

NextSeq™ 1000 および NextSeq 2000 システムでの 小さなサイズの 全ゲノムシーケンス

実績のある NGS プラットフォームに
おけるスケーラブルで高品質な
全ゲノムシーケンス

illumina®

ベンチトップ型の小さなサイズの全ゲノムシーケンス

細菌、ウイルスおよびその他の微生物はその小さなサイズにかかわらず、私たちの健康と環境に大きな影響を及ぼします。このため、微生物ゲノムの次世代シーケンシング (NGS) は食品の安全性検査、公衆衛生、感染症サーベイランス、分子疫学、環境メタゲノムに一般的に使用されています。全ゲノムシーケンス (WGS) やターゲットリシーケンスを含む微生物NGSは、マッピングや*de novo*ゲノムアセンブルが可能であり、完全長ゲノムの解読、サンプル内の個々の種と亜種の検出、微生物進化のモニタリングおよび抗生物質耐性を含む重要な形質の解析を行うことができます。

本アプリケーションノートでは、WGSに対するNextSeq 1000およびNextSeq 2000システムとMiSeq[™]システムの性能を比較します。NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムは、P1およびP2両方のフローセル構成で600サイクルのキットが利用可能なため、小さいサイズから中程度のサイズのゲノムのWGSに関心のあるラボにとって最高の選択肢となります。NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キット (カタログ番号: 20075294) は1億リードで60 Gbの高品質データを生成し、NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles)キット (カタログ番号: 20075295) は3億リードで180 Gbの高品質データを生成します。これと比べて、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) (カタログ番号: MS-102-3003) は2,500万リードで15 Gbの高品質データを生成します。

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムのWGSワークフローには、ライブラリー調製、シーケンスおよびBaseSpace[™] Sequence Hubで使用できるアプリケーションを介したボタン操作で実施できる二次データ解析が含まれます。(図1)。本アプリケーションノートの結果は、さまざまなゲノム研究に対して、NextSeq 2000システムはMiSeqシステムと比べて、301 bp × 2リードで高品質なデータをより早く、サンプルあたりより低いコストで生成することを示しています。留意すべき点として、NextSeq 1000システムは、本アプリケーションノートに記載した互換性のあるキットを用いた場合、NextSeq 2000システムと同一の機能を発揮します。

メソッド

ライブラリー調製

この研究では、American Type Culture Collection (ATCC)から選択した利用可能な細菌分離株を評価しました(表1)。個々のシーケンスライブラリーの生成には各サンプル1 ngを用いました。各細菌分離株について、Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 Samples, IPB) (イルミナ、カタログ番号: 20060060) およびIDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples) (イルミナ、カタログ番号: 20027213) を用いて、2つのテクニカルレプリケートを調製しました。



図1: NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムでのWGSワークフロー: ユーザーが使いやすい効率的なNGSワークフローには、ライブラリー調製、シーケンス、データ解析が含まれます。NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットのシーケンスランタイムは約34時間であり、NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles)フローセルのランタイムは、約44時間です。

表1: 評価した細菌サンプル

サンプル	ATCC カタログ番号	ゲノムサイズ	GC コンテンツ
<i>R. sphaeroides</i> , グラム陰性	17023D-5	± 4.1 Mb	69%
<i>E. coli</i> , グラム陰性	700926	± 4.6 Mb	51%
<i>B. pacificus</i> , グラム陽性	10987D-5	± 5.4 Mb	35%

シーケンス

調製したライブラリーをプールし、NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットのフローセルにロードしました。これらの600サイクルキットは、NextSeq 1000またはNextSeq 2000システムのいずれの装置で使用した場合にも、同一の性能仕様を示し、高品質なQ30スコアと優れたカバレッジ均一性をもたらします。シーケンスは、NextSeq 2000システムとMiSeqシステムでそれぞれ実施しました。代表的なシーケンスランと解析データは、[BaseSpaceデモデータウェブページ](#)でご覧いただけます。

データ解析

FASTQデータは、BaseSpace Sequence HubのFASTQ Toolkitで100万リードにダウンサンプリングしました。WGSデータの*de novo*アセンブルには、BaseSpace Sequence HubのSPAdes Genome Assemblerを使用しました。SPAdes Genome Assemblerは、標準的な細菌データセットをアセンブルするためにデザインされた*de novo*シーケンス用のオープンソースツールです。ゲノムカバレッジはIntegrative Genomics Viewer (IGV)で視覚化しました。¹

結果

シーケンス出力

NextSeq 2000システムに使用したNextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットは、MiSeqシステムに使用したMiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)と比較した場合、Q30以上のクオリティスコアをより高い割合で示します。また、NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットは最大1億のシングルエンドパスフィルターリード、または2億のペアエンドパスフィルターリードを出力します。さらに、NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットは、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)の約15 Gbと比べて4倍以上の約60 Gbのデータを生成します。これに加えて、NextSeq 1000/2000 P1 Reagents

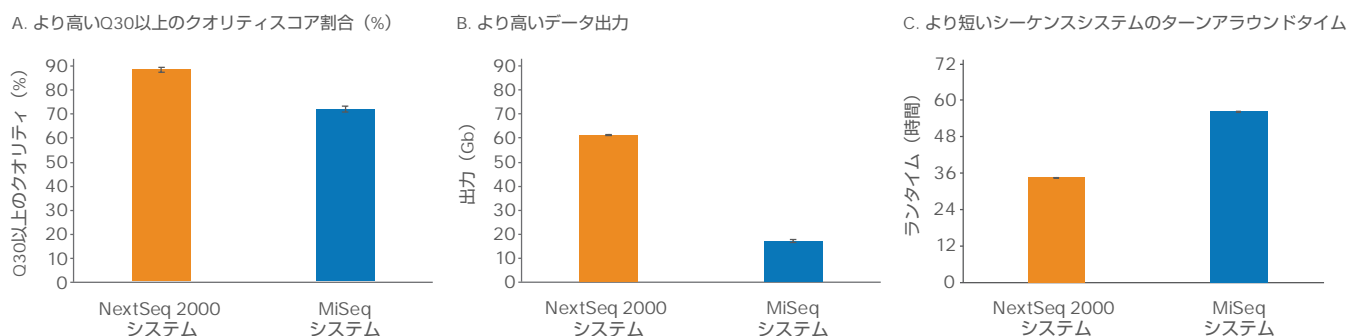


図 2: 主要な性能メトリクスの比較: NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットを用いたNextSeq 2000システム上でのsWGSは、MiSeqシステムでのsWGSと比較して、(A) Q30以上のクオリティスコアの割合が高く、(B) 約60 Gbでほぼ4倍高いデータ出力を生み出し、(C) P1フローセルを用いた場合、装置ランタイムが約20時間短縮します。

(600 Cycles)キットを用いた場合、約34時間でシーケンスランが完了し、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いた場合のシーケンスランよりも約20時間短いランタイムとなります (図2)。

包括的なカバレッジ

NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムは、微生物について同等の高品質のゲノムアセンブリを生み出し、さまざまなグラム陰性菌とグラム陽性菌の種にわたって同等のカバレッジをもたらします (図3)。両装置で検証したすべての微生物種で、GCコンテンツにかかわらず、均一なカバレッジレベルを示しました。また、これらのゲノムアセンブリからの結果は、全ゲノム微生物シーケンスに対するIllumina DNA Prepの類まれな性能も証明しています。

まとめ

本アプリケーションノートは、NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステム上での600サイクルキットの性能の同等性を示しています。NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムを用いて、前述した301 bp × 2のラン構成で、一致したWGS結果が達成されました。両システムとも、使用した装置にかかわらず正確かつ高精度なde novoアセンブリを達成しました。

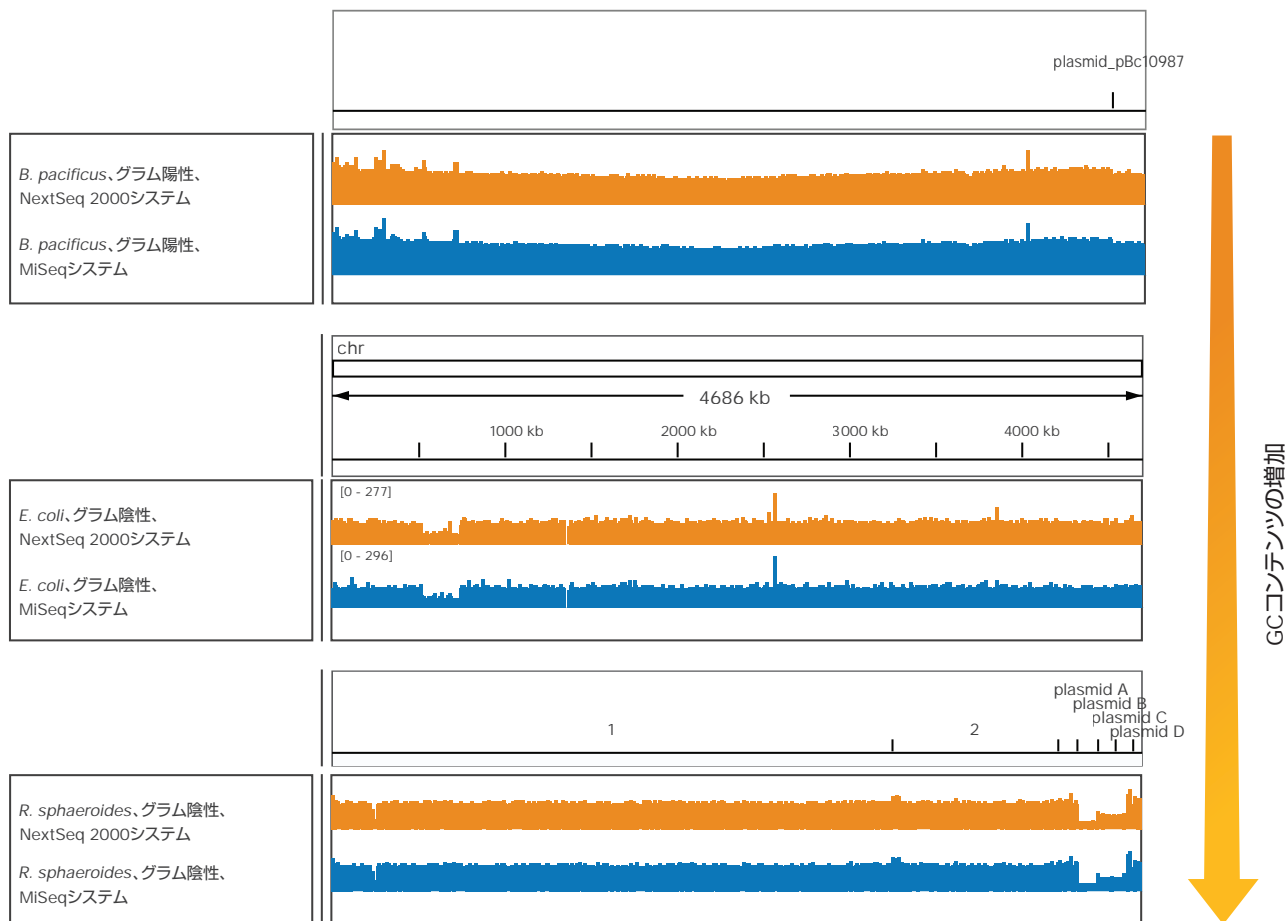


図 3: さまざまなGCコンテンツを含む小さなサイズの全ゲノムの均一なカバレッジ: Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 Samples, IPB)を用いて調製し、NextSeq 2000システムでNextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キット、またはMiSeqシーケンサーシステムでMiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてシーケンスした、*B. pacificus*、*E. coli*および*R. sphaeroides*ライブラリーに対して、一貫性のある同等のゲノムカバレッジが示されています。

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム上でのNextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)キットおよびNextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles)キットは、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いたMiSeqシステムと比べて、高い出力と迅速なターンアラウンドタイムで高品質なシーケンスを提供します。これらの600サイクルキットはNextSeq 1000またはNextSeq 2000システムのいずれの装置で使用した場合にも、同一の性能仕様を示し、高いQ30スコアと優れたカバレッジの均一性をもたらします。さらに、NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム上での600サイクルキットは、小さいサイズから中程度のサイズのゲノムの解析に対して拡張性があり、柔軟にバッチに対応できるデータ出力オプションが備わっています。結論として、NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム用の600サイクルキットは、実証済みのMiSeqシステムで確立されたデータ品質を維持しつつ、アプリケーションの拡大、オペレーションの簡便性、経済性の向上を実現します。

詳細はこちら

イルミナシーケンスプラットフォーム : jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html

NextSeq 1000/2000試薬 : jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/nextseq-1000-2000-reagents.html

Illumina DNA Prep : jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-dna-flex.html

シーケンスランのリンクおよびプロジェクトリンク : <https://basespace.illumina.com/s/QV5fDyZ9A6z7>および<https://ilmn-ss0.basespace.illumina.com/s/r8eukjc0IGqm>

* BaseSpace Sequence Hub デモデータはユーザーログインとパスワードが必要です。

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

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

© 2023 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。

参考文献

1. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. [Integrative genomics viewer](#). *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-26. doi:10.1038/nbt.1754

販売店

illumina[®]