

サンプルのマルチプレックスおよび下流の解析におけるインデックスのミスアサインメントの影響

インデックスのミスアサインメントの原因と、インデックスホッピングの影響を軽減するベストプラクティス

はじめに

次世代シーケンス (NGS) 技術の改良により、シーケンスビードが大幅に向上し、データ出力が飛躍的に増加したことと、現在のシーケンスプラットフォームにおいて大規模なサンプルの解析が可能になりました。10年前、Genome Analyzerは1回のランあたりのシーケンスデータの出力が最大1Gbでしたが、今日では、同様のコアテクノロジーに基づいたNovaSeq™システムにより、2日間で最大2Tbのシーケンスデータを生成できます。10年前と比較すると、データ出力量が2,000倍以上に増加しています¹。

この飛躍的に向上したデータ出力量を効率的に利用するためには、マルチプレックス法がカギとなります。マルチプレックス法は、ライプラリー調製時に各DNA断片にインデックスと呼ばれるユニークな配列を付加することで行います。これによって、一回のシーケンスランで同時に多数のライプラリーをプールし、シーケンスできるようになります。マルチプレックス法によって得られたデータは、最終のデータ解析前に、プールしたそれぞれのライプラリーを、インデックスの配列情報によって、コンピューター上で振り分けるデマルチプレックスと呼ばれる複雑なプロセスを要します（図1）。

マルチプレックス法におけるライプラリー間のインデックスのミスアサインメントは、マルチプレックス法が開発された当初からシーケンスデータに影響すると知られていた問題です²。本書は、インデックスホッピングが起こりうるメカニズム、インデックスホッピングの測定方法、ならびにシーケンスデータの品質に関するインデックスホッピングの影響を低減させるためのベストプラクティスについて記述しています。

インデックスミスアサインメントの発生メカニズム

インデックスの組み換え、「インデックスホッピング」

Exclusion Amplification (ExAmp) ケミストリーおよび整列化フローセル技術の開発は、データ出力量の増加、コスト削減、ラン時間の短縮など、NGS技術に重要な進歩をもたらしました。この開発によって、1,000ドルゲノムを含む幅広いアプリケーションに対応できるようになりました³。しかし、整列化フローセルで用いるクラスター形成は、

従来のブリッジ増幅を用いたクラスター形成よりも高い割合でインデックスのミスアサインメントを起こすことが確認されました⁴。インデックスホッピングはインデックスのミスアサイ

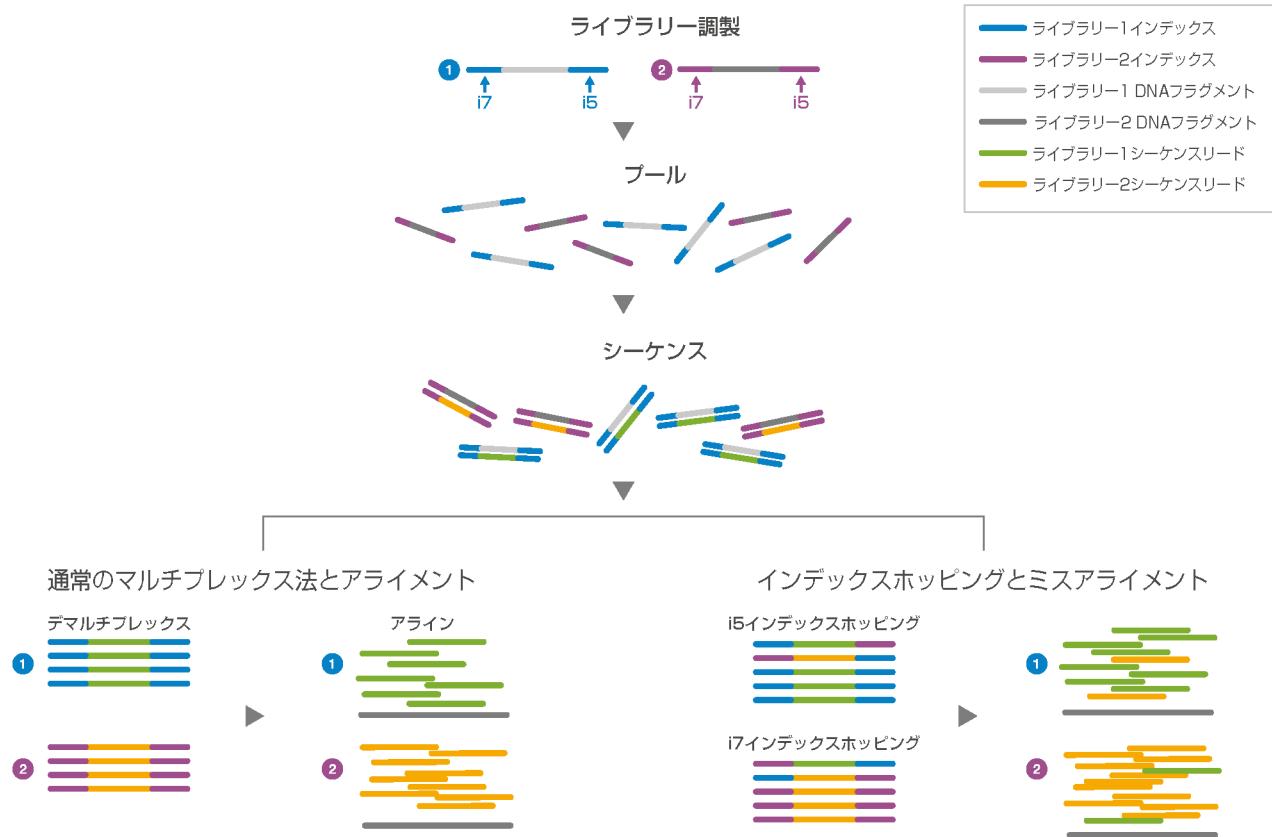


図1：マルチプレックス法とインデックスホッピングの概要—マルチプレックス法では、ライプラリー調製時に各DNA断片にユニークなインデックス配列を付加することにより、1回のシーケンスで同時に複数のライプラリーをランすることが可能となります。シーケンスリードはデマルチプレックスを行うことにより、それぞれのサンプル毎に振り分けられ、適切なアライメント結果が得られます。インデックスホッピングは、シーケンスリードの不正確なアサインメントを引き起こし、リードのミスアライメントまたは下流の解析における不正確なデータの解釈につながる可能性があります。

メントの原因となります。これによりシーケンスリードが本来のインデックスではない同一プール中の別のインデックスが付加されたライブラリーに誤ってアサインされる可能性があり、ミスアライメントおよび不正確な解析結果を引き起こすことにつながります（図1）。インデックスホッピングは整列化フローセル中のインデックスのミスアサインメントの増加を引き起こす主な原因となります。

遊離アダプターまたはプライマーの混入

アダプターを核酸断片に結合した後、遊離した非結合アダプターを除去するためにライブラリーを精製します。ライブラリー精製は、ビーズを用いた方法またはゲル精製法によって行い、遊離したアダプターやプライマーを除去することができます。遊離したアダプターやプライマーの除去が十分でないと、調製したライブラリーに混入することになり、インデックスホッピングおよびインデックスのミスアサインメントを引き起こす可能性があります。この可能性を検証するために、アダプターを除去したライブラリーブール中に、DNAインプット量に対してモル濃度で0~35%の異なる濃度のアダプターを混合しました。インデックスホッピングの割合は、混合したアダプターの増加量に一致して直線的に増加しました。（図2）この結果より、調製したライブラリーを、シーケンスランを行う前に確実に精製することの重要性が示されています。

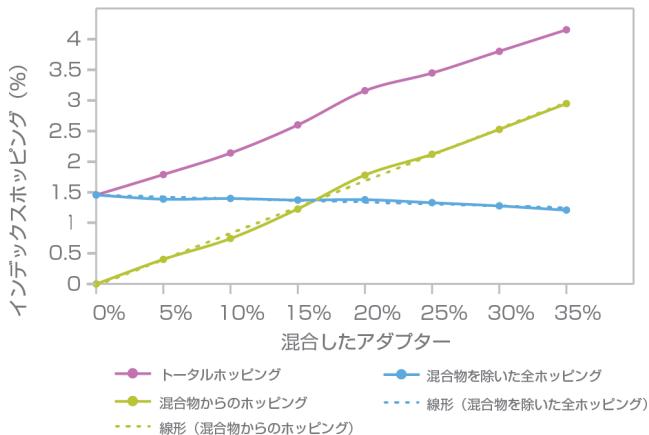


図2：遊離アダプターによるインデックスホッピング—インデックスホッピングの割合をアダプター混合量に対してプロットしています。全インデックスホッピング（赤線）と混合した遊離アダプター量（黄線）との正の相関関係が示されています。

インデックスホッピング発生頻度の測定

ライブラリーをプールした実験から、インデックスホッピングの割合を定量化することができます。ユニークなペアであるi5およびi7インデックスアダプターを用いて、dual indexライブラリーを作成し、それぞれのライブラリーをプールし、シーケンスを行った後、デマルチブレックスを行いました。全ての想定されるアダプターの組み合わせのうち、無効な（サンプルに使用されていない）組み合わせのインデックスホッピングの割合を%で示しました（図3）。例えば、0.17%という値は600対の正確なインデックスペアあたり約1つのインデックスホッピングが発生することを意味しています。

インデックス	i7インデックス							
	701	702	703	704	705	706	707	708
501	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
502	0.00%	26.20%	0.00%	0.11%	0.14%	0.14%	0.00%	0.00%
503	0.00%	0.17%	0.00%	0.10%	23.41%	0.12%	0.00%	0.00%
504	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
505	0.00%	0.15%	0.00%	22.91%	0.12%	0.16%	0.00%	0.00%
506	0.00%	0.14%	0.00%	0.12%	0.12%	23.37%	0.00%	0.00%
507	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
508	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

図3：ユニークなインデックスを用いたコンタミネーションの一全アダプターの組み合わせのインデックスホッピングの割合（%）。有効（緑）および無効（赤）な組み合わせは、それぞれ緑と赤でハイライトされています。インデックスホッピングの発生率は、インデックスの組み合わせによって、偏りを生じることはありません。

インデックスホッピングの影響

ライブラリー調製方法はインデックスホッピング率に影響することが示されています。一般的に、TruSeq[®] DNA PCR-Free Library Prep Kitなどのライゲーションのみを行いライブラリー調製を行う方法では、TruSeq Nano DNA Library Prep KitのようなPCR増幅のステップを含むライブラリー調製法よりも、インデックスホッピングの割合が高いライブラリーを形成します（図4）。従来のブリッジ増幅による不均一化フローセル上にクラスター形成したライブラリーは、インデックスホッピング率（1%）が、ExAmpのクラスター形成による整列化フローセル上のライブラリーをランしたインデックスホッピング率（2%）と比較して低いことが認められます。例えば、TruSeq PCR-Freeライブラリーのシーケンスでは、整列化フローセルよりも不均一化フローセル上で低いインデックスホッピング率が示されています（図4）。

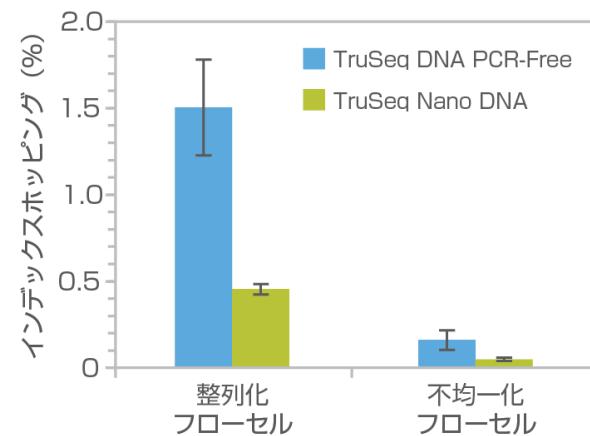


図4：インデックスホッピングの発生率の差—インデックスホッピングの割合は、ライブラリー調製方法に関わらず、不均一化フローセルよりも整列化フローセルが高いことを示しています。PCR増幅のステップを含むライブラリー調製方法（例、TruSeq Nano）は、ライゲーションのみの方法（例、TruSeq DNA PCR-Free）と比較して低いインデックスホッピング率を示します。

RNAシーケンス実験でのインデックスホッピングの影響

非常に高い発現マーカーが存在するサンプルのRNAシーケンス（RNA-Seq）に関してインデックスホッピングの一般的な影響の程度を示すために、stranded mRNAライブラリーを異なる2種類のヒト組織のトータルRNAサンプルから調製しました。こ

こでは、組織特異的マーカーの発現が非常に豊富な組織（肝臓）と、特異的なトランскriptに偏らない分散型の発現プロファイルを示す組織（脳）を選択しました。

ライブラリーはTruSeq Stranded mRNA Library Prep Kitを用い、プロトコールに従ってライブラリーを調製しました。サンプルは、ユニークなインデックスセットを付加し、インデックスホッピングを別々に測定しました。HiSeq 4000システムを用いて、肝臓と脳のサンプルをミックスしたレーン、または肝臓サンプルのみ、脳サンプルのみの組織別にプールしたレーンで、6ブレックスのランを実施しました。

シーケンスデータでデマルチブレックスを行った後、BaseSpace Sequence HubのRNA Express Appと標準的な解析パイプラインを用いて解析を行いました。インデックスホッピング率は解析したレーンにおいて0.3~0.5%と測定されました。FPKM（遺伝子発現強度の単位）の遺伝子発現プロットでは、組織サンプルを混合したレーンの脳サンプルにおいて、アルブミン（肝臓中120,000~950,000カウント）のような肝臓の強発現マーカー遺伝子が検出されました。これは脳サンプルのみをシーケンスしたレーンには見られていないため、インデックスホッピングによって生じた現象であると考えられます（図5上）。組織サンプルを混合したレーンの脳サンプルにおいて認められたこれらの肝臓マーカーは、肝臓サンプル中で認められたレベルの~0.13%であることがわかりました。肝臓組織とともにシーケンスした脳サンプルの反復実験を比較解析したFPKM遺伝子発現プロットでは、サンプル間での特異的な発現の差は見られず、両者が同等のバックグラウンドノイズを示すことを表しています（図5下）。これらの結果よりインデックスホッピングの影響を最小にするためには、同類のサンプルと一緒にプールすることが最適であり、それによって優位に高発現する転写産物へのインデックスホッピングの解析における影響を軽減することができます。

インデックスホッピングを減少させるためのベストプラクティス

インデックスホッピングの影響を低減させるために、シーケンサーシステムによる特別な推奨方法、ライブラリー調製ワークフローおよびアプリケーションが特定されています。インデックスホッピングの影響を減少させるための一般的なガイドラインおよび推奨方法を示します（表1）。

推奨する条件以外で調製したライブラリーの保存（表1）は、インデックスホッピング率を増加させることができます。それぞれのライブラリーは-20°Cで保存し、4°Cでの保存は避けてください。プールした後、できるだけ早くライブラリーをシーケンスするまたは-20°Cで保存することで、インデックスホッピングが低減します。

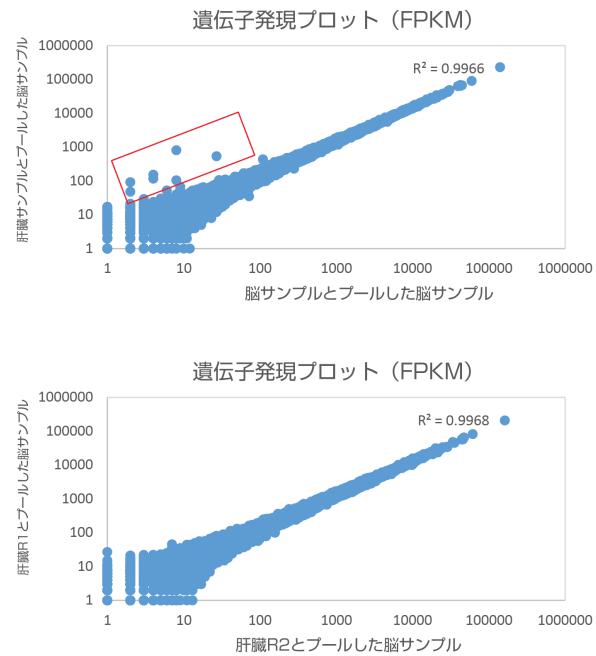


図5：RNA-Seq解析におけるインデックスホッピングの影響—肝臓および脳からのトータルRNAライブラリーを6ブレックスでHiSeq 4000システムを用いて、シーケンスしました。組織サンプルを混合、もしくは別々にプールしてシーケンスを行い、比較解析を行ったFPKM発現プロットを示します。組織サンプルをプールしたレーンの脳サンプルで、非常に高く発現する肝臓マーカー遺伝子の検出（赤色の囲み内）は、インデックスホッピングの発生を示しています。下段のプロットで、組織サンプルを混合したレーンの反復実験の比較解析の発現プロファイルではほとんど影響がないことが示されています。

表1：インデックスホッピングを低下させるベストプラクティス

現象の発生を軽減する方法/推奨方法	利点/結果
ユニークなインデックスを使用し dual indexライブラリーを調製 ^a	インデックスホッピングが生じたリードをUndetermined readとして分類
1レーン当たり30カバレッジでヒトゲノムをシーケンス ^b	サンプルのプールとインデックスホッピングを回避
アダプターの除去（精製、スピンカラムなど） ^c	インデックスホッピング率の低減
推奨温度-20°Cで調製ライブラリーを保存 ^c	インデックスホッピング率の低減
同様のRNA-Seqサンプルを混合	高発現遺伝子および低発現遺伝子の混入を低下

a. HiSeq Xシリーズのシーケンスシステムではサポートされていません。
b. HiSeq Xシリーズのシーケンスシステムのみ可能です。
c. [TruSeq Sample Preparation Best Practice](#)および[Troubleshooting Guide](#)をご覧ください。

デュアルインデックスシーケンスのためのサンプルプールガイドライン

TruSeq High-Throughput (HT) Library Prep Kitには、キットによってDNAアダプタープレート (DAP) またはRNAアダプタープレート (RAP) のいずれかが含まれています。アダプタープレートは、96のユニークなインデックスアダプターのコンビネーションを含む96ウェルプレートで、最大96のユニークなインデックス化ライブラリーをマニュアルまたは自動で調製するためにデザインされています。イルミナは、アダプタープレートの利用を最大にし、インデックスホッピングを低減または同定するために用いる、12種類の8ブレックスコンビネーション（表2）、または16種類の6ブレックスコンビネーション（表3）に

表2: 8プレックスコンビネーションのためのプールガイドライン

1	2	3	4	5	6
アダプターペア	座位	アダプターペア	座位	アダプターペア	座位
D501-D705	A5	D502-D706	B6	D503-D701	C1
D502-D704	B4	D501-D702	A2	D505-D703	E3
D503-D703	C3	D505-D705	E5	D506-D706	F6
D505-D701	E1	D503-D704	C4	D507-D702	G2
D506-D710	F10	D507-D712	G12	D504-D707	D7
D507-D709	G9	D506-D708	F8	D508-D711	H11
D504-D711	D11	D508-D710	H10	D501-D712	A12
D508-D707	H7	D504-D709	D9	D502-D708	B8
7		8		9	
アダプターペア	座位	アダプターペア	座位	アダプターペア	座位
D501-D710	A10	D502-D712	B12	D503-D707	C7
D502-D709	B9	D501-D708	A8	D505-D711	E11
D503-D711	C11	D505-D710	E10	D506-D712	F12
D505-D707	E7	D503-D709	C9	D507-D708	G8
D506-D705	F5	D507-D706	G6	D504-D701	D1
D507-D704	G4	D506-D702	F2	D508-D703	H3
D504-D703	D3	D508-D705	H5	D501-D706	A6
D508-D701	H1	D504-D704	D4	D502-D702	B2
10		11		12	
アダプターペア	座位	アダプターペア	座位	アダプターペア	座位
D501-D710	A10	D502-D707	C7	D505-D709	E8
D502-D709	B9	D501-D712	A8	D503-D710	F12
D503-D711	C11	D505-D710	E10	D507-D707	G7
D505-D707	E7	D503-D709	C9	D506-D711	F11
D506-D705	F5	D507-D706	G6	D504-D702	H2
D507-D704	G4	D506-D702	F2	D508-D703	B5
D504-D703	D3	D508-D705	H5	D501-D704	A9
D508-D701	H1	D504-D704	D4	D502-D706	E6
13		14		15	
アダプターペア	ウェル	アダプターペア	ウェル	アダプターペア	ウェル
D501-D705	A5	D501-D710	A10	D502-D704	B4
D502-D706	B6	D502-D712	B12	D501-D702	A2
D503-D701	C1	D503-D707	C7	D505-D703	E3
D505-D702	E2	D505-D708	E8	D503-D706	F11
D506-D704	F4	D506-D709	F9	D507-D705	G5
D507-D703	G3	D507-D711	G11	D506-D701	F1
16		17		18	
アダプターペア	ウェル	アダプターペア	ウェル	アダプターペア	ウェル
D501-D709	A9	D501-D704	A4	D502-D710	B10
D502-D711	B11	D502-D703	B3	D501-D707	A7
D503-D707	C7	D503-D701	C1	D504-D709	A1
D505-D708	E8	D505-D702	E6	D506-D709	E9
D506-D709	F5	D506-D701	F4	D507-D704	E4
D507-D710	G10	D507-D703	G9	D508-D702	F7
D508-D712	H1	D508-D707	H2	D509-D705	F1
D509-D704	I1	D509-D701	I2	D510-D703	G3
D510-D711	J1	D510-D709	J2	D511-D707	H4
D511-D703	K1	D511-D701	K2	D512-D709	I5
D512-D705	L1	D512-D703	L2	D513-D707	K6
D513-D707	M1	D513-D705	M2	D514-D709	L7
D514-D709	N1	D514-D707	N2	D515-D705	M8
D515-D705	O1	D515-D703	O2	D516-D707	N9
D516-D707	P1	D516-D705	P2	D517-D709	O10
D517-D709	Q1	D517-D707	Q2	D518-D705	P11
D518-D705	R1	D518-D703	R2	D519-D707	Q12
D519-D707	S1	D519-D705	S2	D520-D709	R13
D520-D709	T1	D520-D707	T2	D521-D705	S14
D521-D705	U1	D521-D703	U2	D522-D707	T15
D522-D707	V1	D522-D705	V2	D523-D709	U16
D523-D705	W1	D523-D703	W2	D524-D707	V17
D524-D707	X1	D524-D705	X2	D525-D709	W18
D525-D705	Y1	D525-D703	Y2	D526-D707	X19
D526-D707	Z1	D526-D705	Z2	D527-D709	Y20
D527-D705	AA1	D527-D703	AA2	D528-D707	Z21
D528-D707	AB1	D528-D705	AB2	D529-D709	AA22
D529-D705	AC1	D529-D703	AC2	D530-D707	AB23
D530-D707	AD1	D530-D705	AD2	D531-D709	AC24
D531-D705	AE1	D531-D703	AE2	D532-D707	AD25
D532-D707	AF1	D532-D705	AF2	D533-D709	AE26
D533-D705	AG1	D533-D703	AG2	D534-D707	AF27
D534-D707	AH1	D534-D705	AH2	D535-D709	AG28
D535-D705	AI1	D535-D703	AI2	D536-D707	AH29
D536-D707	AJ1	D536-D705	AJ2	D537-D709	AI30
D537-D705	AK1	D537-D703	AK2	D538-D707	AJ31
D538-D707	AL1	D538-D705	AL2	D539-D709	AK32
D539-D705	AM1	D539-D703	AM2	D540-D707	AL33
D540-D707	AN1	D540-D705	AN2	D541-D709	AM34
D541-D705	AO1	D541-D703	AO2	D542-D707	AN35
D542-D707	AP1	D542-D705	AP2	D543-D709	AO36
D543-D705	AQ1	D543-D703	AQ2	D544-D707	AP37
D544-D707	AR1	D544-D705	AR2	D545-D709	AQ38
D545-D705	AS1	D545-D703	AS2	D546-D707	AR39
D546-D707	AT1	D546-D705	AT2	D547-D709	AS40
D547-D705	AU1	D547-D703	AU2	D548-D707	AT41
D548-D707	AV1	D548-D705	AV2	D549-D709	AU42
D549-D705	AW1	D549-D703	AW2	D550-D707	AV43
D550-D707	AX1	D550-D705	AX2	D551-D709	AW44
D551-D705	AY1	D551-D703	AY2	D552-D707	AX45
D552-D707	AZ1	D552-D705	AZ2	D553-D709	AY46
D553-D705	AA1	D553-D703	AA2	D554-D707	AZ47
D554-D707	AB1	D554-D705	AB2	D555-D709	AA48
D555-D705	AC1	D555-D703	AC2	D556-D707	AB49
D556-D707	AD1	D556-D705	AD2	D557-D709	AC50
D557-D705	AE1	D557-D703	AE2	D558-D707	AD51
D558-D707	AF1	D558-D705	AF2	D559-D709	AE52
D559-D705	AG1	D559-D703	AG2	D560-D707	AF53
D560-D707	AH1	D560-D705	AH2	D561-D709	AG54
D561-D705	AI1	D561-D703	AI2	D562-D707	AH55
D562-D707	AJ1	D562-D705	AJ2	D563-D709	AI56
D563-D705	AK1	D563-D703	AK2	D564-D707	AJ57
D564-D707	AL1	D564-D705	AL2	D565-D709	AK58
D565-D705	AM1	D565-D703	AM2	D566-D707	AL59
D566-D707	AN1	D566-D705	AN2	D567-D709	AM60
D567-D705	AO1	D567-D703	AO2	D568-D707	AN61
D568-D707	AP1	D568-D705	AP2	D569-D709	AO62
D569-D705	AQ1	D569-D703	AQ2	D570-D707	AP63
D570-D707	AR1	D570-D705	AR2	D571-D709	AQ64
D571-D705	AS1	D571-D703	AS2	D572-D707	AR65
D572-D707	AT1	D572-D705	AT2	D573-D709	AS66
D573-D705	AU1	D573-D703	AU2	D574-D707	AT67
D574-D707	AV1	D574-D705	AV2	D575-D709	AU68
D575-D705	AW1	D575-D703	AW2	D576-D707	AV69
D576-D707	AX1	D576-D705	AX2	D577-D709	AW70
D577-D705	AY1	D577-D703	AY2	D578-D707	AX71
D578-D707	AZ1	D578-D705	AZ2	D579-D709	AY72
D579-D705	AA1	D579-D703	AA2	D580-D707	AZ73
D580-D707	AB1	D580-D705	AB2	D581-D709	AA74
D581-D705	AC1	D581-D703	AC2	D582-D707	AB75
D582-D707	AD1	D582-D705	AD2	D583-D709	AC76
D583-D705	AE1	D583-D703	AE2	D584-D707	AD77
D584-D707	AF1	D584-D705	AF2	D585-D709	AE78
D585-D705	AG1	D585-D703	AG2	D586-D707	AF79
D586-D707	AH1	D586-D705	AH2	D587-D709	AG80
D587-D705	AI1	D587-D703	AI2	D588-D707	AH81
D588-D707	AJ1	D588-D705	AJ2	D589-D709	AI82
D589-D705	AK1	D589-D703	AK2	D590-D707	AJ83
D590-D707	AL1	D590-D705	AL2	D591-D709	AK84
D591-D705	AM1	D591-D703	AM2	D592-D707	AL85
D592-D707	AN1	D592-D705	AN2	D593-D709	AM86
D593-D705	AO1	D593-D703	AO2	D594-D707	AN87
D594-D707	AP1	D594-D705	AP2	D595-D709	AO88
D595-D705	AQ1	D595-D703	AQ2	D596-D707	AP89
D596-D707	AR1	D596-D705	AR2	D597-D709	AQ90
D597-D705	AS1	D597-D703	AS2	D598-D707	AR91
D598-D707	AT1	D598-D705	AT2	D599-D709	AS92
D599-D705	AU1	D599-D703	AU2	D600-D707	AT93
D600-D707	AV1	D600-D705	AV2	D601-D709	AU94
D601-D705	AW1	D601-D703	AW2	D602-D707	AV95
D602-D707	AX1	D602-D705	AX2	D603-D709	AW96
D603-D705	AY1	D603-D703	AY2	D604-D707	AX97
D604-D707	AZ1	D604-D705	AZ2	D605-D709	AY98
D605-D705	AA1	D605-D703	AA2	D606-D707	AZ99
D606-D707	AB1	D606-D705	AB2	D607-D709	AA100
D607-D705	AC1	D607-D703	AC2	D608-D707	AB101
D608-D707	AD1	D608-D705	AD2	D609-D709	AC102
D609-D705	AE1	D609-D703	AE2	D610-D707	AD103
D610-D707	AF1	D610-D705	AF2	D611-D709	AE104
D611-D705	AG1	D611-D703	AG2	D612-D707	AF105
D612-D707	AH1	D612-D705	AH2	D613-D709	AG106
D613-D705	AI1	D613-D703	AI2	D614-D707	AH107
D614-D707	AJ1	D614-D705	AJ2	D615-D709	AI108
D615-D705	AK1	D615-D703	AK2	D616-D707	AJ109
D616-D707	AL1	D616-D705	AL2	D617-D709	AK110
D617-D705	AM1	D617-D703	AM2	D618-D707	AL111
D618-D707	AN1	D618-D705	AN2	D619-D709	AM112
D619-D705	AO1	D619-D703	AO2	D620-D707	AN113
D620-D707	AP1	D620-D705	AP2	D621-D709	AO114
D621-D705	AQ1	D621-D703	AQ2	D622-D707	AP115
D622-D707	AR1	D622-D705	AR2	D623-D709	AQ116
D623-D705	AS1	D623-D703	AS2	D624-D707	AR117
D624-D707	AT1	D624-D705	AT2	D625-D709	AS118
D625-D705	AU1	D625-D703	AU2	D626-D707	AT119
D626-D707	AV1	D626-D705	AV2	D627-D709	AU120
D627-D705	AW1	D627-D703	AW2	D628-D707	AV121
D628-D707	AX1	D628-D705	AX2	D629-D709	AW122
D629-D705	AY1	D629-D703	AY2	D630-D707	AX123
D630-D707	AZ1	D630-D705	AZ2	D631-D709	AY124
D631-D705	AA1	D631-D703	AA2	D632-D707	AZ125
D632-D707	AB1	D632-D705	AB2	D633-D709	AA126
D633-D705	AC1	D633-D703	AC2	D634-D707	AB127
D634-D707	AD1	D634-D705	AD2	D635-D709	AC128
D635-D705	AE1	D635-D703	AE2	D636-D707	AD129
D636-D707	AF1	D636-D705	AF2	D637-D709	AE130
D637-D705	AG1	D637-D703	AG2	D638-D707	AF131
D638-D707	AH1	D638-D705	AH2		

まとめ

マルチプレックス法は、NGS技術の大きな進展と重要性を代表するものであり、これによってサンプル解析量の飛躍的な増加が実現します。しかし、マルチプレックス法を用いた場合、ライブラリー調製方法または使用するシーケンサーシステムに関わらず、インデックスホッピングの可能性が存在します。インデックスホッピングは、デマルチプレックス時に間違ったインデックスにシーケンスリードのアサインメントを引き起こす可能性があり、それによってミスマライメントおよびデータの品質にネガティブな影響を与える可能性があります。インデックスホッピングの検証の結果、ほとんどのアプリケーションの解析結果に、大きな影響を与えないことが示されています。インデックスホッピングの恒久的な解決方法は開発中ですが、本書はインデックスホッピングを最小にするためのガイドラインとベストプラクティスを提供するものです。

参考文献

1. Illumina.An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.2016.Accessed April 2017.
2. Kircher M, Sawyer S, Meyer M. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform.*Nucleic Acids Res.*2012;2513-2524.
3. Illumina.HiSeq X Series of Sequencing Systems.2016.Accessed April 2017.
4. Illumina.Illumina Sequencing Technology.2010.Accessed April 2017.

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。販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, Design Studio, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Innuim, iSelect, MiSeq, 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. 770-2017-004-A-10MAY2017-JPN

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。

