illumina®

Nextera® Rapid Captureカスタム濃縮

迅速なサンプル調製と濃縮のワークフローで、目的の領域へ優れたアクセスを実現

特　長

- **サンプル調製と濃縮のワークフローを統合**
  Nexteraのタグメンテーションと最適化したハイブリダイゼーションにより、全体のワークフローにかかる時間を短縮し迅速に結果を取得
- **目的の領域をターゲットに効率よく濃縮**
  0.5～15Mbのカスタムコンテンツを選び、1回の濃縮反応で最大12サンプルまでプール
- **アドオン機能でコンテンツのデザインを改良**
  研究の必要に応じて既存パネルに追加で領域を搭載

はじめに

Nextera Rapid Captureカスタム濃縮では、サンプル調製からカスタムターゲットの濃縮までをオールインワンのアッセイで行うことができます。Nexteraタグメンテーションと最適化されたターゲットキャプチャーの組み合わせにより、お手元のカスタムコンテンツを最速で濃縮することが可能です。柔軟性が高くかつ完全にカスタム化が可能なデザインにより、最長で15Mbのコンテンツを搭載することができるため、ゲノム上の目的領域にフォーカスした研究が実施できます。またDesignStudioの新しいアドン機能で、新しい発見のためにコンテンツを何度でも追加することが可能です。

カスタムプローブデザイン

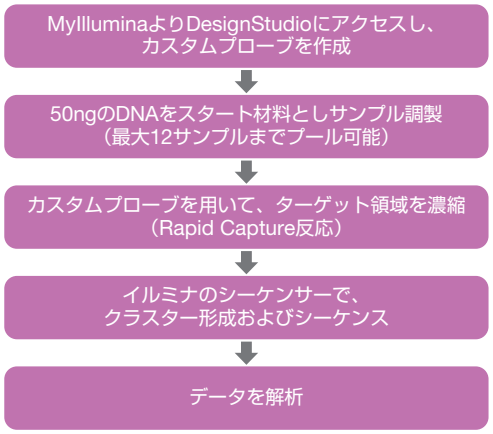
Nextera Rapid Captureカスタム濃縮アッセイでは、はじめにカスタムプローブセットのデザインを行います。DesignStudioはユーザーフレンドリーな無料のオンラインツールで、お客様のMyIlluminaアカウントからアクセスいただけます。DesignStudioで目的の領域を指定し、カスタムプローブセットを作成した後、デザインIDと詳細を営業までご連絡いただき、見積もりおよびご注文のながれとなります。DesignStudioでは複雑なアルゴリズムに基づきプローブセットのデザインが最適化されており、カバレッジにギャップが生じる可能性や、シーケンスが困難な領域がある場合は警告が表示されます。ご要望のターゲットは染色体の座標や遺伝子名ごとに1つずつ、もしくはひとまとめに指定できます。

より簡便なワークフロー

Nextera Rapid Capture濃縮を用いることで、イルミナのシーケンステクノロジーを最大限に活用し、ラボ全体の生産性を引き上げることができます。Nextera Rapid Captureアッセイはその簡便性およびスピードから、1人のスタッフが12サンプルの調製と濃縮をわずか1.5日で行うことができます。

Nexteraベースのサンプル調製では、50ngのゲノムDNAからアダプター標識されたライブラリーを生成します（図2A）。

図1：Nextera Rapid Captureカスタム濃縮の概要



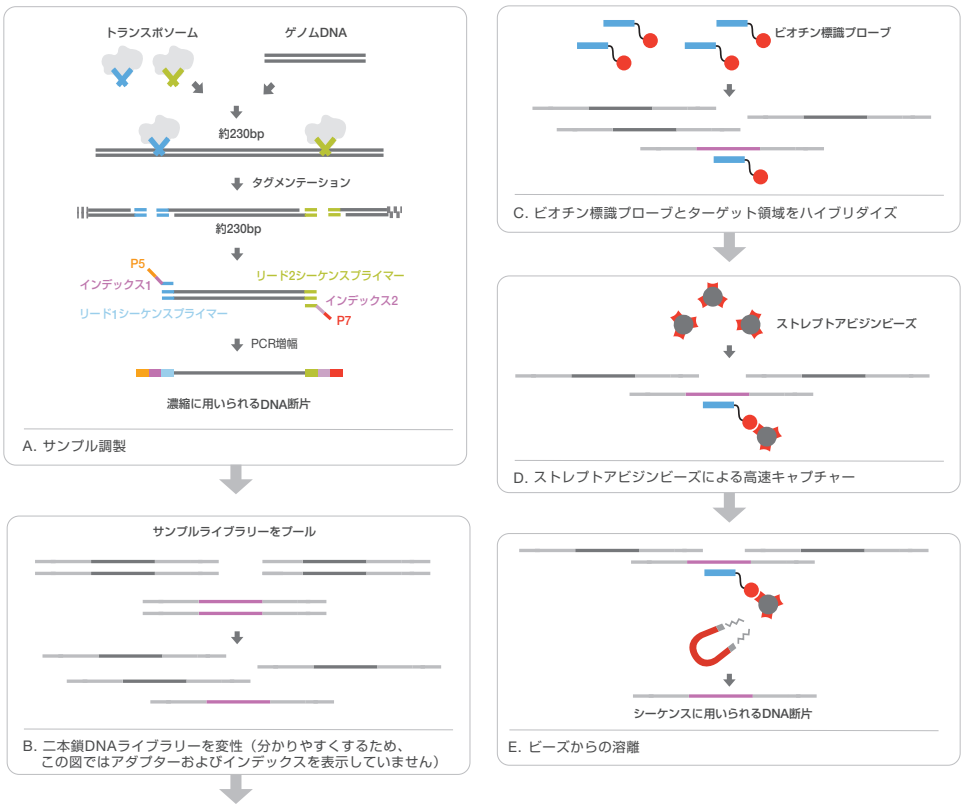
Nextera Rapid Captureカスタム濃縮キットは、ターゲットリシーケンスのトータルソリューションを提供します。

NexteraのDNAタグメンテーションでは、DNAの断片化と標識化が同時に行われるため、機械的に断片化する必要はありません。組み込まれたサンプルバーコードにより、最大12サンプルのライブラリーを1つにプールすることができ、これによりハイブリダイゼーションに基づいた反応を1回行うだけで済みます。プールしたライブラリーを1本鎖DNAに変性し（図2B）、ビオチン標識されたターゲット領域に特異的なプローブを用いてRapid Captureハイブリダイゼーションを行います（図2C）。ビオチン標識され、またターゲット領域にハイブリダイズしたプローブに結合するストレプトアビジンビーズを添加します（図2D）。磁気によってストレプトアビジンビーズをプルダウンすると、ビオチン標識プローブにハイブリダイズしたターゲット領域を濃縮することができます（図2E）。この濃縮されたDNA断片をビーズから溶離し、再度Rapid Capture反応を行うことで、濃縮の特異性を上げることができます。全行程はわずか1.5日で終了し、研究者1人でも自動化装置なしで一度に最大12サンプルの処理が可能です。

データ解析

カスタム濃縮で得られたシーケンスデータは、HiSeq Analysis Software（HAS）のEnrichment Workflowを用いて解析します。HAS解析には、Linuxカーネルを経由して直接アクセスするか、追加のAnalysis Visual Controller（AVC）インターフェースからアクセスします[1]。

図2：Nextera Rapid Captureのワークフロー



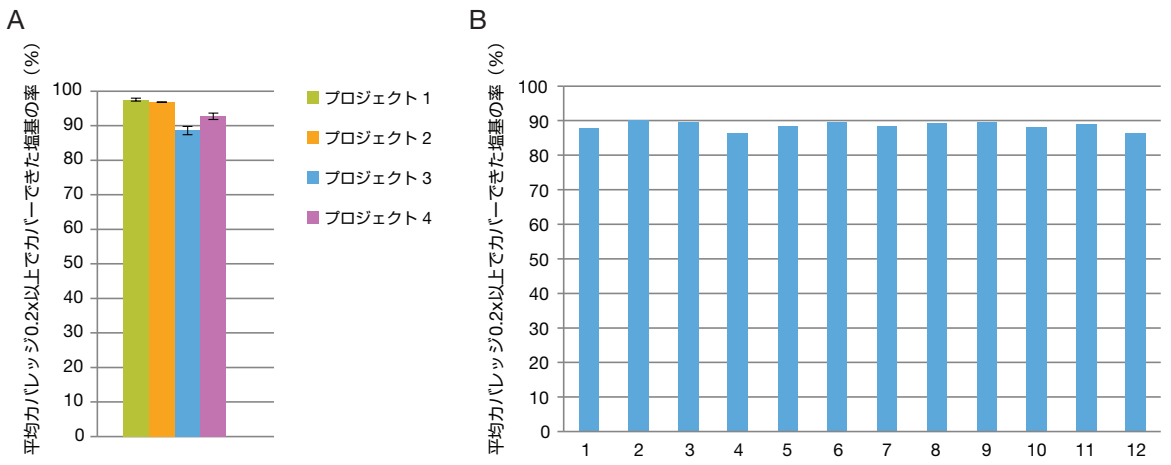
Nextera Rapid Captureカスタム濃縮では、シンプルかつ効率的なソリューション法により、ターゲット領域を分離、濃縮することができます。ワークフローはライブラリー調製とエクソーム濃縮のステップを組み合わせており、実際に完了するまでのハンズオン時間はわずか1.5日です。

MiSeq®でシーケンスしたカスタムアッセイは、MiSeq Reporter（MSR）を用いて解析します。HASとMSRのEnrichment Workflowでは、BWAアルゴリズムを用いて.bamフォーマットでシーケンスリードをアラインメントし、GATKのインデルアライメントツールでindelのリアラインメントを行います。変異コールは、マニフェストファイルで表示されたターゲット領域内で行われます。GATKの変異コールは、遺伝子型、アノテーション、その他特定のターゲット領域内におけるすべての情報がのった.vcfファイルを作成します。カバレッジファイルにはゲノム上のカバレッジやギャップ深度の情報が含まれています（.CoverageHistogram.txt、.gaps.csv）。さらに、濃縮の統計サマリーは.enrichment_summary.csvファイルにより得られるほか、Picard Suite（.HSmetrics.txt）のCalculate HSMetrics.jarツールを通して得ることもできます。濃縮ファイルにはオン・ターゲットまたはオフ・ターゲットのリードまたは塩基、ターゲット領域の平均カバレッジ、および1x、10x、20x、50xのカバレッジで存在するリード率がまとめられています。さらに、リードまたは塩基の濃縮と変異数（SNPおよびindel）を含む変異コールの情報や、Het/Hom比ならびにTs/Tv比および標準管理されているデータベースとのオーバーラップなどの情報も得られます。

データ例

4種のNextera Rapid Capture濃縮のワークフローが図2に示されています。それぞれのプロジェクトは、異なるターゲット領域とカバレッジ深度を対象としています（表1）。図3には主な濃縮とカバレッジのデータがまとめられています。すべてのマルチプレックスプロジェクトにおいて濃縮率は高く、標準化した平均カバレッジプロットは、>85%の塩基が平均カバレッジの0.2xでカバーされています。また図4では、既存のデザイン（Nextera Rapidキャプチャーエクソーム）にカスタムアドオンコンテンツを付け加えても、カバレッジの均一性に著しい低下が見られないことを示しています。

図3：カスタム12プレックスプールでの高いカバレッジ均一性



Nextera Rapid Captureカスタム濃縮は、異なるカスタムプローブセットとサンプルを12プレックスプールで解析した場合にも、均一なターゲット濃縮が可能です。A. 平均カバレッジに対して0.2x以上のときのカバレッジ均一性が、ターゲットの塩基率で表されています。これらのカスタムプローブセットの平均カバレッジを表1に示しています。エラーバーは、それぞれのプロジェクトのプールされた12サンプルの均一性の標準偏差（SD）です。B. プロジェクト3のプールされた12サンプルのカバレッジ均一性を示しています。このランにおける平均カバレッジは300xで、60x以上でカバーされたターゲットの塩基率が示されています。

表1：プロジェクト例のシーケンスの詳細

プロジェクト	コンテンツ	平均カバレッジ	オンターゲットの塩基率（%）*
1**	0.5Mb	1500x	88.6
2**	0.5Mb	146x	79.5
3 †	3.5Mb	300x	80.1
4**	7Mb	152x	72.5

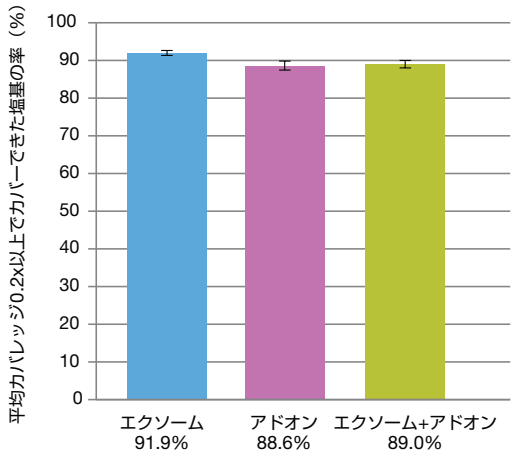
* Picard Hybrid Selectionツールで±250bpの領域で算出
** HiSeqでシーケンス
† MiSeqでシーケンス

Nextera Rapid Captureカスタム濃縮の詳細

濃縮効率 *	>70%
カバレッジ均一性（平均の 0.2x）	>85%
コンテンツ範囲	0.5 ～ 15Mb
濃縮前にプールできるサンプル数	最大 12 サンプル
サンプル調製に必要な DNA スタート量	50ng
ライブラリーインサートサイズ	230bp

* カスタムデザインのため、ターゲットの値は変化します。

図4：アドオンコンテンツの使用時の高いカバレッジ



Nextera Rapid Captureエクソームに3.5Mbのアドオンコンテンツが付加されても、高いカバレッジ均一性が保たれています。すべてのサンプルは12プレックスプールで解析されました。

製品情報

製品	カタログ番号
Nextera Rapid Capture カスタム（48 サンプル）3,000 ～ 10,000 デザインのカスタム濃縮プローブとともにお使いいただけます。	FC-140-1007
Nextera Rapid Capture カスタム（96 サンプル）3,000 ～ 10,000 デザインのカスタム濃縮プローブとともにお使いいただけます。	FC-140-1008
Nextera Rapid Capture カスタム（288 サンプル）3,000 ～ 67,000 デザインのカスタム濃縮プローブとともにお使いいただけます。	FC-140-1009

まとめ

Nextera Rapid Captureカスタム濃縮は、その優れたサンプル調製と濃縮のワークフローで、興味ある領域への優れたアクセスを実現します。ターゲットシーケンスがわずか50ngのDNAスタート量で可能になっただけでなく、今までになく迅速かつ効率的にデータを得ることでできるようになりました。優れたアドオン機能を利用して、時間をかけてコンテンツの質を洗練させたり、Nextera Rapidキャプチャーエクソームや TruSight®コンテンツセットのパネルに独自の興味ある領域を追加することができます。

ターゲットリシーケンスのソリューションの詳細については、www.illuminakk.co.jp/applications/sequencing/targeted_resequencing.ilmnをご覧ください。

参考文献

1. http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/analysis_visual_controller_avc.ilmn
2. http://picard.sourceforge.net

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. 770-2013-J025 16OCT2013