

Nextera™ DNA Flex Library Preparation Kit

ヒト全ゲノムシーケンスからアンプリコン、プラスミド、微生物まで、幅広いアプリケーションに対応する短時間で完成されたライブラリー調製ワークフロー

特長

- **短時間のライブラリー調製ワークフロー**
ビーズ上でのタグメンテーションにより、時間を節約し、作業工程を削減することで、全工程を3時間未満に短縮
- **サンプル調製にも対応**
血液、唾液、ろ紙血からのDNA抽出プロトコルによりライブラリー調製効率を向上
- **幅広いDNAインプット量に対応する柔軟なワークフロー**
幅広いDNAインプット量（1～500 ng）、複数のサンプルタイプ、そして小さなサイズから大きなサイズのゲノムまでをサポートするキットで作業を簡便化
- **幅広いアプリケーションに対応**
ヒトまたはその他の大きな/複雑なゲノム、並びにアンプリコンや微生物、寄生虫、真菌をシーケンス
- **最適化されたライブラリー調製**
ユーザーの経験値に関わらず、一定したインサートサイズと高いカバレッジ形成

はじめに

次世代シーケンス（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、シーケンスを始める前工程での著しい遅れに苦慮しています。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¹。Nextera XT DNA Library Prep Kitの登場によって、ライブラリーのプール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²。イルミナのライブラリー調製ケミストリーにおける新革命、それがNextera DNA Flex Library Preparation Kitです。Nextera DNA Flex Library Preparation Kit（図1、表1）で見られるユニークなケミストリーは、DNA抽出、断片化、ライブラリー調製およびノーマライゼーションを統合しており、短時間で最も柔軟性のあるワークフローがイルミナのライブラリー調製関連製品のラインナップに加わります（図2、表2）。

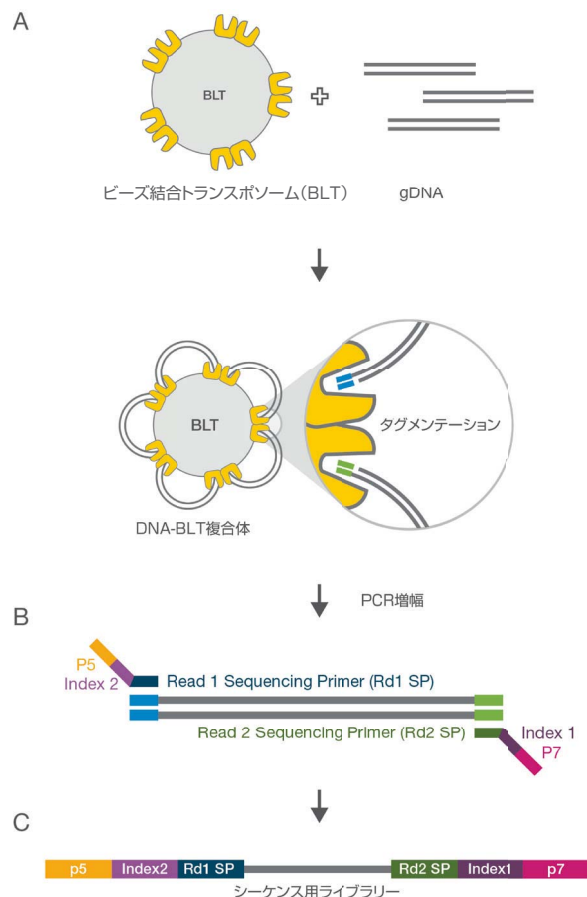


図 1: Nexteraのビーズ結合トランスポソームケミストリー - (A) ビーズ結合トランスポソームは、gDNAの同時断片化し、イルミナシーケンスプライマーを付加します。(B) 少ないサイクルのPCRによってシーケンス用DNA断片を増幅し、インデックスとアダプターを付加します。(C) シーケンス用断片を洗浄しプールします。

表 1: Nextera DNA Flex Library Prep製品仕様

	Nextera DNA Flex
サンプルタイプ	gDNA、血液、唾液、PCR産物、プラスミド、ろ紙血
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)
マルチプレックス	24シングルインデックス、96デュアルインデックス
対応シーケンサー	全てのイルミナNGSシステム
全ライブラリー調製時間(gDNA) ^a	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/プールを含む	

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ル	合計 ~11時間
1時間	0.5時間	1時間	6時間	0.5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ル	合計 ~5.5時間
1時間	0.5時間	2.5時間	1.5時間	

Nextera DNA Flex

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	合計 ~4時間
1時間	0.5時間	2.5時間	

Nextera DNA Flex

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	合計 ~3時間
0.5時間	2.5時間	

図 2: Nextera DNA Flex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ル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ル (Bioanalyzer)。所要時間は、使用機器、サンプル数、自動化法、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 Nano	Nextera XT	Nextera DNA Flex ^{a,b}
付属の細胞溶解液	-	-	✓
柔軟で幅広いDNAインプット量	-	-	✓
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
ライブラリー調製合計時間 ^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	300~350 ng
マルチプレックス	96デュアルインデックス	384デュアルインデックス	24シングルインデックス、96デュアルインデックス

a. 付属のDNA抽出プロトコルは、血液、唾液およびDBSサンプルに使用可能です。
 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しています。
 c. ライブラリー調製合計時間は、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/プールを含みます。

短時間のワークフローに加え、Nextera DNA Flex Library Preparation 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。Nextera DNA Flex Library Preparation 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、イルミナのsequencing by synthesis (SBS) ケミストリーの実証された精度によって均一なゲノムカバレッジをお届けします³。

短時間かつ柔軟なライブラリー調製ワークフロー

Nextera DNA Flex Library Preparation Kitにはさまざまな特長があり、イルミナの製品ラインナップ中で最短のライブラリー調製を実現します。Nextera DNA Flexケミストリーの大幅な進歩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。この方法によって、さまざまな重要な利点が得られます。

- 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、共通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により、時間のかかるプール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工程数を減らし、ライブラリー調製の自動液体分注システムにも対応できるように設計されています。これらの利点を組み合わせることで、イルミナの製品ラインナップ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)。

付属のDNA抽出

Nextera DNA Flex Library Preparation KitおよびFlex Lysis Reagent Kitを用いた場合、DNA抽出は採取したばかりの血液や唾液サンプルから直接DNA抽出を行うことが可能です。オプションのNextera DNA Flex Lysis Kitは、Nextera DNA Flexライブラリー調製用に最適化され、実証されており、完成されたワークフローステップ、試薬およびユーザーズガイドによって最大の効率が得られます。細胞溶解プロトコルは、便利なビーズ法を採用した試薬を用いて行い、必要な操作時間は30分未満であり、Nextera DNA Flexのタグメンテーション反応に直接持ち込めます。

最適化されたライブラリー調製

ビーズ上のタグメンテーションの特徴は、ライブラリー調製の大幅な改善が実現したことです。Nextera DNA Flex Library Preparation 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幅広いDNAインプット量から、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、貴重なサンプルを含めた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、幅広いDNAインプット量（100~500 ng）から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し、安定した量を回収できます。これによってプール前の手間に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。Nextera DNA FlexとTruSeq Nano DNA Library Prep Kitを比較した場合、Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは特定のパラメーターに対して、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5）。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）。

表 3: Nextera DNA Flex Library Prepの性能

パラメーター ^a	Nextera DNA Flex	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リコール率	98.7%	98.7%
SNV精度	99.8%	99.7%
Indelリコール率	93.7%	92.9%
Indel精度	97.0%	94.9%

a. 20サンプル（Coriell Institute NA12878サンプル）について、5回に分け、約30×ヒトゲノムを構築するまで実行。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=シングルヌクレオチドバリエーション、Indel=挿入欠失バリエーション

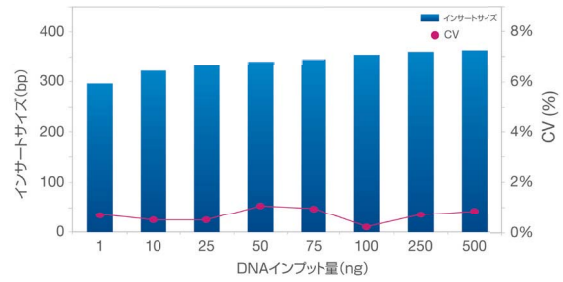


図 3: 均一で安定したインサートサイズ - ビーズ上のタグメンテーションはDNAインプット量に関わらず一定したインサートサイズをもたらします。1~500 ngのDNAインプット量では、総変動係数 (CV) は6.09%です。Nextera DNA Flex Kitによる*E. coli*複製サンプルで産生されたライブラリー。MiSeq™ (2 × 76 bp) システムでシーケンス。

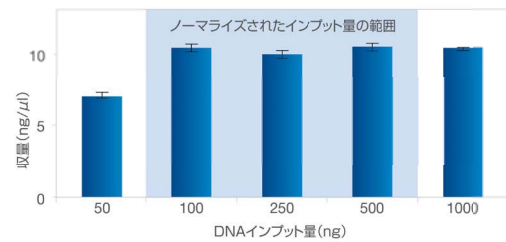


図 4: ライブラリーの断片化とノーマライゼーション - 100 ng以上でビーズが飽和することで、断片化されたDNA産物はノーマライゼーションされます。断片化DNAのノーマライゼーションによって、後工程が不要になります。Nextera DNA Flex Kitを用いて、ヒトNA12878 (Coriell Institute) から作製されたライブラリー。MiSeqシステム (2 × 76 bp) でシーケンス。

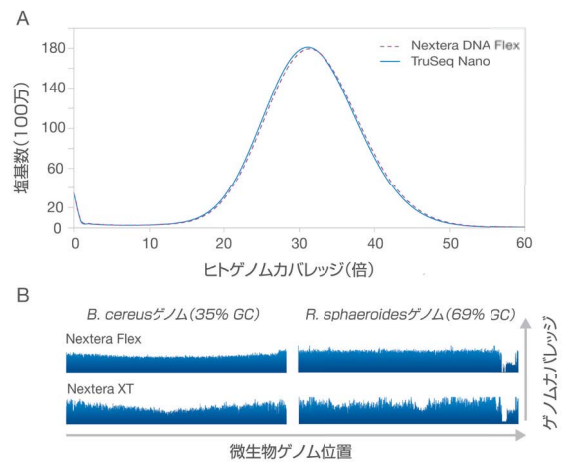


図 5: Nextera DNA Flexによるカバレッジ均一性の改善 - (A) Nextera DNA Flex KitはTruSeq Nano DNA Kitと同程度にゲノムの均一なカバレッジをもたらします。Nextera DNA FlexまたはTruSeq Nano Kitを用いて、ヒトNA12878サンプル (Coriell Institute) から作製されたライブラリー。HiSeq X™ システム (2 × 151 bp) で実施したシーケンス。 (B) GCコンテンツが極端に高い、または低い微生物種に対するカバレッジを示しています。ビーズ上のライブラリー調製ケミストリーの改善に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

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

Nextera DNA Flex Library Preparation Kit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



ヒトゲノム

対応
アプリケーション

- がんゲノム研究
- バリエーション検出
- 遺伝的リスク研究
- 集団遺伝学



大きな、または複雑なゲノム

- アグリゲノム解析(トウモロコシ、小麦、ウシなど)
- モデル生物
(ショウジョウバエ、マウス、ゼブラフィッシュなど)
- 植物/動物研究



小さなゲノム

- ヒトマイクロバイオーム
- 微生物学/メタゲノム
- 公衆衛生研究
- アンプリコンシーケンス

シーケンス
モデル例

- ヒトゲノム(3.2 Gb)、30x、S2 Kit、NovaSeq™ システム、8サンプル/フローセル
- ヒトゲノム(3.2 Gb)、30x、v2.5、HiSeq X® システム、8サンプル/フローセル

- ショウジョウバエゲノム(175 Mb)、30x、v2 Kit、NextSeq® システム、22サンプル/フローセル
- マウスゲノム(2.7 Gb)、30x、v1 Kit、HiSeq® システム、8サンプル/フローセル

- 大腸菌ゲノム(4.6 Mb)、30x、MiniSeq™ システム、50サンプル/フローセル
- プラスミド/アンプリコン(650 kb)、1000x、MiSeq® システム、11サンプル/フローセル

図 6: Nextera DNA Flexによる幅広いアプリケーション - Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは、幅広いアプリケーションをサポートできます。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、Nextera DNA Flex Library Preparation Kitは実験上の柔軟性を提供します。

メタゲノム解析、感染性疾患研究、アグリゲノム解析などをサポートします(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、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit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。

まとめ

Nextera DNA Flex Library Preparation 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革新的なワークフローを特長にしており、イルミナの製品ラインナップの中で最短で柔軟性のあるライブラリー調製ワークフローをもたらしています。ユーザーが使いやすく、自動化と同等のワークフローは、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をサポートします。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Nextera DNA Flex Library 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。

製品情報

製品名	カタログ番号
Nextera DNA 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 Indexes: Combinatorial Dual Indexes. 24および96デュアルインデックスは、それぞれ最大24および96サンプルに対応します。

Single Indexes: 24シングルインデックスは、最大96サンプルに対応します。

詳細はこちらから

Nextera DNA Flex Library Prep Kitについての詳細は、jp.illumina.com/nextera-dna-flexをご覧ください。

Nextera DNA Flex Library Prep Kitを用いたヒトWGSについての詳細は、[Human WGS with Nextera DNA Flex Application Note](#)をご覧ください。

Nextera DNA Flex Library Prep Kitを用いた微生物ゲノムシーケンスについての詳細は、[Human WGS with Nextera DNA Flex Application Note](#)をご覧ください。

参考文献

1. Illumina (2016).[Nextera DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#). Accessed July 10 2017.
2. Illumina (2014).[Nextera XT DNA Library Preparation Kit Data Sheet](#). Accessed July 10 2017.
3. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456:53-59.

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



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

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, DASL, Design Studio, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Innium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NovaSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。

その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。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. 770-2017-011-A-JPN

