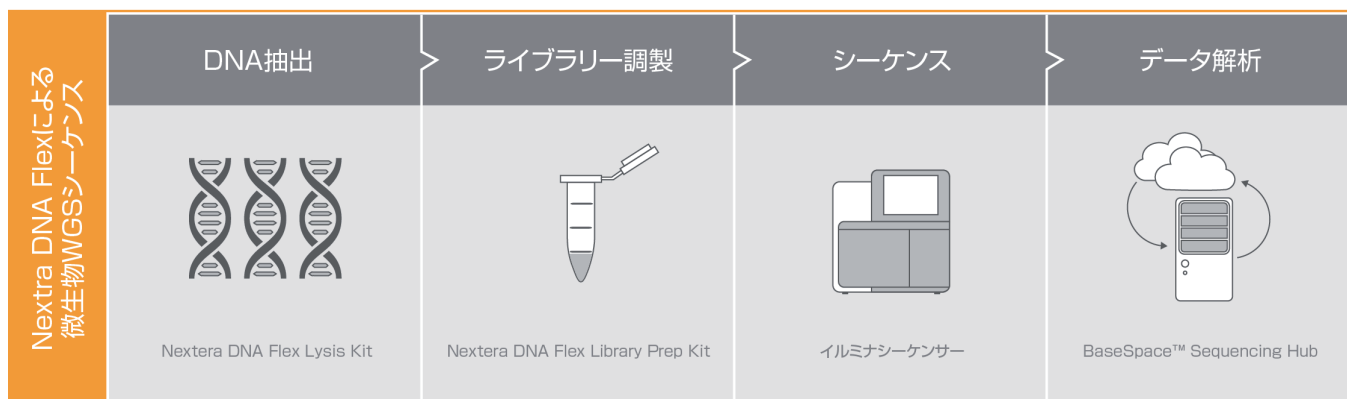


図2: Nextera DNA Flexライブラリー調製ワークフロー—使いやすいNextera DNA Flexによるライブラリー調製は、ライブラリー調製、シーケンスおよびデータ解析を含むスリム化されたNGSワークフローの一部です。

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%以上のシーケンスデータを生み出している実証済みの精度のあるイルミナ sequencing 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、ライブラリー調製からシーケンス、そしてBaseSpace™ Sequence Hubでのタッチパネル操作によるデータ解析を含む統合したNGSワークフローの一部であり(図2)、微生物WGSアプリケーションに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

イルミナライブラリー調製ケミストリーの大幅な進歩とNextera DNA Flex Library Preparation Kitの主な特徴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3)。

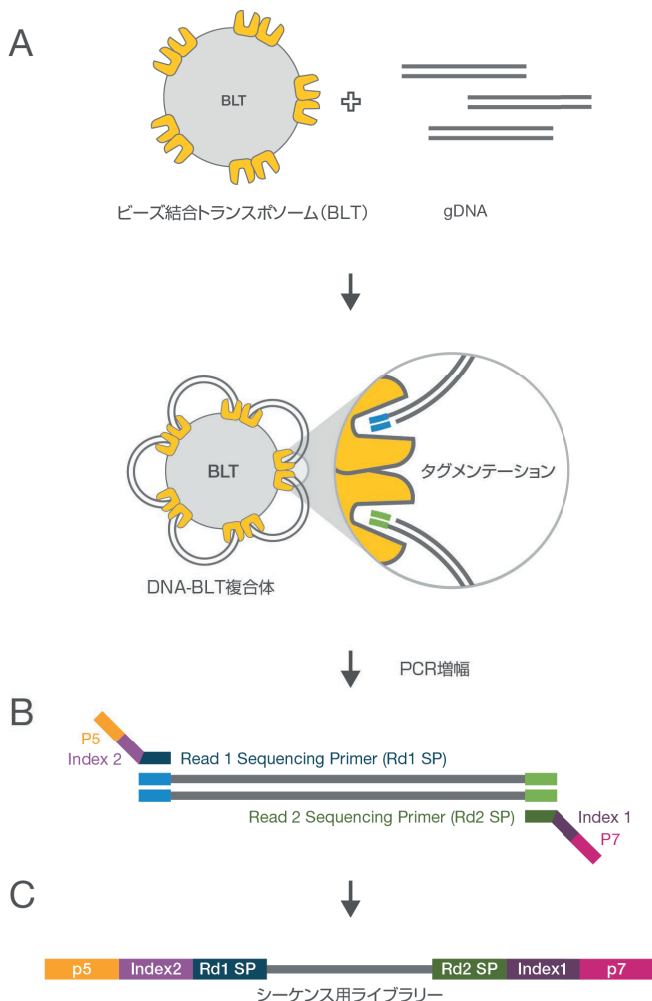


図3: Nextera ビーズ上のタグメンテーションケミストリー — (A) BLTによるタグメンテーション。(B) 少ないサイクルのPCRによってシーケンス用DNA断片を増幅し、インデックスとアダプターを付加します。(C) シーケンス用断片を洗浄しプールします。

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あります:

- 幅広いDNAインプット量(100~500 ng)に対し、スタート時のDNAサンプルを定量する必要がないため、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。
- DNA断片化の必要がないため、時間の節約と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インプット量(100~500 ng)に対し、プールとシーケンス前の個々のライブラリーの定量とノーマライゼーションの必要がありません。

ビーズ上のタグメンテーションは、幅広いDNAインプット量に対して一定のインサートサイズ(~350 bp)でライブラリーを調製します(図4)。この幅広いDNAインプット量(1~500 ng)によって、貴重なサンプルなどさまざまなサンプルタイプに対する柔軟性が増加します。この新しいケミストリーは1 ngまでのDNAインプット量で素晴らしい性能を発揮します。100 ng以上のDNAインプット量を用いた場合、ビーズ上のタグメンテーション反応は飽和するようになるため、一定のノーマライズされた産物が得られることとなります(図5)。このノーマライズされるインプット量の幅は、Nextera DNA Flexのライブラリー調製時のDNAインプット量に非常に優れた柔軟性をもたらします。

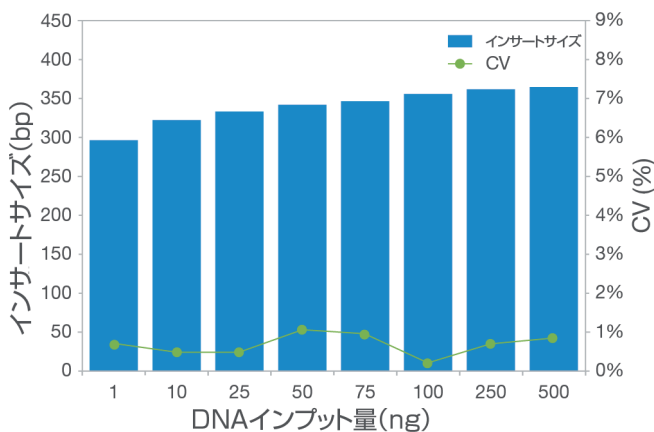


図4: 均一で一定したインサートサイズ — ビーズ上のタグメンテーションはDNAインプット量に関わらず一定したインサートサイズを提供します。Nextera DNA Flex Kitによる*E. coli*複製サンプルで調製されたライブラリー。シーケンスはMiSeq™ システム(2 × 76 bpラン)で実施。

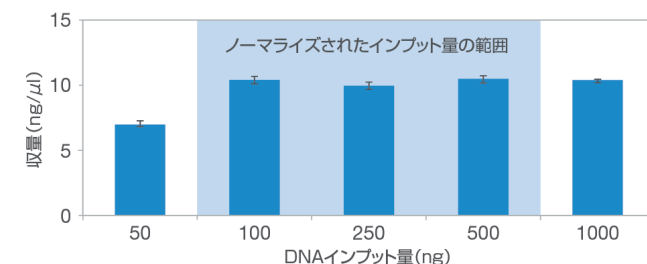


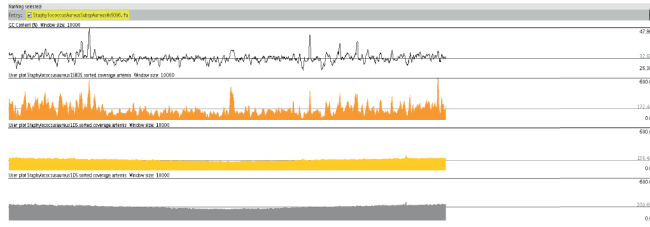
図5: ライブラリーの断片化とノーマライゼーション — 100 ng付近でビーズが飽和してしまうことで、断片化DNA産物はノーマライズされます。Nextera DNA Flex Kitを用いて、ヒトNA12878サンプル(Coriell Institute)を基に調製されたライブラリー。シーケンスはMiSeqシステム(2 × 76 bp)で実施。

\*ファイル上で算出されたデータIllumina, Inc., 2015.

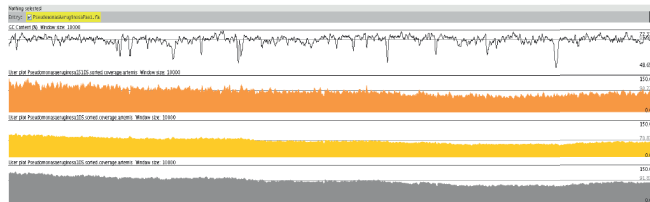
## 均一なカバレッジ

微生物のゲノムアセンブリについてNextera DNA Flexによるライブラリー調製の改良された精度を示すために、Nextera DNA Flex/Nextera DNA Flex LibraryとNextera XT DNA Library Preparation Kitを用いて、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit最大8種類の異なる細菌類からインプットゲノムDNAの量を変えてライブラリーを調製しました。ライブラリーは、NextSeq™ 550 システムによってペアエンド2 ×150 bpリードでシーケンスしました。

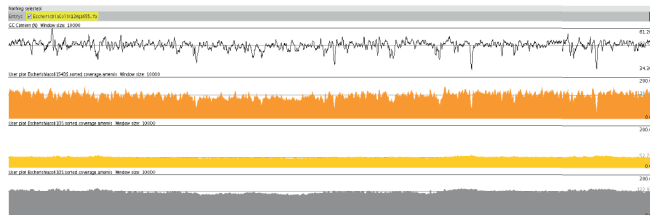
### 黄色ブドウ球菌



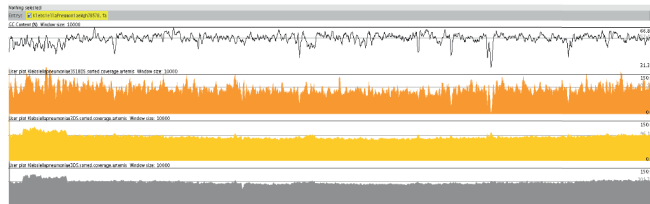
### 緑膿菌



### 大腸菌



### 肺炎桿菌



■ Nextera XT (1 ng) ■ Nextera DNA Flex (1 ng) ■ Nextera DNA Flex (200 ng)

図 6: 改良されたカバレッジの均一性 —Nextera DNA Flex Library Preparation KitをNextera XT DNA Library Prep Kitと比較した場合、さまざまなグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌について非常に均一なカバレッジが得られています。

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、Nextera XT DNA Library Prep Kitと比較した場合、さまざまなグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌について、特に少ないDNAインプット量で非常に均一なカバレッジが得られています (図 6)。さらに2つの測定法によってゲノムアセンブリーの質について比較しました。N50はゲノムの50%をカバーするために必要な最短コンティグの長さとして定義されています。一般的に、高いN50値すなわち平均して長いコンティグは、よりよいゲノムアセンブリーを示しています。伸長によって、数の長いコンティグが集まることは、数の多い小さなコンティグが集まるよりも、高い精度を示すことになるため、アセンブリー中のより少ないコンティグは品質に関する別の指標となります。Nextera DNA Flex Library Preparation Kitを用いて8種の細菌類から調製したライブラリーは、Nextera XT DNA Library Prep Kitと比較して、より高いN50値と (図 7)、より少ない総コンティグ数を示します (図 8)。まとめると、これらの結果より、微生物ゲノムアセンブリに対してとくに低いDNAインプット量で、Nextera DNA Flex Library Preparation Kitの優れた性能がサポートされています。

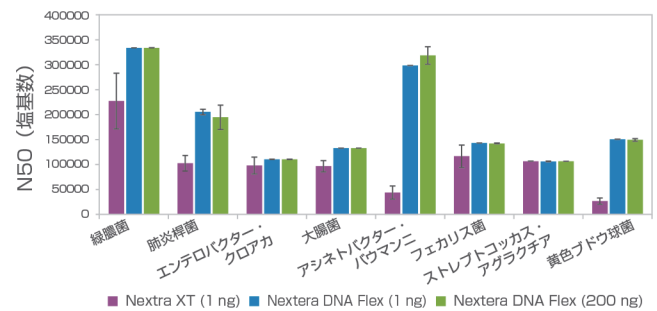


図 7: ライブラリー調製キットによるコンティグ長の比較—8種の異なる細菌類からNextera DNA Flex Library Preparation KitまたはNextera XT DNA Library Prep Kitで調製したライブラリーを、NextSeq 550 システムによってペアエンド2 ×150 bpリードを用いてシーケンス。N50で測定した場合、Nextera DNA Flexは高品質のゲノムアセンブリーをもたらします。

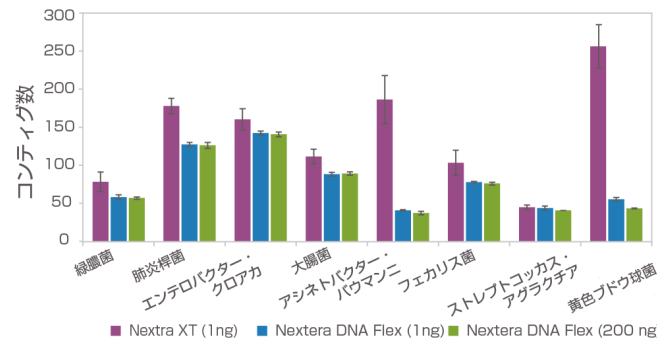


図 8: ライブラリー調製キットによるコンティグ数の比較—8種の異なる細菌類からNextera DNA Flex Library Preparation KitまたはNextera XT DNA Library Prep Kitで調製したライブラリーを、NextSeq 550 システムによってペアエンド2 ×150 bpリードを用いてシーケンス。Nextera DNA Flexはより少ないコンティグ数となるため、高品質のゲノムアセンブリーをもたらします。

## 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ており、イルミナの製品ラインナップの中で最も迅速で柔軟性のあるライブラリー調製ワークフローを提供します。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、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対するカバレッジの均一性とゲノムアセンブリーにおいてNextera XT DNA Library Prep Kitよりも改良されており、微生物WGSを行う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
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きましては、[jp.illumina.com/nextera-dna-flex](http://jp.illumina.com/nextera-dna-flex) をご覧ください。

## 参考文献

1. Illumina. Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet. [www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_nextera\\_xt\\_dna\\_sample\\_prep.pdf](http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_xt_dna_sample_prep.pdf). Accessed September 2017.
2. Rubin BE, Sanders JG, Hampton-Marcell J, Owens SM, Gilbert JA, Moreau CS. DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *MicrobiologyOpen*. 2014;3(6):910-921.
3. van Tongeren SP, Degener JE, Harmsen HJM. Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(9):1053-1061.
4. Vesty A, Biswas K, Taylor MW, Gear K, Douglas RG. Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169877.
5. Miller JR, Koren S, Sutton G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*. 2010;95(6):315-327.

## 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](http://jp.illumina.com)

[www.facebook.com/illuminakk](https://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](http://jp.illumina.com/tc)

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, 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. 770-2017-019-A-JPN 17NOV2017

**illumina**<sup>®</sup>