

Illumina DNA Prep

さまざまなシーケンス
アプリケーションに対応する
高速で統合されたライブラリー
調製ワークフロー

- 最小限のハンズオンタッチポイントによる3時間未満のライブラリー調製
- 幅広いDNAインプット量 (1~500 ng) と複数のDNAインプットタイプに対応
- 大小サイズのゲノムおよびアンプリコンのシーケンスに対応でき、幅広いアプリケーションにアクセス可能

illumina®

はじめに

次世代シーケンサー (NGS) 技術の進歩によって、ゲノム研究のスピードが加速している一方で、多くの研究室がライブラリー調製段階で問題を抱えています。ライブラリーの調製前後には複数の必要なステップがあり、シーケンスランを始める前工程での著しい遅れに苦慮することがあります。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 Library Preparation Kitは、タグメンテーションケミストリーを採用しており、DNA断片化とアダプターライゲーションが1回15分の反応で完了でき、ライブラリー調製時間を90分にまで削減しました。Nextera XT DNA Library Prep Kitでは、ライブラリーのプーリングおよびシーケンス前のライブラリー定量が不要になりました。¹ これらのイノベーションを基に、Illumina DNA Prep Kit* はDNA抽出、断片化、ライブラリー調製およびライブラリーノーマライゼーションステップを統合したユニークなケミストリー (図1、表1) を提供し、イルミナのライブラリー調製ポートフォリオの中で、最速かつ最も柔軟性のあるワークフローを実現します。(図2、表2)。

短時間のワークフローに加え、Illumina DNA Prep Kitは、サンプルタイプ、インプット量および幅広くサポートするアプリケーションに対して非常に優れた柔軟性をもたらします。Illumina DNA Prep Kitは、ヒト全ゲノムシーケンス (WGS) から小さい微生物のプラスミドまで、均一なゲノムカバレッジと優れたデータ品質をお届けします。

迅速なライブラリー調製ワークフロー

Illumina DNA Prep Kitはさまざまな特長の組み合わせにより、イルミナの製品ポートフォリオの中で最短のライブラリー調製を実現します。大幅な進歩の1つはビーズ上でのタグメンテーションであり、これはビーズに結合したトランスポソームを用いることで、通常のタグメンテーション反応よりもさらに均一な反応を介在します。ビーズ結合トランスポソームがDNAと飽和すると、それ以上タグメンテーションが起こることはありません。このため、飽和による安定したノーマライゼーションが可能となります。

* 以前のNextera DNA Flex Library Preparation Kit。

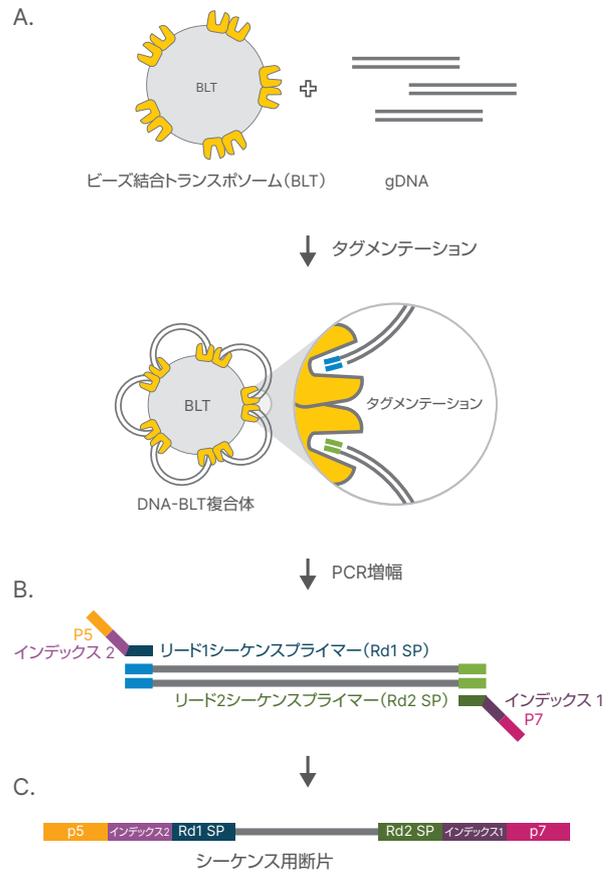


図1: イルミナのビーズ結合トランスポソームケミストリー: (A) ビーズ結合トランスポソームは、gDNAを同時断片化し、シーケンスプライマーを付加します。(B) 少ないサイクルのPCRによってシーケンス用DNA断片を増幅し、インデックスとアダプターを付加します。(C) シーケンス用断片を洗浄しプールします。

表1: Illumina DNA Prep製品仕様

パラメーター	仕様
DNAインプットタイプ	gDNA、血液、唾液、PCR産物、プラスミド、ろ紙血
必要なDNAインプット量	1~500 ng (小さなゲノム) 100~500 ng (大きなゲノム)
サンプルマルチプレックス	384種類のデュアルインデックス
対応するシーケンスシステム	すべてのイルミナシステム
合計ワークフロー時間 ^a (gDNA)	3~4時間

a. DNA抽出、ライブラリー調製およびライブラリーノーマライゼーション/プーリングを含む。

この方法には、次のようないくつかの重要な利点があります。

- 100~500 ngのDNAインプット量に対して、スタート時のDNAサンプルの正確な定量が不要。DNAインサートの断片サイズは、このインプット量の範囲内では影響しないため、面倒な定量に関連する時間の節約とコストを削減
- ビーズ上のタグメンテーションによって、機械的または酵素的なDNA断片化の個別ステップの必要性をなくし、断片化の機器または酵素系キットに関連する時間の節約とコストを削減

- 100~500 ngのDNAインプット量に対して、ビーズ上のタグメンテーションは飽和によるノーマライゼーションを行うため、時間のかかるプーリング前の個々のライブラリー定量とノーマライゼーションが不要

さらに、使いやすいワークフローはハンズオンステップを減らし、ライブラリー調製用の自動分注機にも対応します。これらの利点により、イルミナの製品ポートフォリオ中で最も工程数が少ない最短のワークフローを実現しています (図2)。

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リング	~11時間 TWT
1時間	.5時間	1時間	6時間		.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リング	~5.5時間 TWT
1時間	.5時間	2.5時間	1.5時間	

Illumina DNA Prep			
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	~4時間 TWT
1時間	.5時間	2.5時間	

Illumina DNA Prep (blood)			
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	~3時間 TWT	
.5時間	2.5時間		

図2: Illumina DNA Prepによるイルミナ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リングまでの合計時間。具体的な方法を想定し計算された工程毎に要する時間: 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リング (Bioanalyzer)。所要時間は、使用する機器、処理するサンプル数、自動化の手順、または使用者の経験値によって異なる場合があります。濃い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内容に含まれていません。

表2: イルミナライブラリー調製ワークフローの比較

	TruSeq DNA Nano	Nextera XT	Illumina DNA Prep ^{a,b}
付属の細胞溶解液	—	—	✓
柔軟で幅広いDNAインプット量範囲	—	—	✓
ノーマライゼーション	—	✓	✓
DNAインプット量	100~200 ng	1 ng	1~500 ng
合計ライブラリー調製時間 ^c	11時間	5時間	3~4時間
インサートサイズ	350 bpまたは550 bp	< 300 bp	300~350 ng
サンプルマルチプレックス	96種類のデュアルインデックス	384種類のデュアルインデックス	384種類のデュアルインデックス

a. 付属のDNA抽出プロトコールは、血液およびDBSサンプルに使用可能。
 b. ノーマライゼーションは100 ng以上のDNAインプット量に対応。
 c. DNA抽出、ライブラリー調製およびライブラリーノーマライゼーション/プーリングを含む。

統合されたDNA抽出

ILLUMINA DNA Prep KitおよびFlex Lysis Reagent Kitを用いた場合、鮮血サンプルから直接DNA抽出を行うことが可能です。オプションのFlex Lysis Reagent KitはILLUMINA DNA Prepで使用するために最適化され、実証されており、ワークフロー内のステップ、試薬、ユーザーガイドは最大の効率を得るために統合されています。細胞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、必要なハンズオンタイムは30分未満であり、ILLUMINA DNA Prepのタグメンテーション反応に直接持ち込めます。

最適化された性能

ビーズでタグメンテーションを行うという特徴により、ライブラリー調製の大幅な改善が実現しました。ILLUMINA DNA Prep Kitは、幅広いDNAインプット量（1~500 ng）で、高いカバー率と安定したインサートサイズ（300~350 ng）をもたらします（図3）。ビーズ上のタグメンテーションは均一なインサートサイズを作り出すことができるため、フラグメントの長さを調製する手段である、トランスポソーム対DNA比の入念な調整の必要がありません。さらに、幅広いDNAインプット量によって、さまざまなサンプルを用いた実験を柔軟に行うことが可能です。均一なインサートサイズに加え、ビーズ上のタグメンテーションによって、均一で安定したライブラリーを回収できます（図4）。100 ngまたはそれに近いDNAインプット量でビーズは飽和するため、一定の収量でライブラリーを回収でき、プーリング前の手間のかかるライブラリー定量およびノーマライゼーションの必要がなくなります。ILLUMINA DNA PrepとTruSeq™ DNA Nano Library Prep Kitを比較した場合、ILLUMINA DNA Prep Kitは特定のマトリクスに対して、機械的断片化法と比べて同程度かまたはそれ以上の結果をもたらしました（表3）。

ビーズ固定化技術によってサポートされるワークフローの改善に加え、安定した均一なインサートサイズおよびライブラリーを回収できるという最も顕著な利点によって、ヒトおよびヒト以外の種のゲノムに対して、さらに均等で安定したカバレッジをもたらします（図5A）。GCコンテンツの高い、または低いゲノムであっても、領域特異的なバイアスがなく、非常に均一なカバレッジを示します（図5B）。

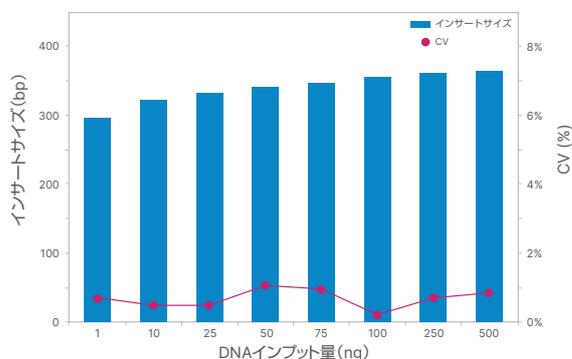


図3：均一で安定したインサートサイズ：ビーズ上のタグメンテーションはDNAインプット量に関わらず一定したインサートサイズをもたらします。1~500 ngのDNAインプット量では、総変動係数（CV）は6.09%です。ライブラリーはILLUMINA DNA Prepによる*E. coli*レプリケートサンプルから調製し、MiSeqシステムでランを行いました（76 bp × 2）。

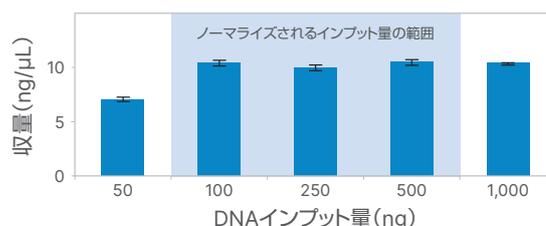


図4：ライブラリーの断片化とノーマライゼーション：100 ng以上でビーズが飽和することで、断片化されたDNA産物はノーマライズされ、後工程が不要になります。ライブラリーはHuman-NA12878サンプル（Coriell Institute）から調製し、MiSeqシステム（76 bp × 2）でランを行いました。

表3：ILLUMINA DNA Prepの性能

パラメーター ^a	ILLUMINA DNA Prep	TruSeq Nano
ペアエンドパスフィルターリード数	3.7 × 10 ⁸	3.7 × 10 ⁸
常染色体のコール率	96.5%	96.9%
常染色体エクソンのコール率	98.4%	98.4%
10×超の常染色体カバレッジ率	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. 解析は20サンプルすべて（Coriell Institute NA12878サンプル）について、5ランに分け、約30×ヒトゲノムを構築。データ解析はBaseSpace™ Apps Whole Genome Sequencing v6.0.0およびVariant Calling Assessment Tool v3.0.0を用いて実施。SNV：1塩基変異、Indel：挿入欠失バリエーション。

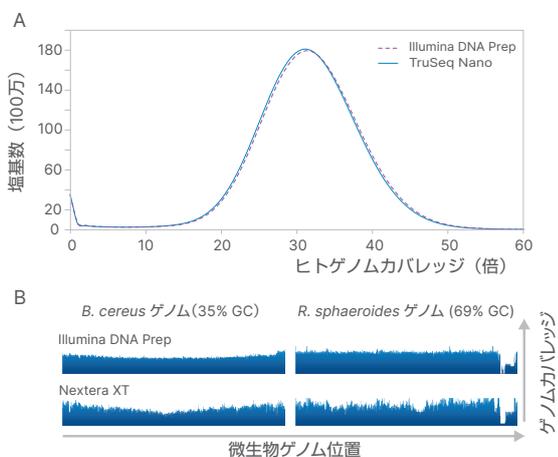


図5：カバレッジ均一性の改善：(A) Illumina DNA PrepはTruSeq DNA Nanoキットと同程度にゲノムの均一なカバレッジをもたらします。ライブラリーはIllumina DNA PrepまたはTruSeq DNA Nanoキットを用いて、ヒトNA12878サンプル (Coriell Institute) から調製。シーケンスはHiSeq X™システムで実施 (151 bp × 2)。(B) GCコンテンツが極端に高い、または低い微生物種に対するカバレッジを示しています。ビーズ上のライブラリー調製ケミストリーの改善によって、Illumina DNA PrepはNextera XTよりも優れたカバレッジを示します。Nextera XTまたはIllumina DNA Prep Kitを用いて調製したライブラリー。HiSeq™ 2500システム (Rapid Run v2、151 bp × 2) で生成したデータ。

柔軟なワークフローによって幅広いアプリケーションに対応

Illumina DNA Prepの最も優れた利点は、幅広い研究目的とアプリケーションに用いることのできる柔軟性でしょう。本キットは、ヒトWGS、がんゲノム研究、環境メタゲノム解析、感染性疾患研究、アグリゲノミクスなどに対応します (図6)。大きく複雑なゲノム、小さなゲノム、プラスミド、アンプリコン、グラム陽性/陰性細菌、真菌、または幅広い植物と動物に関わらず、Illumina DNA Prepは網羅的なゲノムカバレッジをもたらします。柔軟で使いやすいワークフローは、経験値の異なるユーザー、さまざまなアプリケーションおよびさまざまなサンプルに適応します。



図6：Illumina DNA Prepを用いた幅広いアプリケーション：ヒトWGSや巨大で複雑なゲノムから微生物の小さなゲノムまで、Illumina DNA Prepは実験上の柔軟性を提供します。

まとめ

Illumina DNA Prep 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効率的なワークフローを特長にしており、イルミナの製品ポートフォリオの中で最速かつ最も柔軟性のあるライブラリー調製ワークフローを実現します。使いやすく、自動化対応のワークフローは、すべての経験値のユーザーをサポートし、さまざまな実験デザインに対して共通の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、そしてヒトWGS、環境メタゲノム、動植物研究、腫瘍のプロファイリングなど幅広いアプリケーションに対応します。イルミナのSBSケミストリーのパワーと組み合わせることにより、革新的なIllumina DNA Prepのワークフローが現在のお客様の研究目的をどのように進歩させ、加速させることができるかを想像してみてください。

詳細はこちら

[Illumina DNA Prep](#)

製品情報

製品	カタログ番号
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 samples, IPB)	20060060
Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (96 samples, IPB)	20060059
Flex Lysis Reagent Kit	20018706
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660
Nextera DNA CD Indexes (96 indexes, 96 samples)	20018708

参考文献

1. Illumina. [Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#). Published November 2, 2016. Accessed August 28, 2023.

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

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

© 2024 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 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。

