

MiSeqTM i100 シリーズでの 性能の最大化

ランの成功を保証する ライブラリーローディング 最適化ステップ

- MiSeq i100シリーズフローセルの最適なライブラリーローディング濃度の決定
- シーケンス性能を最大限引き出すためにインサートサイズを改善
- ライブラリーの複雑性をPhiXで調整することで多様性の低いライブラリーに対応



はじめに

MiSeq i100シリーズは最もシンプルで高速なベンチトップシーケンサーです。システム設計の画期的な進歩、XLEAP-SBS™ケミストリーおよび統合型のデータ解析により、使いやすさの向上、高精度のデータ、並外れたスピードを実現し、初期MiSeqシステムの最大4倍のスピードで結果を出すことができます。エンドツーエンドのNGSソリューションの一部として、MiSeq i100シリーズは、微生物学、感染症、腫瘍学などの主要な領域におけるトランスクリプトミクス、微生物学ゲノミクス、およびターゲット遺伝子シーケンシング研究など、さまざまなアプリケーションに対して即日結果を提供します。

別のシーケンスシステムからMiSeq i100シリーズにプロジェクトを移行する際は、ライブラリーローディングの最適化がデータ出力と品質の最大化に役立ちます。このテクニカルノートでは、ライブラリーローディング濃度、ライブラリー品質およびヌクレオチド多様性に関する考慮事項のガイダンスを含め、MiSeq i100シリーズでの結果を最適化するための推奨事項をご紹介します。

最適なライブラリーローディング

ローディング濃度とは、シーケンスのために装置にロードするライブラリーの最終濃度のことです。ライブラリーは調製後に、ライブラリーの種類、シーケンスシステム、試薬キットに応じて適切なローディング濃度に希釈されます。

高すぎたり低すぎたりする濃度でライブラリーをローディングすると、シーケンス品質と出力の低下につながることがあり、極端な条件下ではランが失敗する可能性もあります。過少ローディングは、ナノウェル占有率（% Occupied）の低下と重複リードの増加につながることがあり、これによりターゲットカバレッジを達成するにはより多くのリードが必要になります。一方過剰ローディングは、クラスターパスフィルター率（% PF）の低下を生じることがあります。MiSeq i100シリーズでの最適なローディング濃度を決定するには、% Occupiedおよび% PFメトリクスをSequencing Analysis Viewでプロットすることで、ランが過少ロードされた、最適にロードされた、または過剰ロードされたかどうかを判断できます。以下の実験例のアプローチは、最適ローディング濃度検討と、一次および二次メトリクスの評価に使用できます。


[詳細については、「Optimizing library loading for Illumina NGS systems with patterned flow cells」をご一読ください。](#)

最適ローディング濃度の決定

最適ローディング濃度を見つけるには、幅広い濃度を検証することが重要です。% PFや% Occupiedなどの一次メトリクスと、重複、インサートサイズおよびカバレッジなどの二次メトリクスを使用して、さまざまなローディング濃度で性能を測定し、特定のアプリケーションに対する「使用可能な収量」を決定します。

ステップ1: 最適濃度検討実験のデザイン

MiSeq Reagent Kit v3を使用した初期MiSeqシステムからMiSeq i100シリーズへの移行プロジェクトでは、MiSeq Reagent Kit v3のローディング濃度の約6.5倍を中心に最適濃度を検討します。推奨される中央濃度は、MiSeq i100シリーズで使用するライブラリー調製キットの種類によって異なります（表1）。その他すべての場合については、中央濃度には100 pMを使用することが推奨されます。

表1: MiSeq i100シリーズでの最適濃度検討実験のデザインに推奨される中央濃度^a

ライブラリー調製キット	中央濃度
Illumina DNA Prep	80 pM
Illumina DNA Prep with Enrichment	60 pM
Illumina RNA Prep with Enrichment	80 pM
Illumina DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq™ DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA Nano	120 pM
Illumina Viral Surveillance Panel v2	80 pM
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B	80 pM
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel	80 pM
Urinary Pathogen ID/AMR Panel	80 pM
TruSight™ RNA Pan-Cancer	80 pM
16S rRNA Amplicon ^b	60 pM
Pillar® oncoReveal™ Myeloid Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Essential MPN Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel	80 pM
Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA2 plus CNV Panel	80 pM
PhiX Control v3	120 pM

- 二本鎖DNAライブラリーは、蛍光分析法のQubit dsDNA Quantitation High Sensitivityアッセイ（Thermo Fisher、カタログ番号：Q32851）を使用して定量し、Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit（agilent、カタログ番号：5067-4626）を使用して平均断片サイズを推測しました。一本鎖DNAライブラリーは、Qubit ssDNA Assay Kit（Thermo Fisher、カタログ番号：Q10212）を使用して定量しました。
- 16S rRNAアンプリコンライブラリーは、[「16S Metagenomic Sequencing Library Preparation」](#)（パート番号：15044223 Rev.B）に記載のワークフローを使用して調製しました。

この例では、Illumina DNA Prepを使用して調製した*Bacillus pacificus*、*Cereibacter sphaeroides*および*Escherichia coli*からの細菌ゲノムサンプルから成るライブラリープールを、40 pM、80 pMおよび120 pMのローディング濃度で検証しました。

ステップ2: ナノウェル占有率とクラスターPFの評価

各ローディング濃度に対するシーケンスランからの% PFと% Occupiedメトリクスをプロットし、どの濃度が過少、過剰、または均衡の取れたローディング結果になったかを判断します。この実験では、検証した3つすべての濃度（40 pM、80 pM、120 pM）が% PF対% Occupiedのプロットで最適なローディング形状（正の傾きの点の集まり）を示したことから、MiSeq i100シリーズは幅広いライブラリーローディング濃度範囲内でロバストな結果を達成できることが実証されました（図1）。

ステップ3: 重複の評価

重複割合を解析することでターゲット濃度範囲を狭めます。重複はローディング濃度増加に伴って減少する傾向があります。この例では、検証した3つすべての濃度で重複は15%未満であり、80 pMおよび120 pMは最低値でした（図2）。

ステップ4: インサートサイズの解析

インサートサイズの確認ライブラリーとアプリケーションの最適な範囲は、ワークフロー要件に応じて異なることがあります。この例では、3種類の細菌株すべてのインサートサイズが検証した濃度範囲で異なっており、40 pMおよび80 pM間で大きな差が認められました（図2）。

ステップ5: その他のアプリケーションに依存するメトリクスの確認（カバレッジ、マッピングなど）

アプリケーションの最適な性能については、その他の二次解析メトリクスを確認します。この例では、マッピングされたリード数の割合のメトリクスから、検証した3つすべてのローディング濃度でロバストな結果が示されています（図2）。二次メトリクスは、装置上およびクラウドソリューションとして利用できるDRAGEN™ Small Whole Genome Sequencingアプリで生成しました。

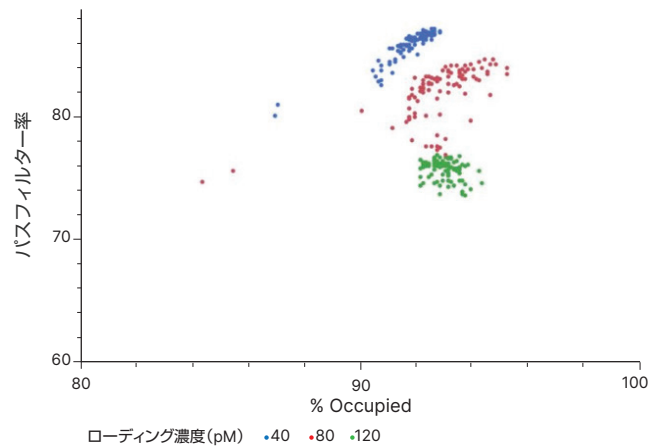


図1: 広範囲なライブラリーローディング濃度にわたる最適なナノウェル占有率: 40 pM、80 pMおよび120 pMでローディングしたライブラリーのシーケンスが最適なローディング形状を示していることから、MiSeq i100シリーズは幅広いローディング濃度でロバストな結果を達成できることが示されました。

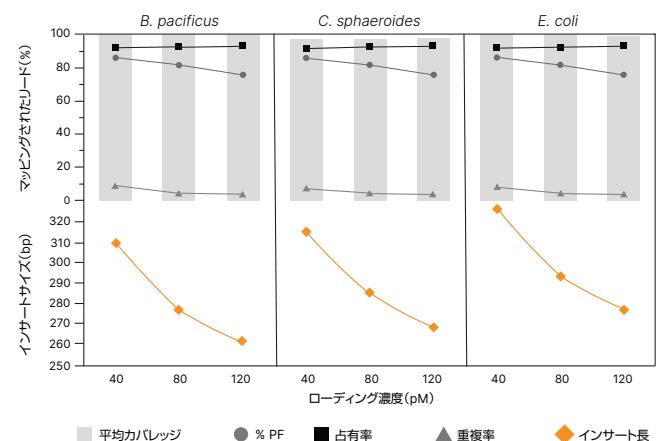


図2: MiSeq i100シリーズのシーケンス最適化: 重複、平均カバレッジ、インサートサイズを調べるための最適濃度検討実験の例。

ライブラリー品質

アダプターダイマー、プライマーダイマーおよび部分的なライブラリー生成物など、ライブラリー調製中に生じた短いインサートと夾雑物は、MiSeq i100シリーズのクラスタリングに負の影響を及ぼすことがあります。これらの短いインサートや夾雑物をクリーンアップまたはサイズ選択ステップ中に除去することが重要です。必要であれば、短いインサートと夾雑物は、オプションのビーズ精製ステップをライブラリー調製プロトコルに加えることで、より効果的に除去できる場合があります。ライブラリー調製が完了したら、シーケンスを

実施する前にすべてのライブラリーの品質と純度を検証してください。アジレントバイオアナライザー、Fragment AnalyzerシステムまたはTapeStationを使用して、ライブラリーの完全性、平均インサートサイズおよび夾雑物を確認します。

追加のビーズ精製による短いインサートの除去

この例では、Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kitを使用して調製した廃水サンプルのライブラリーを、『[Optimal variant calling with Illumina DNA PCR-Free Prep on the NovaSeq™ X Series](#)』テクニカルノートに記載のものと同様のプロトコルに従い、ビーズ対サンプルの比を0.8倍にして、追加のビーズ精製を実施しました。唯一の違いは、ステップ2でIllumina Purification Beadsを指定の52.5 µlではなく、40 µl添加したことです。追加のビーズ精製により、250 bp未満の断片のほとんどが効率的に除去され、ライブラリー収量の合計除去率は約35%でした（図3）。

シーケンス性能の向上

追加のビーズ精製を行ったもので行っていないViral Surveillance Panel v2ライブラリーをMiSeq i100シリーズでシーケンスし、DRAGEN™ Microbial Enrichment Plusアプリで解析しました。追加のビーズ精製を行ったライブラリーのシーケンスでは、平均リード長およびポストクオリティリード率などのメトリクスが改善し、プロトコルを変更していない場合と比較して微生物検出が増加しました（図4）。

ヌクレオチドの多様性

ヌクレオチドの多様性は、ランの各サイクルに存在する各塩基（A、C、G、T）の相対的な割合を示します。ヌクレオチドの均衡は、シーケンスシステムによるカラーマトリックス修正およびシグナル強度のノーマライゼーションに重要です。MiSeq i100シリーズ搭載の適応型Real-Time Analysisソフトウェアは、多様性の低いライブラリーの正確なベースコール用に入念に開発されました。多様性の低いライブラリーのシーケンスの最適な性能は、最小のPhiX添加率（≥ 5%）によって達成され、高品質リード数を最大化できます。

この例では、MiSeq i100シリーズでシーケンスした5%および20%PhiXを添加した多様性の低い16Sアンプリコンライブラリーが、多様性の高いヒトIllumina DNA Prepライブラリーの性能と同等のロバストな性能を示しています（図5）。

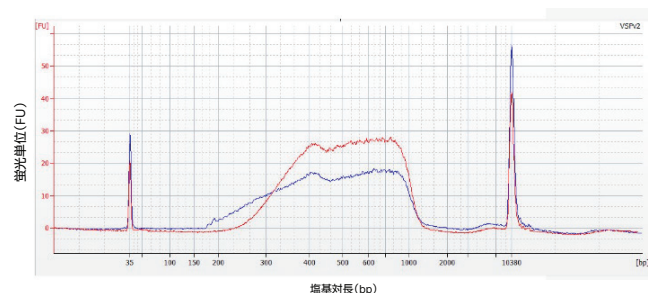


図3：追加のビーズ精製によるインサートサイズの増加：追加のビーズ精製（赤線）により、プロトコルを変更していない場合（青線）と比べて、250 bp未満のほとんどの断片が効果的に除去されました。

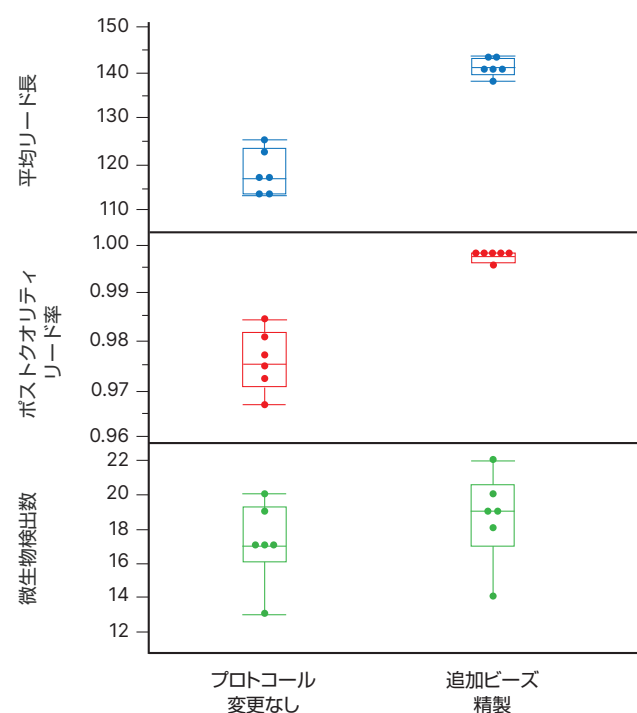


図4：インサートサイズの増加による性能の向上：変更プロトコル（インサートサイズを増加）に従って調製したライブラリーのMiSeq i100シリーズでのシーケンスは、平均リード長、ポストクオリティリード率および微生物検出などの性能向上につながりました。

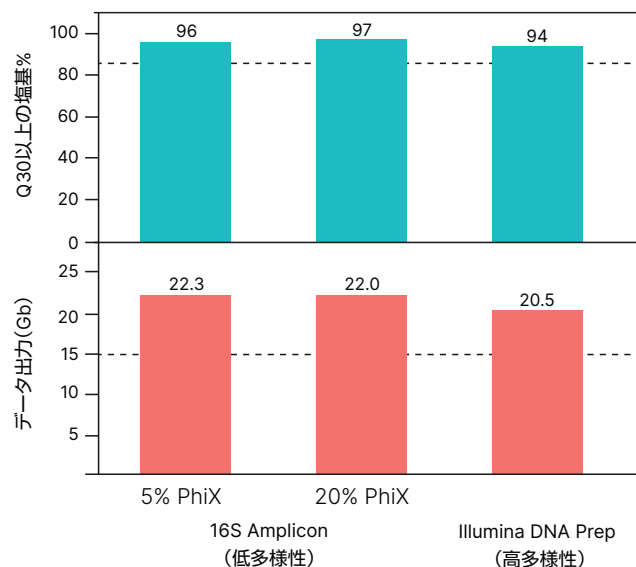


図5：多様性の低いライブラリーへの対応：MiSeq i100シリーズに搭載されたソフトウェアは、Q30以上でベースコールされた塩基の割合とGb出力で示されるように、多様性の低いライブラリーのシーケンス性能を最適化します。すべてのランは、MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles)を使用し、リード長301 bp × 2でシーケンスしました。破線は性能仕様を表しています。

まとめ

シーケンスケミストリーの画期的な進歩とMiSeq i100シリーズの統合型データ解析が、使いやすさの向上、精度の高いデータ、並外れたスピードを実現します。このテクニカルノートで説明したベストプラクティスに従い、ライブラリーの品質評価、ローディング濃度の最適化、およびライブラリーのプーリングを実施することで、MiSeq i100シリーズの性能を最大化できます。

詳細はこちら

[MiSeq i100およびMiSeq i100 Plusシステム](#)

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/illumina

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

© 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 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