

Nextera™ Crude Lysate Protocol を使った メタゲノム次世代シーケンス

Nextera DNA Flex Library Prep Kit とともに Nextera Crude Lysate Protocol によって迅速で
正確なメタゲノムプロファイリングと高品質な *de novo* ゲノムアセンブリデータを取得

はじめに

次世代シーケンス (NGS) 技術は、種の同定、メタゲノムプロファイリング、および *de novo* アセンブルのためのメタゲノム研究における重要なツールです^{1,2}。Nextera のライブラリー調製ポートフォリオでは、メタゲノムアプリケーションに対してより迅速でさらに効率的なライブラリー調製が可能となるようワークフローに様々な利点をもたらしてきました (図 1)。Nextera DNA Library Preparation Kit および Nextera XT DNA Library Preparation Kit の開発では、タグメンテーションケミストリーを統合し、1 回の反応で DNA の断片化およびアダプタータグ付けステップが可能となりました³。そして、Nextera DNA Flex Library Prep Kit では革新的なビーズ上のタグメンテーションによって、DNA 抽出、定量、断片化、そしてライブラリーノーマライゼーションステップを統合することで、さらにライブラリー調製ワークフローを短縮しました⁴。

NGS による全ゲノムシーケンス (WGS) は微生物研究を行うラボにスピード、精度、得られる情報量における重要な利点をもたらしましたが、DNA 抽出とライブラリー調製のステップは NGS ワークフローの重要なボトルネックとなったままでした。メタゲノム研究の NGS ライブラリー調製は時間と手間のかかる、ゲノム DNA 抽出ステップから始まるのが一般的です。メタゲノムクスにおいてこの問題に対処するために、イルミナは Nextera DNA Flex Library Preparation Kit とともに、クルードライセートから直接、素早く簡単にライブラリー調製が行えるライブラリー調製方法、Nextera Crude Lysate Protocol を提供しています。クルードライセートから直接シーケンスを行うことで、DNA 抽出ステップに関する時間と費用を削減できます。スピードと効率の向上に加え、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit では、細菌コロニーからのダイレクトサンプル、血液や唾液など、サンプルインプットの種類、細胞溶解の方法に対して優れた柔軟性を発揮します。

本アプリケーションノートでは、標品微生物コミュニティと実在のヒト糞便サンプルを用いて、Nextera Crude Lysate Protocol を用いた Nextera DNA Flex Library Prep Kit のパフォーマンスを示しています。また、新しいケミストリーと迅速なワークフローを備えた Nextera DNA Flex Library Prep Kit が、メタゲノムプロファイリングと *de novo* アセンブルにおいて、どれくらいオリジナルの Nextera DNA Library Prep Kit より優れているかを示しています*。

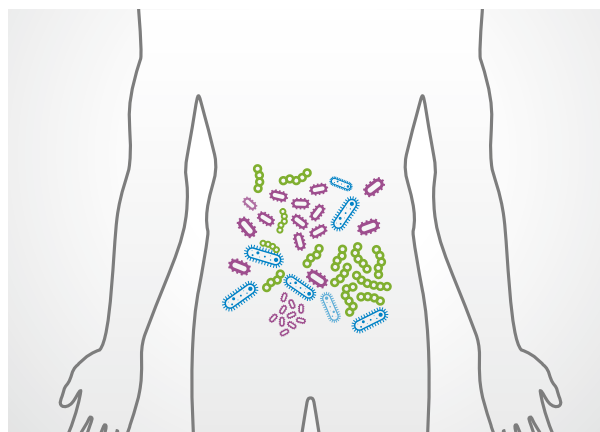


図 1: メタゲノムのための Nextera Crude Lysate Protocol Nextera DNA Flex Kit とともに Nextera Crude Lysate Protocol を用いることで、クルードライセートから直接ライブラリー調製を行うことが可能となり、データの一貫性と品質を保ったまま、余分な時間と費用を節約します。

方法

サンプル

標品微生物コミュニティの代表として、20 Strain Even Mix Genomic Material (ATCC MSA-1002)、20 Strain Staggered Mix Genomic Material (ATCC MSA-1003)、および 20 Strain Even Mix Whole Cell Material (ATCC MSA-2002) を使用しました。20 Strain Even/Staggered Mix Genomic Material は、20 の細菌株から抽出した精製 DNA の混合物で構成されており、20 Strain Even Mix Whole Cell Material は細胞 (非溶解) の混合物です。ゲノムのサイズ、GC コンテンツの割合、およびグラム染色プロファイルが得られるよう、この混合した種が選択されています。さらに、20 株を混合した微生物の全長をシーケンスし、ゲノムの特徴付けが行われています。実在するメタゲノムサンプルの代表としては、健康者及び薬剤治療中患者の両方から糞便サンプルを収集しました。

* オリジナルの Nextera DNA Library Prep Kit および Nextera XT DNA Library Prep Kit ではタグメンテーションケミストリーを使用しますが、Nextera DNA Flex Library Prep Kit では新しいビーズ上のタグメンテーションケミストリーを使用します。ビーズ上のタグメンテーションケミストリーは、オリジナルのタグメンテーションケミストリーと比較して、より均一なライブラリー産生、より一貫したインサートサイズ、そしてより均一なゲノムカバレッジをもたらします。

標品微生物コミュニティからのクルードライセートおよび DNA 抽出

クルードライセートを調製するために、PureLink Microbiome DNA Purification Kit (カタログ番号: A29790, ThermoFisher) を用いて、Nextera Crude Lysate Protocol の説明に従い、200 µl の 20 Strain Even Mix Whole Cell サンプルを処理しました。用いたキットのステップ H (ホモジネートした細胞の上清を清潔なチューブに移すステップ) からの上清をクルードライセートとして使用しました⁵。抽出 DNA の調製には、PureLink Microbiome DNA Purification Kit のプロトコールを使って、同等数の細胞を処理しました。

糞便サンプルからのクルードライセートおよび DNA 抽出

提供された患者の糞便サンプルから、Nextera Crude Lysate Protocol from Stool Samples の説明に従って、PureLink Microbiome DNA Purification Kit を使用し、クルードライセートおよび抽出 DNA を生成しました。0.05 g の糞便サンプルを PureLink Microbiome DNA Purification Kit で処理しました。用いたキットのステップ G (ホモジネートした細胞の上清を清潔なチューブに移すステップ) からの上清をクルードライセートとして使用しました⁶。抽出 DNA の調製には、PureLink Microbiome DNA Purification Kit のプロトコールを使って、同等のサンプル開始量を処理しました。糞便サンプルは、胆汁、塩分、多糖類などの PCR 阻害物が存在するため、非常に阻害性が高くなる場合があります。阻害されたライブラリー調製では洗浄ステップ中のペレット化に障害が見られたり、ライブラリー産生量が非常に低くなる場合があります。阻害性が高い一部のサンプルには推奨量より少ないライセート量に減らす必要がある場合があります。Nextera Crude Lysate Protocol はさまざまな細菌 DNA 抽出キットおよび糞便サンプル精製キットに対応しています (表 1)。

表 1: DNA 抽出およびライセート調製キット^a

細菌サンプル用キット
PureLink Microbiome DNA Purification Kit (ThermoFisher)
UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO)
ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit (ThermoFisher)
糞便サンプル用キット
PureLink Microbiome DNA purification kit (Invitrogen)
PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO)
PowerFecal DNA Isolation Kit (MOBIO)
QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen)

a. これらのキットを用いてクルードライセートを得るための推奨回収方法および可溶化方法、ならびにクルードライセートの推奨インプット量に関する詳細については、[Nextera Crude Lysate Protocol Guide](#) をダウンロードしてください。

ライブラリー調製およびシーケンス

種の同定およびメタゲノムプロファイリングから Nextera DNA Flex Library Prep Kit の精度と感度を検証するために、20 Strain Staggered Mix Genomic Material サンプルの DNA 10 ng を直接 Nextera DNA Flex Library Prep Kit (カタログ番号: 20018704, イルミナ) に加え、標準のプロトコール (DNA 抽出) を用いて調製しました。

クルードライセートと抽出 DNA のパフォーマンスを比較するために、20 Strain Even Mix Whole Cell サンプルまたは糞便サンプルから、ライセート 5 µl または抽出 DNA 5 µl を用いてシーケンスライブラリーを調製しました。ライセートおよび抽出 DNA サンプルは、Nextera Crude Lysate Protocol または標準プロトコールのいずれかを用いて、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit に用いました。Nextera Crude Lysate Protocol を用いたライブラリー調製により、ライブラリー調製ワークフローの合計時間と作業数が大幅に減少しました。(図 2)。Nextera DNA Flex Library Preparation Kit に直接インプットとしてクルードライセートを用いることで、費用と時間のかかる DNA 定量化キットの必要性もなくなりました。

Nextera DNA Flex Library Preparation Kit とオリジナルの Nextera DNA Library Preparation Kit (カタログ番号: FC-121-1030, イルミナ) を比較するために、20 Strain Even Mix Genomic Material サンプルから 50 ng の DNA、そして 20 Strain Staggered Mix Genomic Material サンプルから 50 ng の DNA をこれらのライブラリー調製キットに直接加えました。ライブラリーは標準のプロトコールを用いて調製しました。

すべてのライブラリーは、NextSeq 500/550 High Output v2 Kit (カタログ番号: FC-404-2004, イルミナ) を用いて、2 × 150 bp のペアエンドリードのランを設定し、NextSeq™ 550 シーケンサーシステム (カタログ番号: SY-415-1002) でシーケンスを実施しました。



図 2: DNA 抽出とクルードライセートのワークフローの比較 Nextera Crude Lysate Protocol ではライブラリー調製プロトコールにおける合計時間と作業数を削減します。クルードライセートプロトコールは精製と定量のステップに関する時間と費用も削減します。ワークフロー時間は、具体的な方法として DNA 抽出 (PureLink Microbiome DNA Purification Kit)、DNA 定量 (Qubit) を仮定として算出しました。時間は使用機器、使用キット、サンプルバッチ番号、機械処理、およびユーザーの経験によって異なる場合があります。

データ解析

真陽性、相対存在量、偽陽性、実測存在量、および予測存在量などのメタゲノムプロファイリングのパラメーターは、One Codex⁷ プラットフォーム上で計算しました。ゲノムアセンブリ棒グラフを2つのソフトウェアツールで作成しました。

First MEGAHIT v1.1.1.⁸ では FASTQ リードから *de novo* アライメントを実施してコンティグを生成し、そのコンティグを既知のリファレンスゲノムを使って、Quality Assessment Tool for Genome Assemblies (QUAST)⁹ で評価しました。メタゲノムプロファイリングの積み重ね棒グラフは CosmolID Metagenomics ソフトウェアで統合しました¹⁰。CosmolID Metagenomics ソフトウェアは、イルミナのゲノムコンピューティングプラットフォームの BaseSpace™ Sequence Hub でアクセスすることができます。

結果

標品コミュニティ混合物と糞便サンプルを用いたメタゲノムプロファイリング

微生物の同定における Nextera DNA Flex Library Prep Kit の精度および感度を確認するために、20 Strain Staggered Mix サンプルからシーケンスライブラリーを調製しました。結果は、20 Strain Staggered Mix の全 20 種の微生物を偽陽性なく同定し、優れたメタゲノムプロファイリングのパフォーマンスを示しました (表 2)。20 Strain Staggered Mix による構成統計量でも、全 20 種に対する実測存在量スコアは予測存在量スコアにほぼ一致する高い精度となりました (表 3)。さらに、実測存在量スコアは 4 桁に及び、サンプル中の 0.018% の低い存在割合の種を検出することが可能であり、このことから Nextera DNA Flex シーケンスワークフローの高い感度が示されます。

表 2: 20 Strain Staggered Mix のメタゲノムプロファイリングの要約統計量^{a, b}

ライブラリー	真陽性	相対存在量	偽陽性
20 Strain Staggered Mix および Nextera DNA Flex Library Prep Kit	100%	100%	0

a. One Codex は次のように統計量を規定します：**真陽性**: コントロールに存在する微生物の割合。真の存在量の 2 ログ以内で微生物が検出された場合、それらの微生物を「Present (存在)」としてマークします。**相対存在量**: 既知のインプット微生物の存在量と検出した微生物の存在量に関するピアソンの相関係数 (リードカウントで調節したゲノムサイズに基づく)。**偽陽性**: 100% の陽性率から各偽陽性の存在量、「高」、「中程度」、「低」に応じてそれぞれ 10%、5%、1% ポイントを引いたもの。「Trace (トレース)」した偽陽性はそのスコアには数えないため、最小の偽陽性率は 0% になります。

b. 2000 万リードから 100 万リードのダウンサンプルしたデータセットを表示しています。

表 3: 20 Strain Staggered Mix のメタゲノムプロファイリングの構成統計量

微生物名	実測量	予測存在量
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	19.07%	18.00%
<i>Escherichia coli</i>	18.54%	18.00%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18.26%	18.00%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	17.17%	18.00%
<i>Streptococcus mutans</i>	17.61%	18.00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.93%	1.80%
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.80%	1.80%
<i>Bacillus cereus</i>	1.15%	1.80%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.64%	1.80%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.77%	1.80%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.18%	0.18%
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.21%	0.18%
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.21%	0.18%
<i>Lactobacillus gasserii</i>	0.19%	0.18%
<i>Helicobacter pylori</i>	0.19%	0.18%
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0.015%	0.018%
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.021%	0.018%
<i>Deinococcus radiodurans</i>	0.017%	0.018%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0.013%	0.018%
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0.007%	0.018%

標品微生物コミュニティを用いた Nextera DNA Flex Crude Lysate Protocol と標準プロトコールの比較

Nextera Crude Lysate Protocol と標準プロトコールのパフォーマンスを比較するために、20 Strain Even Mix Whole Cell Material サンプルからのクルードライセートおよび抽出 DNA を用いてシーケンスライブラリーを調製しました。クルードライセートおよび抽出 DNA から作製したライブラリーは同等のメタゲノムプロファイリングの要約統計量を生成しました (表 4)。

表 4: クルードライセートおよび抽出 DNA からのメタゲノムプロファイリングの要約データの比較

ライブラリー	真存在量	相対陽性	偽陽性
クルードライセート	100%	33%	0
抽出 DNA	100%	32%	0

a. 2000 万リードから 500 万リードのダウンサンプルしたデータセットを表示しています。

クルードライセートおよび抽出 DNA の同じデータセットを用いて、*de novo* ゲノムアセンブルの品質についても比較し、アセンブルしたゲノム断片の割合を QUAST で算出しました。一般的に、高い割合でアセンブルされたゲノム断片は高品質なゲノムアセンブリを示します。解析した全 20 種の微生物について、クルードライセートおよび抽出 DNA のライブラリーでは非常によく似たゲノムアセンブリの結果が生成されました。(図 3)。

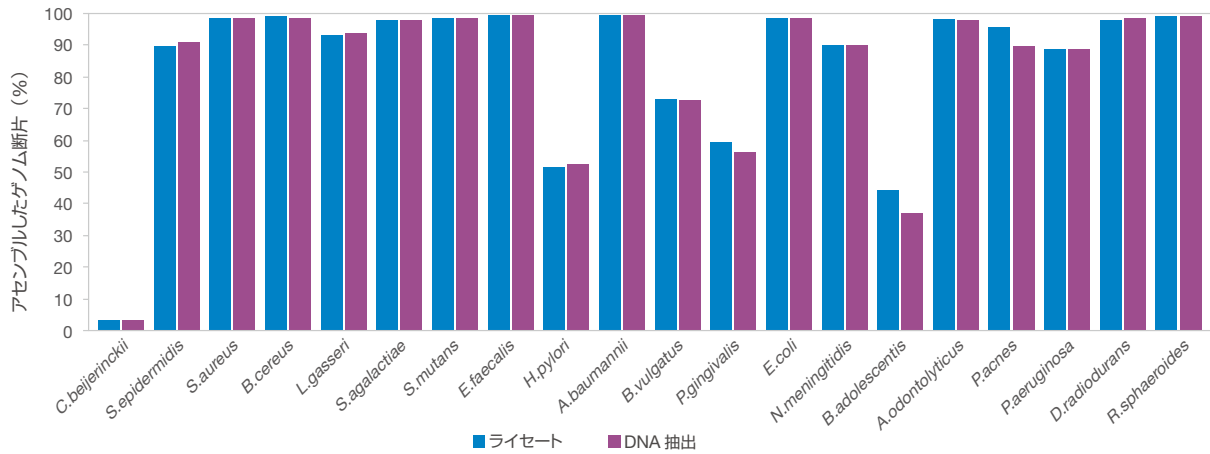


図 3：クルードライセートおよび抽出 DNA のゲノムアセンブリの比較 アセンブリは、150 bp ペアエンド、500 万リードを用いて、MEGAHIT で実施しました。棒グラフは QUAST によってレポートされたもので、20 種の微生物のゲノムアセンブリのパフォーマンスを示しています。

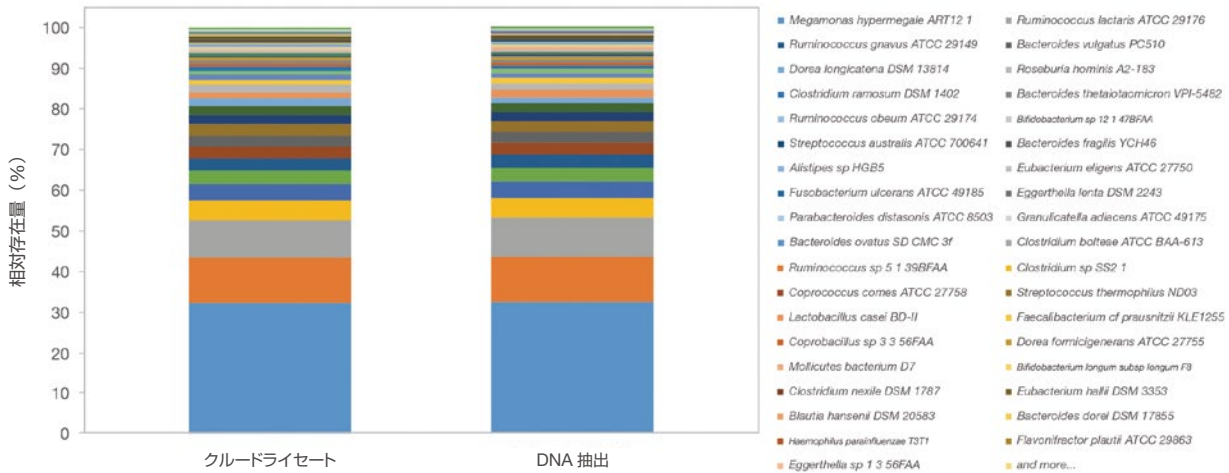


図 4：クルードライセートおよび抽出 DNA のメタゲノムプロファイルの比較 棒グラフは、2 つの方法を用いて調製した糞便ライブラリーで同定された 60 以上の微生物について、CosmosID メタゲノム解析 (150 bp ペアエンド、300 万リード) によって同定した各微生物の存在量を示しています。

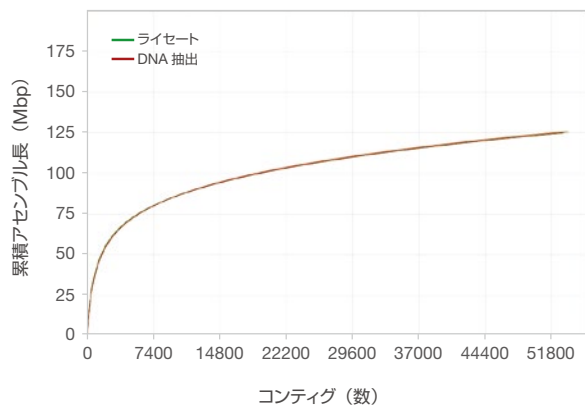


図 5：未知の種のクルードライセートおよび抽出 DNA のゲノムアセンブリの比較 グラフは、最大から最小の順に並べたコンティグによる累積アセンブル長 (Mbp) を示しています。2000 万リードをアセンブリに用いました。

糞便サンプルを用いた Nextera DNA Flex Crude Lysate Protocol と標準プロトコールの比較

Nextera Crude Lysate Protocol および 標準 Nextera DNA Flex Library Prep プロトコールから得られたメタゲノムプロファイルは、高い阻害性のある、困難な糞便サンプルであっても非常に類似した結果となっています (図 4)。標品微生物コミュニティサンプルと異なり、糞便サンプルは未知の種が混合し未知の種で構成されます (各微生物種の割合)。未知の種によるメタゲノムサンプルの *de novo* アセンブルについて、累積アセンブル長をゲノムアセンブルの品質評価のために用いることができます。QUAST を用いたアセンブリより、累積アセンブル長は、糞便サンプルから Nextera Crude Lysate Protocol で調製したライブラリーと標準の Nextera DNA Flex Library Prep プロトコールで調製したライブラリー間で非常に類似していることが示されました (図 5)。

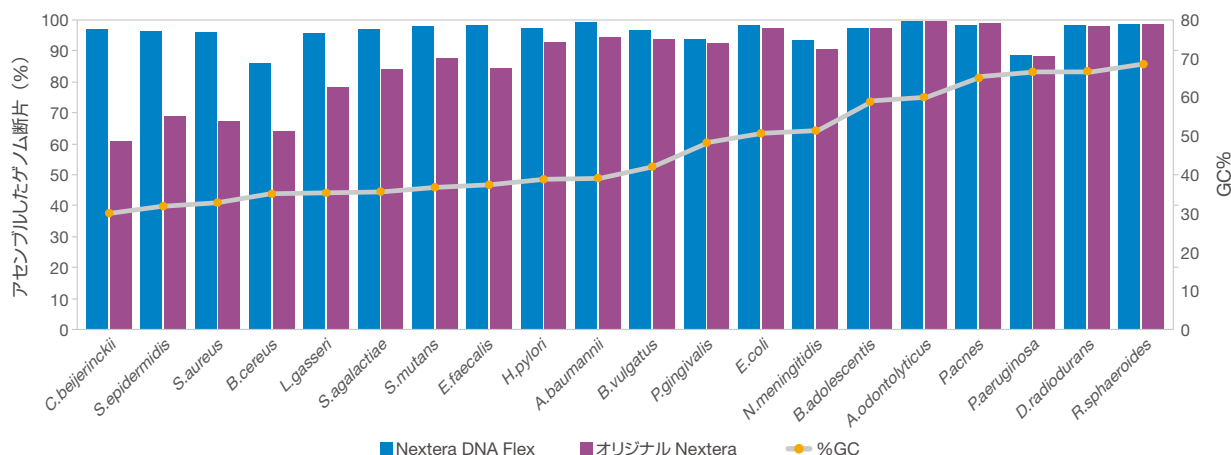


図 6：Nextera DNA Flex とオリジナルの Nextera ゲノムアセンブリメトリクスと比較 棒グラフは全 20 種の生物種について MEGAHIT（150 bp ペアエンド、200 万リードを使用）によってアセンブルしたゲノム断片を示しています。微生物は左から右へ GC% の増加順に表示されています。

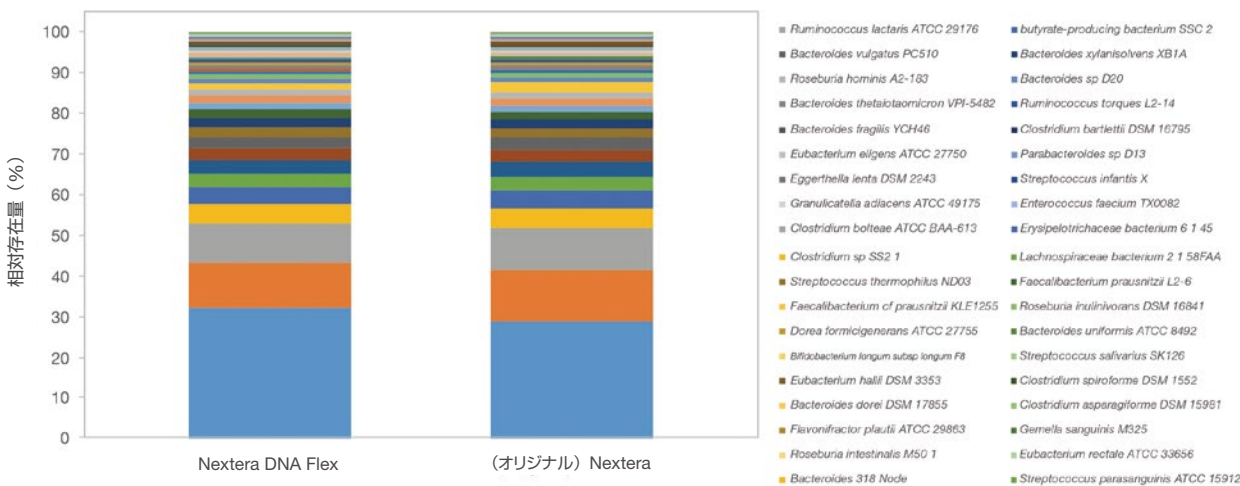


図 7：Nextera DNA Flex およびオリジナルの Nextera DNA のメタゲノミクスプロファイルの比較 棒グラフは、両方の方法で調製したライブラリーで同定された 60 以上の微生物について、CosmosID メタゲノム解析（150 bp ペアエンド、300 万リードリードを解析に使用）によって同定した、各微生物の存在量を示しています。

メタゲノムプロファイリングにおける、Nextera DNA Flex のオリジナルの Nextera DNA Library Prep Kit に対する優位性

Nextera DNA Flex Library Preparation Kit とオリジナルの Nextera DNA Library Preparation Kit のプロファイリングパフォーマンスの比較には、20 Strain Even Mix Genomic Material サンプルおよび 20 Strain Staggered Mix Genomic Material サンプルから調製したライブラリーを用いました。要約パラメーターは One Codex プラットフォームで計算し、その結果は Nextera DNA Flex Library Prep Kit が、オリジナルの Nextera DNA Library Prep Kit と比べて向上したメタゲノムプロファイリング結果となっています（表 5）。Nextera DNA Library Prep Kit および Nextera XT DNA Library Prep Kit と異なり、Nextera DNA Flex Library Prep Kit は新しいビーズ上のタグメンテーションを用いるため、均一なライブラリー産生、一貫性のあるインサートサイズ、そして均一なゲノムカバレッジが得られます。これらの利点が共に作用することで、向上したメタゲノムプロファイリングを産生します。

Nextera DNA Flex はオリジナルの Nextera DNA Library Prep Kit より優れたゲノムアセンブリを行うことが可能

微生物の検出およびメタゲノムプロファイリングの評価以外に、ゲノムアセンブリパラメーターを比較するためにシーケンスデータを解析しました。ゲノムアセンブリ品質を評価するために、ゲノム断片アセンブリパラメーターを QUAST によって算出しました。QUAST データより、Nextera DNA Flex は、20 Strain Even Mix Whole Cell Material サンプルの 20 種の微生物の大半、特に AT リッチな微生物について、オリジナルの Nextera DNA Kit よりも優れていたことを示しています（図 6）。

実在するメタゲノムサンプルを用いて、Nextera DNA Flex Library Prep Kit と（オリジナルの）Nextera DNA Library Prep Kit を比較してパフォーマンスを調べるために、糞便サンプルからのクールドライセートおよび抽出 DNA サンプルのライブラリーを調製しました。2 つのライブラリー調製キットから得られたメタゲノムプロファイリングの結果は非常に類似しており、このことから両方のキットは優れた同等のプロファイル結果をもたらすことが示されます（図 7）。

表 5 : Nextera DNA Flex Library Prep および オリジナル Nextera DNA Library Prep の メタゲノムプロファイリングの要約データの比較

	真陽性	相対存在量	偽陽性
20 Strain Even Mix Genomic Material			
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (50 ng)	100%	97%	0
Nextera DNA Library Prep Kit (50 ng)	100%	83%	0
20 Strain Staggered Mix Genomic Material			
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (50 ng)	100%	100%	0
Nextera DNA Library Prep Kit (50 ng)	100%	96%	0

まとめ

Nextera DNA Flex Library Prep Kit とともに Nextera Crude Lysate Protocol を用いることで迅速かつ簡単なワークフローが実現し、費用と時間のかかる DNA 抽出ステップを削減し、他に類を見ないデータ品質が得られます。Nextera Crude Lysate Protocol では、微生物検出およびメタゲノムプロファイリング、ならびに高品質な *de novo* ゲノムアセンブリに対して、DNA を抽出する方法と比較し、高い感度と精度が得られます。Nextera DNA Flex Library Prep Kit は、Nextera Crude Lysate Protocol を用いた糞便サンプルまたは標品微生物コミュニティサンプル、並びに追加で示したプロトコールを用いた唾液、血液、細菌コロニーからのダイレクトサンプルなどの複雑なメタゲノムの混合物に対応するための能力を備え、NGS ベースのメタゲノム研究に柔軟性と費用効率の良い方法を提供します。

詳細はこちらから

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

Nextera DNA Flex による細菌コロニーのダイレクトシーケンスに関する詳細は、www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/nextera-dna-flex-direct-colony-app-note-770-2017-036.pdf をダウンロードしてください。

Nextera DNA Flex による微生物ゲノムシーケンスの詳細は、www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/nextera-dna-flex-small-genomes-application-note-770-2017-019.pdf をご覧ください。

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

製品情報

製品名	カタログ番号
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (24 Samples)	20018704
Nextera DNA Flex Library Prep Kit (96 Samples)	20018705
Nextera DNA CD Indexes (24 Indexes, 24 Samples)	20018707
Nextera DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	20018708

CD Indexes : Dual Index の組み合わせ。最大 24 サンプルに対応するために提供される 24 のデュアルインデックスまたは、最大 96 サンプルに対応するために提供される 96 のデュアルインデックス。

Single Indexes : 最大 96 サンプルに対応するために提供される 24 のシングルインデックス。

参考文献

- Ranjan R, Asha RA, Metwally A, McGee HS, Perkins DL. [Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing.](#) *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;469:967–977.
- Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. [Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project.](#) *Nature.* 2017;550:61-66.
- Illumina (2016). [Nextera DNA Library Preparation Kit Data Sheet.](#) Accessed April 10, 2018.
- Illumina (2017). [Nextera DNA Flex Library Preparation Kit Data Sheet.](#) Accessed April 10, 2018.
- Invitrogen (2015). [PureLink Microbiome DNA Purification Kit User Guide for Microbial Culture.](#) Accessed April 12, 2018.
- Invitrogen (2015). [PureLink Microbiome DNA Purification Kit User Guide for Stool Samples.](#) Accessed April 12, 2018.
- One Codex platform. www.onecodex.com. Accessed April 12, 2018.
- MEGAHIT v1.1.1. github.com/voutcn/MEGAHIT. Accessed April 12, 2018.
- QUAST. quast.sourceforge.net/quast.html. Accessed April 13, 2018.
- CosmosID Metagenomics. www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/cosmosid-CosmosID-metagenomics-know-now.html. Accessed April 12, 2018.

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

© 2018 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。

Pub. No. 770-2018-006-A-JPN QB 6391 14DEC2018

illumina[®]