Nextera® カスタム濃縮キット

カスタムプローブのデザイン、迅速なサンプル調製、特異性の高いターゲット濃縮
全てを1つにまとめたシンプルな製品キット

特　長

- **短時間で終了するNexteraサンプル調製**
  機械的なDNA断片化不要で3時間以内のライブラリー調製
- **End-to-Endの濃縮プロトコール**
  500kbから25Mbをターゲットに、最も効率が良いサンプル調製およびカスタム濃縮
- **少ないDNAスタート量**
  わずか50ngのDNAからサンプル調製可能で卓越した品質のデータを産出

図1：Nextera カスタム濃縮キット

フルカスタマイズ可能な、End-to-Endのターゲットリシーケンスソリューション。プーリングしたサンプルからカスタム濃縮およびライブラリー調製を行えます。

はじめに

Nextera カスタム濃縮キットは、サンプル調製に必要な試薬を全て備え、ターゲット領域を自由に選択できる濃縮ソリューションです（図1）。本キットをお使いいただくと、DNAを機械的に断片化する必要がなく、3時間以内にサンプル調製を行うことができます。また、濃縮済みのライブラリーが完成するまでに要する時間はわずか2.5日です。革新的なNexteraテクノロジーをベースとしており、50ngのDNAから短時間でサンプルライブラリーを作製できます。DNA量が極めて少ないサンプルからも簡単にシーケンスおよびターゲット濃縮を行い、優れた品質のデータを得られるようになりました。本製品は、イルミナのシーケンステクノロジーのために開発および最適化された、End-to-Endのソリューションです。新規変異の発見および検証、またはパスウェイにおける特定遺伝子の研究に向け、ゲノムの特定のサブセットをシーケンスする実験において、最も迅速で最も簡潔な手法となります。

簡単なプローブデザイン

カスタム濃縮の実験を始めるには、まずDesignStudio™を使い、ご興味のあるターゲットのパネルを作製してください。DesignStudio™は無料でご使用いただけるシンプルなオンラインツールで、最大のターゲットカバレッジを得るための最適なプローブデザインをご提供します（図2）。お客様のアカウントよりログインしていただき、プロジェクト名を入力、リファレンスとなるゲノムビルドを選択した後、遺伝子の位置情報あるいは遺伝子名を入力（個別に入力またはバッチでアップロード）し、最後にプローブデザインのオプションを、エクソンのみまたはゲノム全域から選択できます。キャプチャー用プローブのデザインが自動で行われます。プローブデザインに用いられるアルゴリズムは、GC含量、特異性、プローブ間隔、カバレッジを含むさまざまなパラメーターを考慮します。候補として上がってきたプローブは可視化され、サクセススコアにより評価されます。プローブデザインの成功率は通常95%以上ですが、これは配列に左右されます。配列の相同性やGC含量といった条件により、デザインの成功率は上下します。

ユーザーがデザインしたプローブのフィルタリング、デザインへのプローブの追加、削除を行うことができます。可視化およびQC後、カスタムプローブライブラリーは最終的なデザインに追加されます。全ての情報は保存が可能で、再デザインまたは新しいプロジェクトへコピーすることもできます。DesignStudioのご使用にあたってはMyIlluminaアカウントが必要となります。アカウントの登録はhttps://icom.illumina.com/Account/Registerで行っていただけます。

効率的なワークフロー

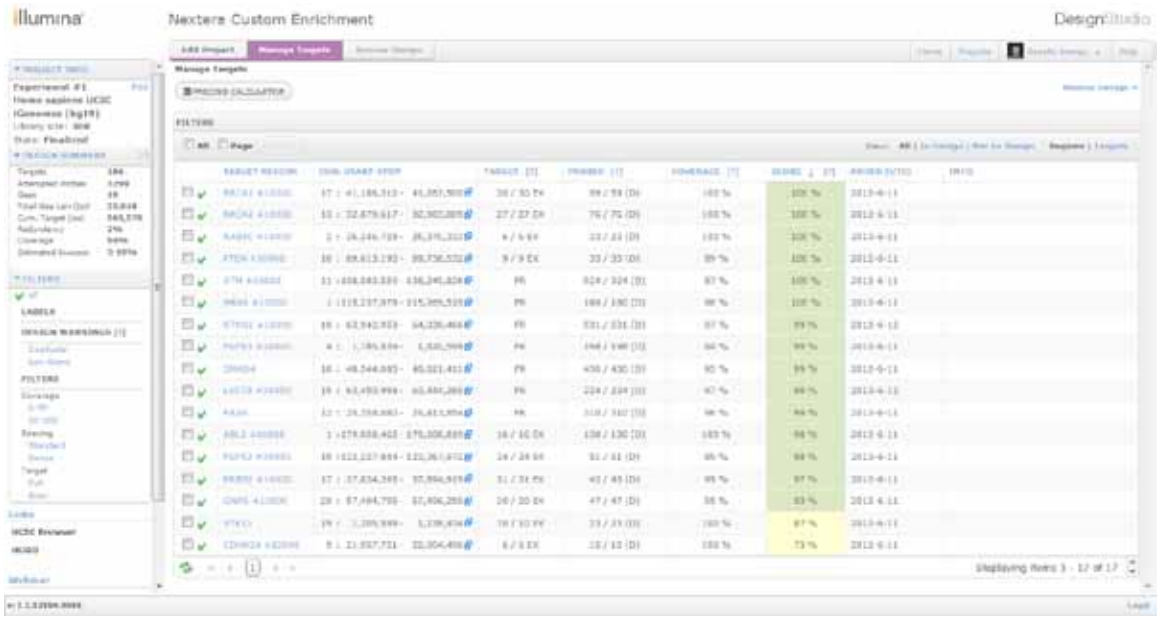
高速なNexteraサンプルライブラリー調製テクノロジーの活用、濃縮前に12プレックスのサンプルプーリングを行うユニークな手法の採用により、Nextera カスタム濃縮キットではハンズオンタイムが短縮され、対費用効果に優れると同時にハイスループットなワークフローを実現しました。このワークフローは、現在利用可能な他の濃縮方法に比べ、所用時間が1日以上も短いものとなっています（図3）。試薬はマスターミックスとなっており、プレートフォーマットで一度に8濃縮反応（96サンプル）まで操作できます。また、反応液の容量はリキッドハンドリングロボットに適したものとなっており、より高いスループットのための自動化にも容易に対応できます。

サンプル調製

サンプル調製のワークフローは、革新的なNexteraライブラリー調製テクノロジーから始まります。1ステップの「タグメンテーション」酵素反応において、サンプルDNAのフラグメンテーションおよびアダプターの付加が同時に行われます。最適化され、サイクル数を抑えられたPCRプロトコールにより、タグの付いたDNAが増幅され、シーケンス用のインデックスが付加されます。開始から終了まで、Nexteraのプロトコールにかかる時間は他のサンプル調製方法に比べ80%以上高速なものとなっており、ハンズオンタイムも最短です。

Nextera カスタム濃縮キットは、濃縮の前に12サンプルまで同時にプールできるという革新的なソリューションをご提供します。サンプル調製の段階で、個々のゲノムDNAフラグメントにはユニークな組み合わせのインデックスが2つ付加されてお

図2：カスタムプローブ設計のためのDesignStudio



DesignStudioの「Manage Targets」画面。「Target Region」を表示しています。ゲノムのターゲット領域およびプローブを容易に可視化し、カバレッジとスコアの推定も容易に行えます。プロジェクト全体の「Design Summary」マトリックスは、プロジェクトの情報、ユーザー定義によるラベルと共に、左側のサイドバーに表示されています。このラベルは、デザインを行っている際、データをソートするのに便利です。

り、これはシーケンス後、データのジマルチプレックスに使用されます。インデックスが付加されたサンプルライブラリーは濃縮の前にプールされます。

ライブラリーの濃縮

濃縮の過程では、プールしたライブラリーを一本鎖のDNAに変性した後、ターゲット領域に特異的な、ビオチン標識されたカスタムオリゴヌクレオチドキャプチャープローブとハイブリダイズさせます。次に、ストレプトアビジンビーズを加えビオチン標識プローブと結合させます。ビオチン標識されたDNAフラグメントはストレプトアビジンビーズに結合し、反応液中で磁石により集められます。濃縮されたDNAフラグメントをビーズから溶離し、再ハイブリダイズ後に2回目の濃縮反応を行います。濃縮された領域の増幅を行った後、クラスター形成およびシーケンス用のターゲットライブラリーが完成します。

データ解析

カスタム濃縮サンプルのシーケンスデータからは2種類の統計値が算出されます：アライメント解析の後およびCASAVA（Consensus Assessment of Sequence and Variation）解析の後です。アライメント後の解析では、任意のターゲット領域とオーバーラップするリードをカウントし、各々のリードがターゲット領域内に収まっているかを判定します。CASAVA解析後は、領域内の塩基ごとにカバレッジを計算します。データはGenomeStudio® Data Analysis Softwareで可視化することができ、サンプルのオンターゲットおよびオフターゲットのカバレッジを確認できます。

卓越したデータ品質

Nexteraカスタム濃縮により、複数のサンプルがプールされたライブラリーから、確実なシーケンスデータが得られます。図4に、およそ約6,000種のオリゴを用いて1Mbをターゲットとしたカスタムパネルの実験結果を示します。各サンプルのターゲット領域は高度に均一なカバレッジでシーケンスされ、平均リードカバレッジ0.2×では80%を超す塩基がカバーされました。Nexteraの濃縮プロトコールは、ターゲット領域に対する特異性にも優れています。12サンプルの実験では、ジマルチプレックス後のサンプルライブラリーは、全てのサンプルにおいて80%を超すターゲット濃縮率を示しました（図5）。

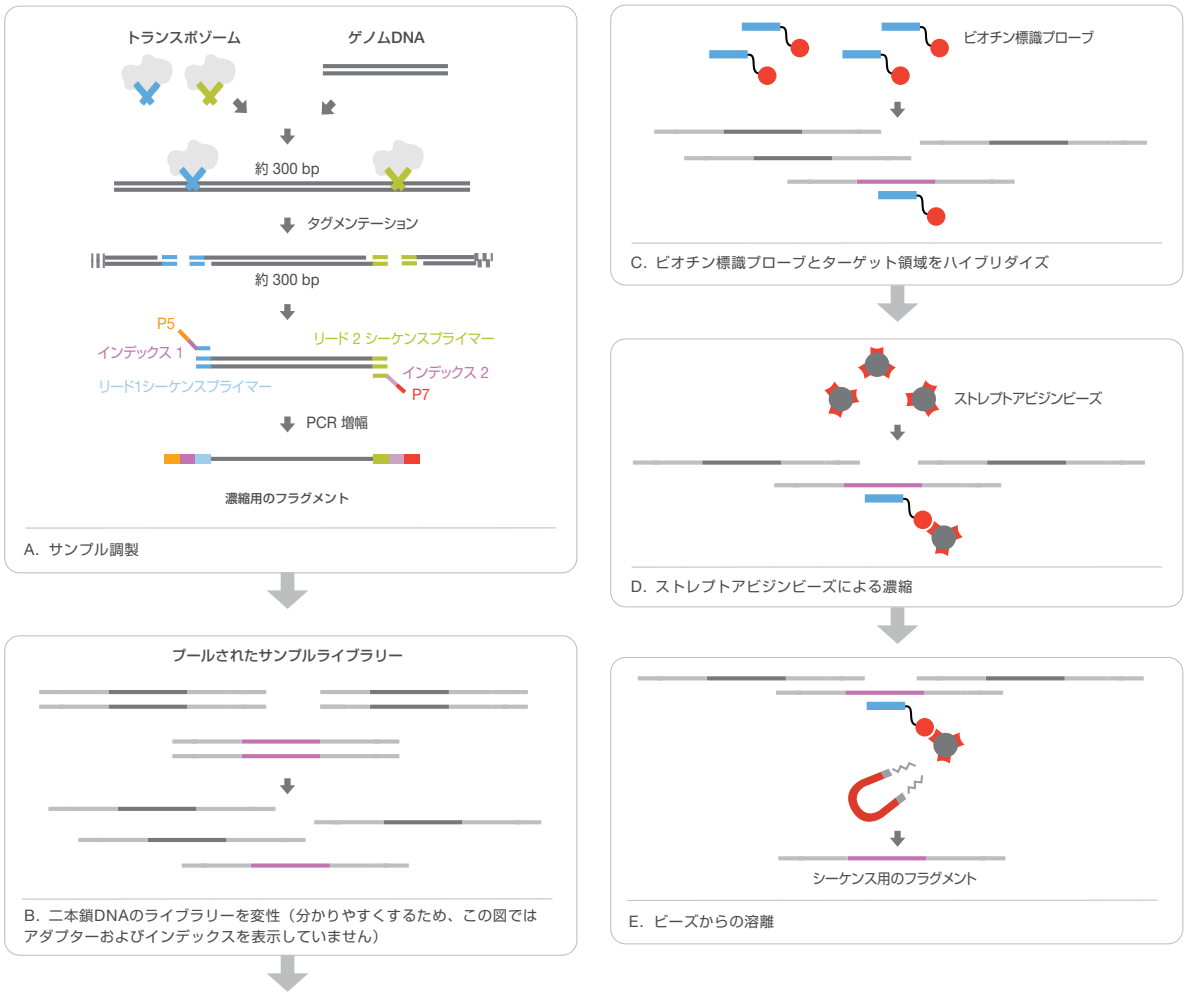
ターゲットリシーケンスのパワーを最大限に引き出す

ターゲットリシーケンス実験の効率を最大に上げるため、そして高感度で変異を検出するのに充分なカバレッジを確実に得るためには、以下の3点を考慮に入れる必要があります：

1. ターゲット領域の長さの総計、つまりターゲット配列の総塩基数
2. 濃縮効率（パスフィルターかつターゲット領域にマップされるリードの割合）
3. ターゲット領域におけるカバレッジの分布

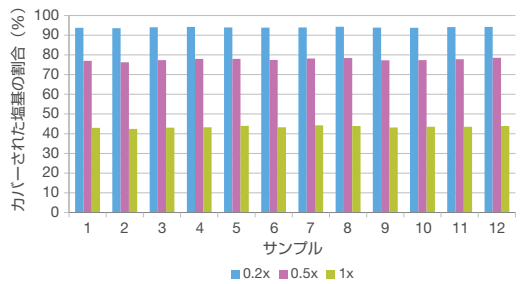
上記の主要なパラメーターに加え、全てのターゲットシーケンス実験を最適化するためには、シーケンスの総量および平均カバレッジを事前に計算する必要があります。その手法については、Optimizing Coverage for Targeted Resequencing Technical Note[1]に詳しく記述してあります。

図3：Nexteraカスタム濃縮ワークフロー



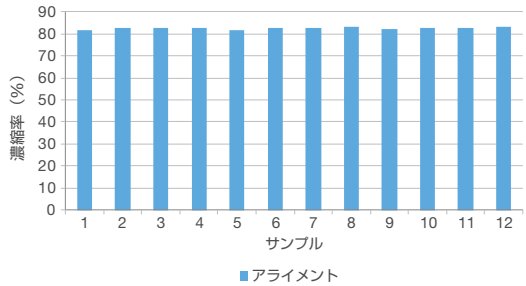
Nextera カスタム濃縮キットは、研究対象となるターゲット領域を シンプルかつ効率的に分離･濃縮する、ソリューションを提供します。

図4：高い均一性を誇るカバレッジ



12サンプル間のカバレッジ均一性。1Mbのターゲット領域において、様々な正規化後平均リードカバレッジに対する、塩基のカバー率を示します。Nextera カスタム濃縮キットを用い、12サンプルを調製し同時に濃縮しました。プールしたサンプルは、HiSeq®のフローセル1レーンを使ってシーケンスされ、平均のリードカバレッジは128～158×でした（サンプルによって数値は異なります）。平均カバレッジ0.2×の時、80%を超える塩基がカバーされました。

図5：高いターゲット特異性



濃縮率は、1回のシーケンスランで生成された（サンプル毎の）総リード数のうち、ターゲット領域にマッピングされたリード数の割合により定義されます。ここに示した12サンプルはNextera カスタム濃縮キットによって調製および濃縮を行い、Genome Analyzer IIxでシーケンスを行いました。プールした12サンプルの全てにおいて、80%を超す濃縮が達成されました。

まとめ

Nextera カスタム濃縮キットは、ターゲットリシーケンスの比類なきスピードと簡潔さをもたらします。わずか50ngのDNAからスタートし、3時間以内にサンプル調製を終わらせ、一度に96サンプルの濃縮を2.5日間で完了することができます。ターゲット領域を濃縮するためのカスタムプローブは、使いやすいDesignStudioを使ってデザインおよび注文ができます。DesignStudioは、直観的に操作を行えるオンラインツールで、ステップごとにガイダンスが表示されます。本製品の卓越したパフォーマンス、信頼できる高品質なデータは、お客様にご満足していただけるものと確信しております。

追加情報

ターゲットリシーケンスに関するソリューションについて、詳しい情報は弊社ウェブサイト www.illuminakk.co.jp/applications/sequencing/targeted_resequencing.ilmnをご覧ください。

参考文献

1. Optimizing Coverage for Targeted Resequencing Technical Note.

Nextera カスタム濃縮 詳細

濃縮効率*	> 55～60%（ターゲット上） > 60～65% (±150bp)
カバレッジ均一性（平均0.2×）*	> 80%
ターゲットサイズ	500kbから25Mb
オリゴ数	2,500～67,200
濃縮前にプールできるサンプル数	最大12
ライブラリースタート量	50ng
ライブラリーサイズ	250～450bp

* カスタムデザインのため、ターゲット値はデザインにより変わります。

製品情報

製品名	説明	カタログ番号
Custom Oligo Set	対象となるターゲット領域に対してデザインされたカスタムオリゴ	FC-121-0200
Nextera Custom Enrichment Kit (48 samples)	12プレックスで、48サンプルを調製・濃縮するための試薬を含みます。24種類のインデックス組み合わせをサポートするデュアルインデックス14種類を含みます。	FC-121-1204
Nextera Custom Enrichment Kit (96 samples)	12プレックスで、96サンプルを調製・濃縮するための試薬を含みます。24種類のインデックス組み合わせをサポートするデュアルインデックス14種類を含みます。	FC-123-1208
Nextera Custom Enrichment Kit (288 samples)	12プレックスで、288サンプルを調製・濃縮するための試薬を含みます。96種類のインデックス組み合わせをサポートするデュアルインデックス20種類を含みます。	FC-123-1224

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
www.illuminakk.co.jp

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, 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。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 770-2012-J015 23SEP2012