illumina®

Nextera® メイトペアサンプル調製キット

De novoシーケンスおよび構造変異検出を可能にする、インサートサイズの長いライブラリー作製に最適なサンプル調製キット

特　長

- **迅速かつ簡便なメイトペアサンプル調製**
  DNAからライブラリー作製まで2日以内、簡便なタグメンテーション反応の利用と少ないDNAスタート量
- **2つのプロトコールをサポート**
  ゲルフリーおよびゲルありのプロトコールにより、*de novo* アセンブリおよび構造変異検出を含む幅広いアプリケーションに対応
- **優れたデータ品質**
  多様性に富むライブラリーで、最大のデータ量を産出
- **メイトペアのトータルソリューション**
  使いやすくまとめられたキットには、効率良くメイトペアを調製するための試薬およびインデックスをパッケージ

はじめに

メイトペアシーケンスでは、インサートの長いペアエンドライブラリーが必要です。Nexteraメイトペアサンプル調製キットはゲルフリーおよびゲルありのプロトコールを用意しており、多様なアプリケーションおよびDNAスタート量に対応できます。少ないDNAスタート量でできるゲルフリーの頑健なプロトコールは、多様性に富んだライブラリーの作製と、より深いカバレッジのシーケンスが可能になります。サイズ選択のステップを含むゲルありのプロトコールは、サイズ分布が狭いフラグメントを生成できるので、構造変異検出に向いています。ゲルありのプロトコールで調製したライブラリーでは、より長いリピート領域のシーケンス情報を得ることができ、*de novo* ゲノムアセンブリを可能にします。

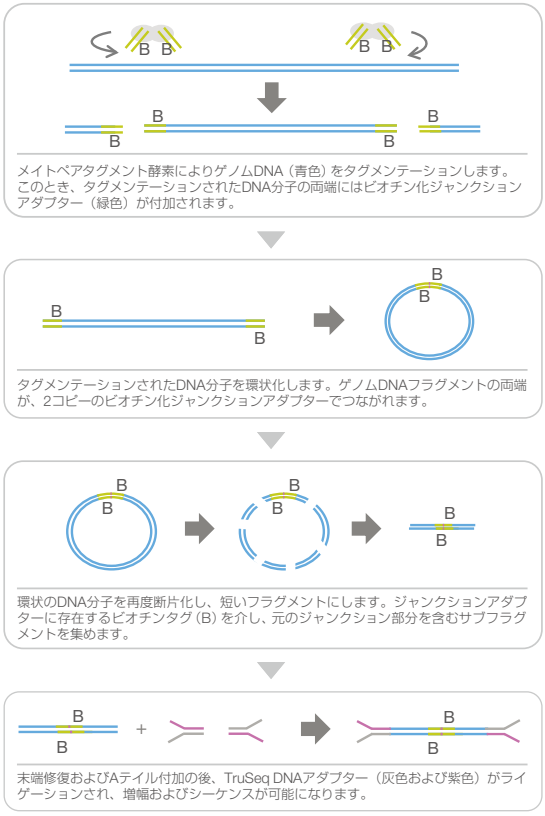
簡便なメイトペアワークフロー

Nexteraメイトペアのプロトコールは、簡便なワークフロー（図1）で、シーケンス可能なライブラリーを2日以内で調製できます。キットに含まれているTruSeq DNAサンプル調製の試薬はマスターミックスになっているため、アッセイのステップ数が減り、結果としてハンズオンタイムはわずか3時間に短縮されました。Nexteraの「タグメンテーション」反応は、特別に開発されたトランスポソームであるメイトペアタグメント酵素を用い、サンプルDNAの断片化およびタグ付けを同時に行います。簡素化されたこの手法では、断片化が起こったDNAの部位のみがビオチン化され、問題となる内側領域のビオチン化は起こりません。

2つのプロトコールをサポート

Nexteraメイトペアサンプル調製は、2つの異なるサイズ選択オプションがあります（表1）。

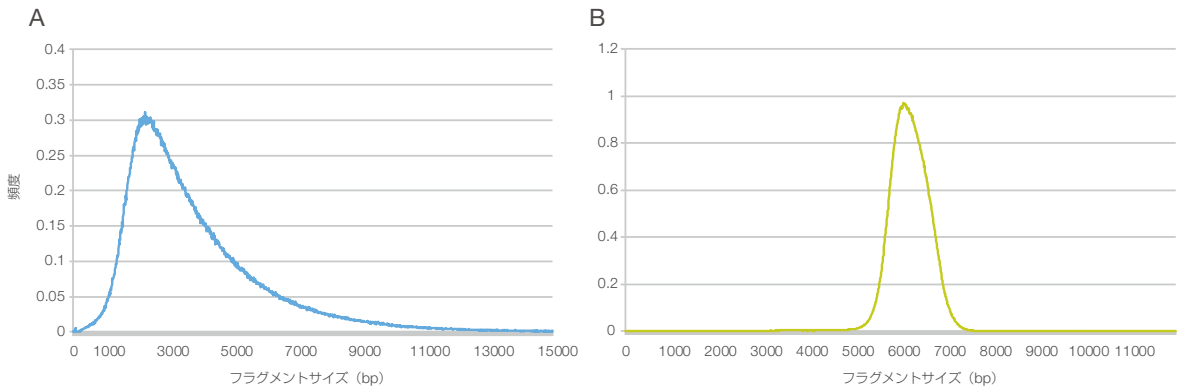
図1：Nextera メイトペアワークフロー



Nexteraメイトペアサンプル調製キットの簡便なワークフローは、ライブラリー調製を2日以内に行うことができ、2～15Kbのフラグメントを作製できます。

ゲルフリーのプロトコールのDNAスタート量はわずか1μgで、広範なサイズのフラグメントを有する、多様性に富んだメイトペアライブラリーを作製できます（図2A）。このプロトコールは、ゲノムサイズの小さい微生物ゲノムのルーチンな*de novo* アセンブリ、またはDNA量に限りのあるサンプルから安定したメイトペアデータを作製するのに最適です。ゲルフリーのプロトコールは、より迅速で簡潔なオプションを提供し、必要とするスタート量が少ないため、メイトペア解析を効率的におこなえます。ゲルありのプロトコールは必要とするスタート量が4μgで、汎用的なアガロースゲルまたはSAGE社のPippin Prepゲル[1]が必要ですが、より厳密なサイズ選択が可能です。ゲルありのプロトコールで調製したライブラリーは、サイズ分布が狭いため、構造変異の検出を容易にします（図2Bおよび3）。フラグメントのサイズをより厳密にコントロールできる点から、複雑なゲノムの*de novo*アセンブリおよび構造変異検出といった、より高度なメイトペアアプリケーションに最適です。

図2：2つのプロトコールにおけるフラグメントサイズの分布の比較



パネルAは、Nexteraメイトペアプロトコール（ゲルフリー）を用いて調製した大腸菌メイトペアライブラリーのフラグメントサイズ分布です。サイズが広範囲に広がっています。パネルBは、ゲルありのプロトコールで自動化装置Pippin Prepによるサイズ選択を行って調製した大腸菌メイトペアライブラリーのフラグメントサイズ分布です。

多様性に富んだライブラリー

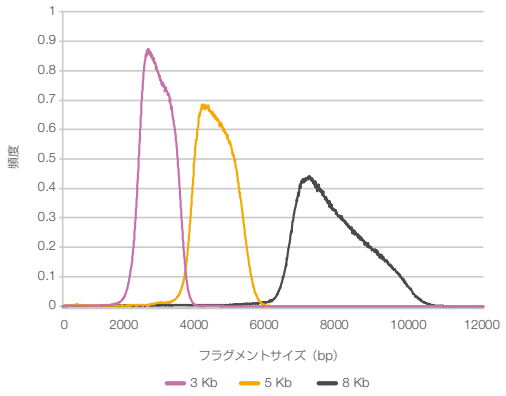
Nexteraのタグメンテーション反応では、多様性に富むライブラリー（表2）を作製し、作製されたライブラリーはイルミナの全シーケンサーで使用できます。ライブラリーの多様性は、あるライブラリー中に存在する重複しないフラグメントの数として定義されます。Nexteraのメイトペアプロトコールでは、何百万もの重複しないフラグメントを作製することができるため、ライブラリーの多様性を高まり、その結果重複しているリードを減らし、データ産出量を増やします。

また、Nexteraメイトペアサンプル調製キットでは、識別可能なジャンクション配列でフラグメントの末端を標識しているため、バイオインフォマティクスにおける解析が大幅に軽減されます。検出可能なジャンクション配列が存在することで、フラグメントを正確に検出でき、より長いリード長のシーケンスが可能になります。これは、メイトペアのジャンクションを精確に同定し、トリミングできるためです。

メイトペア調製のソリューション

Nexteraメイトペアサンプル調製キットには、Nexteraメイトペア試薬に加え、TruSeq DNAサンプル調製試薬およびインデックスの全ての試薬が含まれています。Nexteraメイトペアのタグメンテーションおよび環状化の後、ビーズ上でTruSeqの反応を行い（図1）、精製のワークフローを簡略化するとともにサンプルのロスを低減しています。このように統合されたソリューションにより、サンプル調製のワークフローが効率化され、1レーン当たりのサンプル数を増やしてシーケンス効率の向上、ゲノムサイズの小さい生物種のマルチプレックスシーケンスを可能にします。Nexteraメイトペアサンプル調製キットは大規模な実験が可能なように、TruSeq DNAサンプル調製のアダプターインデックスを採用して、1キットあたり12インデックスをサポートしています。必要な試薬全てが、使いやすくコスト効率のよいセットになっているNexteraメイトペアサンプル調製キットは、より迅速かつ簡便なメイトペア調製のためのオールインワンソリューションです。

図3：フラグメントのサイズ分布



上の図は、同一のタグメンテーション反応液から調製した、3つの大腸菌メイトペアライブラリー（3Kb、5Kb、および8Kb）におけるフラグメントサイズ分布を示します。これらのライブラリーは、Nexeteraメイトペアプロトコール（ゲルあり）で、アガロースゲルによるサイズ選択を行い調製しました。

表1：Nextera メイトペアプロトコール

プロトコール	DNA スタート量	Nextera による断片化反応のサンプル数	選別できるサイズ／サンプル	ライブラリー数
ゲルフリー	1μg	48	選別不可	48
ゲルあり、Pippin Prep によるサイズ選択	4μg	12	1 種類	12
ゲルあり、アガロースゲルによるサイズ選択	4μg	12	最大 4 種類	最大 48

表2：Nextera メイトペアライブラリーの多様性*

調製方法	DNA スタート量	フラグメントサイズ	多様性**
Nextera メイトペア ゲルフリー	1μg	約 2 ～ 15Kb	8 億 6000 万
Nextera メイトペア ゲルあり	4μg	約 2 ～ 4Kb	5 億 6800 万
Nextera メイトペア ゲルあり	4μg	約 5 ～ 7Kb	3 億 9600 万
Nextera メイトペア ゲルあり	4μg	約 6 ～ 10Kb	1 億 200 万

* この表は、重複しないフラグメント数で示される、多様性の値を例として示しています。Nexteraメイトペアキットを使用して実際に得られる多様性は、スタートDNA量、DNAの品質、プロトコール実施の精確さなど複数の要素によって変化します。

** ライブラリーの多様性は、データセット中のユニークなリードペア数を、Lander-Wattermanの方程式に基づく方法で算出しました[2]。

製品情報

製品名	カタログ番号
Nextera Mate Pair Sample Prep Kit	FC-132-1001

本キットには、NexteraメイトペアTruSeq試薬とインデックスが含まれます。

まとめ

迅速かつ簡便なワークフローにより、Nexteraメイトペアサンプル調製キットは、高品質なシーケンスライブラリーを2日以内で調製できます。ゲルフリーおよびゲルありのオプションによって、多様なアプリケーションに対応する柔軟性を有します。トランスポソームによるタグメンテーション、識別可能なジャンクション配列、インデックス対応により、Nexteraメイトペアサンプル調製は、メイトペアアプリケーションにおける最も簡便な製品となっています。

References

1. www.sagescience.com/products/pippin-prep
2. Lander ES and MS Waterman. (1988) Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. Genomics 2(3): 231–9. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3294162

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-J052 05MAR2013