



# MiSeq™ i100シリーズを 使用した高精度な 次世代シーケンス

主要なMiSeq i100シリーズアプリケーションに対する  
MiSeqシステムのデータ比較



微生物ゲノミクスメソッドを使用した、GC含量に関わらない微生物群衆の均一な  
カバレッジ



イルミナ感染症パネルを使用した、細菌やウイルスなどの微生物病原体の広範囲な  
検出



イルミナ腫瘍学パネルを使用した、さまざまながん種に対する高精度なバリエーション  
コール

## はじめに

MiSeq i100およびMiSeq i100 Plusシステムにより、イルミナは次世代シーケンサー（NGS）のシンプルさと使いやすさの基準を確立し続けています。システム設計のブレークスルーとなったXLEAP-SBS™ケミストリーや統合型のDRAGEN™二次解析は、操作のシンプルさ、精度の高いデータ、並外れたスピードを実現しています。エンドツーエンドのNGSソリューションの一部であるMiSeq i100シリーズは、微生物学、感染症、腫瘍学などにわたるさまざまなアプリケーションに対応し、即日結果が得られます。

このアプリケーションノートでは、MiSeq i100シリーズが、微生物ゲノミクスおよびターゲット遺伝子シーケンス研究などの主要なメソッドに対して、MiSeqシステムと同等またはそれを超越するデータ品質を提供することを示します。

## メソッド

### 微生物ゲノミクス

#### 小規模全ゲノムシーケンス (WGS)

小規模WGS用のライブラリーはIllumina DNA Prep (イルミナ、カタログ番号: 20060060) を使用して、*Escherichia coli* MG1655株 (ATCC、カタログ番号: 700926D-5)、*Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1株 (ATCC、カタログ番号: 17023D-5) および*Bacillus pacificus* NRS 248株 (ATCC、カタログ番号: 10987D-5) などの市販で入手可能な微生物gDNA 100 ngから調製しました。

シーケンスは、MiSeq i100 Plusシステムで、MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (300 cycles) (イルミナ、カタログ番号: 20126568) を使用し、151 bp × 2ラン構成、PhiXコントロールを1%添加、24プレックスで実施しました。比較のため、同一ライブラリーのシーケンスは、MiSeqシステムで、MiSeq Reagent Kit v3を使用し、151 bp × 2ラン構成、PhiXコントロールを1%添加して実施しました。

微生物ゲノムのリファレンスに基づくマッピングを目的とした二次解析は、DRAGEN Small Whole-Genome Sequencingアプリ v4.3.13で実施しました。

### 16S rRNAシーケンス

ライブラリーはIllumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparationのアンプリコンに基づくプロトコールを使用し、20 Strain Even Mix Genomic Material (ATCC、カタログ番号: MSA-1002) または20 Strain Staggered Mix Genomic Material (ATCC、カタログ番号: MSA-1003) 由来の5 ngのインプットgDNAから調製しました。

シーケンスは、MiSeq i100 Plusシステムで、MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles) (イルミナ、カタログ番号: 20126566) を使用し、301 bp × 2ラン構成、96プレックスで実施しました。比較のため、同一ライブラリーのシーケンスは、MiSeqシステムで、MiSeq Reagent Kit v3を使用し、301 bp × 2ラン構成で実施しました。

分類学的分類、相対存在量およびHTML視覚化を目的としたデータ解析は、16S Metagenomicsアプリv1.1.3で実施しました。

### 感染症パネル

ライブラリーは市販で入手可能なコントロールと生の廃水サンプルから調製し、呼吸器病原体、尿中病原体およびインフルエンザウイルスなどのさまざまな感染性微生物をプロファイルしました (表1)。

シーケンスは、MiSeq i100 Plusシステムで、MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (300 cycles) (イルミナ、カタログ番号: 20126568) を使用し、Viral Surveillance Panel v2およびIllumina Microbial Amplicon Prepの場合は151 bp × 2ラン構成で、Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel KitおよびUrinary Pathogen ID/AMR Enrichment Kitの場合は151 bp × 1ラン構成で実施しました。比較のための同一ライブラリーのシーケンスは、MiSeqシステムで、MiSeq Reagent Kit v3を使用し、151 bp × 2および151 bp × 1ラン構成で実施しました。

微生物検出およびウイルス共通配列生成を目的としたデータ解析は、DRAGEN Microbial Enrichment Plusアプリv1.1.0またはDRAGEN Microbial Ampliconアプリv4.3.6で実施しました。

表1: サンプルおよび感染症パネルを使用したライブラリー調製

サンプル	入手元	インプット	パネル	入手元
生の廃水サンプル	Wisconsin State Laboratory of Hygieneが廃水処理工場から、Colorado State Universityが学生寮から採取	8.5 $\mu$ l ( $\geq$ 100 ngの抽出総核酸)	Viral Surveillance Panel v2	イルミナ、カタログ番号: 20087932
NATtrol Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Controls	Zeptomatrix、 カタログ番号: NATRPC2.1-BIO	8.5 $\mu$ l (抽出RNA)	Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit	イルミナ、カタログ番号: 20047050
Microbial Community Standard	ZymoBIOMICS、 カタログ番号: D6300	30 $\mu$ l (抽出DNA)	Urinary Pathogen ID/AMR Enrichment Kit	イルミナ、カタログ番号: 20090309
Genomic RNA from Influenza A virus (H1N1) strain A/Virginia/ATCC2/2009	ATCC、カタログ番号: VR-1737D	Ct値 < 30の抽出RNA	Illumina Microbial Amplicon Prep	イルミナ、カタログ番号: 20097857
Genomic RNA from Influenza A virus strain A/Hong Kong/8/68	ATCC、カタログ番号: VR-1679D			
Quantitative Genomic RNA from Influenza A virus (H1N1) strain A/PR/8/34	ATCC、カタログ番号: VR-95DQ			
Quantitative Genomic RNA from Influenza A virus (H3N2) strain A/Wisconsin/15/2009	ATCC、カタログ番号: VR-1882DQ			
Genomic RNA from Influenza B virus strain B/Lee/40	ATCC、カタログ番号: VR-1535D			
Genomic RNA from Influenza B virus strain B/Taiwan/2/62	ATCC、カタログ番号: VR-1735D			
Genomic RNA from Influenza B virus (BY) B/Massachusetts/2/2012	ATCC、カタログ番号: VR-1813D			
Quantitative Genomic RNA from Influenza B virus strain B/Florida/4/2006	ATCC、カタログ番号: VR-1804DQ			

## 腫瘍学パネル

ライブラリーは、Pillar<sup>®</sup> oncoReveal™ Myeloid Panel (イルミナ、カタログ番号：HDA-MY-1001-24)、Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel (イルミナ、カタログ番号：HDA-BR-1003-24)、およびTruSight™ RNA Pan-Cancer Panel Set A (イルミナ、カタログ番号：RS-303-1002)を使用し、市販で入手可能なサンプルから調製しました(表2)。

シーケンスは、MiSeq i100 Plusシステムで、MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (300 cycles) (イルミナ、カタログ番号：20126568)を使用し、Pillar oncoReveal Panelの場合は151 bp × 2ラン構成で、TruSight RNA-Pan-Cancer Panelの場合は76 bp

× 2ラン構成で実施しました。比較のため、同一ライブラリーのシーケンスは、MiSeqシステムで、MiSeq Reagent Kit v3を使用し、151 bp × 2および76 bp × 2ラン構成で実施しました。

Pillar oncoRevealライブラリーのデータ解析は、DRAGEN Ampliconアプリで実施しました。TruSight RNA Pan-Cancerライブラリーのデータ解析には、BaseSpace™ RNA-Seq Alignmentツールを使用しました。

表2：サンプルおよび腫瘍学パネルを使用したライブラリー調製

サンプル	入手元	DNA インプット量	パネル	入手元
SeraSeq Myeloid Mutation DNA Mix	SeraCare、カタログ番号：0710-0408	20 ng	Pillar oncoReveal Myeloid Panel	イルミナ、カタログ番号：HDA-MY-1001-24
NA12877およびNA12878の混合	Coriell Institute for Medical Research	20 ng		
Mimix BRCA Germline I, gDNA Reference Standard	Horizon Discovery、カタログ番号：HD793	20 ng	Pillar oncoReveal BRCA 1 & BRCA 2 + CNV Panel	イルミナ、カタログ番号：HDA-BR-1003-24
Mimix BRCA Germline II, gDNA Reference Standard	Horizon Discovery、カタログ番号：HD794	20 ng		
Mimix BRCA Somatic Multiplex I, gDNA Reference Standard	Horizon Discovery、カタログ番号：HD795	20 ng		
NA12878	Coriell Institute for Medical Research, NIST ID HG001	20 ng		
NA24385	Coriell Institute for Medical Research, NIST ID HG002	20 ng		
NA24149	Coriell Institute for Medical Research, NIST ID HG003	20 ng		
NA24143	Coriell Institute for Medical Research, NIST ID HG004	20 ng		
NA24631	Coriell Institute for Medical Research, NIST ID HG005	20 ng	TruSight RNA Pan-Cancer Panel Set A	イルミナ、カタログ番号：RS-303-1002
Universal Human Reference RNA	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：QS0639	50 ng		
Mimix Pan-Cancer 6-Fusion Panel, FFPE Reference Standard	Horizon Discovery、カタログ番号：HD834	50 ng		
MCF7ヒト乳がん細胞株	ATCC、カタログ番号：HTB-22	50 ng		
K-562ヒト白血病細胞株	ATCC、カタログ番号：CCL-243	50 ng		

## 結果

### 微生物ゲノミクス

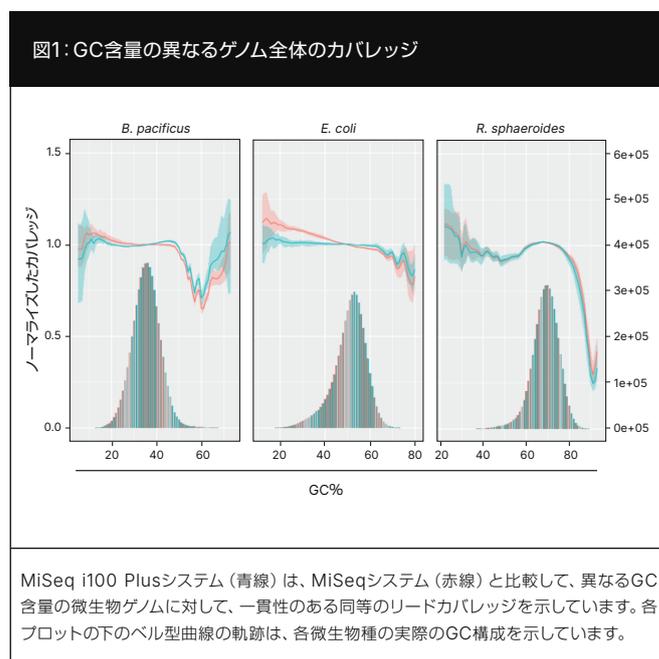
#### 小規模WGS

Q30以上の塩基率およびエラー率などのシーケンスランメトリクスを評価しました。両システムは高品質なデータを生成しました。MiSeq i100 PlusシステムはMiSeqシステムと比較して、有意に低いエラー率を実現しました (表3)。

GC含量が低、中、高の範囲の細菌種に対するカバレッジ性能を評価するために、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムからのノーマライズしたカバレッジデータを、GC含量別にリファレンスゲノムコンテンツに対してプロットしました。両システムは、GC含量に関わらず、検証したすべての微生物種間で均一なカバレッジレベルと高品質なデータメトリクスを示しました (図1および表4)。これらのデータは、MiSeq i100シリーズのWGS結果がMiSeqシステムの性能と同等であることを示しています。

**表3: WGSのシーケンスランメトリクス**

メトリクス	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム
ラン構成	151 bp × 2	151 bp × 2
Q30以上のリード1の塩基	96.88%	96.30%
Q30以上のリード2の塩基	94.07%	96.75%
リード1のエラー率	0.72%	0.13%
リード2のエラー率	0.78%	0.23%

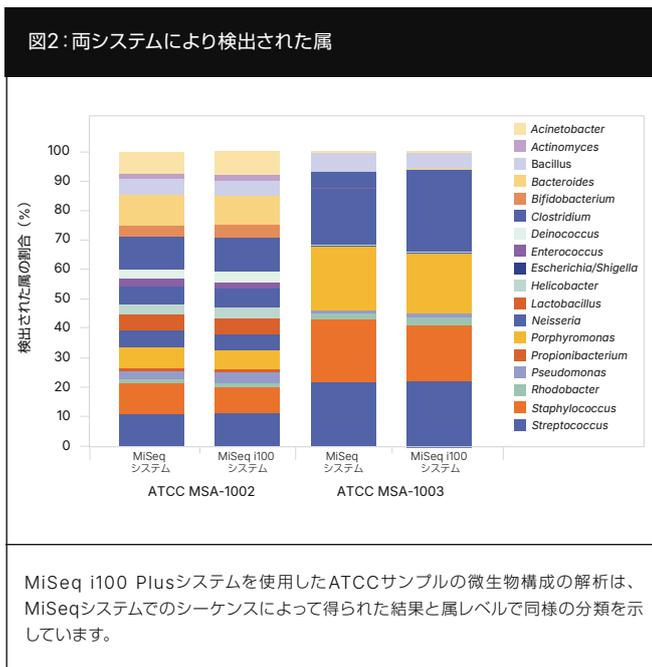


**表4: GC含量が異なるゲノムのWGSアライメントメトリクス**

シーケンスシステム	<i>B. pacificus</i>		<i>E. coli</i>		<i>R. sphaeroides</i>	
	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム
カバレッジ均一性	98.62%	98.58%	99.13%	99.04%	99.16%	99.07%
マッピングされた塩基 (%)	96.54%	97.72%	95.41%	97.56%	95.21%	97.39%
マッピングされたリード (%)	99.75%	99.88%	99.75%	99.93%	97.85%	97.94%
ミスマッチリード (%)	0.18%	0.05%	0.21%	0.04%	0.19%	0.05%

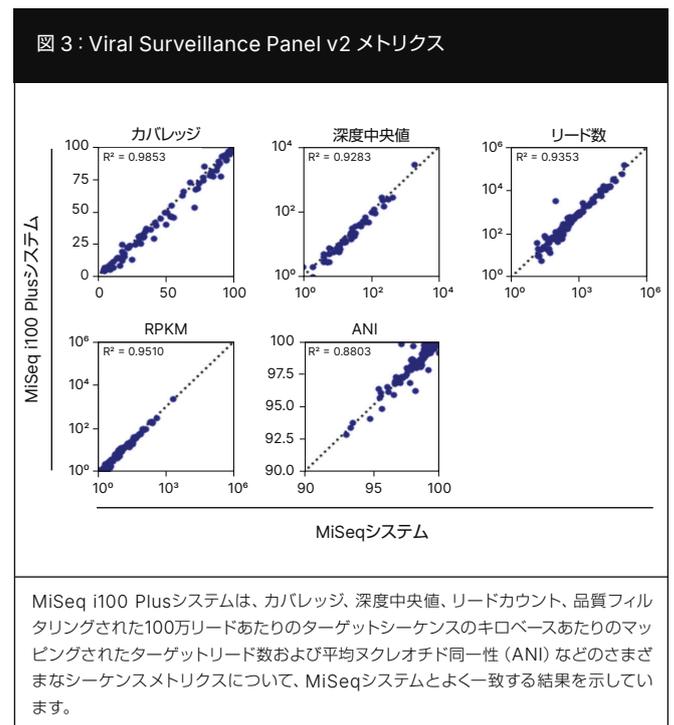
### 16S rRNAシーケンス

16Sシーケンス結果の解析では、細菌群集のうちの予想されるすべての細菌が特定され、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムは同等の結果を示しました（図2）。これらの結果は、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムが16Sメタゲノムアプリケーションにおいて同等の性能を有することを示しています。



### 感染症パネル

Viral Surveillance Panel v2を使用した廃水サンプルのシーケンス結果の解析では、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムはウイルスゲノムの検出とカバレッジにおいて同等の性能を示し、シーケンスマトリクスの高い一致が認められました（図3および表5）。



Respiratory Pathogen ID/AMR Panelを使用したRP2.1 Controlシーケンスからの結果の解析では、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムは微生物の検出と定量において同等の性能を示し、シーケンスメトリクスの高い一致が認められました (図4Aおよび表6)。特筆すべきこととして、解析した微生物のターゲットGC含量に関わらず、両システムの性能に観察できる相違はありませんでした (図4B)。

Urinary Pathogen ID/AMR Panelを使用したMicrobial Community Standardシーケンス結果の解析では、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムは微生物の検出と定量において同等の性能を示し、シーケンスメトリクスの高い一致が認められました (図5Aおよび表7)。解析した微生物のターゲットGC含量に関わらず、両システムの性能に観察できる相違はありませんでした (図5B)。

図4: Respiratory Pathogen ID/AMR Panelメトリクス

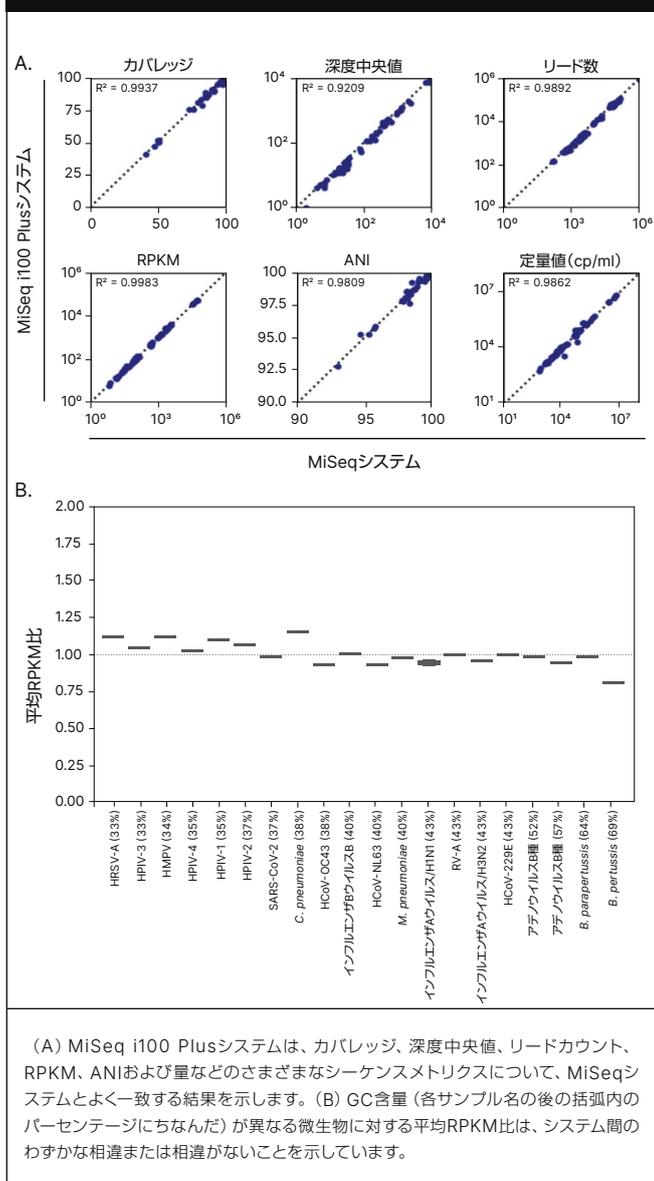


図5: Urinary Pathogen ID/AMR Panelメトリクス

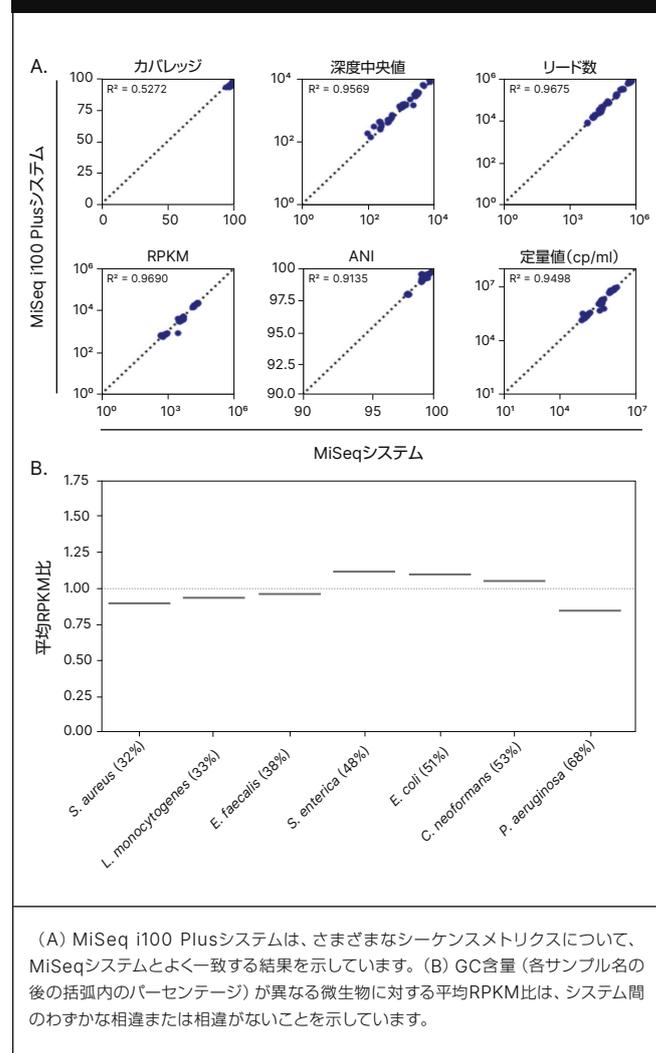


表5: Viral Surveillance Panel v2を使用して25%以上のゲノムカバレッジで検出されたウイルス

微生物	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム	微生物	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム
アイチウイルス1 (AIV-A1)	1	1	ヒトアデノウイルスF	4	4
ヒトアデノウイルスA	1	1	ヒトボカウイルス (HBoV)	4	4
ヒトパピローマウイルス69 (HPV69)	1	1	マmastロウイルス1 (MAstV1)	4	4
ライノウイルスA (RV-A)	1	1	マmastロウイルス8 (MAstV8)	4	4
ライノウイルスC (RV-C)	1	1	マmastロウイルス9 (MAstV9)	5	5
ヒトポリオーマウイルス6 (HPyV6)	2	1	サボウイルス	5	5
ノロウイルスGII	1	2	メルケル細胞ポリオーマウイルス (MVPyV)	5	6
ヒトパピローマウイルス53 (HPV53)	2	2	BKポリオーマウイルス (BKPyV)	6	6
ロタウイルス (RVA)	2	2	ヒトコロナウイルスOC43 (HCoV_OC43)	6	6
ノロウイルスGI	3	2	JCポリオーマウイルス (JCPyV)	6	6
マmastロウイルス6 (MAstV6)	3	3	合計検出結果	67	67

表6: Respiratory Pathogen ID/AMR Panelを使用して検出された微生物

微生物	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム	微生物	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	3	3	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2)	3	3
ヒトアデノウイルスB	3	3	<i>Bordetella parapertussis</i>	3	3
ヒトアデノウイルスC	3	3	<i>Bordetella pertussis</i>	3	3
ヒトメタニューモウイルス (HMPV)	3	3	ヒトコロナウイルス229E (HCoV_229E)	3	3
ヒトパラインフルエンザウイルス1 (HPIV-1)	3	3	ヒトコロナウイルスNL63 (HCoV_NL63)	3	3
ヒトパラインフルエンザウイルス4 (HPIV-4)	3	3	ヒトコロナウイルスOC43 (HCoV_OC43)	3	3
インフルエンザAウイルス (H1N1)	3	3	ヒトパラインフルエンザウイルス2 (HPIV-2)	3	3
インフルエンザAウイルス (H3N2)	3	3	ヒトパラインフルエンザウイルス3 (HPIV-3)	3	3
<i>Mycoplasmoides pneumoniae</i>	3	3	ヒト呼吸器合胞体ウイルスA (HRSV-A)	3	3
ライノウイルスA (RV-A)	3	3	インフルエンザBウイルス (B/Victoria/2/87-like)	3	3
			合計検出結果	60	60

表7: Urinary Pathogen ID/AMR Panelを使用して検出された微生物

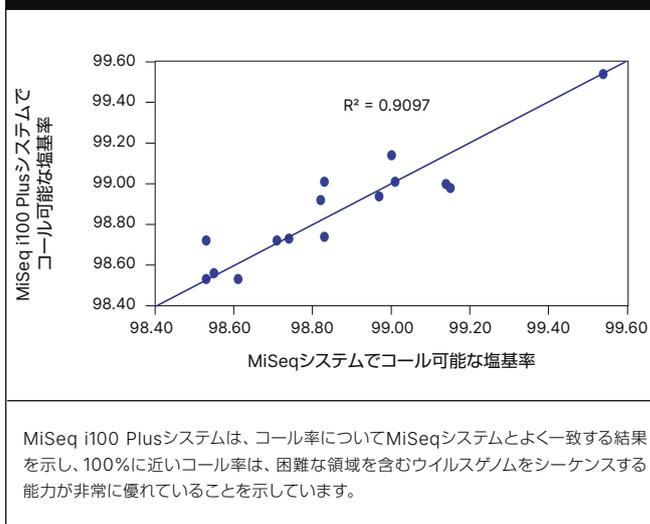
微生物	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム
クリプトコッカス・ネオフォルマンس	6	6
エンテロコッカス・フェカリス	6	6
大腸菌	6	6
リステリア・モノサイトゲネス	6	6
緑膿菌	6	6
サルモネラ菌	6	6
黄色ブドウ球菌	6	6
合計検出結果	42	42

Illumina Microbial Amplicon Prepを使用したATCCインフルエンザウイルスサンプルシーケンス結果の解析では、MiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムはウイルスゲノムの検出において同等の性能を示しました (表8)。MiSeq i100 Plusシステムは、繰り返し配列、高GC含量、複雑性が低い領域などの困難な領域を含むゲノム全体のシーケンス精度をレポートするメトリクスであるコール可能な塩基率について、MiSeqシステムとよく一致する結果を示しました (図6)。

表8: Illumina Microbial Amplicon Prepを使用して検出されたウイルスゲノム

微生物	MiSeqシステム	MiSeq i100 Plusシステム
A型インフルエンザ (H1N1)	6	6
A型インフルエンザ (H3N2)	6	6
B型インフルエンザ	8	8
合計検出結果	20	20

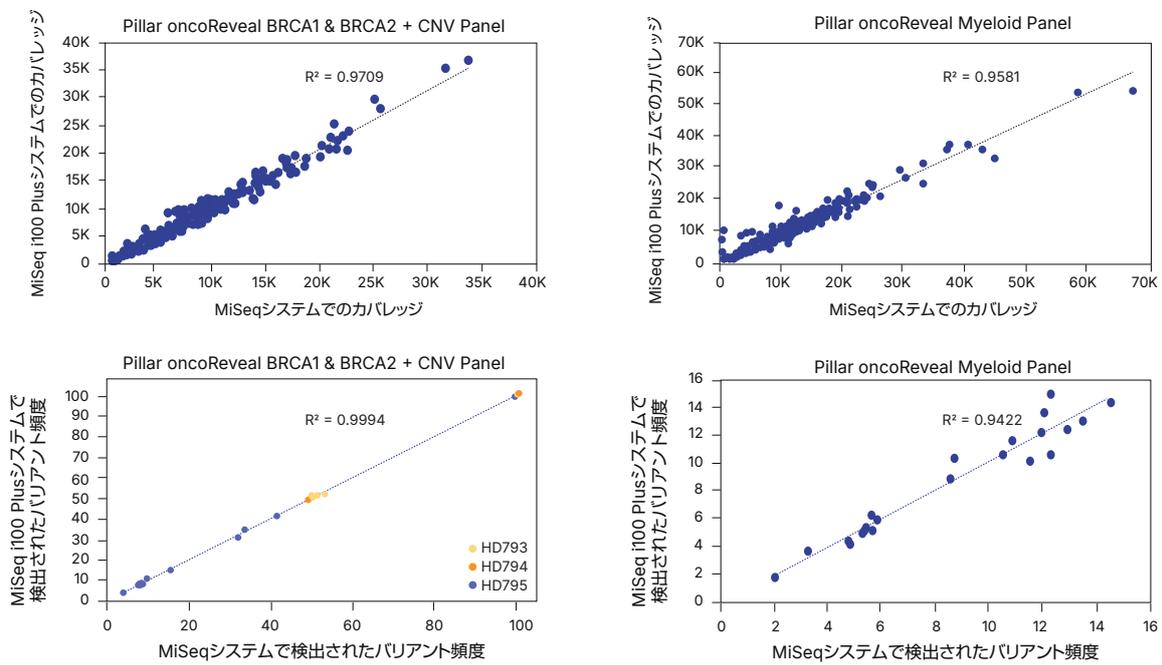
図6: システム間のコール率の比較



## 腫瘍学パネル

Pillar oncoReveal Myeloid PanelおよびBRCA1 & BRCA2 + CNV Panelを使用した結果の解析では、両パネルはMiSeq i100 PlusおよびMiSeqシステムで同等のアンプリコンカバレッジを示したことから、これらパネルの増幅と性能に相違はないことが示されました (図7)。両システムは解析した標準サンプルのうちの予想されるバリエーションすべてを正確にコールしました (図7)。さらに、TruSight RNA Pan-Cancer Panelを使用して生成した結果の解析では、アッセイ検出を下回る発現レベルの融合遺伝子を除き、両システムは標準サンプルHD834の既知の融合遺伝子を問題なく検出したことが示されました (表9)。これらのデータは、MiSeq i100 Plusシステムの焦点を絞った腫瘍学パネル結果がMiSeqシステムの性能と同等であることを示しています。

図7：腫瘍学パネルのシーケンス性能の比較



MiSeq i100 Plusシステムは、Pillar oncoReveal Myeloid PanelおよびPillar oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panelを使用したシーケンスカバレッジ（上側パネル）およびバリエーション頻度（下側パネル）について、MiSeqシステムとよく一致する結果を示しています。

表9：システム間のTruSight RNA Pan-Cancer Panelを使用した融合遺伝子検出の比較

予想される融合遺伝子	RNA発現レベル	MiSeqシステムで検出	MiSeq i100 Plusシステムで検出
<i>TPM3-NTRK1</i>	≥ 100コピー/ng	2/2	2/2
<i>QKI-NTRK2</i>	≥ 100コピー/ng	2/2	2/2
<i>SLC34A2-ROS1</i>	≥ 40コピー/ng	2/2	2/2
<i>EML4-ALK</i>	≥ 40コピー/ng	2/2	2/2
<i>CCDC6-RET</i>	≥ 4コピー/ng <sup>a</sup>	2/2	1/2
<i>ETV6-NTRK3</i>	≥ 4コピー/ng <sup>a</sup>	0/2	1/2
<b>感度</b>		<b>83%</b>	<b>83%</b>

a. 発現レベルがアッセイ検出未満の融合遺伝子は、発現レベルが高い融合遺伝子よりも検出精度が低下します。

## まとめ

MiSeq i100およびMiSeq i100 Plusシステムは、システム設計のブレイクスルー、ケミストリーおよび統合型の解析を備え、操作のシンプルさ、精度の高いデータ、並外れたスピードを実現します。感染症および腫瘍学アプリケーションに対応するWGS、16S rRNAシーケンス、ターゲットシーケンスパネルなど、MiSeqシステムで一般的に実行される主要なメソッドから得たデータを、MiSeq i100 Plusシステムを使用して生成したデータと直接比較しました。これらの結果は、MiSeq i100 Plusシステムの性能はMiSeqシステムの性能に匹敵する、あるいはそれを上回り、出力の増加と非常に短いシーケンスランタイムにより、さらに多くのデータ集約型アプリケーションに対応することを示しています。

## 詳細はこちら

[MiSeq i100シリーズ](#)

## 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)

© 2025 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。

**illumina**<sup>®</sup>

Pub. No. M-GL-02246 v1.0-JPN 24APR2025