

# 手軽に始めるターゲットシーケンス： Tailed PCRによるカスタムライブラリー作成

---

湯 祥彦

イルミナ株式会社  
フィールドアプリケーションサイエンティスト

2021年9月29日

# Agenda

## SECTIONS

1

ターゲットシーケンスの種類と  
Tailed PCR法について

2

Tailed PCR用 Primerのデザイン  
～ワークフローとプライマー配列～

3

Tailed PCRライブラリーの  
ランセットアップ方法

4

本日のまとめ

5

関連資料

SECTION 1

# ターゲットシーケンスの 種類とTailed PCR法について

---

# ターゲットシーケンスの特徴

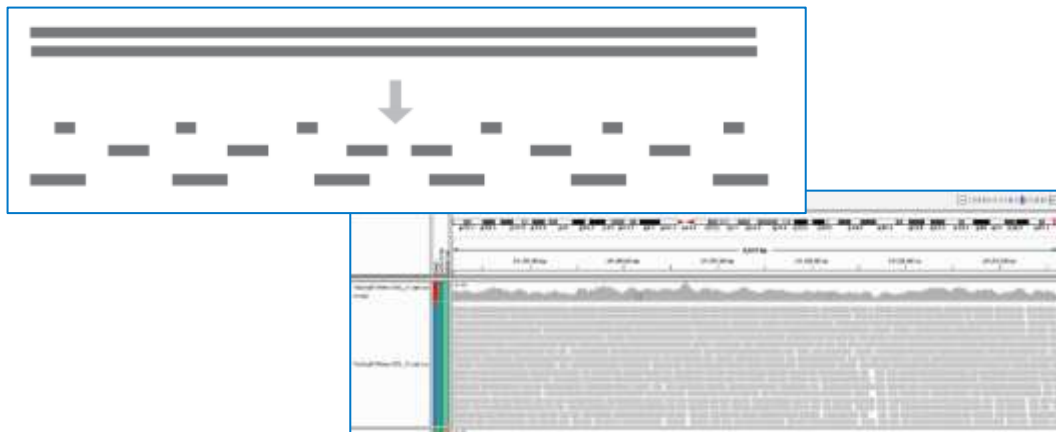
## 全ゲノムシーケンス

### メリット

- 全ゲノムを包括的にシーケンス
- 一塩基バリエーションのみでなく、構造バリエーションも解析可能

### デメリット

- 1サンプルに必要なデータ量が多くコスト高
- 解析にもコストと時間がかかる



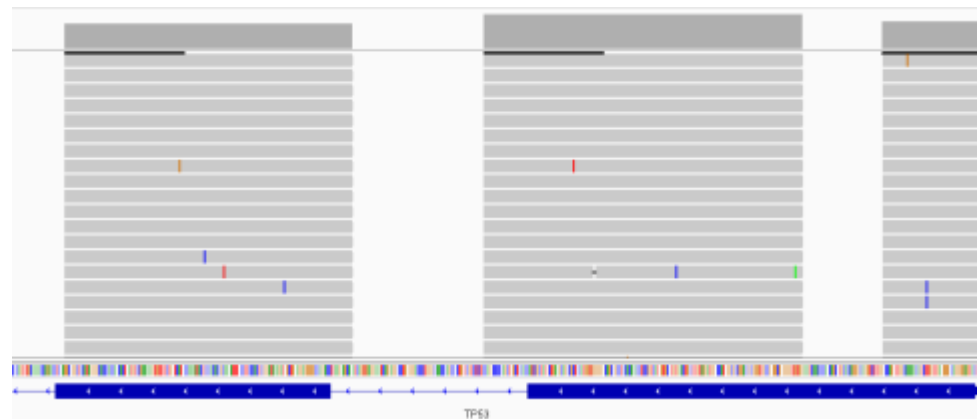
## ターゲットシーケンス

### メリット

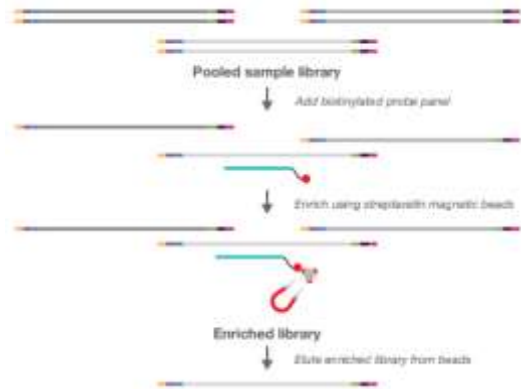
- 興味のある領域のみシーケンス
- 1サンプル当たりの必要データ量が少なく、シーケンス、解析コストが安い

### デメリット

- ターゲット領域外の情報は得られない
- カスタムライブラリーの場合イルミナのサポート外

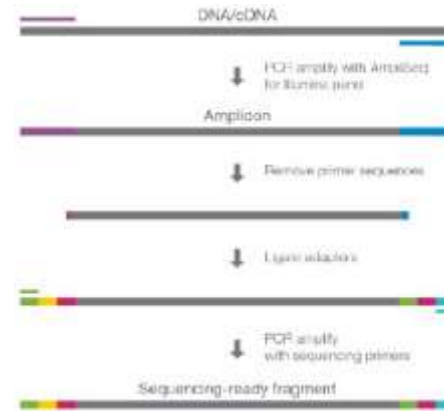


# ターゲットシーケンスのライブラリー調製法にも色々あります



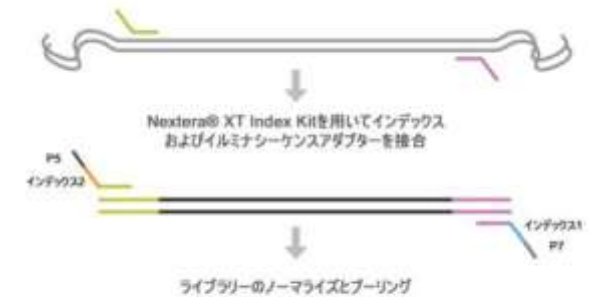
## ターゲットエンリッチメント解析

- 例：全エクソームシーケンス
- 全ゲノムライブラリーをエクソン特異的プローブでエクソンのみ濃縮（エンリッチメント）後、シーケンス



## 既存のパネルを用いたアンプリコン解析

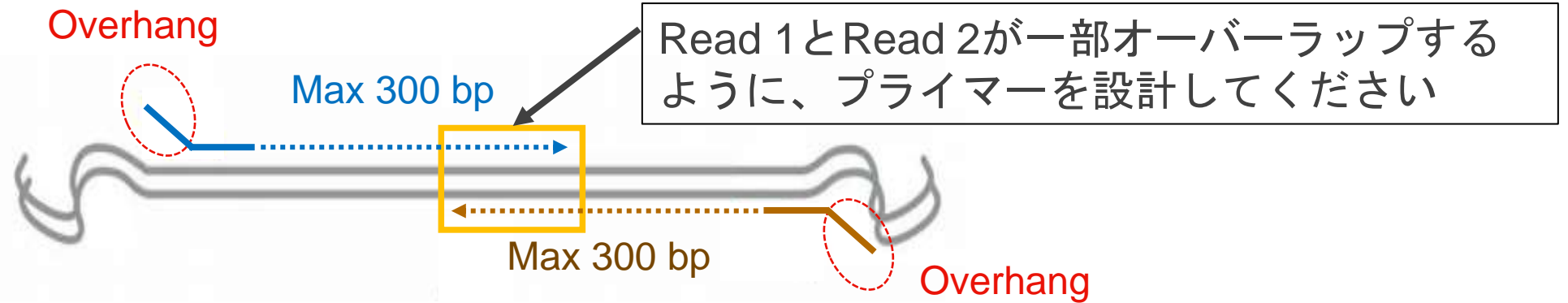
- 例：ヒトの腫瘍研究・遺伝性疾患パネル
- AmpliSeq™ for Illumina Cancer HotSpot Panel v2 など



## Tailed PCR法を用いたアンプリコン解析（カスタム）

- 興味のあるゲノム領域を増幅するカスタムプライマーを設計
  - カスタムPCRプライマーにアダプター配列を付与してPCR
- 本日のウェビナーでご紹介します

# Tailed PCR法：メリットとデメリット



\* Tailed-PCR法では、PCRプライマーにオーバーハング領域を付加してPCRを行うことで、PCRアンプリコンの端に特定配列を付加します

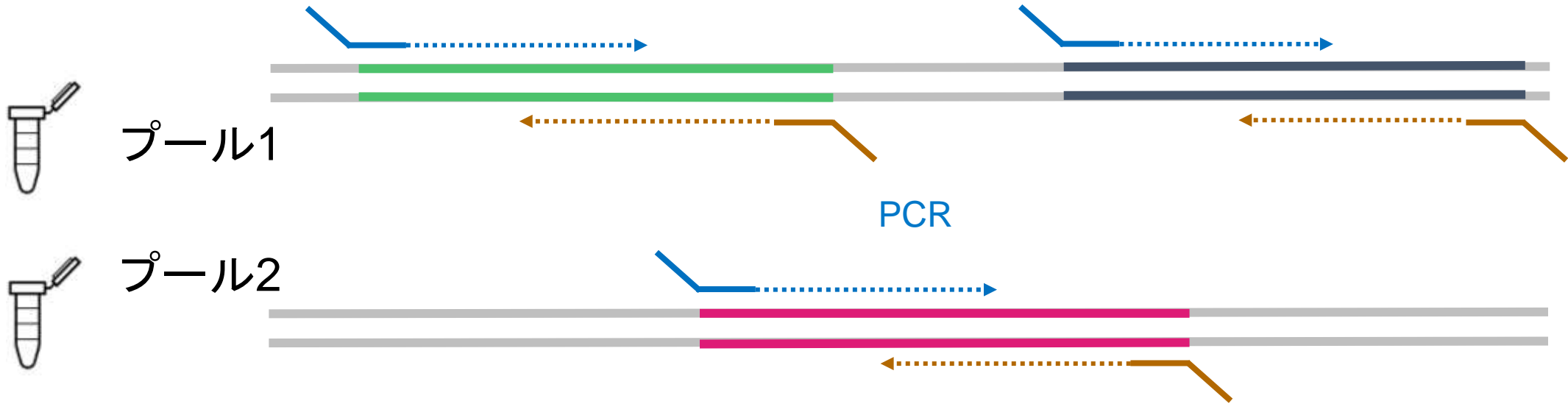
## 👍 メリット

- PCRの装置・経験で簡便に作成可能
- 生物種・領域を問わず自由にデザインできる

## 👎 デメリット

- 1つのアンプリコンの長さが限られる
- PCRのバイアスの影響を受ける可能性
- **カスタムライブラリーとなるのでイルミナのサポート外**

# Tailed PCR法の応用：Multiplex Tiling PCR



- 複数のプライマープールを用いてPCRを行うことでターゲット領域をカバーする方法
- 通常のTailed PCRではアンプリコン長に制限があるが、それを越えたターゲット領域に対応
- ゲノムの複数の領域、あるいは小さなサイズのゲノムであれば全長をライブラリー化することが可能

例：SARS-CoV-2 (ARTIC tailed amplicon method)

# Tailed PCRを用いたカスタムライブラリー作成は様々な研究分野で行われています

ターゲット領域のプライマー配列の5'末端にシーケンサーで解析する際に必要な配列を追加したプライマーにてPCRを行い、シーケンスを行う

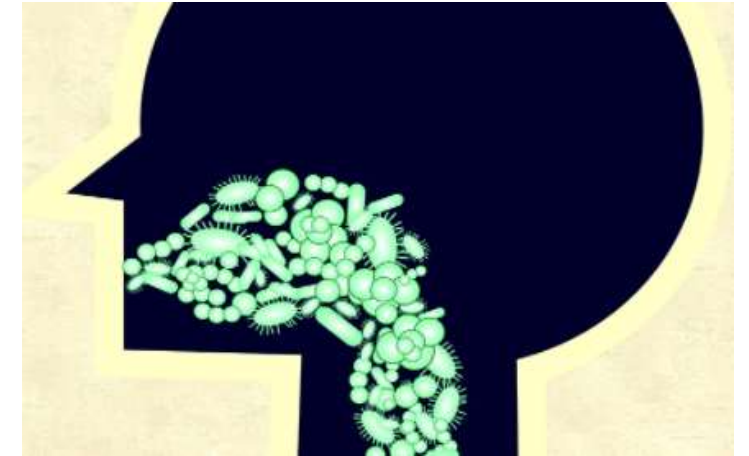
対象領域の  
ジェノタイピング



環境DNA (eDNA)  
メタバーコーディング解析

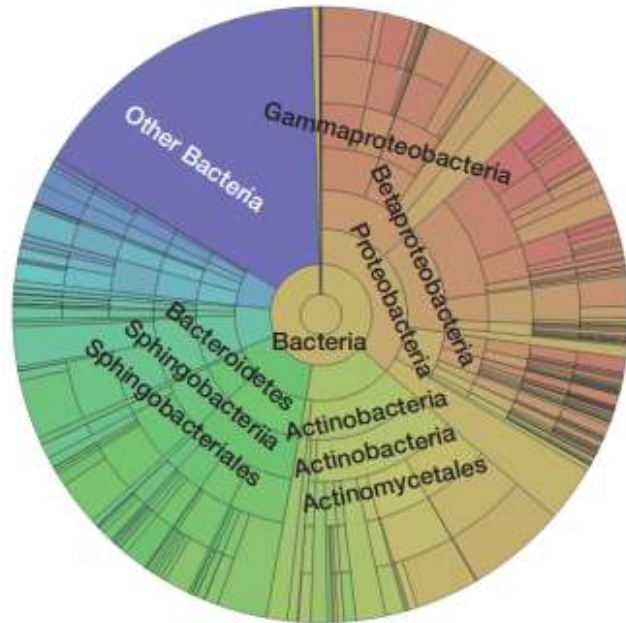


16Sメタゲノム解析  
ITSメタゲノム解析

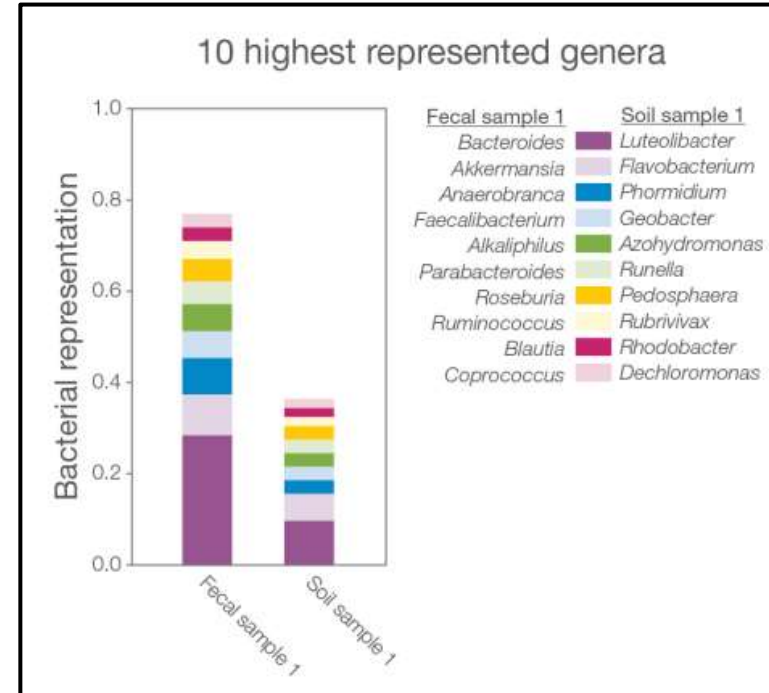




# Tailed PCRを用いた16Sメタゲノム解析結果の一例



サンプル中の菌叢構造  
の視覚化



異なるマイクロバイオームに  
おける細菌集団の解析

詳細はこちらのApp Note ([with MiSeq™](#), [with iSeq™ 100](#)) をご参照ください

# Tailed PCRを用いたカスタムライブラリー作成は様々な研究分野で行われています

ターゲット領域のプライマー配列の5'末端にシーケンサーで解析する際に必要な配列を追加したプライマーにてPCRを行い、シーケンスを行う

対象領域の  
ジェノタイピング

環境DNA  
メタバーコーディング解析

16Sメタゲノム解析  
ITSメタゲノム解析

日本語ウェブサイト

日本語ウェビナー

日本語ウェビナー

[【次世代シーケンスと  
サンガーシーケンスと  
の主な違い】](#)

[【環境DNA分析のご提案】](#)

[【16S rRNA メタゲノム解  
析のポイント プロトコール  
のご紹介】](#)

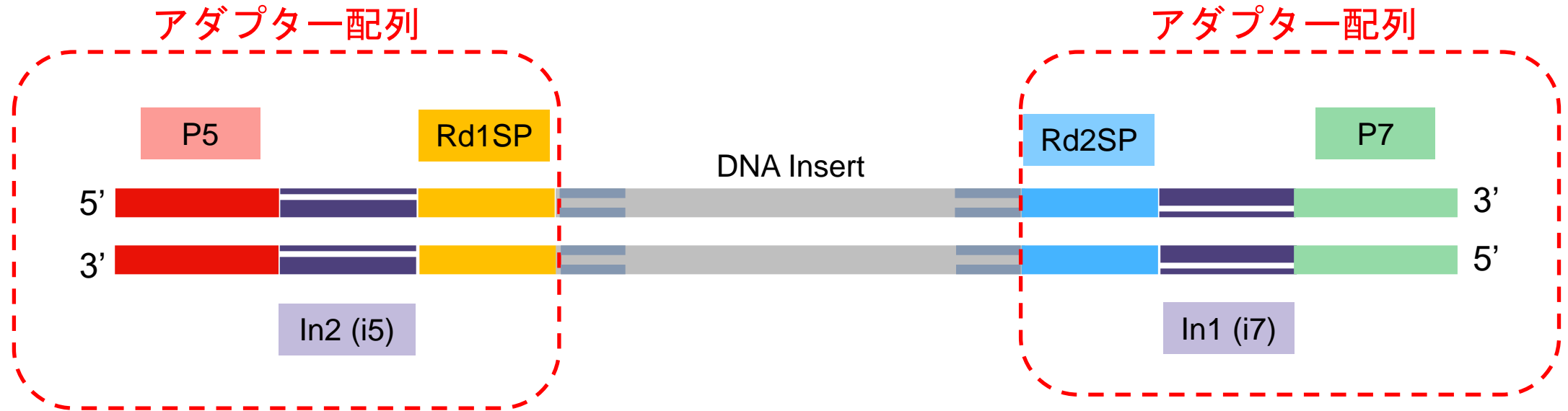
SECTION 2

# Tailed PCR用 Primerの デザイン

～ワークフローと  
プライマー配列～



# ライブラリー構造 (Dual indexの例)



DNA insert: Read 1あるいは2としてシーケンスされるDNA

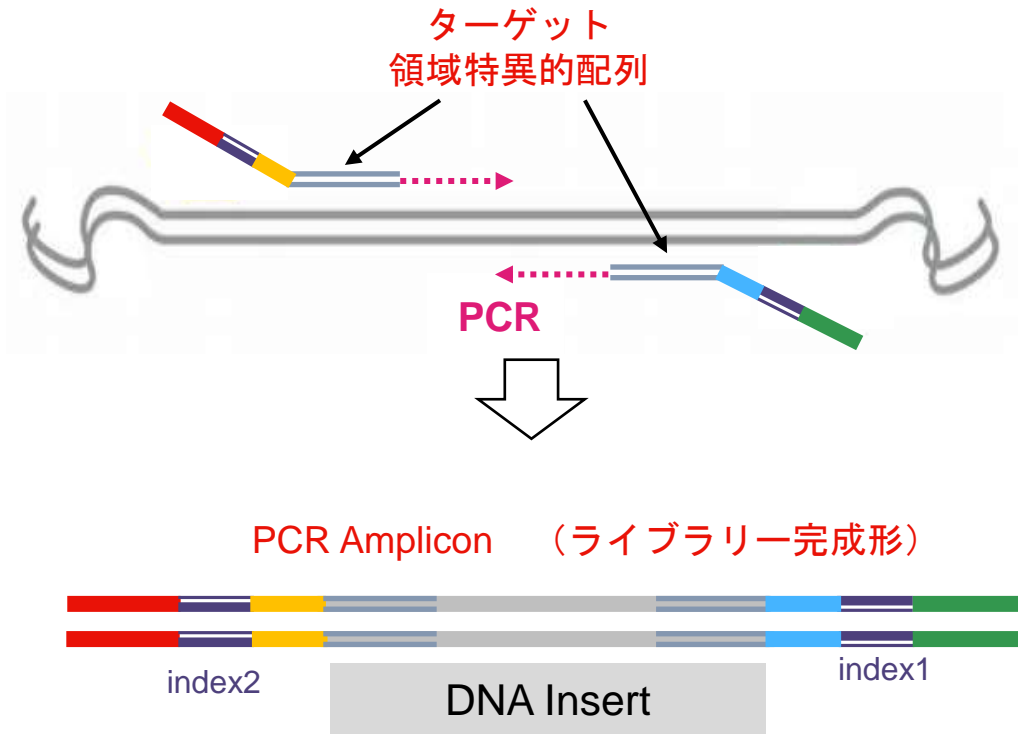
**Rd1SP** および **Rd2SP** = シーケンスプライマー結合配列

**Index 1 (i7)** および **Index 2 (i5)**: インデックス配列 (サンプルを区別するためのバーコード配列)

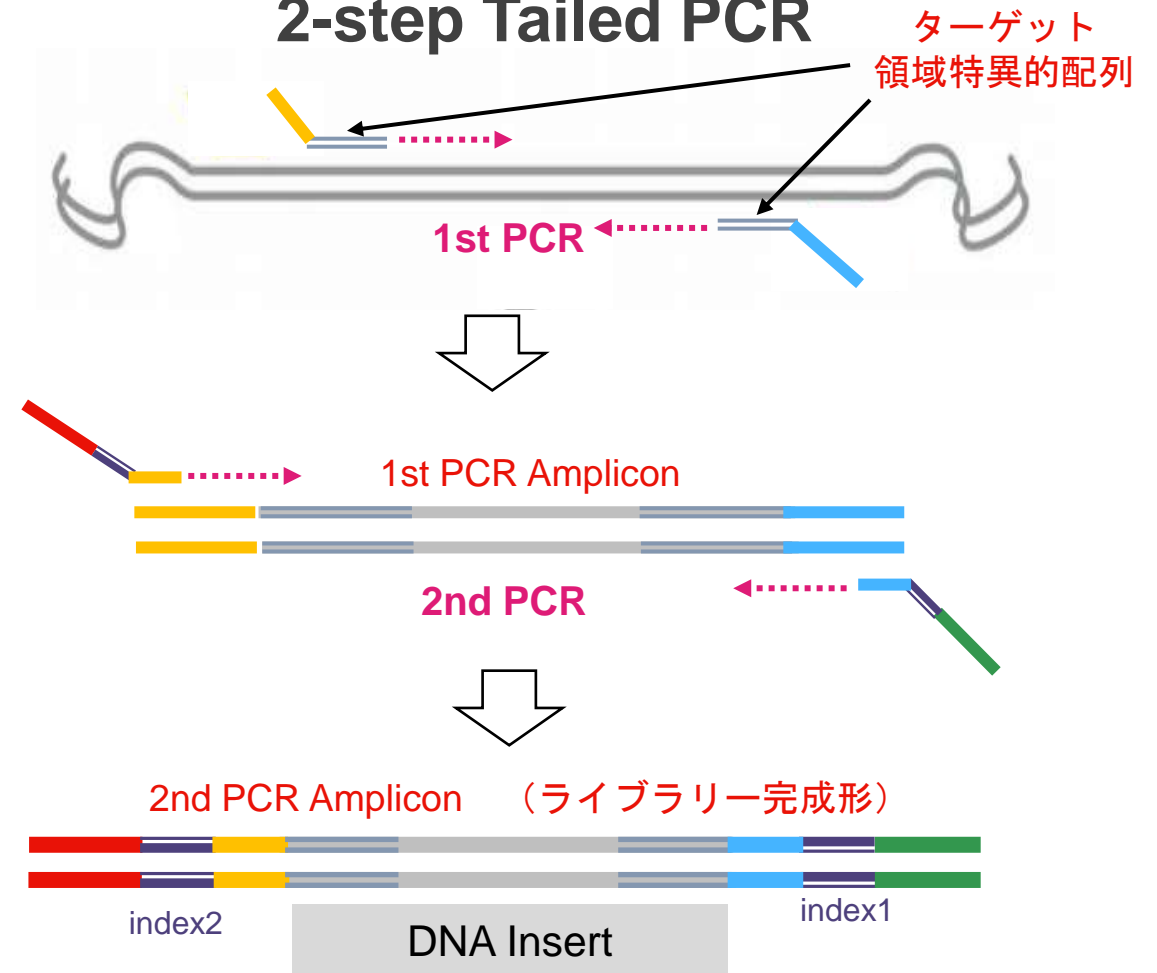
**P5** および **P7** = フローセルに結合するために必要な配列 (すべてのライブラリーで共通の固定配列)

# Tailed PCRのワークフロー : 1-stepと2-step

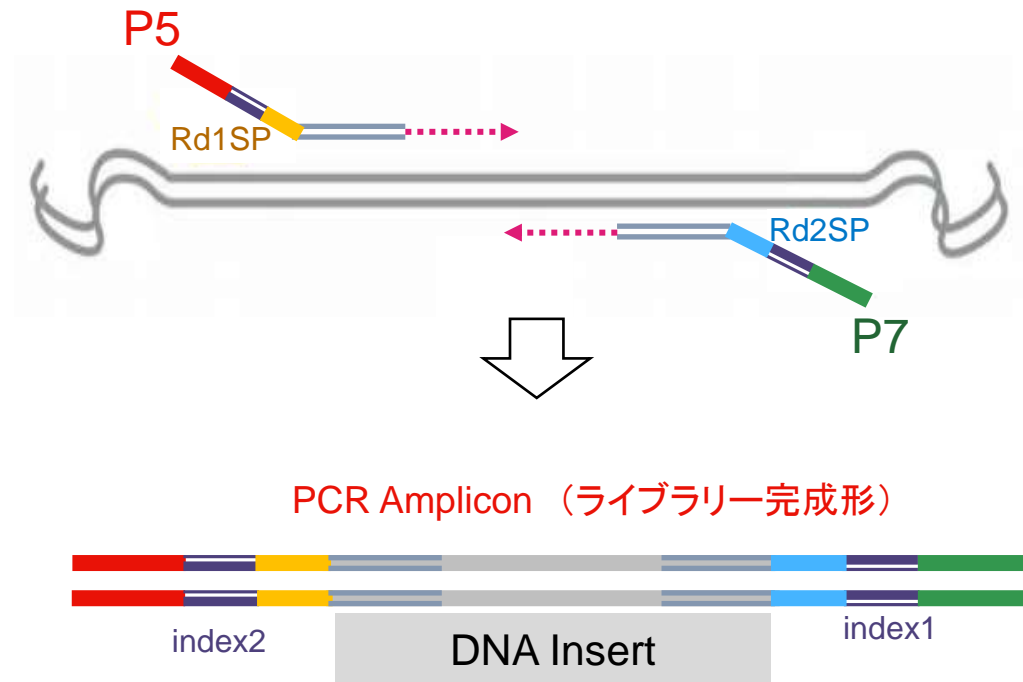
## 1-step Tailed PCR



## 2-step Tailed PCR



# 1-step Tailed PCRのメリット・デメリット

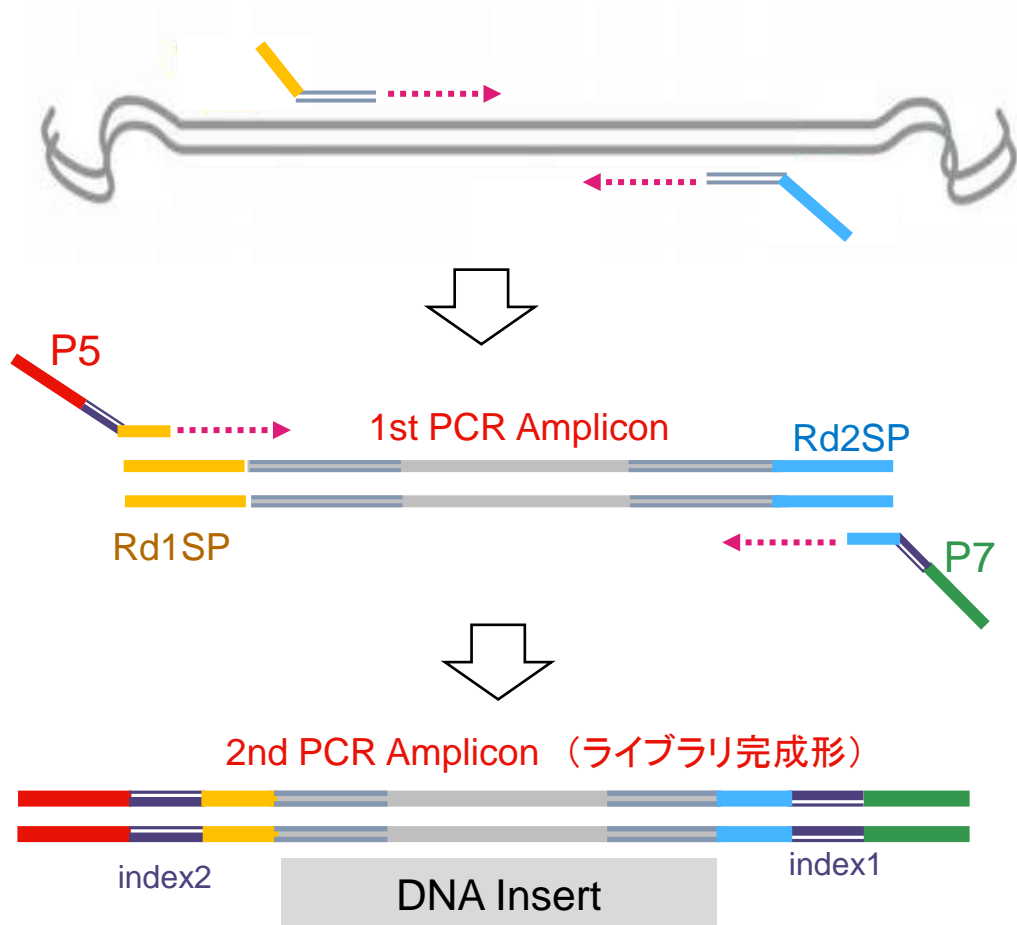


- 実験ステップが少ない
- PCRによるバイアスがより少ない



- 作成後にインデックスの変更ができない
- 長鎖プライマーの作製が必要

# 2-step Tailed PCRのメリット・デメリット



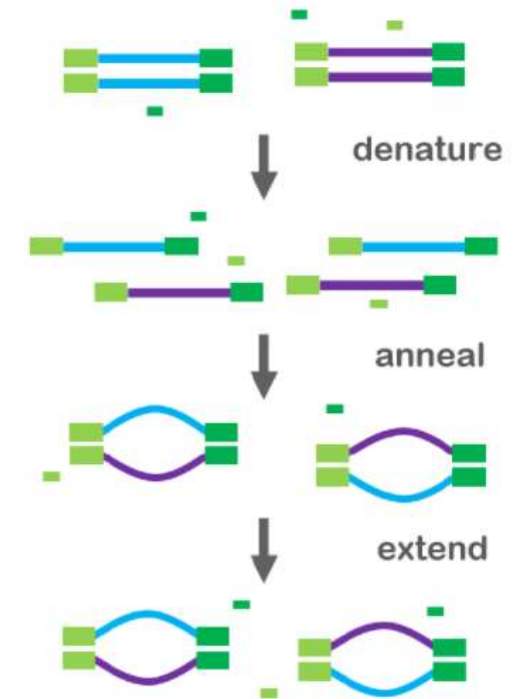
- 1st PCRのプロダクトを用いて、別のインデックスでの再解析が可能
- 2nd PCRのプライマー配列（アダプター）は他のプロジェクトでも使用可能



- 1-step PCRよりもPCRによるバイアスがかかりやすくなる

# Tailed PCR法の注意点（1-step/2-stepともに）

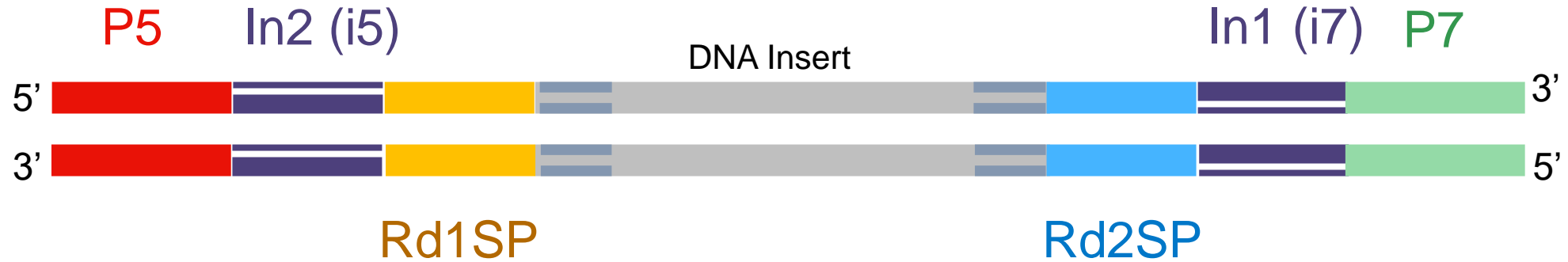
- いずれの場合も増幅がかからない場合に  
対象領域が増幅しにくい部分なのか  
長鎖プライマーが問題なのか（特に1-step PCRにて）  
の判断がつきにくい
- PCRによるBubble productが生じやすい
  - 過剰DNAインプット、過剰なPCRサイクルに起因
  - シーケンスには問題ない



Bubble Productに関する詳しい説明  
はこちらの[Bulletin](#)をご参照ください



# ライブラリー構造 – Rd1/2SP配列による種類分け

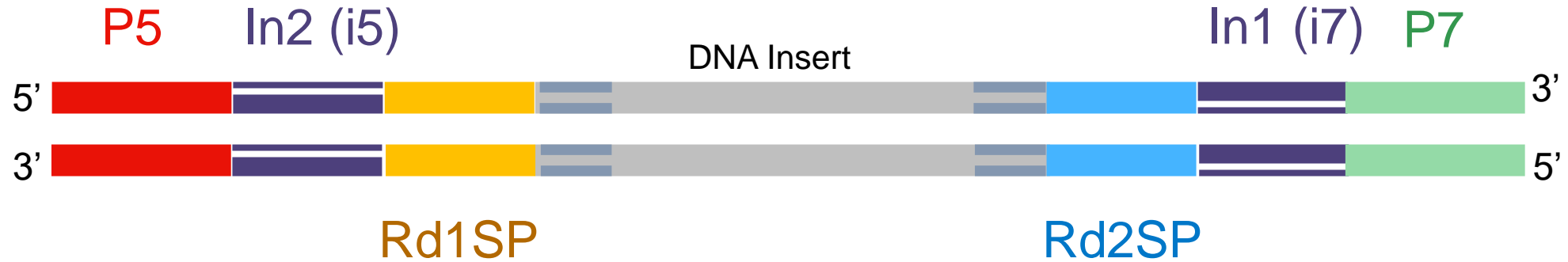


インデックス配列（**i7**および**i5**）、シーケンスプライマー結合配列（**Rd1SP** および**Rd2SP**）  
→イルミナのキットの配列を基にすることも、カスタム配列にすることも可能

本ウェビナーでは

- ・ Nextera™-basedアダプターを使用した2-step Tailed PCR
  - ・ TruSeq™-basedアダプターを使用した1-step Tailed PCR
- をご説明いたします。

# ライブラリー構造 – Rd1/2SP配列による種類分け



インデックス配列（**i7**および**i5**）、シーケンスプライマー結合配列（**Rd1SP** および**Rd2SP**）  
→イルミナのキットの配列を基にすることも、カスタム配列にすることも可能

## Custom Adapter

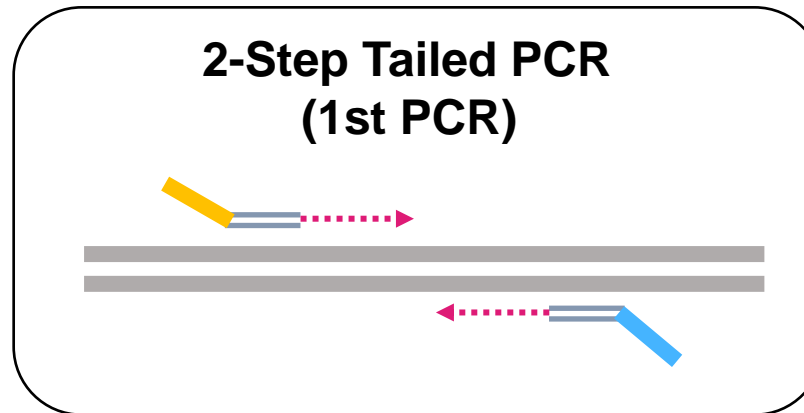
- Index, Rd1/2SPも完全にオリジナルの配列で設計
- 論文などを参照、トラブルシューティングが難しい
- カスタムシーケンスプライマーが必要
- iSeq 100は非対応

# 2-step Tailed PCRの Primer配列例 (Nextera-based)

---

# 2-1

# Tailed PCR (2-step, Nextera-based) Primer配列 【1st PCR】



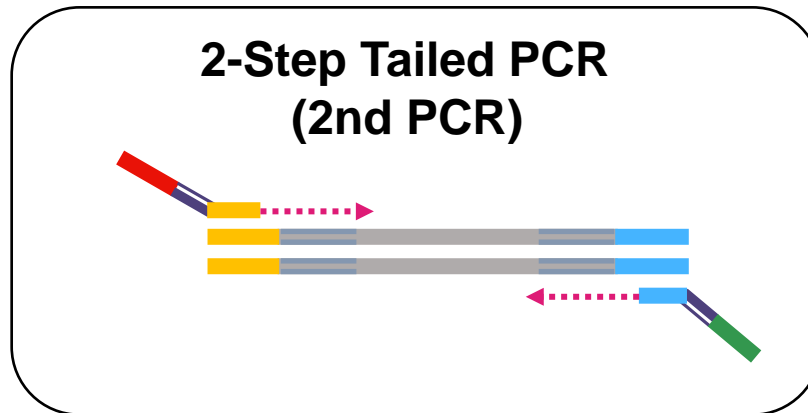
## PCR primer 1 (1st PCR)

5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG - (ターゲット領域相補配列F) -3'

## PCR primer 2 (1st PCR)

5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG - (ターゲット領域相補配列R) -3'

# Tailed PCR (2-step, Nextera-based) Primer配列 【2nd PCR】



## PCR primer 1 (2nd PCR)

5' – AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC – [index 2 (i5)] – TCGTCGGCAGCGTC – 3'  
← P5 →

## PCR primer 2 (2nd PCR)

5' – CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT – [index 1 (i7)] – GTCTCGTGGGCTCGG – 3'  
← P7 →

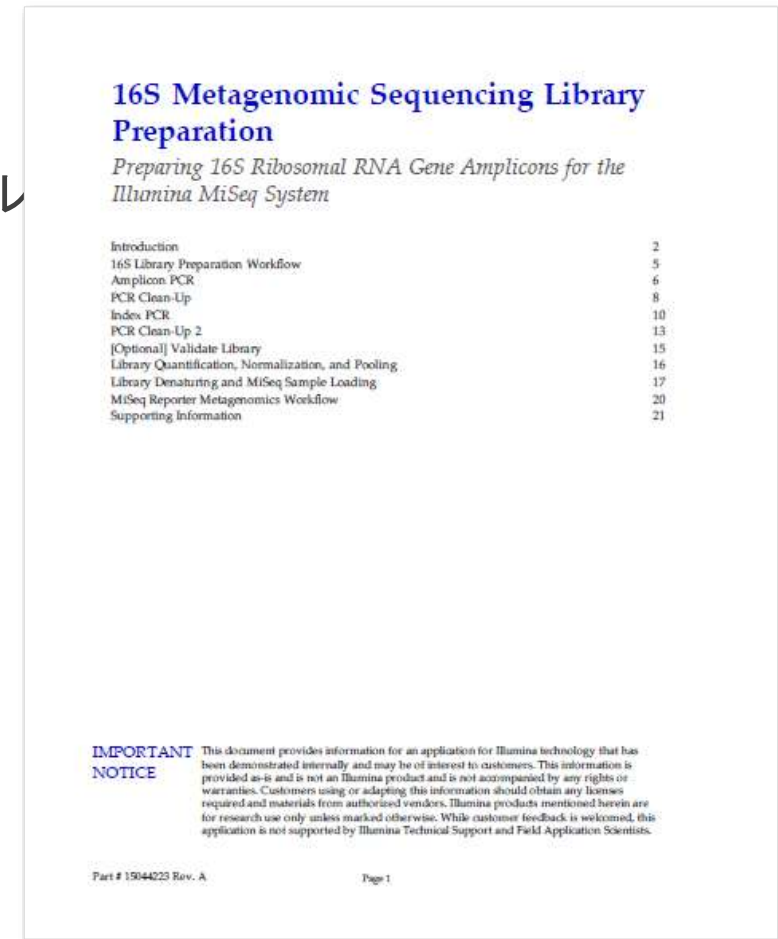
※2nd PCR PrimerにNextera XT Index Kit v2などを用いることもできます

# 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation

## ILLUMINA 参考公開プロトコール

- 16Sメタゲノム解析用のライブラリー調製プロトコール
  - 16S rRNA V3–V4領域を含む460 bpを増幅解析
  - MiSeq V3 kit 2x300サイクルでのランを想定
  - Nextera XT Index Kit v2を2nd PCR Primerとして使用した例
  - PCR条件、Primer濃度なども記載

詳細は[こちら](#)よりPDFをダウンロードください  
日本語版資料もご用意しております



# 真菌Metagenomics Sequencing Library Preparation Illumina参考公開プロトコル

- 真菌ITSメタゲノムのライブラリー調製プロトコル
  - ITS1領域を増幅解析
  - 2x150サイクルでのランを想定
  - Nextera XT Index Kit v2あるいはNextera DNA CD Index (24 indexes / 96 indexes) を2nd PCR Primerとして使用
  - PCR条件、Primer濃度なども記載

詳細は[こちら](#)よりPDFをダウンロードください  
日本語版資料もご用意しております

## Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol

Preparing ITS Amplicons for Sequencing on Illumina Sequencing Systems

Introduction	2
Workflow Summary	3
Tips and Techniques	4
Library Prep Workflow	4
Amplicon PCR	5
PCR Cleanup	6
Index PCR	7
Second PCR Cleanup	9
Optional Check Library	10
Library Quantification, Normalization, and Pooling	11
Sample Loading	11
Supporting Information	11
Revision History	17

**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 identify their authorized vendors. Illumina products mentioned herein are for research use only unless marked otherwise. While customer feedback is welcomed, the application is not supported by Illumina Technical Support and Field Application Scientists.

Document # 1000000094941-V01

Page 1

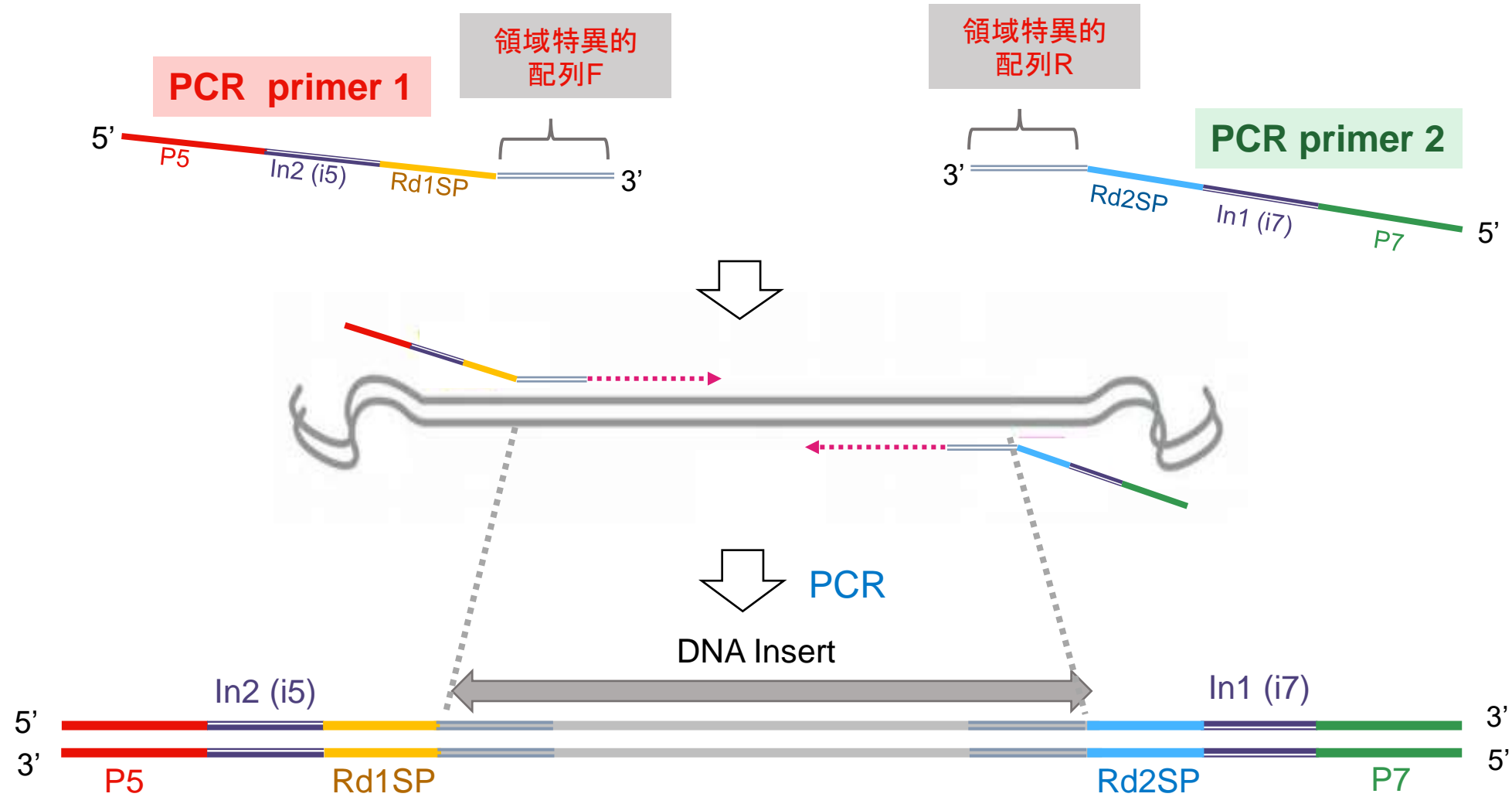
# 1-step Tailed PCRの Primer配列例 (TruSeq-based)

---

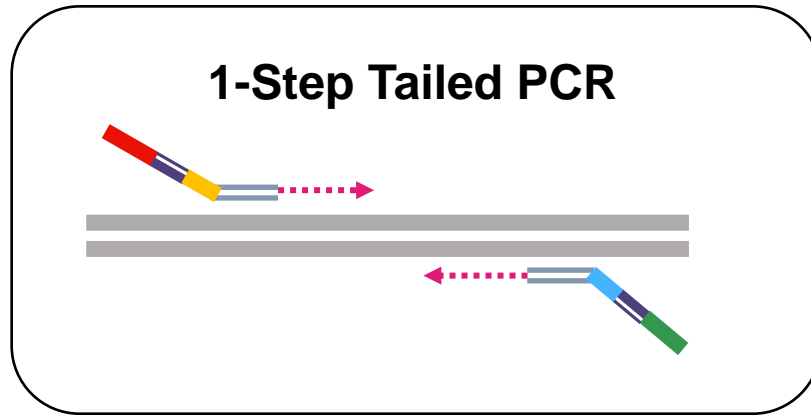
2-2



# Tailed PCR (1-step) Workflow



# Tailed PCR (1-step, TruSeq-based) Primer配列



## PCR primer 1

5' - **AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC** - [index 2 (i5)] - **ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT** - (領域特異的配列F) - 3'

←----- P5 -----→

## PCR primer 2

5' - **CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT** - [index 1 (i7)] - **GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT** - (領域特異的配列R) - 3'

←----- P7 -----→

# インデックス配列デザイン およびプーリングの注意点

---

# 2-3

# カスタムインデックス・デザイン時の注意事項

- 2つ以上のライブラリーを混合(Pooling)する場合、インデックス配列の組み合わせに注意
- シーケンサーごとに蛍光シグナル検出の特性が異なる (p. 29~31)  
→ デザイン・Pooling時にインデックス部分の塩基バランスの考慮が必要
- 特に少ないサンプル数のランで、インデックスの蛍光バランスをとるのが難しいときは、こちらの資料もご参照ください

➤ [Index Adapters Pooling Guide](#)

➤ [Library pooling guidelines for the NextSeq™ 500/550 and MiniSeq™ systems](#)

# 少数サンプルのPooling時の注意事項

## ～MiSeq, HiSeq™ Systemsの場合～

- ATGCの塩基がそれぞれ異なる蛍光色素でラベル（4チャンネル・ケミストリー）されており、蛍光色素の励起には以下のレーザーが使用される

- A/C塩基 → 赤色レーザー
- G/T塩基 → 緑色レーザー

- インデックス・リードの各サイクルに、A/C塩基およびG/T塩基がどちらも出現する必要がある

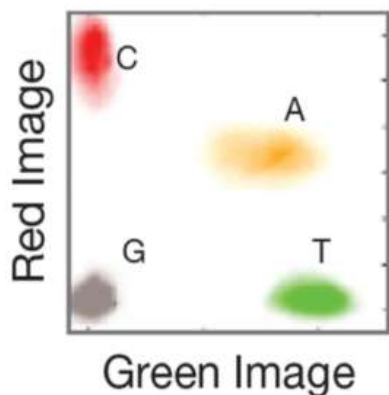
	Index 1	Index 2
N705	GGACTCCT	S502 CTCTCTAT
N706	TAGGCATG	S502 CTCTCTAT
N701	TAAGGCGA	S503 TATCCTCT
N702	CGTACTAG	S503 TATCCTCT
	✓✓✓✓✓✓✓✓	✓✓✓✓XXXX

# 少数サンプルのPooling時の注意事項

## ～MiniSeq, NextSeq Systems,およびNovaSeq™ 6000の場合～

- インデックス・リードの各サイクルに、A/C塩基（赤色あるいは青色レーザー）およびA/T塩基（緑色レーザー）がどちらも出現することが望ましい
- すべてのインデックス・リードの先頭2塩基がGで始まっていると、クラスタの検出に失敗し、データの出力が行われない

赤色・緑色レーザーでのシグナル検出の例



詳細はこちらの[Bulletin](#)をご参照ください



カラーバランスの良好なindexの組み合わせの一例

	Index 1 (i7)							
D705	A	T	T	C	A	G	A	A
D706	G	A	A	T	T	C	G	T
D712	A	G	C	G	A	T	A	G
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓



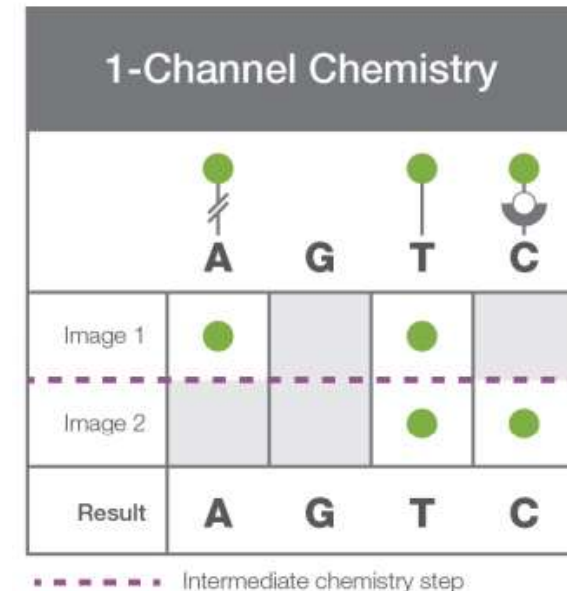
すべてのindexリードの先頭2塩基がGで始まっているため、データ出力されない一例

	Index 1 (i7)							
N705	G	G	A	C	T	C	C	T
N718	G	G	A	G	C	T	A	C
	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓

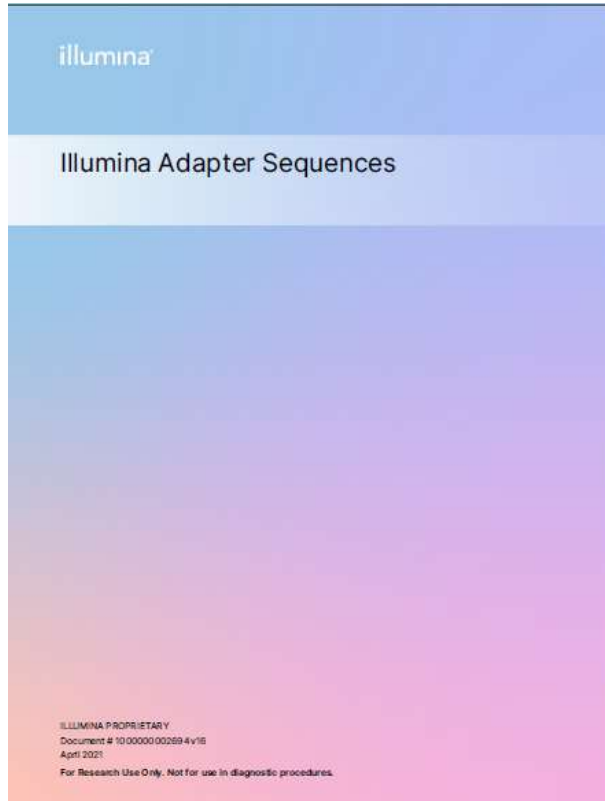
# 少数サンプルのPooling時の注意事項

## ～iSeq 100の場合～

- 1色の蛍光色素と1サイクルにつき2枚の画像撮影にて、塩基の検出を行う  
(1チャンネル・ケミストリー)
- すべてのインデックス・リードの先頭2塩基がGで始まっていると、クラスタの検出に失敗し、データの出力が行われない
- どのサイクルにおいても、すべてGとならないようにする



# Illumina Adapter Sequences



- Local Run Managerなどで既存インデックスを選択してランセットアップ可能（カスタムで入力する手間がない）
- 少サンプルプール時の蛍光バランスなどについても [Index Adapters Pooling Guide](#) を参照できる



- インデックス長、種類(~384)に制限がある

[Illumina Adapter Sequences Document](#)



SECTION 3

# Tailed PCRライブラリー のランセットアップ方法

---



# Tailed PCRライブラリーのランセットアップについて

- シーケンサーの機種、OSやControl Software Versionによってセットアップ方法が異なります
- 多くの機種で、Local Run Manager (LRM) をランセットアップに使用できます
- 本日は、先ほどご紹介した「2-step tailed PCR (Nextera-based)」と「1-step tailed PCR (TruSeq-based)」の場合にわけて、それぞれの設定をご紹介します
- また、ライブラリーロードの際の注意事項もご案内します
- インデックスの入力配列の向きに関しては、本資料のAppendix (p. 73 ~) をご参照ください

# 2-step Tailed PCR (Nextera-based) の ラン設定方法

～Nextera XT indexなどを  
使用する場合～

# 3-1

# 本セクションの説明内容

- イルミナのインデックスキットをそのまま使用する、あるいは同じインデックス配列の場合は、通常のランセットアップ法になります
- 今回のウェビナーでは、Local Run Manager (LRM)とIllumina Experiment Manager (IEM)での設定法を簡単にご紹介します
  - MiSeq (MCS3.0以降) , iSeq 100, NextSeq 500/550, MiniSeq  
→ LRM (p. 37~)
  - MiSeq (MCS2.6以前)  
→ IEM Sample Sheet (p. 45~)

# Local Run Manager v2のホーム画面

1. Local Run Manager (LRM) のCreate Runページへの移動
  - a. Create Runを選択
  - b. モジュールを選択

RUN NAME / ID	MODULE	STATUS	LAST MODIFIED
User 2 run --	GENERATEFASTQ	Ready for Sequencing	2018-02-11 14:41
User 1 Run --	GENERATEFASTQ	Ready for Sequencing	2018-02-11 14:40

# Local Run Manager v2でのランの設定画面

## Create Run GENERATEFASTQ

[Import Sample Sheet](#)

**ランの名前と説明**

Run Name\*

Run Description

**ライブラリー調製キットの選択、ラン情報**

Library Prep Kit\*

Index Reads\*  0  1  2

Read Type\*  Single Read  Paired End

Read Lengths\* 

READ 1	INDEX 1	INDEX 2	READ 2
<input type="text" value="151"/>	<input type="text" value="8"/>	<input type="text" value="8"/>	<input type="text" value="151"/>

Custom Primers  Read 1  Index  Read 2

**選択したモジュールに応じたデータ解析情報**

Module-Specific Settings

Adapter Trimming\*  On  Off Show Advanced Settings

**サンプルの情報**

[Show Index Sequence](#)

	SAMPLE ID*	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (17)	INDEX 2 (15)	SAMPLE PROJECT	
	1					X

[+ 1](#) Rows

[Cancel](#) [Export Sample Sheet](#) [Save Run](#)

# Nextera 2-Step PCRのランの設定方法-1

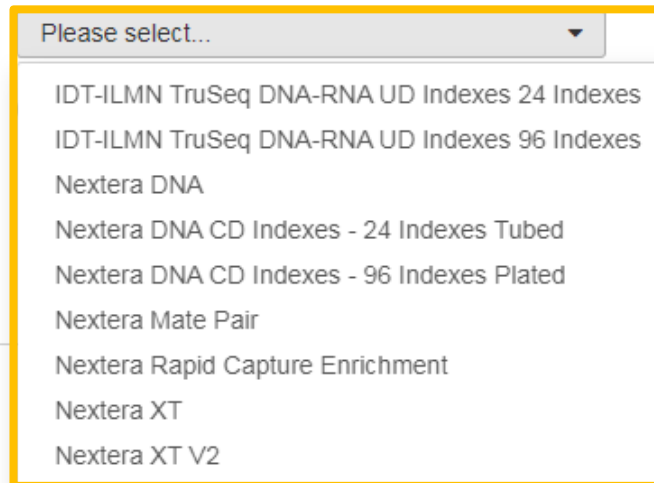
## 2. Library Prep Kitより使用したインデックスキットを選択する

### Run Settings

Library Prep Kit \*

Index Reads \*

### Module-Specific Settings



The image shows a dropdown menu with a yellow border. The menu is open, displaying a list of options. The top option is "Please select..." with a downward arrow. Below it are several options: "IDT-ILMN TruSeq DNA-RNA UD Indexes 24 Indexes", "IDT-ILMN TruSeq DNA-RNA UD Indexes 96 Indexes", "Nextera DNA", "Nextera DNA CD Indexes - 24 Indexes Tubed", "Nextera DNA CD Indexes - 96 Indexes Plated", "Nextera Mate Pair", "Nextera Rapid Capture Enrichment", "Nextera XT", and "Nextera XT V2".

- Please select...
- IDT-ILMN TruSeq DNA-RNA UD Indexes 24 Indexes
- IDT-ILMN TruSeq DNA-RNA UD Indexes 96 Indexes
- Nextera DNA
- Nextera DNA CD Indexes - 24 Indexes Tubed
- Nextera DNA CD Indexes - 96 Indexes Plated
- Nextera Mate Pair
- Nextera Rapid Capture Enrichment
- Nextera XT
- Nextera XT V2

# Nextera 2-Step PCRのランの設定方法-2

## 3. リードタイプ、リード長などを入力する

Run Settings

Library Prep Kit \*

Index Reads \*  0  1  2

Read Type \*  Single Read  Paired End

Read Lengths \* 

READ 1	INDEX 1	INDEX 2	READ 2
151	8	8	151

Custom Primers -- -- -- --

- Nexteraインデックスキットを選択すると、自動でそのインデックスキットのパラメーターが入力される
- リードタイプを選択、リード長・インデックス長を確認し、必要であれば変更・修正してください



# Nextera 2-Step PCRのランの設定方法-3

## 4. サンプル情報の入力

Show Index Sequence

	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (I7)	INDEX 2 (I5)	SAMPLE PROJECT	
1	Sample					✕

+ 1 Rows

Cancel

NAME	SEQUENCE
H705	GGACTCCT
H706	TAGGCATG
H707	CTCTCTAC
H710	CGAGGCTG
H711	AAGAGGCA
H714	GCTCATGA

NAME	SEQUENCE
H503	TATCCTCT
H505	GTAAGGAG
H506	ACTGCATA
H517	GCGTAAGA

Export Sample Sheet Save Run

- サンプルIDの入力、インデックスの名前と配列を選択する  
→Save Runを選択して終了

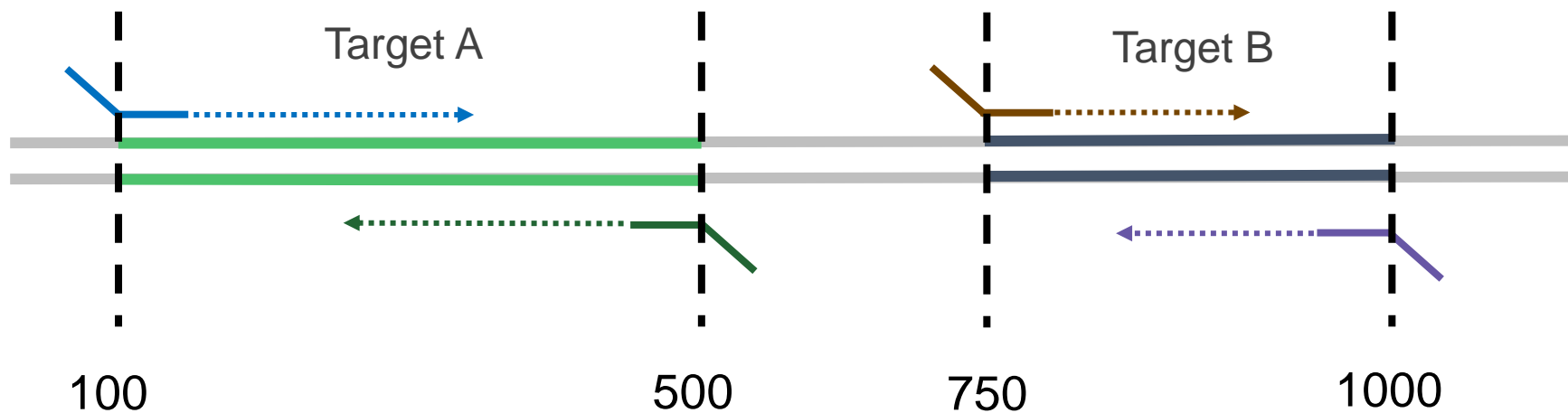
Local Run Manager v3については、下記のウェビナーをご参照ください。

[【MiSeqアップデート】 Windows 10対応ソフトウェアのご紹介・MiSeq Control Software v4 /Local Run Manager v3](#)

# Local Run Manager v2で二次解析以降も行う場合-1 ~マニフェストファイルとは~

マニフェストファイルが必要となります

- ターゲットアンプリコンのゲノム上の位置情報を記載したテキストファイル



Manifest file内  
の位置情報

Chromosome	Start Position	End Position
1	100	500
1	750	1000

Manifest fileに関する  
の詳細はこちらの[Bulletin](#)  
をご参照ください

# Local Run Manager v2二次解析以降も行う場合-2

## ～ラン設定方法 (1)～

1. Local Run Managerホーム画面のCreate Runページへの移動
  - a. [Create Run](#)を選択 (→p. 37参照)
  - b. [DNA Amplicon Analysis](#)や[16S Metagenomics Analysis](#)モジュールを選択することでFASTQファイル生成以降の解析も可能です

The screenshot displays the Local Run Manager v2 interface. At the top, there is a navigation bar with 'Local Run Manager' and 'MISEQ MISEQ' logos, 'RUN DASHBOARD', and 'TOOLS' menu. On the right, there is a search icon, a help icon, a user profile 'Admin User', and the 'illumina' logo. Below the navigation bar, there are five status cards: 'Ready' (2), 'In Progress' (0), 'Stopped or Unsuccessful' (0), 'Complete' (0), and 'Total' (2). A 'Create Run' button is highlighted with a yellow box, and a dropdown menu is open, showing options: 'DNA Amplicon' (highlighted with a red box), 'DNA Enrichment', 'GenerateFASTQ', and 'RNA Amplicon'. Below the status cards, there is a table header with columns: 'RUN NAME / ID', 'MODULE', 'STATUS', and 'LAST MODIFIED'.

2. 各モジュールのラン条件設定 (→p. 38~41)

# Local Run Manager v2で二次解析以降も行う場合-3 ～ラン設定方法 (2) ～

## 3. マニフェストファイルのLocal Run Managerへのアップロード方法

- ラン設定時にマニフェストファイルを指定する場合：サンプル情報入力画面で**Import Manifests**をクリックし、マニフェストファイルをアップロード



The screenshot shows a user interface with a blue button labeled 'Import Manifests' and a 'Show Index Sequence' button. Below them is a table with the following data:

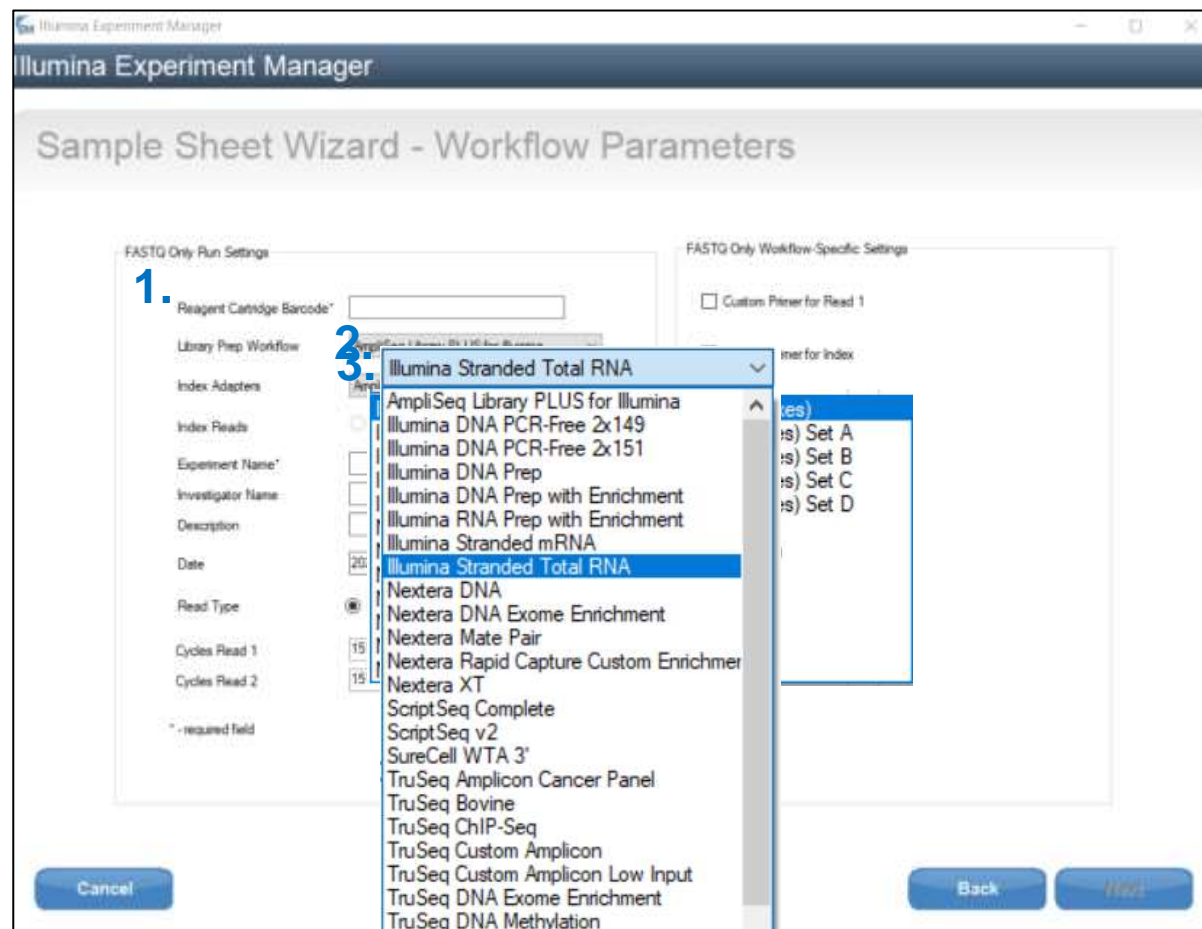
	SAMPLE ID*	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (I7)	INDEX 2 (I5)	MANIFEST*	SAMPLE PROJECT	
1	Sample1		N701	E501	Example_manifest.txt		x

- 今後、複数回使用する場合：Local Run Managerのホーム画面の**Tools**より**Module Settings**を選択

→各モジュールの画面から  
マニフェストファイルを登録

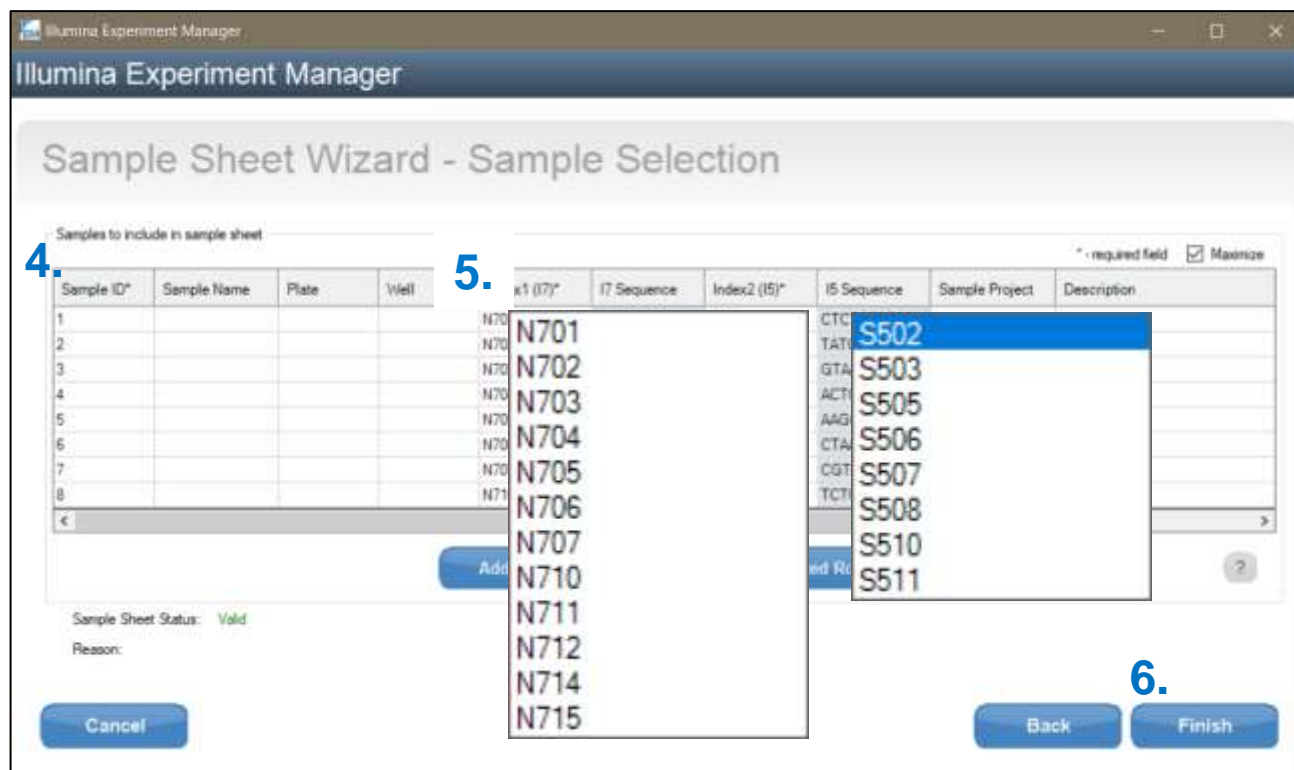


# MiSeq (Control Software v2.6以前): Illumina Experiment Manager (IEM) v1.19.1での設定方法-1



1. Reagent Cartridge Barcode  
を入力する
2. Library Prep Kitより使用した  
キットを選択する
3. Index Adaptersより使用した  
Index Kitを選択する

# MiSeq (Control Software v2.6以前): Illumina Experiment Manager (IEM) v1.19.1での設定方法-2



4. Sample IDを入力する
5. Index 1, 2 をドロップダウンリストから選択する
6. Finishをクリックし、SampleSheet.csvを出力
7. Control Softwareで指定したフォルダにファイルを置く

# Local Run Manager (LRM) / Illumina Experiment Manager (IEM)

日本語ウェビナー

[【MiSeqアップデート：Windows 10対応ソフトウェアのご紹介・MiSeq Control Software v4/Local Run Manager v3】](#)

[【新登場 MiSeq Control Software v3.1 / Local Run Manager v2.0 の紹介】](#)

[【サンプルシート作成ツール：Illumina Experimental Manager \(IEM\) の使用方法 - 最新バージョン v1.15.1 のご紹介】](#)

詳細な設定や使用方法については、  
これらのウェビナーや各ソフトウェアガイドもご参考ください

# 1-step Tailed PCR (TruSeq-based) の ラン設定方法

## (注意)

販売中のTruSeqインデックスと同じ  
インデックス配列にした場合は、3-1  
の方法に従いランセットアップ可能  
です

# 3-2

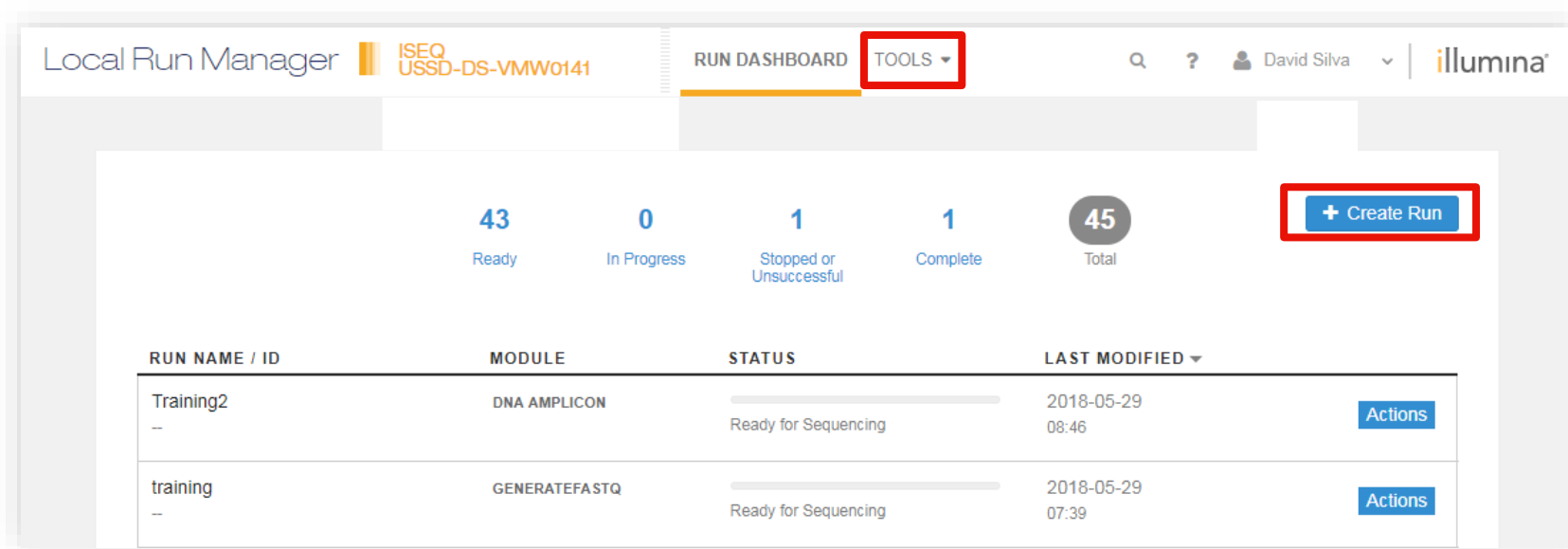


# 本セクションの説明内容

- 次の場合、カスタムでランを設定する必要があります
  - インデックス配列がカスタム
  - かつ、TruSeq系アダプター配列（Rd1SP/Rd2SP）を有する1-step Tailed PCR Primer配列を使用される場合
- 今回のウェビナーでは LRMおよびIEMでの設定法を簡単にご紹介します
  - MiSeq（MCS3.0以降）, iSeq 100, NextSeq 500/550, MiniSeq
    - カスタムライブラリのLRMでの設定方法（p. 50~）
  - MiSeq (MCS2.6以前)
    - カスタムライブラリのIEMでの設定方法（p. 56~）

# Local Run Manager v2でのカスタムインデックス配列の入力

- A. LRM画面上での手動入力 → p. 51
- B. Sample Sheetのテンプレートファイルを編集し、インポート → p. 52~54
- C. カスタムライブラリー調製キットの登録 → p. 55



\* LRM上でのインデックス配列の入力の向きについては、Appendixご参照ください

# Local Run Manager v2でのランの設定方法A ～LRM画面上での手動入力～

1. LRMのCreate Runページへの移動
2. LRMを用いてラン・サンプル情報を入力
  - a. Library Prep KitはCustomを選択し、インデックスリード、リードタイプを入力・選択
  - b. サンプル欄にて、サンプル名や使用するインデックス配列画面上に直接入力

Create Run DNA AMPLICON

Import Sample Sheet

Run Name\*  
Run Name

Run Settings

Library Prep Kit\*  
Please select...  
TruSeq Amplicon  
TruSight Amplicon Panels  
AmplSeq Library PLUS for Illumina...  
Custom

Index Reads\*

	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (I7)	INDEX 2 (I5)	SAMPLE PROJECT	
1	Sample					x

- c. すべてのサンプル分のLRM上でインデックス配列を入力した場合は、Save Run→完了

Export Sample Sheet

Save Run

# Local Run Manager v2でのランの設定方法B ～Sample Sheetを用いる方法～

1. 多検体をプーリングする場合は、LRMを用いてサンプルシートを作成する方法もあります
  - a. **Library Prep KitはCustomを選択**し、インデックスリード、リードタイプを入力・選択
  - b. サンプル欄にて、サンプル名と**ダミー**のインデックス配列を入力

Create Run DNA AMPLICON

Import Sample Sheet

Run Name\*

Run Name

Run Settings

Library Prep Kit\* Please select...

TruSeq Amplicon

TruSight Amplicon Panels

Ampliseq Library PLUS for Illumina

Custom

	SAMPLE ID*	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (I7)	INDEX 2 (I5)	SAMPLE PROJECT
1	Sample				x

- c. 1サンプル以上入力後に、**Export sample sheet**を選択してサンプルシートを出力し、一度保存

Export Sample Sheet

Save Run

# Local Run Manager v2でのランの設定方法B ～Sample Sheetを用いる方法～

2. テキストエディタなどでエクスポートしたサンプルシート (csv file) を必要に応じて編集

```

[Header]
Experiment Name,testcustom
Date,2021-08-16
Module,GenerateFASTQ - 2.0.1
Workflow,GenerateFASTQ
Library Prep Kit,Custom
Chemistry,Amplicon
[Reads]
151,
151,
[Data]
Sample ID,Description,I7 Index ID,index,I5 Index ID,index2,Sample Project
sample1,,AAAATTTT,AAAATTTT,GGGGTTTT,GGGGTTTT,
sample2,,CCCCTTTT,CCCCTTTT,CCCCAAAA,CCCCAAAA,

```

← カスタム・ライブラリーの名前をカンマの後に入力

← 作製日

← 選択モジュールとそのバージョン

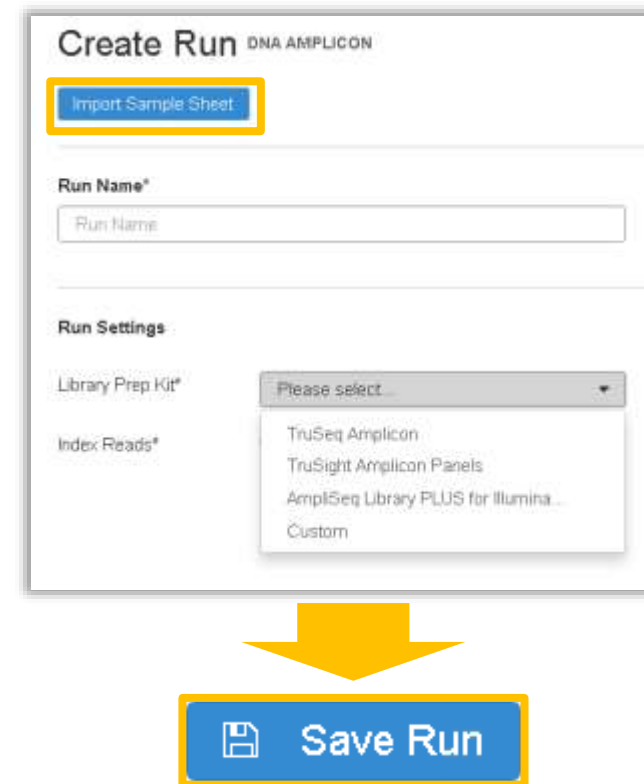
← 選択ライブラリ調製キット (カスタムとなる)

} ← リード長

[
   
 カンマ区切りで
   
 サンプル名
   
 Description
   
 インデックスID
   
 インデックス配列
   
 サンプル・プロジェクト
   
 が行ごとに記載される

# Local Run Manager v2でのランの設定方法B ～Sample Sheetを用いる方法～

3. 2で編集したサンプルシートをLRMで読み込ませる
  - a. **Import Sample Sheet** を選択し、編集したサンプルシートをアップロード
  - b. 内容を確認して**Save Run**を選択→完了



# Local Run Manager v2でのランの設定方法C ～カスタムライブラリー調製キットの登録～

1. LRMのホーム画面よりTOOLS→Library Prep Kitsを選択

2. Download Templateを選択

Library Prep Kits

LIBRARY PREP KIT	DESCRIPTION	SUPPORTED MODULES
AmpliSeq Library PLUS for Illumina (96)	AmpliSeq Library PLUS for Illumina (96)	GenerateFASTQ, DNA Amplicon, RNA

[Kit]  
 Name <Enter the name of the Prep Kit (Must be unique)>  
 Description <Enter Description of the Prep Kit Here>  
 IndexStrategy <Options are: All, SingleOnly, DualOnly, NoAndSingle, NoAndDual, SingleAndDual, NoIndex>  
 ReadType <Options are: All, Single, and Paired>  
 DefaultReadLength1 <Enter Default Read Length for Read 1>  
 DefaultReadLength2 <Enter Default Read Length for Read 2>

[Resources]  
 Name Type Format Value

[Indices]  
 Name Sequence IndexReadNumber  
 <Enter indexes to be populated in index dropdown menus>  
 N701 TAAGGCGA 1  
 N702 CGTACTAG 1

3. ダウンロードしたテンプレートファイル（tsv file）を編集

4. Add Library Prep Kitsを選択して編集したファイルをアップロード→完了

# MiSeq (Control Software v2.6以前): Illumina Experiment Manager (IEM) v1.19.1での設定方法 ~テンプレート・サンプルシートを作って編集する方法~

1. テンプレート用のSamplesheet.csvを作成するために、類似のLibrary Prep WorkflowとIndex Adaptersを選択（インデックスタイプ、インデックス長）

➤ [Illumina Experiment Manager Software Guide](#)

2. Sample IDを入力、インデックスはダミーのものを適当に選択して一度出力
3. 出力されたSamplesheet.csvのインデックス配列を編集して保存→完成

\* この時、ヘッダー情報、フォーマットを変更しないようご注意ください

※IEM上でのインデックス配列の入力の向きについては、Appendixご参照ください



# MiSeq (Control Software v2.6以前): Illumina Experiment Manager (IEM) v1.19.1での設定方法 ～カスタムインデックスキットファイルを登録する方法～

1. 既存のファイルを編集してカスタムインデックスキットファイルを作成、別名で保存
2. 既存のファイルを編集してカスタムライブラリー調製キットファイルを作成、登録
3. Applicationにカスタムライブラリー調製キットを追加編集 →完了

\* いずれもオリジナルのキットファイルを上書きしないよう、ご注意ください

\* 既存ファイルの場所は[Illumina Experiment Manager Software Guide](#) (v09, p. 6~)をご参照ください

# Tailed PCRライブラリーの ランセットアップの注意事項

---

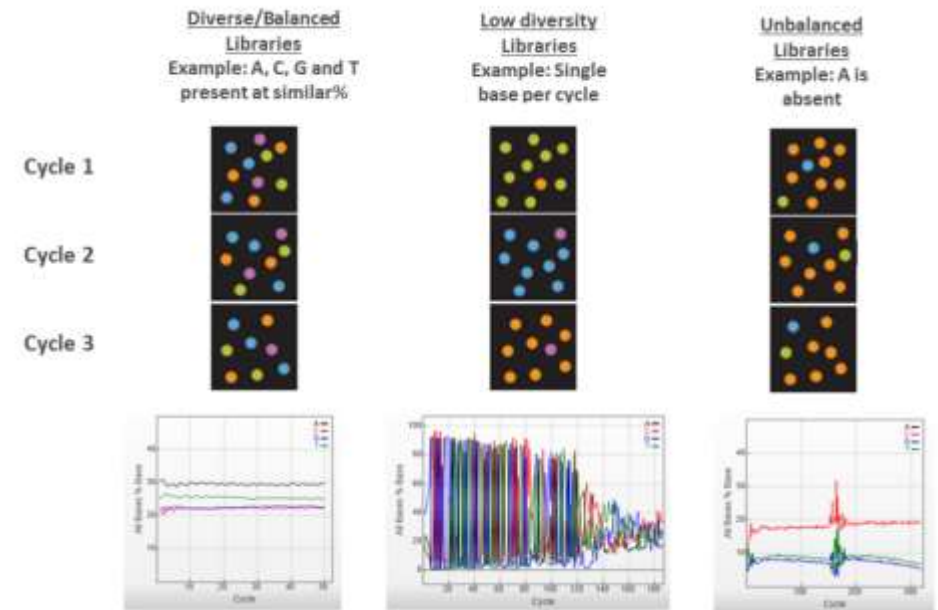
# 3-3

# ランセットアップの際の注意点-1

- 16Sアンプリコンや少数のアンプリコン領域のシーケンスでは、サイクルごとの出現塩基の多様性が低くなり、シーケンスクオリティの低下が起こり得ます
- 相対的にライブラリーの塩基多様性を高くするために、塩基バランスのよいPhiXライブラリーを多めに添加することが推奨されます
- PhiXライブラリーのスパイクインに関しては[こちらのBulletin](#)および下記のウェビナーをご参照ください

日本語ウェビナー

[【PCRアンプリコンDNAライブラリーなどのLow Diversityサンプルのシーケンスランを成功させるコツ】](#)



## ランセットアップの際の注意点-2

- 塩基多様性の高いライブラリーの推奨ローディング濃度は、各シーケンサーの Denature and Dilute Libraries Guide などをご参照ください
- 塩基多様性の低いライブラリーでは、クラスター密度が推奨値より低くなることを目指して、推奨ローディング濃度の6-7割程度にすることを推奨しています
- 初回のラン結果をもとに次回のローディング濃度を調整してください
- 参考資料として [Cluster Optimization Overview](#) もご参照ください

SECTION 4

# 本日のまとめ

---



# Tailed PCR法を用いたカスタムライブラリー作成

- Tailed PCR法\*は、興味のある領域を簡便かつ低コストでシーケンス解析できる手法です
  - 例：16Sメタゲノム解析、環境DNAメタバーコーディング解析、大規模ジェノタイピング
- 1-step、あるいは2-stepのワークフローがあります
  - 2-step Tailed PCR (Nextera-based)の場合 : Primer 配列→p. 20, 21 / 設定方法→p. 35~
  - 1-step Tailed PCR (TruSeq-based)の場合 : Primer 配列→p. 26 / 設定方法→p. 48~
- ランセットアップ時のインデックス配列の入力向きは、本資料のAppendixをご参照ください

\*カスタムライブラリーとなるためイルミナのサポート外となります

SECTION 5

# 関連資料など

---



# 関連資料 ～イルミナ公開資料～

イルミナ製インデックスに関して

- [Illumina Index Adapter Pooling Guide](#) : インデックスプーリングの組み合わせ情報
- [Illumina Adapter Sequences](#) : イルミナのインデックスアダプターの配列が記載
- [Illumina Indexed Sequencing](#) : インデックスシーケンスに関する文書
- [Library pooling guidelines for the NextSeq 500/550 and MiniSeq systems](#)  
: NextSeq 500/550やMiniSeqにおける、インデックス・プーリングの注意点

Nextera系インデックス・キットの製品サポートページ

- [Nextera XT Index kit v2](#)
- [Nextera DNA CD Indexes](#)



# 関連資料 ～イルミナ公開資料～

イルミナシーケンサーのための16Sライブラリー調製プロトコル

- [16S Metagenomic Sequencing Library Preparation \(英語版\)](#)
- [16S Metagenomic Sequencing Library Preparation \(日本語版\)](#)  
→16Sメタゲノム解析に関するイルミナ公開プロトコル
- [Illumina 16S Metagenomics Sequencing Protocol](#)  
→16Sメタゲノム解析におけるライブラリー作成に関しての、よくあるご質問
- [16S Metagenomics Studies with the MiSeq® System](#)
- [16S metagenomics sequencing with the iSeq™ 100 System](#)  
→MiSeqやiSeqを用いての16Sメタゲノム解析に関する情報

# 関連資料 ～イルミナ公開資料～

イルミナシーケンサーのためのITSライブラリー調製プロトコル

- [Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol \(英語版\)](#)
- [Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol \(日本語版\)](#)  
→真菌ITSメタゲノム解析に関するイルミナ公開プロトコル
- [Fungal sequencing and classification with the ITS Metagenomics Protocol](#)  
→MiSeqを用いての真菌ITSメタゲノム解析のプロトコルおよび実験結果の例

ライブラリー調製時のアーチファクト

- [Bubble products in sequencing libraries: causes, identification, and workflow recommendations](#)  
→ライブラリー調製時のPCRにより生じるBubble productsに関する情報

# 関連資料 ～イルミナ公開資料～

Low-Diversity Libraryのシーケンスに関して

- [What is nucleotide diversity and why is it important?](#)
- [How much PhiX spike-in is recommended when sequencing low diversity libraries on Illumina platforms](#)

シーケンサーごとのLow-Diversity Libraryのシーケンスの際の情報

- [Low-Diversity Sequencing on the Illumina MiSeq Platform](#)
- [Low-Diversity Sequencing on the Illumina HiSeq Platform](#)
- [Best Practices for Low-Diversity Sequencing on the NextSeq 500/550 and MiniSeq Systems](#)

# 関連資料 ～イリミナ公開資料～

## Cluster densityの調整

- [Cluster Optimization Overview](#)
- [Cluster density guidelines for Illumina sequencing platforms using non-patterned flow cells](#)
- [Cluster density considerations when migrating Illumina libraries between sequencing platforms](#)

## Manifest fileの作成例

- [How to convert a custom BED file to a manifest file for enrichment analysis](#)

## Non-Illuminaライブラリーのシーケンス(本ウェビナー範囲外)

- [Considerations when migrating non-Illumina libraries between sequencing platforms](#)
- [Spiking custom primers into the Illumina sequencing primers](#)

# 関連イルミナウェビナー

- [PCRアンプリコンDNAライブラリーなどのLow Diversityサンプルのシーケンスランを成功させるコツ](#)
- [ランを成功させるための最適なクラスター密度を得る方法](#)
- [口腔細菌叢のメタ16S解析【イルミナiSchool プロフェッショナル】](#)
- [次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析のためのサンプル調製法と腸内細菌叢データを活用した健康科学への展開【イルミナiSchool プロフェッショナル】](#)
- [海洋における真核生物のメタバーコーディング](#)
- [環境DNA分析のご提案](#)
- [環境DNA分析に基づく新しい生物調査法【イルミナiSchool プロフェッショナル】](#)

# 関連イルミナウェビナー

- [MIG-seq法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析【イルミナiSchool プロフェッショナル】](#)
- [【MiSeqアップデート】 Windows 10対応ソフトウェアのご紹介・MiSeq Control Software v4 /Local Run Manager v3](#)
- [新登場 MiSeq Control Software v3.1 / Local Run Manager v2.0 の紹介【イルミナiSchool ウェビナー】](#)
- [サンプルシート作成ツール：Illumina Experimental Manager \(IEM\) の使用方法 - 最新バージョンIEMv1.15のご紹介 - 【イルミナiSchool 初級】](#)

# 本ウェビナー内容と関連する外部サイト

- [環境DNA調査・実験マニュアル \(ver. 2.2\) \(2020年4月3日発行\)](#)
  - 環境DNA学会・環境DNA技術標準化委員会が作成
  - PCRを含めたカスタムライブラリー作製、MiSeqを用いたシーケンス、準備品など記載
- [Earth Microbiome Project](#)
  - 地球上の微生物群集を解析するための取り組み
  - 16Sメタゲノム解析やITSメタゲノム解析のための具体的なIlluminaライブラリー調製プロトコールも掲載

ご清聴ありがとうございました

---



||

# Appendix

シーケンサーごとのインデックス  
シーケンスと、その違いによる注意点

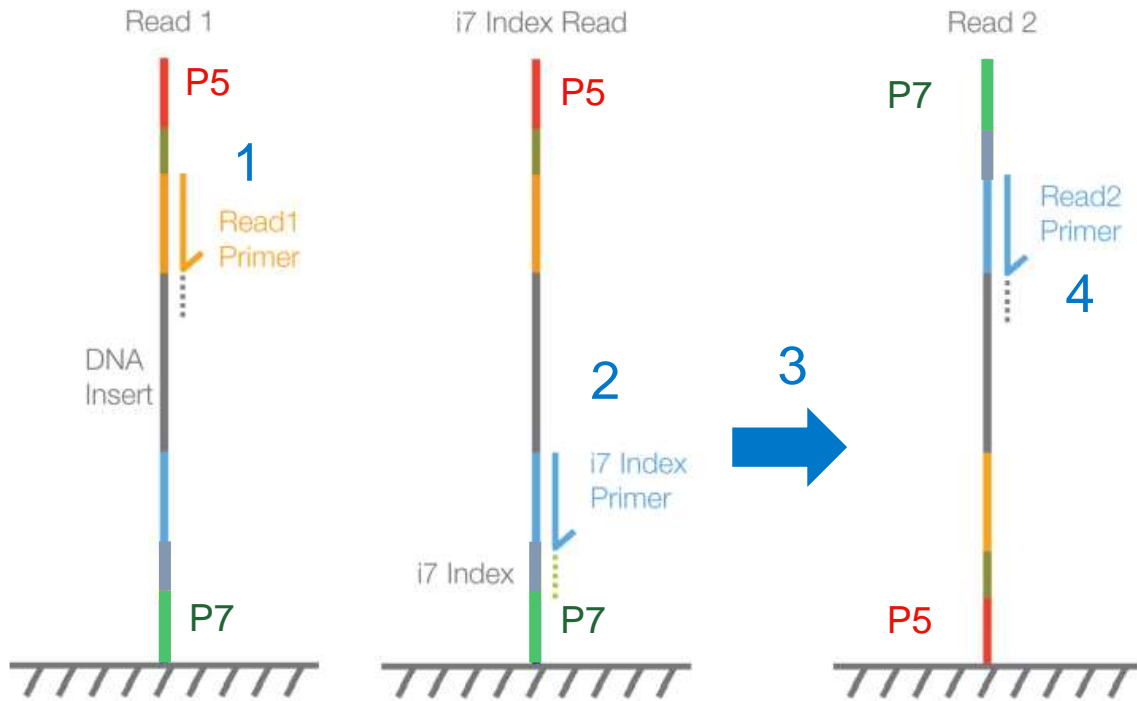
# Appendix-1

## シーケンサーごとの インデックスシーケンス

---

# シングルインデックスシーケンシング

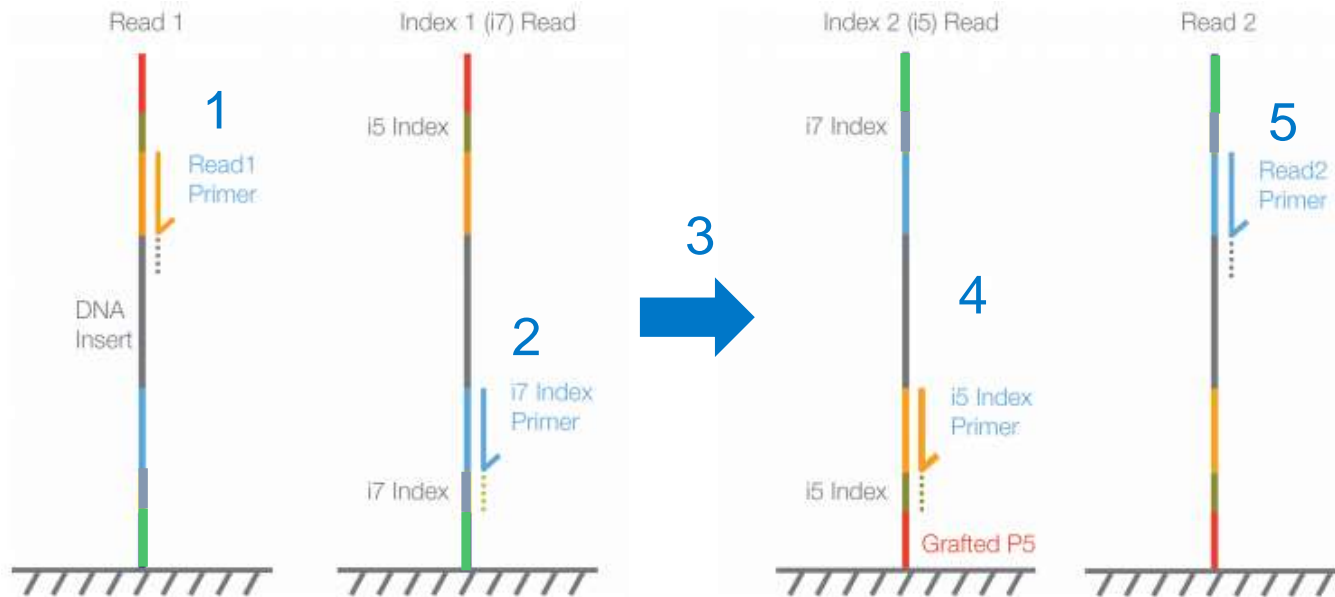
## すべての機種で共通



1. Read1 Seq Primerを用いて、Read 1をシーケンス
2. i7 Index Primerを用いて、i7 Indexをシーケンス
3. Re-synthesis反応
4. Read2 Seq Primerを用いて、Read 2をシーケンス

# デュアルインデックスシーケンシング

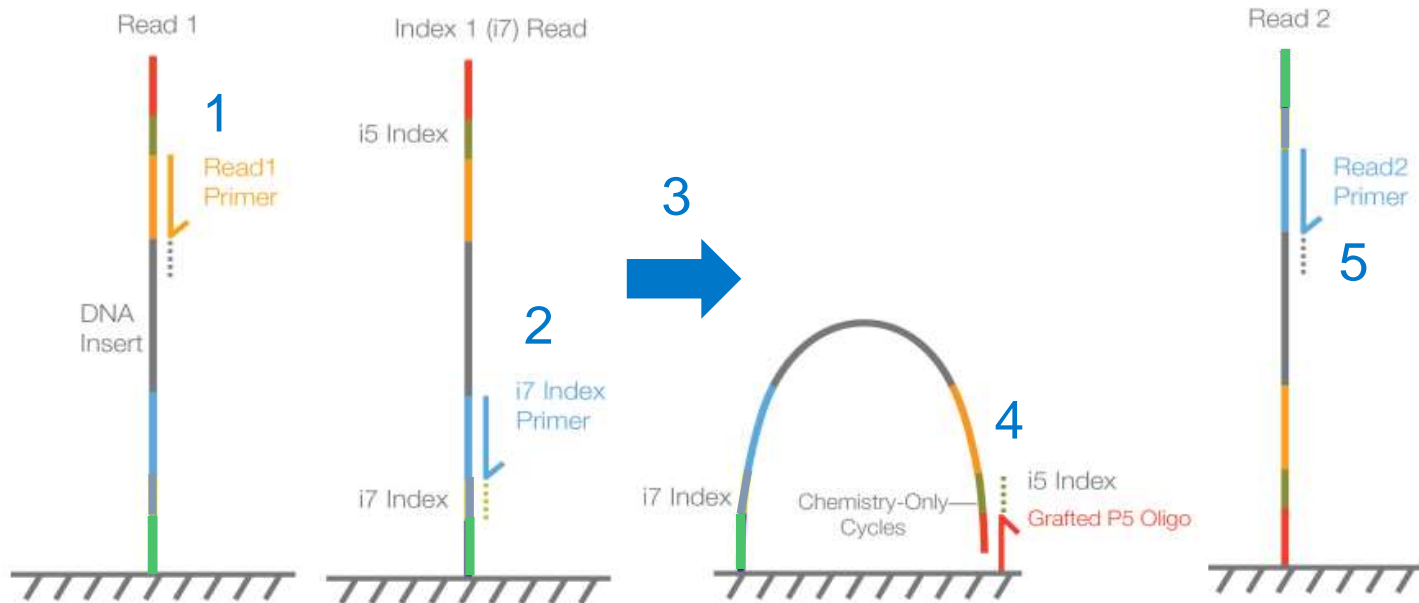
iSeq 100, MiniSeq with standard reagent kits, NextSeq Systems, NovaSeq 6000 with v1.5 reagent kits, HiSeq 3000/4000/X Systems



1. Read1 Seq Primerを用いて、Read 1をシーケンス
2. i7 Index Primerを用いて、i7 Indexをシーケンス
3. Re-synthesis反応
4. i5 Index Primerを用いて、i5 Indexをシーケンス
5. Read2 Seq Primerを用いて、Read 2をシーケンス

# デュアルインデックスシーケンシング

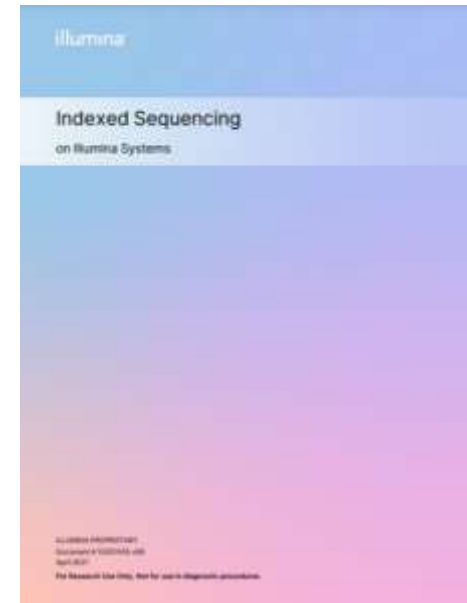
MiSeq, MiniSeq with rapid reagent kits, NovaSeq 6000 with v1.0 reagent kits,  
HiSeq 2000/2500 Systems



1. Read1 Seq Primerを用いて、Read 1をシーケンス
2. i7 Index Primerを用いて、i7 Indexをシーケンス
3. ライブラリーのブリッジ形成
4. Grafted P5 Oligoから、i5 Indexをシーケンス
5. Read2 Seq Primerを用いて、Read 2をシーケンス

# インデックスのシーケンス方向の違い

- シングルインデックスのシーケンスの方向は、全ての機種で共通です
- デュアルインデックスのシーケンスの方向は、機種により異なります
- ランセットアップ時のインデックス配列の入力に注意が必要な場合があります
- インデックスシーケンスに関する詳細は、[Indexed Sequencing on Illumina Systems](#)をご参照ください



# インデックス配列の ラン設定時の入力方向

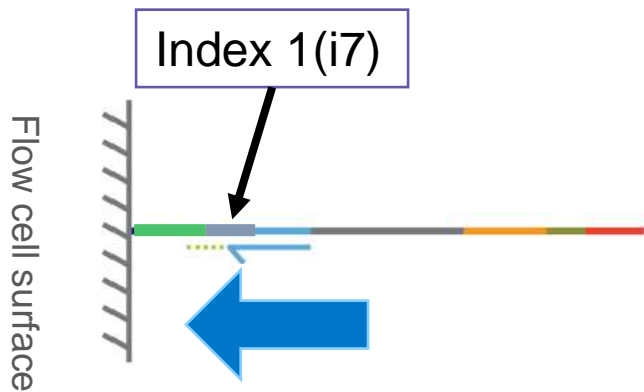
---

# Appendix-2

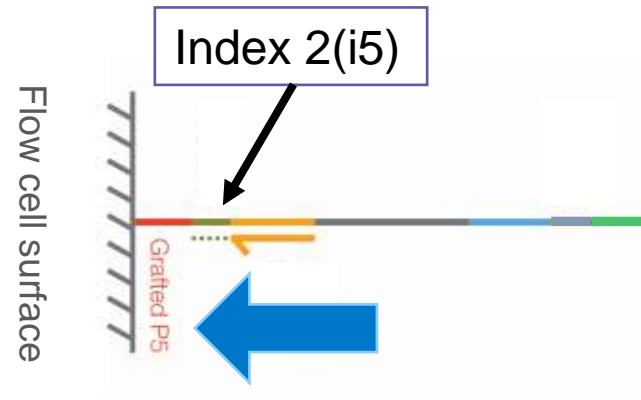
# Index 1 (i7), Index 2 (i5) をシーケンスする方向に注意

インデックス配列を完全にカスタムでデザインする場合、Index 1 (i7), Index 2 (i5) をシーケンスする方向に注意が必要です

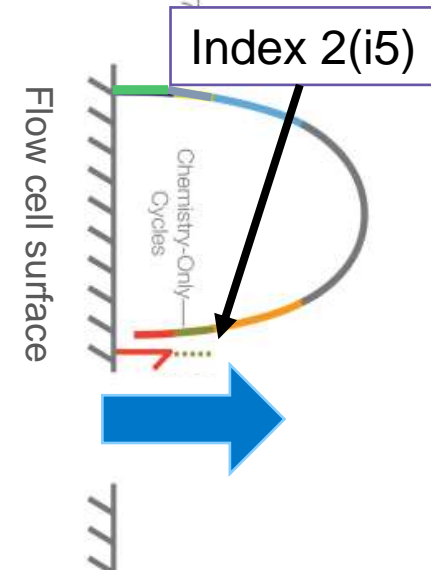
【1】 Index 1 (i7) のシーケンス  
全ての機種で共通



【2】 Index 2 (i5) のシーケンス  
iSeq, MiniSeq (Standard) など



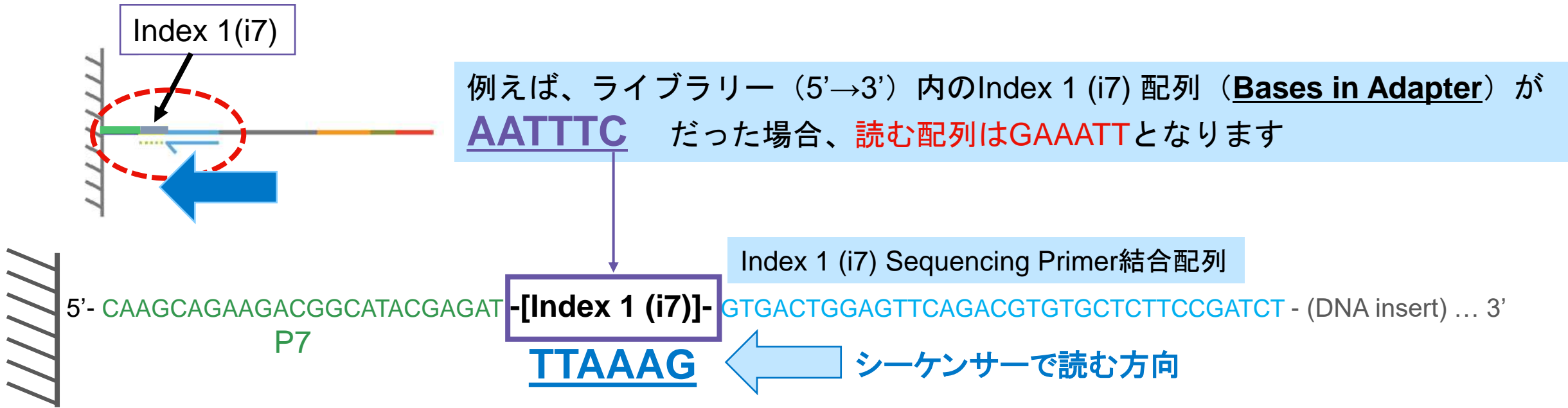
【3】 Index 2 (i5) のシーケンス  
MiSeq, MiniSeq (Rapid) など



解析プラットフォームによって、  
アダプター内配列をそのまま入力する場合と、  
実際に読む配列を入れる場合があります



# 【1】 Index 1 (i7) のシーケンス 全ての機種で共通

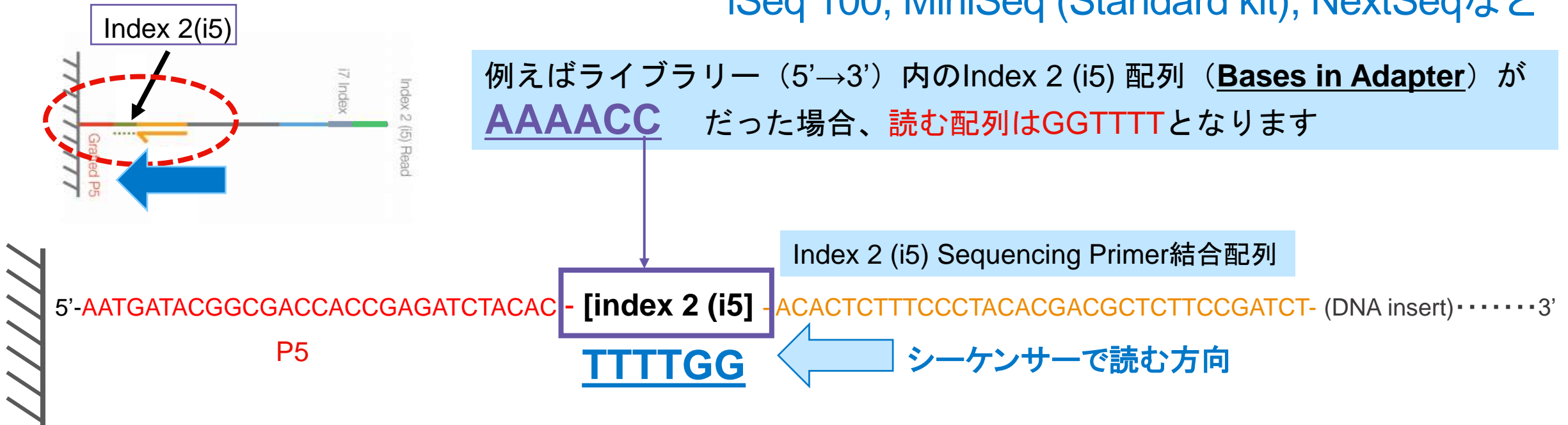


Bases in Adapter i7	LRM (画面入力)	MiSeq Reporter (IEM sample sheet)	Sample Sheet (bcl2fastq, BaseSpace manual mode)
(例) AATTTC	GAAATT	GAAATT	GAAATT

## 【2】 Index 2 (i5) のシーケンス

iSeq 100, MiniSeq (Standard kit), NextSeqなど

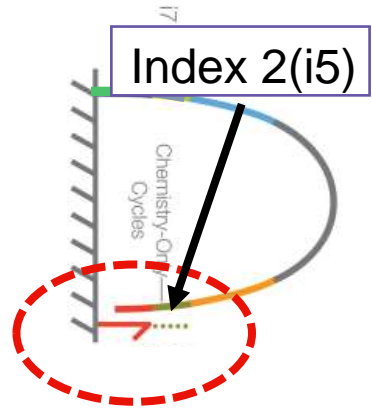
例えばライブラリー (5'→3') 内のIndex 2 (i5) 配列 (**Bases in Adapter**) が **AAAACC** だった場合、**読む配列はGGTTTT**となります



Bases in Adapter i5	LRM* (画面入力)	Sample Sheet (bcl2fastq, BaseSpace manual mode)
(例) AAAACC	AAAACC	GGTTTT

\*LRMでラン後に出力されるSample Sheet中ではGGTTTTと記載

### 【3】 Index 2 (i5) のシーケンス MiSeq , MiniSeq (Rapid kit)



例えば、ライブラリー (5'→3') 内のIndex 2 (i5) 配列 (**Bases in Adapter**) が **AAAACC** だった場合、シーケンス時の鋳型鎖の中ではReverse complement(GGTTTT)となり、読む配列は**AAAACC**となります

3' **TTACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTG** [Index2 (i5) (Rev Comp)] **TGTGAGAAAGGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAGA** - DNA Insert... 5'

5'- **AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC** - **AAAACC**  
 シーケンサーで読む方向  
 (Grafted) P5

Bases in Adapter i5	LRM (画面入力) <b>MiSeq</b>	LRM (画面入力) <b>MiniSeq Rapid kit</b>	MiSeq Reporter (IEM sample sheet)	Sample Sheet (bcl2fastq, BaseSpace manual mode)
(例) <b>AAAACC</b>	<b>AAAACC</b>	<b>GGTTTT</b>	<b>AAAACC</b>	<b>AAAACC</b>

# Appendix-3

イルミナのインデックス配列  
を利用する場合

---

# 【例】 イルミナの既存のインデックス配列を利用 – Reverse primer配列例

## (例) 1-step Tailed PCR-R

CGAGTAAT

5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7 index] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-(領域特異的配列R)-3'

\*リバースプライマー発注時（完成形ライブラリー中）のi7インデックス配列は、  
i7 Bases for Sample Sheetの配列の逆相補配列

i7 Index Name	i7 Bases for Sample Sheet
D701	ATTACTCG

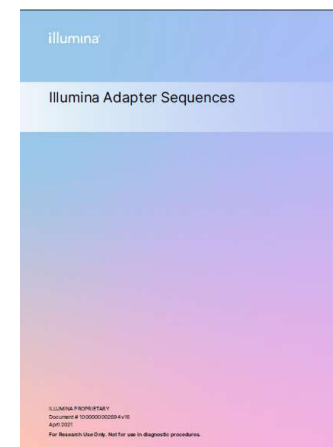


表 : [Illumina Adapter Sequences](#)より抜粋

# 【例】 イルミナの既存のインデックス配列を利用 – Forward primer配列例

## (例) 1-step Tailed PCR-F

5' – AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- **TATAGCCT** [i5 index]-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-(領域特異的配列F)-3'

\*フォワードプライマー発注時（完成形ライブラリー中）のi5インデックス配列は、  
**i5 Bases for Sample Sheet for MiSeq ...**と同じ配列

i5 Index Name	i5 Bases for Sample Sheet NovaSeq 6000 with v1.0 reagent kits, MiSeq, HiSeq 2000/2500, NextSeq 2000 (Sample Sheet v2)	i5 Bases for Sample Sheet iSeq, NovaSeq 6000 with v1.5 reagent kits, MiniSeq, NextSeq 500/550, HiSeq 3000/4000/X, NextSeq 2000 (Sample Sheet v1)
D501	TATAGCCT	AGGCTATA

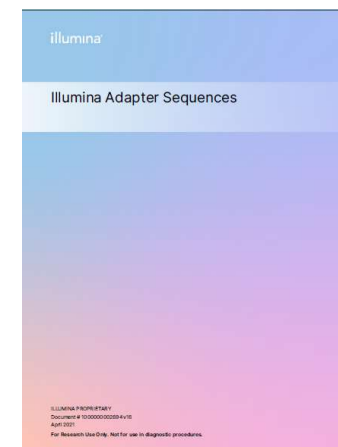


表 : [Illumina Adapter Sequences](#)より抜粋