Nextera® XT DNAサンプル調製キット

小さなゲノム、PCRアンプリコン、プラスミドのサンプル調製用に最も迅速・簡便なワークフロー

特　長

- **迅速なサンプル調製**
  わずか85分でサンプル調製が完了
  ハンズオンタイムは15分だけ
- **最短時間で結果を取得**
  MiSeq®システムを使用した場合、DNAを用意してからデータを得るまでわずか7時間
- **小さなゲノム、PCRアンプリコン、プラスミドに最適**
  1つのキットで多種のアプリケーションに対応
- **革新的なサンプルノーマライゼーション**
  サンプルのプーリング前およびシーケンス前のライブラリー定量が不要に

はじめに

Nextera XT DNAサンプル調製キットの登場により、小ゲノム（細菌、古細菌およびウィルス）、PCRアンプリコン、およびプラスミドから、即シーケンス可能なライブラリーを85分で調製できるようになりました。しかもハンズオンタイムはわずか15分です。MiSeqシステムとNexteraサンプル調製キットをご使用いただくと、DNAからシーケンスデータ取得まで、わずか7時間で完了します（図1）。また、インプットDNAが少量（1ng）であるため、量に限りのある貴重なサンプルの解析にも適しています。Nexteraサンプル調製キットはイルミナの全シーケンサに対応しており、確立された多様なアプリケーション[1-9]において、シーケンスの全ワークフローにかかる時間を大幅に短縮できるため、優れたスループットを実現します。

最も迅速・簡便なサンプル調製ワークフロー

タグメンテーション酵素反応により、サンプルDNAの断片化およびアダプターの付加を同時に行います。最適化された、サイクル数を押さえたPCRプロトコールにより、アダプター付加したDNAを増幅し、シーケンスインデックスを付加します（図1）。サンプル調製の開始から終了まで、Nextera XTプロトコールは既存のサンプル調製プロトコールに比べ、80%以上迅速で、必要ハンズオンタイムも最短となっています。

革新的なサンプルノーマライゼーション

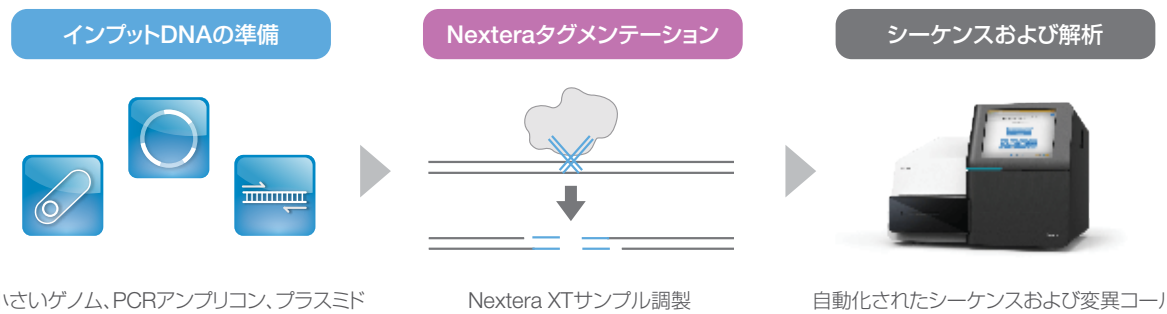
次世代シーケンス用のサンプル調製キットを使用して得られるライブラリーの濃度はさまざまです。複数サンプルを等量ずつプールし、目的のクラスター密度を得るための定量には時間がかかることが多く、さらにその後バーコード化されたサンプルの希釈およびプールを行わなければなりません。Nextera XTサンプル調製キットでは、ビーズを用いたシンプルなサンプルノーマライゼーションステップ（図2）を採用し、サンプルのプール前およびシーケンス前に必要であったライブラリー定量が不要となりました。調製されたライブラリーは等濃度であるため、溶液量を揃えるだけで簡単にプールできます。操作は簡単で、各ライブラリーを5µlずつプールするだけで済みます。

柔軟なマルチプレックス化

Nextera XTサンプル調製キットは革新的なインデックス法を採用しており、1度の実験において最大96サンプルに独自のバーコードを付けることができます。各DNA断片に2種類のインデックスを付加した後、独自のバーコードを付けた最大96のサンプルをプールし、同時にシーケンスすることができます。シーケンス後、2種類のインデックスの独自な組み合わせによりデータのジマルチプレックスを行い、リードをそれぞれのサンプルに割り当てます。Nextera XTインデックスキットでは、デュアルバーコード方式により、わずか20種類のインデックスオリゴで最大96サンプルを処理できるため、スケール変更が自在です。

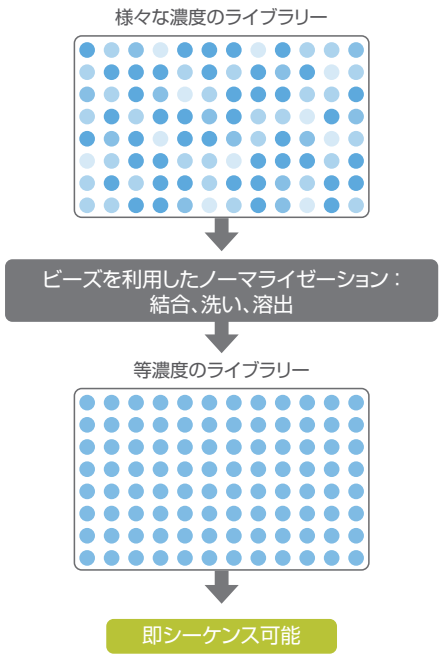
マルチプレックスを行う実験は、無料のソフトウェアツールIllumina Experiment Managerで簡単に管理できます。このソフトウェアをご使用いただくと、反応溶液のセットアップをプレート上で容易に行えます。

図1：Nextera XTのサンプル調製ワークフロー



Nextera XTとMiSeqシステムの迅速なシーケンスの組み合わせにより、DNAを用意してからデータの収集までわずか7時間で終わります。

図2：革新的なサンプルノーマライゼーション



Nextera XTサンプル調製キットでは、サンプルのプール前あるいはシーケンス前のライブラリー定量が不要です。ビーズを利用したサンプルノーマライゼーションにより、等濃度のライブラリーが調製できます。操作は簡単で、5µlのライブラリーをシーケンスするだけで済みます。

解析のためのシンプルなユーザーインターフェース

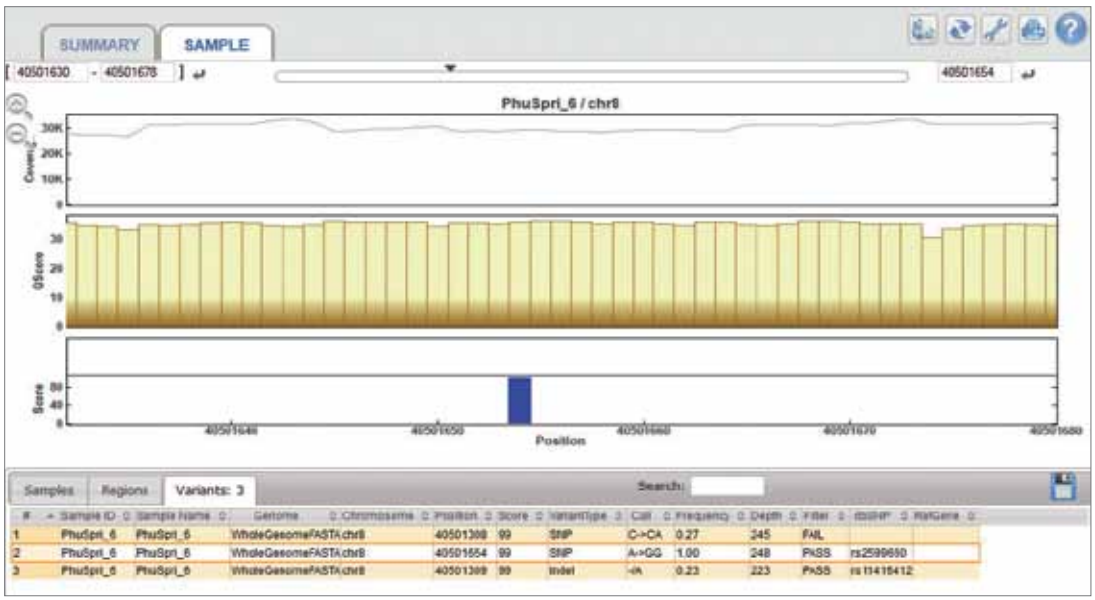
MiSeq Reporterは装置上で小さなゲノムの*de novo*アセンブリまたはリシーケンス、PCRアンプリコン、およびプラスミドのシーケンスなどの様々なアプリケーションで自動解析を行います。シーケンスの結果および解析は見やすく、分かりやすいものになっています。例えば、MiSeq Reporterソフトウェアで PCR Ampliconワークフローを使用した場合、シーケンスのデータは自動的に「Samples」、「Regions」、「Variants」のタブに分かれて表示されます（図3）。それぞれのタブでは、変異スコア、クオリティ（Q）スコア、およびシーケンスのカバレッジを1塩基単位で確定することができ、目的とする変異の解析を容易に行えます。

高カバレッジ、高精度コール

Nextera XTとMiSeqシステムによるPCRアンプリコンシーケンスのパワーをご覧いただくため、サイズの異なる9種類のPCRアンプリコンを、異なる2検体のヒトDNAから調製しました。各サンプルから得られたアンプリコンはプールされ、その内 1ngのDNAを用いてNextera XTキットによりサンプル調製を行いました。2つのサンプルプールから調製されたライブラリーを混合し、ペアエンド2×150bpのリード長で、MiSeqシステムにてシーケンスしました。その後、MiSeq Reporterソフトウェアにて PCRアンプリコンワークフローを用いて解析を行いました。2サンプルのうち1つについて、各アンプリコンの平均シーケンスカバレッジの概算値およびコールされた変異数（variant score > 99）を表1に示します。MiSeqシステムによるアウトプットではこれらのアンプリコンは>12,000×のカバレッジでシークエンスされ、信頼性の高い変異コールを可能にしています。

このサンプルでコールされた31の変異のうち、94%はdbSNP

図3：MiSeq ReporterのPCR Ampliconワークフロー



MiSeq Reporterは、上記のPCRアンプリコンを含む様々なアプリケーションにおいて、装置上で自動的に解析を行います。「Samples」、「Regions」、「Variants」に容易にアクセスでき、バリアントスコア、クオリティ（Q）スコア、およびカバレッジのプロット図を1塩基単位で見ることができます。

表1：アンプリコンのカバレッジおよびコールされた変異

アプリコンのサイズ（bp）	平均カバレッジ（1,000リード）	コールされた変異（SNVs/Indels）
953	15.1	4 SNVs
1083	27.4	4 SNVs
1099	22.1	1 SNV
1800	22.4	7 SNVs
1809	17.8	1 SNV
2166	17.6	7 SNVs
3064	12.5	4 SNVs
3064	13.3	1 SNV
3072	14.8	1 SNV + 1 indel

データベースに存在するものでした。これらの結果は、アンプリコンのサイズに関わらず、同等に高いカバレッジを得られ、変異コールが正確であったことを示します。

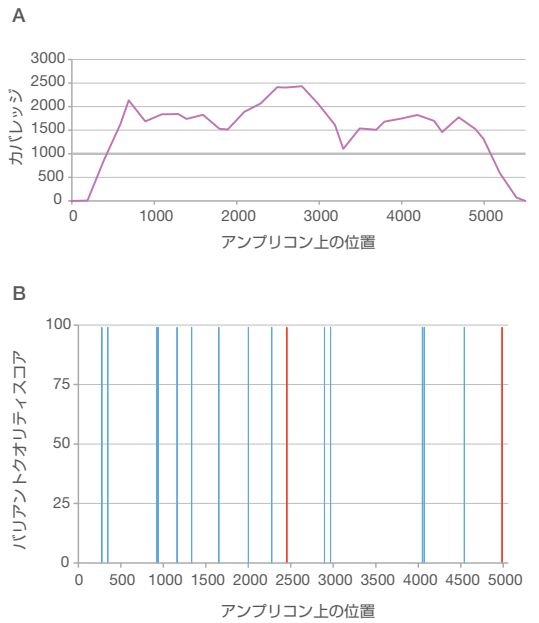
長鎖のアンプリコンにおいて均一なカバレッジ

ロングレンジPCRによって増幅された長鎖のアンプリコン（> 1kb）からのサンプル調製は、Nextera XTキットを用いて容易に行うことができ、イルミナの全てのシーケンサでシーケンス可能です。図4は、あるアンプリコンの位置とカバレッジの関係と、コールされた変異の位置を示しています。このアンプリコンは長さ5.1kbで、高頻度で変異が見られる、ヒトゲノムのノンコーディング領域から増幅されたものです。また、この5.1kbのアンプリコンは、ヒトDNAから増幅されたサイズ約300bpから10kbにわたる24アンプリコンをプールしたものの一部でした。アンプリコンのプールは5つの異なるサンプルから増幅され、各プールから1ngを用いてNextera XTライブラリーが調製されました。ライブラリーはミックスされ、MiSeqにてシングルリード1×150bpサイクルでシーケンスされました。解析にはMiSeq ReporterのPCR Ampliconワークフローを用いました。

小さなゲノムの *De novo*アセンブリ

微生物ゲノムのサンプル調製におけるNextera XTの有用性を示すため、*Escherichia coli*のリファレンス株であるMG1655のゲノムDNA 1ngから、Nextera XTを用いてサンプル調製を行い、MiSeqシステムにてペアエンド2×150bpのリード長でシーケンスを行いました。データの解析はMiSeq ReporterのAssembly workflowを用いました。このサンプルでは、ラン後の解析にかかった時間は28分でした。アセンブリの評価指標の値を表2に示します。質の高いアセンブリが作成され、優れたN50およびカバレッジが得られました。このアセンブリのデータセットは、イルミナのクラウドコンピューター環境であるBaseSpace™で入手できます[10]。

図4：長鎖アンプリコンのカバレッジ



パネルA：5.1kbのアンプリコンにわたり、高いカバレッジ（>1,000×）
パネルB：同じアンプリコンにおいて、パスフィルターの16個の変異（青で示したSNVsが14個+赤で示したIndelが2個）を、変異スコア（Phredスコア形式で測定される変異コールの正確性、最大値=99）に対しプロットしました。16の変異のうち、13はdbSNPに存在するものでした。

表2：*E. Coli* の *de novo*アセンブリ

パラメーター	値
ゲノムカバー率	98%
コーディング数	314
最大コンティング長	221,108
ベースカウント	4,548,900
N50	111,546
平均カバレッジ	184.9

まとめ

Nextera XT DNAサンプル調製キットは、スピードと簡便性が最優先される実験に最適です。Nextera XTの極めて迅速かつ簡便なワークフローにより、小さなゲノム、PCRアンプリコン、あるいはプラスミドのシーケンスを素早く行えるようになります。MiSeqシステムとNextera XTサンプル調製キットを組み合わせると、サンプルを用意してからデータを得るまでの操作が1日で完了します。

参考文献

1. Loman N, Misra RJ, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nat Biotechnol 22 Apr.
2. Gertz J, Varley KE, Davis NS, Baas BJ, Goryshin IY, et al. (2012) Transposase mediated construction of RNA-Seq libraries. Genome Res 22(1): 134–41.
3. Parkinson NJ, Maslau S, Ferneyhough B, Zhang G, Gregory L, et al. (2012) Preparation of high-quality next-generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA. Genome Res 22(1): 125–33.
4. Toprak E, Veres A, Michel J-B, Chait R, Hartl D, et al. (2012) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nat Genet 1(44): 101–106.
5. Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, Tan PL, Tai AK, et al. (2011) A rare penetrant mutation in *CFH* confers high risk of age-related macular degeneration. Nat Genet 43(12): 1176–7.
6. Depledge DP, Palser AL, Watson SJ, Lai I Y-C, Gray E, et al. (2011) Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. PLoS One 6(11): e27805.
7. Lieberman TD, Michel J-B , Aingaran M, Potter-Bynoe G, Roux D, et al. (2011) Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. Nat Genet 43(12): 1275–80.
8. Young TS, Walsh CT (2011) Identification of the thiazolyl peptide GE37468 gene cluster from *Streptomyces* ATCC 55365 and heterologous expression in *Streptomyces lividans*. Proc Natl Acad Sci USA 108(32): 13053–8.
9. Adey A, Morrison HG, Asan, Xun X, Kitzman JO, Turner EH, et al. (2010) Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density *in vitro* transposition. Genome Biol 2010;11(12):R119.
10. http://basespace.illumina.com

Nextera XT DNAサンプル調製キットの仕様

仕様	内容
インプット DNA の種類	ゲノム DNA、PCR アンプリコン、プラスミド
インプット DNA 量	1ng
インサートサイズの中央値	< 300bp
利用可能なインデックス	最大 96
対応するシーケンサ	HiSeq® システム, HiScanSQ™, Genome Analyzer IIx および MiSeq システム
対応するリード長	全てのイルミナシーケンサーのリード長に対応

製品情報

製品	カタログ 番号
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (24 Samples)	FC-131-1024
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 Samples)	FC-131-1096
Nextera XT Index Kit (24 Indices, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit (96 Indices, 384 Samples)	FC-131-1002
TruSeq® Dual Index Sequencing Primer Kit, Single Read (single-use kit)*	FC-121-1003
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Kit, Paired-End Read (single-use kit)*	PE-121-1003

* MiSeqを除くシーケンサは全てシーケンスプライマーキットが必要となります。

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-J011 7JULY2012