

# ハイスループットメタゲノム解析のための自動化 Nextera™ DNA Flex ライブラリー調製 ワークフロー

効率的な自動化ワークフローにより、均一性の高いライブラリーが生成され、種の同定、メタゲノムプロファイリング、および *de novo* ゲノムアセンブリのための優れたデータを得ることができます。

## はじめに

近年、ヒトマイクロバイオームの特性解析および健康面におけるその役割に注目が高まっています。腸の細菌叢は免疫系応答に影響を及ぼし、特定の疾患状態を予防し、一部の健康な状態の維持に参与している可能性があります<sup>1</sup>。アレルギーや肥満などの多くの慢性疾患はマイクロバイオームの組成と関連があります<sup>1,2</sup>。培養可能または培養不可能な細菌を検出し、ヒトマイクロバイオームの多くの細菌種の存在有無を検証する能力は、次世代シーケンス (NGS) テクノロジーの使用によって大きく改善されてきました<sup>1</sup>。

NGSによる全ゲノムシーケンス (WGS) は微生物研究ラボにスピード、精度、情報の深さにおける重要な利点をもたらしましたが、ライブラリー調製はハイスループット解析を行うラボにとってボトルネックとなっている場合があります (図 1)。1 週間に数百ものメタゲノム解析サンプルを処理する研究者のために、イルミナは PerkinElmer と協力し、メタゲノム解析のための自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローを提供しています。このワークフローは、完全に自動化した DNA 抽出を含み、DNA 解析の全工程にわたりサポートする包括的な NGS ソリューションです (図 2)。リキッドハンドリングシステムでの Nextera DNA Flex ライブラリーの調製は、マニュアルでのサンプル調製よりも有意な利点があります。これらの利点には、高いスループットと拡張性、タッチポイントとヒューマンエラーの低減、ワークフローの高い一貫性、スピードアップがあります。

メタゲノム解析のための自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローには、chemagic 360 装置 (PerkinElmer) および chemagic DNA Stool Kit (PerkinElmer) を用いて糞便サンプルから自動で DNA 抽出を行う工程を含みます。DNA 抽出後、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (イルミナ) を用いて Sciclone G3 NGSx Workstation (PerkinElmer) リキッドハンドリングシステムでライブラリー調製を行います。Nextera DNA Flex Library Prep Kit は、さまざまな生物種や検体から素早く簡単にライブラリーを調製できる革新的なビーズ上のタグメンテーションケミストリーを特長としています<sup>3</sup>。このキットは幅広い DNA インプット量 (100 ~ 500 ng) に適合し、はじめの DNA サンプルを正確に定量化する必要がなく、ライブラリーインプットのノーマライゼーションにかかる時間とコストを節約します<sup>3</sup>。

メタゲノム解析のための自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローにより、DNA 抽出から最終的なライブラリープールの定量まで、たった 6 時間以内で 96 の調製済みシーケンス用メタゲノム解析ライブラリーができて上がります。

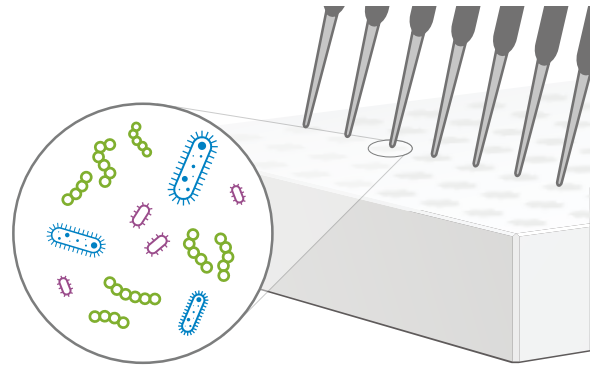


図 1: ハイスループットメタゲノム解析 メタゲノム解析を行うラボでは複雑なサンプルから微生物コミュニティ全体をプロファイリングし、新種を同定し、そして微生物コミュニティとヒトの健康との関係を探ります。ハイスループットメタゲノム解析ラボは、1 週間に数百サンプルを処理する場合があります、シーケンス作業でのボトルネックに対処するための対策が必要になります。

本アプリケーションノートでは、4 例のヒト被験者の糞便サンプルを用いて、標準的なマニュアルによるワークフローと比較したメタゲノム解析用自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローのパフォーマンスを示します。

## 方法

### 糞便採集

糞便サンプルは、西洋食の成人 2 例と菜食の双子の子供 2 例のドナー 4 例から採集しました。DNA 分離の前に、糞便サンプルは 4°C で 20 時間保存しました。



保存温度、時間、安定化バッファーの有無、ならびに使用する保存チューブなどの要素は DNA 品質に重要な影響を与える場合があります。さまざまな保管条件を試した結果、イルミナは糞便サンプルを Omega StableGUT Collection Device Tubes (カタログ番号: AC7005、Omega Bio-Tek, Inc.) で、製造者のプロトコルに従って 4°C で保存することを推奨しています。



図 2：メタゲノム解析用の自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフロー イルミナと PerkinElmer が共同で、ハイスループットメタゲノム解析のために、包括的に自動化した NGS ライブラリー調製ワークフローを作成しました。

## DNA 抽出

抽出は chemagic DNA Stool Kit (カタログ番号: CMG-1076、PerkinElmer) を使用して chemagic 360 装置 (カタログ番号: 2024-0020、PerkinElmer) <sup>4</sup> で行いました。各単離は 150  $\mu$ l の溶出量で行い、これにより合計 300 ng ~ 3  $\mu$ g の精製 DNA を産生しました。抽出方法は合計容量 30  $\mu$ l に DNA 100 ng 以上を産生するように最適化しました。これは、Nextera DNA Flex ライブラリー調製キットインプット容量の最大量です。抽出 DNA の整合性は LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (カタログ番号: CLS137031、PerkinElmer) <sup>5</sup>、HT DNA NGS 3K Reagent Kit (カタログ番号: CLS960013、PerkinElmer)、およびゲノム DNA Reagent Kit (カタログ番号: CLS760685、PerkinElmer) で評価しました。chemagic の方法により、グラム陰性種およびグラム陽性種の両方から最適な単離 DNA が得られます。

## 自動化およびマニュアルによるライブラリー調製

90 の Nextera DNA Flex ライブラリーは、Sciclone G3 NGSx Workstation リキッドハンドリングシステム (カタログ番号: CLS145321、PerkinElmer) <sup>6</sup> および Nextera DNA Flex Library Prep Kit (カタログ番号: 20018705、イルミナ) で 2 つの独立した自動ランから調製しました。合計 DNA インプット量幅 (100 ~ 600 ng) は、Nextera DNA Flex ライブラリーの推奨 DNA インプット量幅 (100 ~ 500 ng) と重なっていました。自動化ライブラリー調製では、固定用量 30  $\mu$ l の chemagic 精製 DNA を使用し、ライブラリーあたり 100 ng 以上の DNA インプット量を確認しました。Sciclone G3 NGSx スクリプトの性能とマニュアルでの Nextera DNA Flex プロトコールとを比較するために、スタンダードプロトコールに従って同じ DNA 単離サンプルからサブセットとなる 42 ライブラリーを調製しました。

## シーケンス


深度のあるメタゲノム解析で十分なゲノムカバレッジを生成するために、48 の Nextera DNA Flex ライブラリーを各 5  $\mu$ l の容量でプールしました。プールしたライブラリーは、HT DNA NGS 3K Reagent Kit 用いた LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer で評価し、収量は Qubit 3.0 Fluorometer (カタログ番号: 15397463、Thermo Fisher Scientific) で測定しました。

研究目的での使用に限定。診断での使用はできません。

ライブラリーは 150 bp  $\times$  2 のラン設定で、HiSeq X™ または NovaSeq™ 6000 シーケンサーシステム (S2 フローセル) でシーケンスを行いました。

## データ解析


インデックス分配プロットはイルミナゲノム解析のコンピューティングプラットフォームである BaseSpace™ Sequence Hub で生成しました。バーグラフに並べられたメタゲノム解析プロファイルリングは、最小 300 万リードおよび最大 8,000 万リードにダウンサンプルしたシーケンスデータセットを用いて、GENIUS Metagenomics <sup>7</sup> アプリおよび Kraken Metagenomics <sup>8</sup> アプリでまとめました。GENIUS Metagenomics アプリおよび Kraken Metagenomics アプリは BaseSpace Sequencing Hub で自由にアクセスできます (図 3)。De novo ゲノムアセンブリ品質は、4,000 万および 6,000 万リードにダウンサンプルしたデータセットを用いて、MEGAHIT v1.1.1. <sup>9</sup> および QUAST v4.4 <sup>10</sup> で評価しました。



**CosmosID Metagenomics**  
CosmosID

Rapid and actionable bacterial identification to the species, subspecies, and strain level based on our curated database.

---



**Kraken Metagenomics**  
BaseSpace Labs

Kraken Metagenomics assigns taxonomic labels to short DNA sequences with high sensitivity and speed.

図 3：BaseSpace Sequencing Hub 上のメタゲノム解析アプリ GENIUS、Kraken、Prokka、MetaPhiAn、QIIME などを含む幅広いメタゲノム解析アプリを BaseSpace Sequence Hub で自由に利用できます。

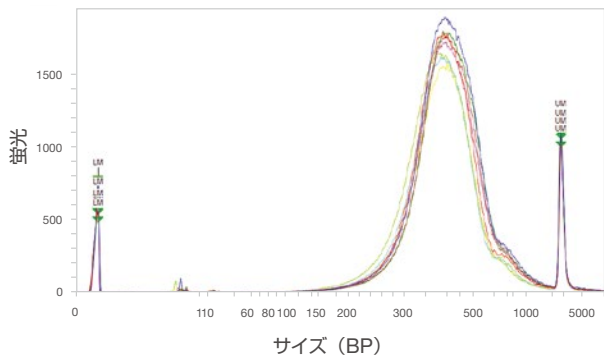


図 4：自動化ワークフローで調製した 8 ライブラリーのインサートサイズワークフロー 自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローで調製した異なる 8 ライブラリーを表わす LabChip® GX Touch™ Nucleic Acid Analyzer で解析した 8 トレースの重ね合わせ。ライブラリーはドナー 1 (成人) からの 2 つの単離した DNA レプリケートとドナー 3 (子供) からの 2 つの単離した DNA レプリケートを表しています。2 つのシーケンスライブラリーのレプリケートを各 DNA 単離サンプルから生成し、合計 8 ライブラリーを産生しました。

## 結果

### 自動化ライブラリー調製による均一なインサートサイズ分布とインデックス分配の実現

一貫性のある、均一なインサートサイズとライブラリー収量を維持しながら幅広い DNA インプット量を用いる能力は Nextera DNA Flex ケミストリーの大きな利点の 1 つです。インサートサイズ分布とライブラリー収量の優れた均一性によって、さらに均一なゲノムカバレッジとデータ精度が得られます。インサートサイズ分布を評価するために、自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローで調製した 8 ライブラリーを LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (図 4) を使って解析しました。8 つの LabChip トレースの重ね合わせは非常に均一性のあるインサートサイズを示しています。

自動化 Nextera DNA Flex ワークフローの一貫性をさらに評価するために、7 つの異なる抽出 DNA インプット量から一連のライブラリーをトリプレケートで調製しました。自動化ライブラリー調製の収量評価には、21 ライブラリーのシーケンスプールにおける各ライブラリーに対して、同定した (フィルターをパスした) リードのパーセンテージをプロットしました (図 5)。インデックス分配の高い均一性は、均一なライブラリー収量を示し、それぞれのライブラリーはフローセル上で均等に存在することも示しています。自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローは、抽出した DNA インプット量に幅があっても、均一性の高いインデックス分配のあるライブラリーを産生しました。

### 自動化およびマニュアルの Nextera DNA Flex プロトコールは互換性のあるメタゲノム解析プロファイリング結果を生成

メタゲノムプロファイリングで自動化およびマニュアルで調製した Nextera DNA Flex ライブラリーのパフォーマンスを評価するために、マニュアルおよび自動で調製したライブラリーをシーケンスし、Kraken アプリおよび GENIUS Metagenomics アプリで解析しました (図 6、図 7)。自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローで調製したライブラリーは、マニュアルで調製したライブラリーと同様に同じ細菌門と種の分布を共有しています。

研究目的での使用に限定。診断での使用はできません。

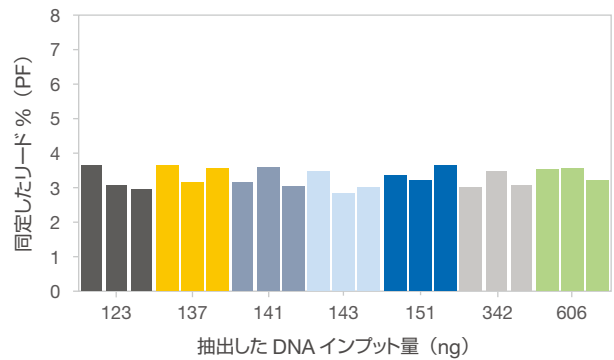


図 5：自動化ワークフローを用いてさまざまな量の抽出 DNA から調製したライブラリーのインデックス分配 ライブラリーは 7 つの異なる抽出 DNA インプット量から調製し、容量ごとにまとめてプールし、トリプレケートでシーケンスを行いました。グラフは、それぞれのシーケンスライブラリーに対して、フィルターをパス (PF) して同定されたリード % を示しています。

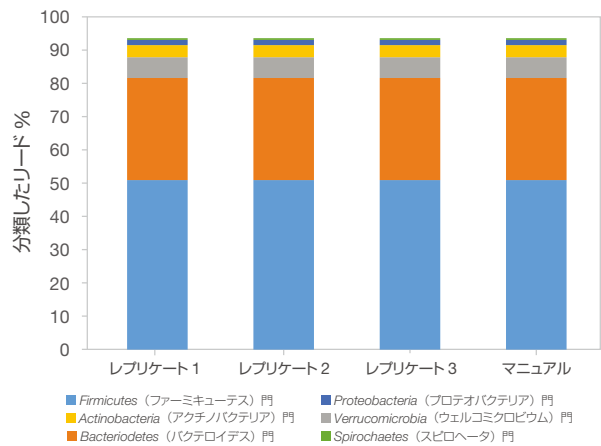


図 6：自動化およびマニュアルで調製した細菌門ライブラリー分布の比較 ドナー 1 サンプルから生成した自動化シーケンスライブラリーのレプリケートとマニュアルで調製した 1 ライブラリーの解析。細菌門分布は、1,000 万の PE リードを使って Kraken Metagenomics で評価しました。

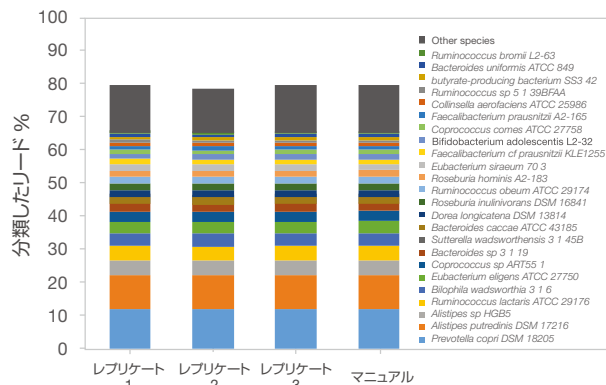


図 7：自動化および手作業で調製したライブラリーの分布の比較 ドナー 1 サンプルから生成した自動化シーケンスライブラリーのレプリケートとマニュアルで調製した 1 ライブラリーの解析。細菌種分布は、1,000 万の PE リードを使って GENIUS Metagenomics で評価しました。

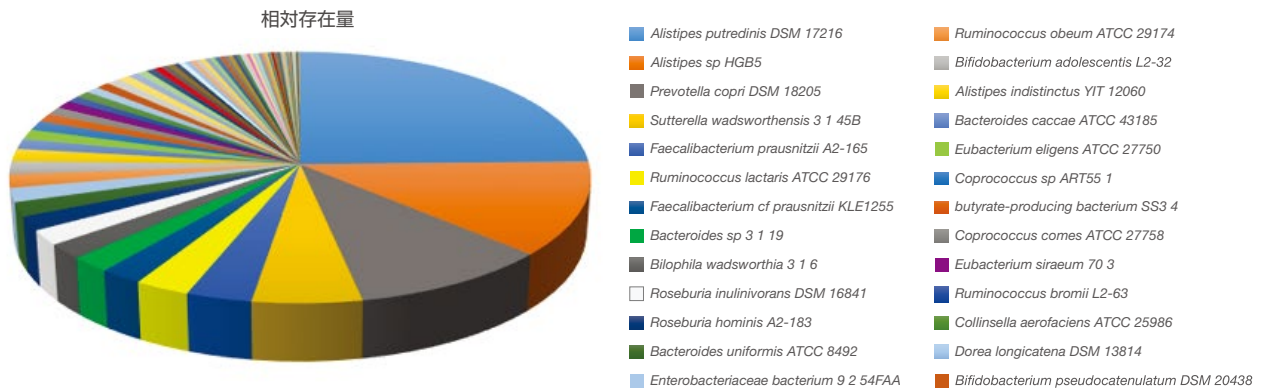


図 8：自動化ライブラリーによる豊富なメタゲノムプロファイルの生成 自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローを使ってドナー 2（成人）サンプルからライブラリーを調製しました。GENIUS Metagenomics アプリでは、4,000 万リードから相対存在量の円グラフを作成し、100 を超える種を同定しました（同定した 100 種以上のうち 26 種だけを図の凡例に含まれます）。

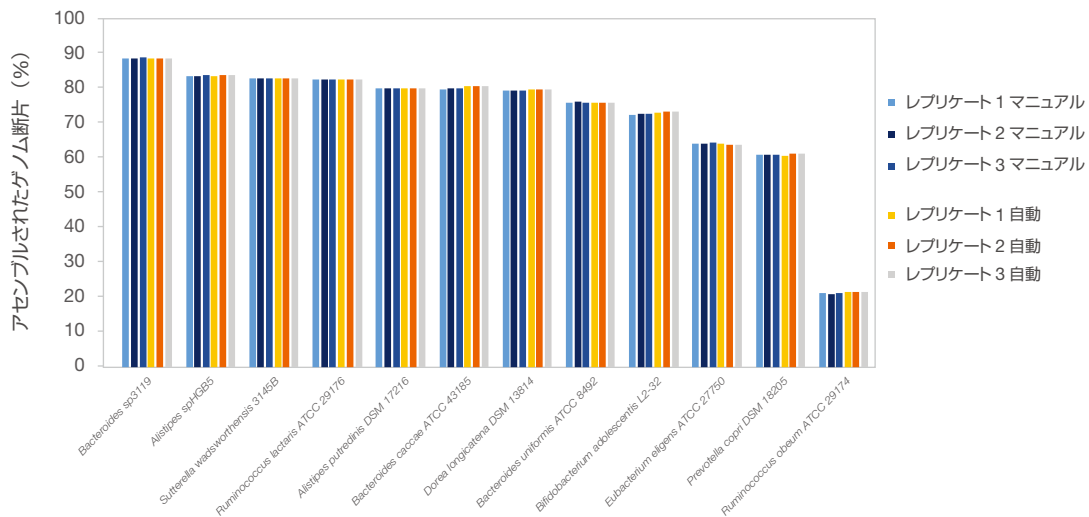


図 9：自動化およびマニュアルで調製したライブラリーのゲノムアセンブリの比較 12 の微生物の De novo ゲノムアセンブリは 6,000 万リードで QUAST で行いました。ライブラリーは自動化およびマニュアルのプロトコルを使ってトリプレケートでドナー 1 サンプルから調製しました。

さらに、自動化 Nextera DNA Flex ワークフローによってドナー 1 サンプル中に 100 以上の種を同定することができました (図 8)。

### 自動化およびマニュアルの Nextera DNA Flex プロトコルは同等で高品質なゲノムアセンブリを生成

自動化およびマニュアルで調製したライブラリーからの同じデータセットを用いて、アセンブルされたゲノム断片のパーセンテージを QUAST を用いて算出しました。一般的に、アセンブルされたゲノム断片のパーセンテージが高い場合は、高い品質のゲノムアセンブリを示します。しかし、アセンブルされたゲノムパーセンテージはサンプル中の特定の種のゲノムと利用できるリファレンスゲノムとの同等性の程度にも依存し、場合によっては、利用できるリファレンスゲノムが完全に一致しない場合もあります。本試験では、解析した全 12 の微生物について、自動化と手作業で調製したライブラリーは、ほぼ同等のゲノムアセンブリ結果となりました (図 9)。

### まとめ

自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローは、ハイスループットメタゲノム解析を行うラボにとって最高のソリューションです。自動化ワークフローでは、chemagic 360 装置 (PerkinElmer) を使って、6 時間以内に最大 96 サンプルの DNA 抽出を実行することができ、最大 96 ライブラリーを Sciclone G3 NGSx Workstation (PerkinElmer) および Nextera DNA Flex Library Prep Kit (イルミナ) で調製することができます。自動化されたワークフローによって、均一性の高いライブラリーを生成し、複雑に混ざり合った微生物、難しい糞便サンプルからでも、種の同定およびメタゲノム解析プロファイリングのための優れたデータが得られます。高いライブラリー一貫性、タッチポイントの少なさ、そして優れた拡張性などの有意な利点によって、自動化 Nextera DNA Flex ライブラリー調製ワークフローは、操作性をスケールアップする方法や、次世代シーケンスの力を生かす方法を探しているラボにとっては理想的なライブラリー調製ソリューションです。

## 詳細はこちらから

Nextera DNA Flex Library Prep Kit についての詳細は、[Nextera DNA Flex Library Prep](#) ページをご覧ください。

Nextera DNA Flex Library Prep Kit による微生物ゲノムシーケンスの詳細は、『[Microbial WGS with Nextera DNA Flex Application Note](#)』をご一読ください。

## 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

CD インデックス：コンビネーションデュアルインデックス最大 24 サンプルをサポートするための 24 のデュアルインデックス、または最大 96 サンプルをサポートするための 96 のデュアルインデックスが提供されます。

## 参考文献

- Guinane CM, Cotter PD. [Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ.](#) *Ther Adv Gastroenterol.* 2013;6:295–308.
- Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, et. al. [The gut microbiota and its relationship to diet and obesity.](#) *Gut Microbes.* 2012;3:186-202.
- Illumina (2017). [Nextera DNA Flex Library Preparation Kit Data Sheet.](#) Accessed April 10, 2018.
- Chemagic 360 instrument, PerkinElmer (2016). [Compact, High Volume, High Throughput Nucleic Acid Isolation.](#) Accessed April 17, 2018.
- LabChip GX Touch, PerkinElmer (2016). [Automated, High Performance Electrophoresis for Genomics.](#) Accessed April 17, 2018.
- Sciclone G3 NGSx Workstation, PerkinElmer (2017). [Sciclone G3 NGSx Workstation for High Throughput Sequencing Sample Prep Applications.](#) Accessed April 17, 2018.
- GENIUS Metagenomics. [www.illumina.com/products/by-type/informaticsproducts/basespace-sequence-hub/apps/cosmosid-genius-metagenomicsknow-now.html.](#) Accessed April 12, 2018.
- Kraken Metagenomics. [www.illumina.com/products/by-type/informaticsproducts/basespace-sequence-hub/apps/kraken-metagenomics.html.](#) Accessed April 17, 2018.
- MEGAHIT v1.1.1. [github.com/voutcn/MEGAHIT.](#) Accessed April 12, 2018.
- QUAST v4.4. [quast.sourceforge.net/quast.html.](#) Accessed April 13, 2018.

## 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)

販売店

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)

© 2018 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。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. 770-2018-007-A-JPN QB 5999 21SEP2018

illumina®

