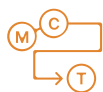


Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment

1回のアッセイでゲノムバリエーションとメチル化を同時ターゲット検出



新しいケミストリーを用いた高感度のメチル化検出



効率的なワークフローと簡単な解析を兼ね備えたツーンワンアッセイ



ターゲットゲノムおよびメチロームの洞察を支えるフレキシブルなカスタマイズ

高感度なマルチオミクス検出

DNAは本質的にマルチオミクスであり、遺伝的およびエピジェネティックな分子情報の両方を保持しています。アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G) およびシトシン (C) の配列以外にも、遺伝子発現に直接関与する5-メチルシトシン (5mC) などの修飾塩基が存在します (図1)。ゲノムバリエーションとDNAメチル化の両方を検出することで、健康状態と疾患状態の隠れたメカニズムが明らかになります。一般的に、ゲノムとメチロームの研究には、別々のアッセイとデータ解析ステップが必要です。Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、新しい酵素法と最適化された解析手法を活用し、同一アッセイで同一シーケンスリードを用いて同一サンプルから5塩基 (A、T、G、C、5mC) を検出します。ハイブリッドキャプチャー濃縮とカスタムデザインパネルにより、特定の対象領域に的を絞った解析が可能となり、高感度なマルチオミクス検出をコスト効率良く、深いカバレッジで実施できます。

効率的かつ柔軟なワークフロー

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、ターゲットDNAシーケンスとメチル化シーケンスを1回の使いやすいアッセイで実施できます (図2)。ライブラリーから解析までを3日以内に完了する効率的なワークフローを、単一ベンダーから提供します。Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、セルフリーDNA (cfDNA) および、血液、細胞株または新鮮凍結組織から採取したゲノムDNA (gDNA) に対応しています。シンプルな1ステップの5mCからTへの塩基転換を含む最適化された濃縮ライブラリー調製は、最小限のタッチポイントで、11時間未満で完了します (表1、図3、図4)。* Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、的を絞った研究向けのカスタムハイブリッドキャプチャープローブパネルを使用します。本アッセイは4ブックスでの濃縮と、最大384種類のユニークデュアルインデックスに対応します。NextSeq™ 2000システム、NovaSeq™ 6000システム、NovaSeq 6000Dxシステム (RUOモード)、またはNovaSeq Xシリーズでライブラリーをシーケンスした後は、シンプルなデータ解析が続きます。ワークフローに組み込まれたDRAGEN™パイプラインは、2つのリードアウトを生成します (図5、図6)。

* 24サンプルのマニュアル処理に基づきます。DNA断片化 (該当する場合) およびライブラリー定量を含みます。ノーマライゼーションおよびプーリングの時間は含まれません。

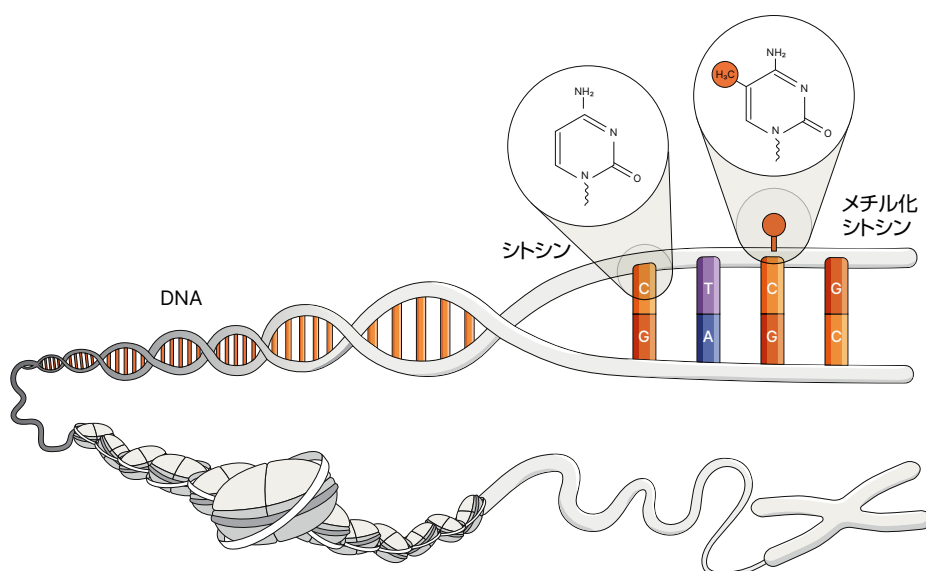


図1: Cから5mCへのDNAメチル化は、遺伝子制御に関わるエピジェネティックなマークとして広く研究されています

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、修飾されていないA、T、G、C塩基とともに5mCを検出し、1回のNGSアッセイでゲノムとエピゲノムの両方の洞察を提供します。

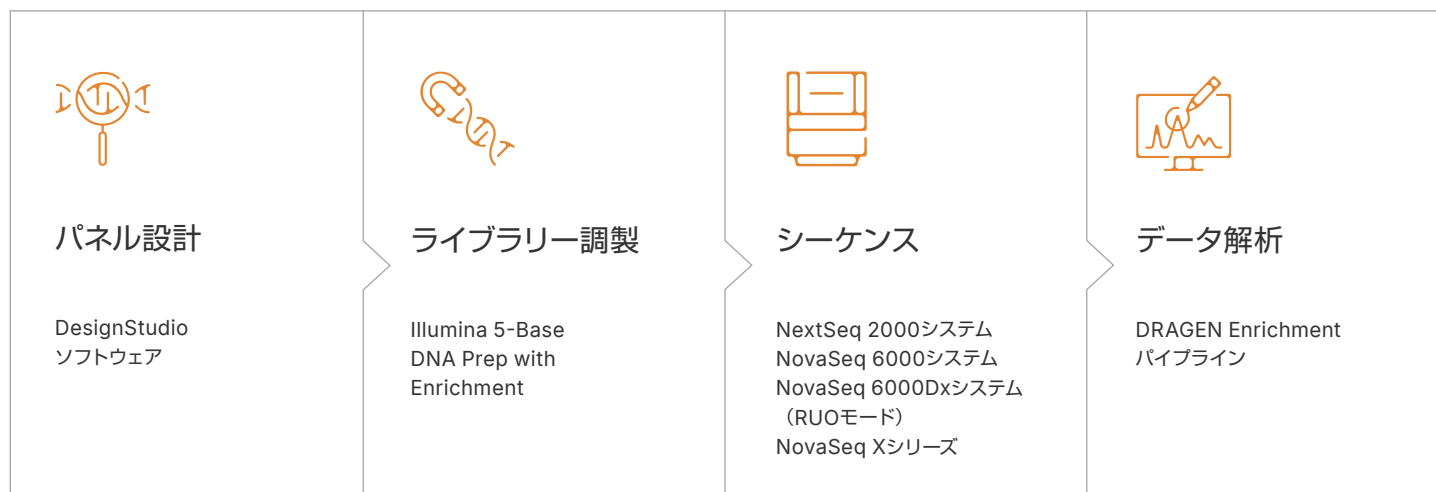


図2: Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentワークフロー

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、ライブラリーから解析までの効率的なワークフローを提供し、ゲノムバリエーションとメチル化を同時に検出します。ライブラリー調製には、新しい単一ステップの塩基変換ケミストリーを含む簡単なプロトコルを用います。イルミナのミッドスループットまたはハイスループットシステムを使用してライブラリーをシーケンスします。DRAGEN二次解析は、単一のリードアウトでゲノムとメチル化の2つのアノテーションを生成します。

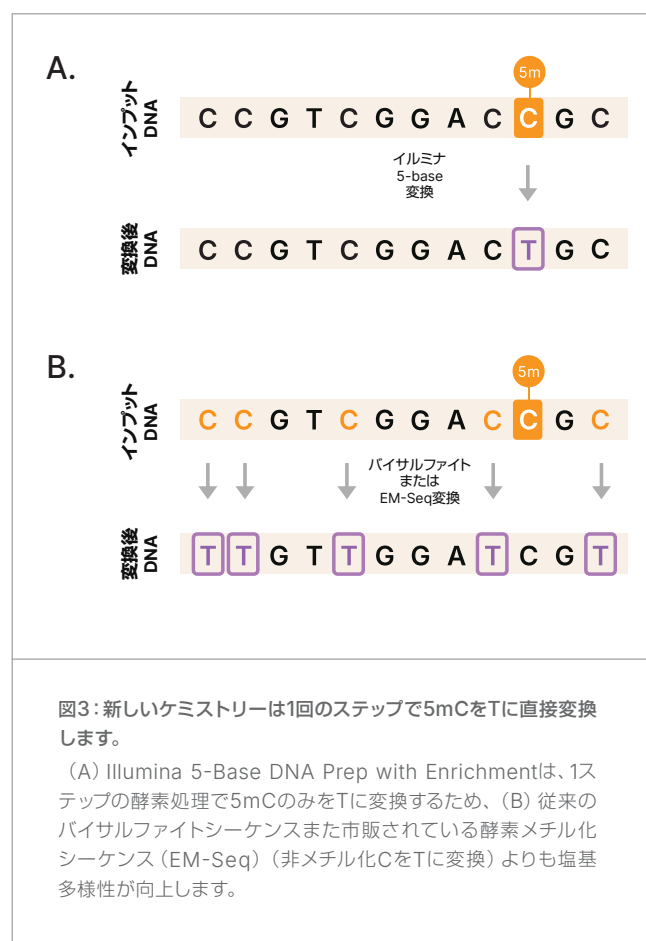
表1: Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentのパラメーター

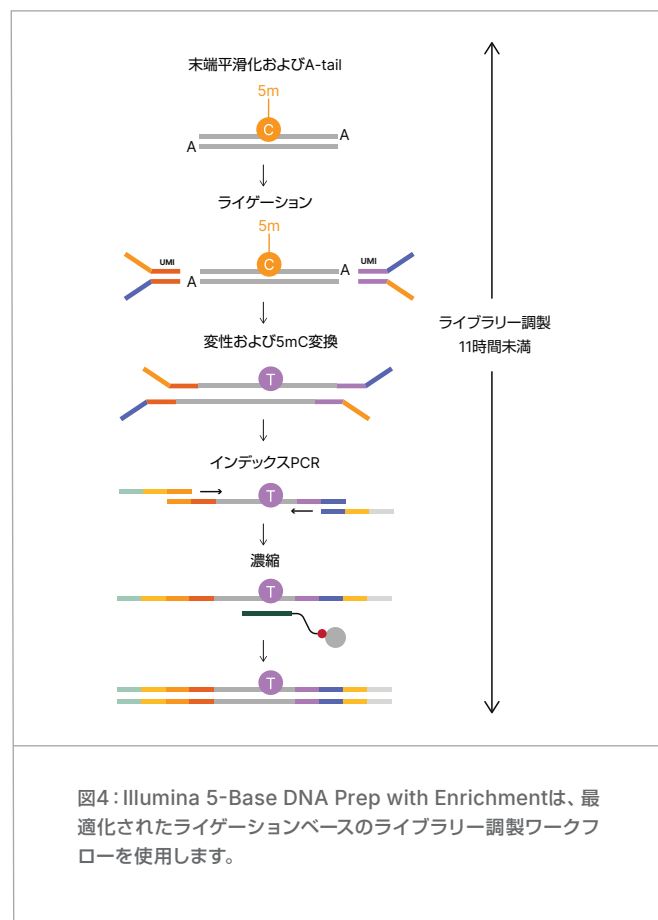
	インプット	ライブラリー調製時間 ^a
ゲノムDNA	50~100 ng	11時間未満
セルフリーDNA	1~20 ng	11時間未満

a. 24サンプルのマニュアル処理に基づきます。DNA断片化（該当する場合）およびライブラリー定量を含みます。ノーマライゼーションおよびプーリングの時間は含まれません。

5-メチルシトシンをチミンに直接変換する新しいケミストリー

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、ターゲットゲノムおよびメチローム解析アプローチとは根本的に異なるアプローチです。従来のDNAメチル化検出手法では、バイサルファイト処理または酵素を使って非メチル化シトシンがチミンに変換されます（図3B）。ゲノム中のシトシンの大部分は修飾されていないため、この手法では塩基多様性が大幅に低下し、シーケンスリードのアライメントが難しくなります。Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、新設計の酵素を用いて、ライブラリー調製中に1回のインキュベーションステップで5mCのみをチミンに直接変換します（図3A）。イルミナ5-baseケミストリーはライブラリー複雑性を保持し、高いデータアライメント率を確保するため、検出感度が高くなります。

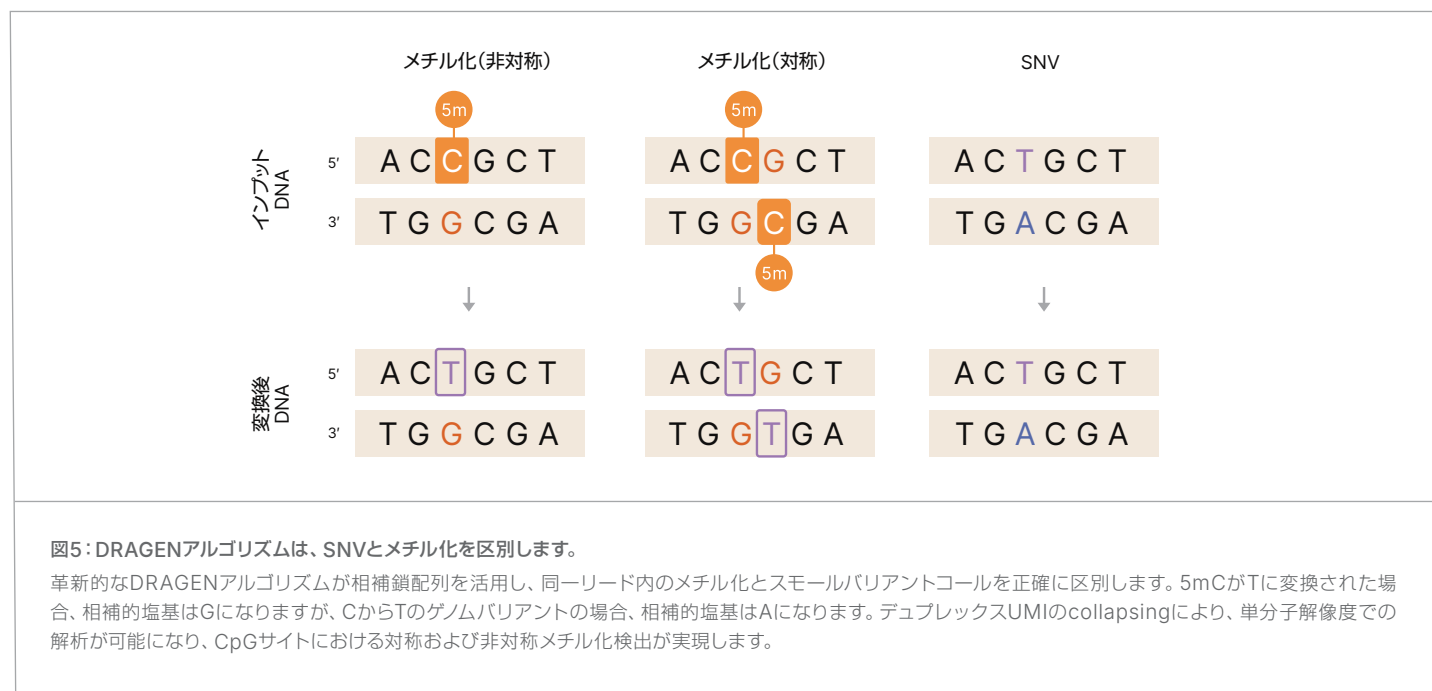




ゲノムおよびメチロームデータを統合した単一リードアウト

ワークフローの一部であるDRAGEN二次解析は、単一のリードアウト内のメチル化およびゲノムバリエーションの両方に対する正確なアノテーションを提供します (図5、図6)。新しいメチル化認識アルゴリズムは、相補的なストランド配列を活用し、メチル化を示すチミンと1塩基多型 (SNV) 由来のチミンを区別します (図5)。組み込まれた分子バーコード (UMI) により、単分子解像度での信頼性の高いメチル化ステータス解析を実現します。デュプレックスUMIのcollapsingにより、メチロームのわずかな差を検出するための技術的な再現性が向上し、シトシン-グアニンジヌクレオチド (CpG) サイトの非対称メチル化の高度な解析が可能です (図5)。

イルミナ 5-baseメチル化レポート作成機能は、DRAGEN Enrichmentパイプライン上で簡単なチェックボックス操作で使用できます。二次解析はBaseSpace™ Sequence HubまたはIllumina Connected Analyticsクラウドプラットフォーム、あるいはDRAGENサーバーを介して実施できます。



DRAGEN Enrichmentパイプラインを用いた5塩基解析

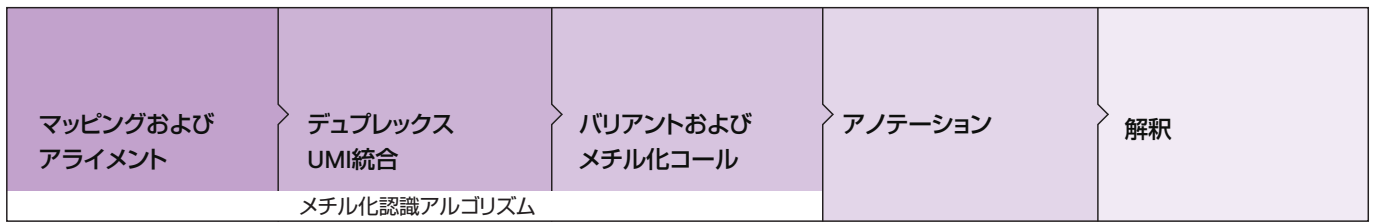


図6：メチル化認識アルゴリズムを統合したDRAGEN Enrichmentパイプラインにより、単一のリードアウトでメチル化とゲノムバリエーションの両方に対する正確なアノテーションが実現します。

イルミナの5-base用二次解析は、簡単なチェックボックス操作でメチル化レポート作成をオンにすることで、DRAGEN Enrichmentパイプライン内で使用できます。UMI：分子バーコード。

対象領域を絞り込むカスタマイズ

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentには、5-baseアッセイ向けに特別に設計されたパネルが必要です。パネルデザインは、最適な性能を発揮し、メチル化ターゲットと非メチル化ターゲットの両方を効率的に検出する鍵となります。[†] シーケンスの対象領域を絞り込むには、幅広いパネルサイズを備えたIllumina Custom Enrichment Panel v2を、DesignStudio™ソフトウェアで設計・注文できます。この専用の設計アルゴリズムは、イルミナ5-baseソリューションに特有の5mCからTへの塩基変換に対応します。[†] DesignStudioソフトウェアでは、ターゲット遺伝子リストまたはゲノムの位置情報からカスタムパネルを設計できます。これには、既存のパネルコンテンツを出発点として使用できます。DesignStudioツールでは、特定のターゲット内のプロモーターなど、制御領域の選択も可能です。

[†] 標準的な濃縮パネルでは、メチル化塩基や非メチル化塩基は考慮されません。バイサルファイトシーケンスのような非メチル化Cを変換する手法向けに作られたパネルは、3塩基多様性向けに設計されており（図3）、Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentとは互換性がありません。

高感度検出

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、複数のアプリケーションにおいて高感度なメチル化およびバリエーション検出を可能にするよう最適化されています。Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、大規模（1 Mb）パネルおよび小規模（75 kb）パネルのいずれにおいても、対象領域で高いカバレッジ均一性を示します（図7、図8）。測定されたメチル化レベルはすべてのサンプルタイプおよびDNAインプットに対して高い精度を示します（図9）。Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentでは、さまざまなメチル化レベルにわたってターゲット領域をバイアスなく捕捉できることも示されています（図10）。小さなゲノムコントロールを添加して測定した場合、5mC変換は、幅広いサンプルインプット量において高い選択性を示します（図11）。組み込まれたUMIにより、低インプットサンプルから低アレル頻度バリエーションを高精度に検出できます（図12）。

補完的に、Illumina 5-Base DNA Prepのワークフローを用いることで、全ゲノムおよび全メチロームをスキャンして広範囲な探索を行うことも可能です。続いて、得られた結果をターゲットパネルの設計に活用することで、Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentを用いたより深いシーケンスが実現します。

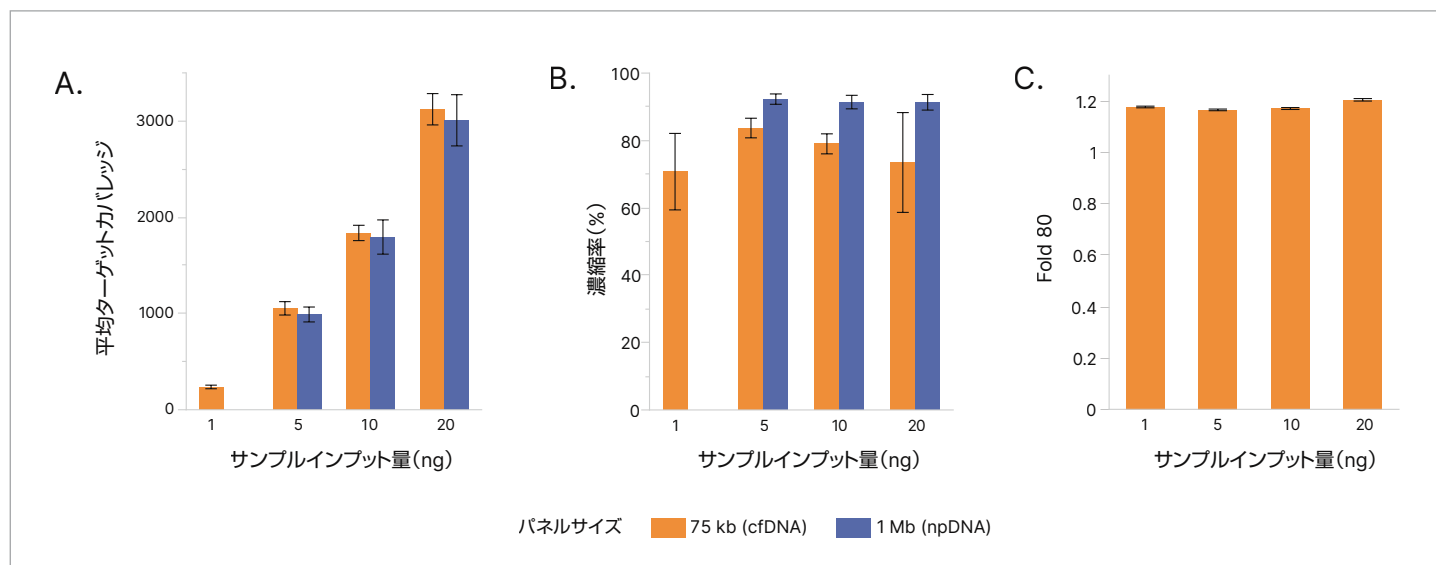


図7: cfDNAおよびnpDNAに対する対象領域の高いカバレッジと均一性

1~20 ngのセルフリーDNA (cfDNA) (オレンジ) およびマイクロソーム由来DNA (npDNA) (青色) から調製したIllumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentライブラリーの (A) 平均ターゲットカバレッジ、(B) 濃縮率、(C) fold-80塩基ペナルティ。cfDNAは健康ドナー血清から抽出し、npDNAはNA12878およびNA12877細胞株に由来します (Coriell Institute for Medical Research)。ライブラリーは、Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment向けに設計されたIllumina Custom Enrichment Panel v2 (イルミナ、カタログ番号: 20073953) を用いて濃縮しました。cfDNAライブラリーは75 kbのカスタムパネルで濃縮し、NextSeq 2000システムでシーケンスし、データは2,500万クラスター (5,000万ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。npDNAライブラリーは1 Mbのカスタムパネルで濃縮し、NovaSeq Xシステムでシーケンスを実施し、データは2億クラスター (4億ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。二次解析はDRAGEN Enrichment v4.4.6を使用して実施しました。平均ターゲットカバレッジおよび濃縮率はUMIのcollapsing後に算出しました。

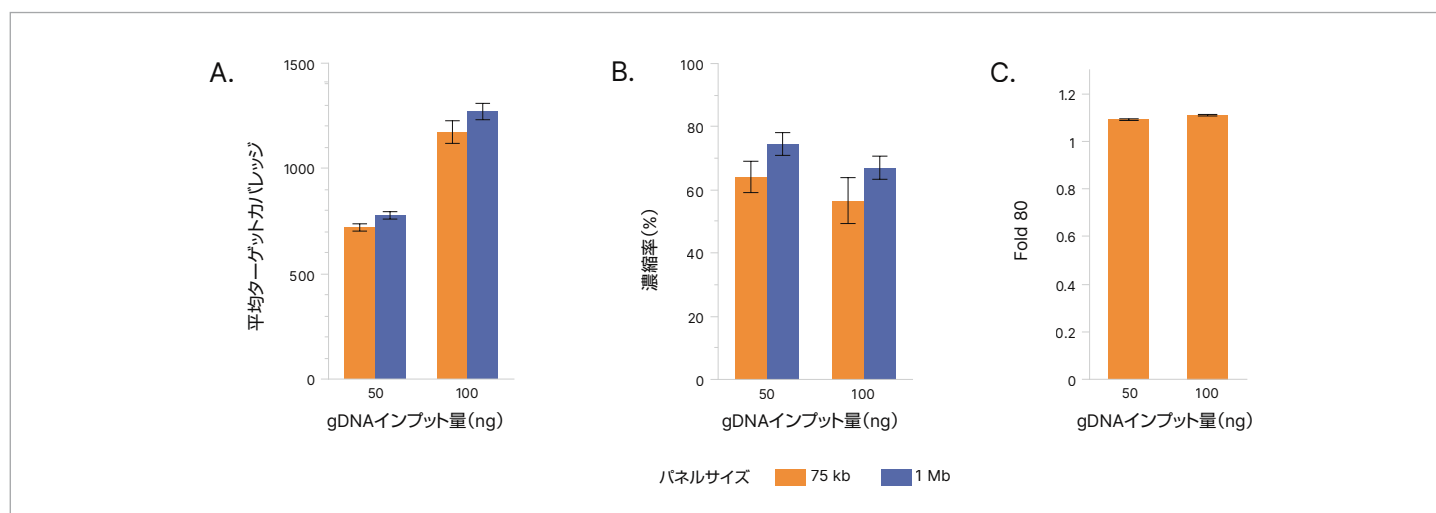


図8: gDNAに対する対象領域の高いカバレッジと均一性

バリエーションコール用に50 ngまたは100 ngのNA12878ゲノムDNA (gDNA) に5%のNA12877 gDNAを添加して調製したIllumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentライブラリーの (A) 平均ターゲットカバレッジ、(B) 濃縮率、(C) fold-80塩基ペナルティ。ライブラリーは、Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment向けに設計されたIllumina Custom Enrichment Panel v2を用いて濃縮し、ゲノムの75 kb (オレンジ) または1 Mb (青色) をターゲットとしました。75 kb濃縮ライブラリーは、NextSeq 2000システムでシーケンスし、データは200万クラスター (400万ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。1 Mb濃縮ライブラリーはNovaSeq Xシステムでシーケンスし、データは2,500万クラスター (5,000万ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。二次解析はDRAGEN Enrichment v4.4.6を使用して実施しました。平均ターゲットカバレッジおよび濃縮率はUMIのcollapsing後に算出しました。

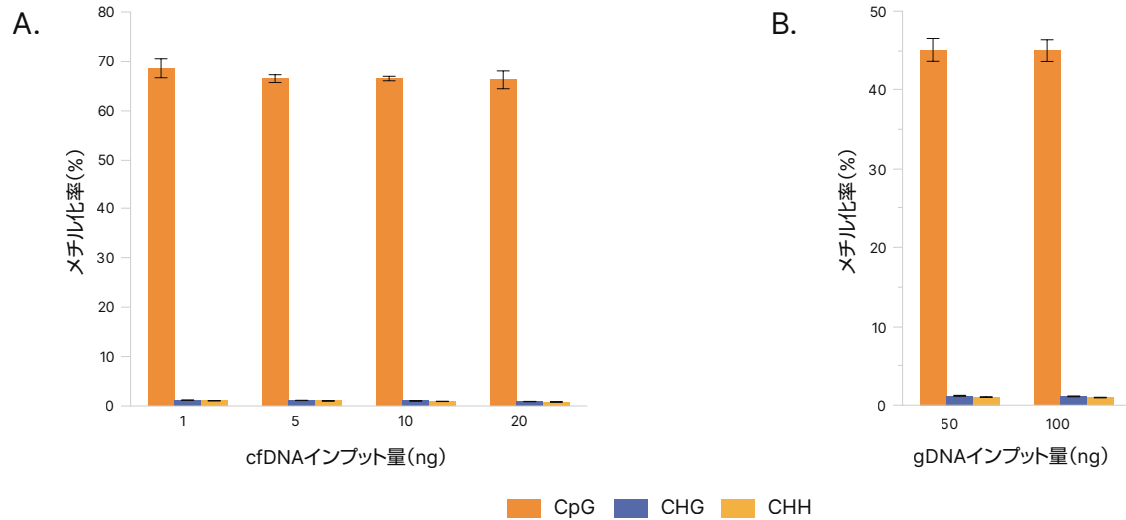


図9: Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentを用いた各サンプルタイプとDNAインプット量に対する正確なメチル化検出

CpG、CHG、CHHゲノムコンテキスト中のシトシンのメチル化率。(A) イルミナ5-baseライブラリーは、健康ドナー血清から抽出したcfDNAを1~20 ngインプットとして調製し、(B) リファレンスヒトゲノムサンプルNA12878由来のgDNA 50 ngおよび100 ngにNA12877を5%添加して調製しました。75 kbパネルでターゲットとしたCpGサイトについて、cfDNAおよびリファレンスgDNAサンプルタイプの全体の平均CpGメチル化を示します。非常に低いレベルのバックグラウンドでのCHGおよびCHHメチル化が観察されました。ライブラリーはNextSeq 2000またはNovaSeq Xシステムでシーケンスしました。二次データ解析はDRAGEN Enrichment v4.4.6で実施しました。

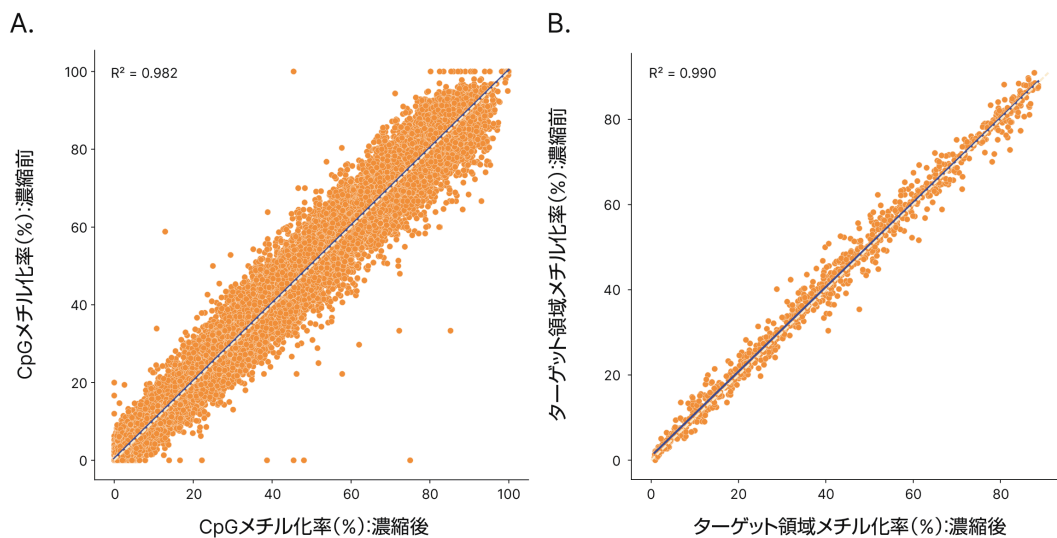


図10: さまざまなメチル化レベルにわたってターゲット領域をバイアスなく捕捉

濃縮後ライブラリーと濃縮前ライブラリーの間には強い相関が認められました。(A) すべてのターゲット化したCpG位置における測定したメチル化レベル ($R^2 = 0.982$, 傾き = 1.00)、および (B) ターゲット領域全体における平均メチル化レベル ($R^2 = 0.990$, 傾き = 0.99)。ライブラリーは、10 ngのnpDNAから調製し、Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment向けに設計された1 MbのIllumina Custom Enrichment Panel v2を用いて濃縮しました。濃縮後ライブラリーおよび濃縮前のライブラリーはNovaSeq Xシステムでシーケンスしました。二次データ解析はDRAGEN Enrichment v4.4.6で実施しました。

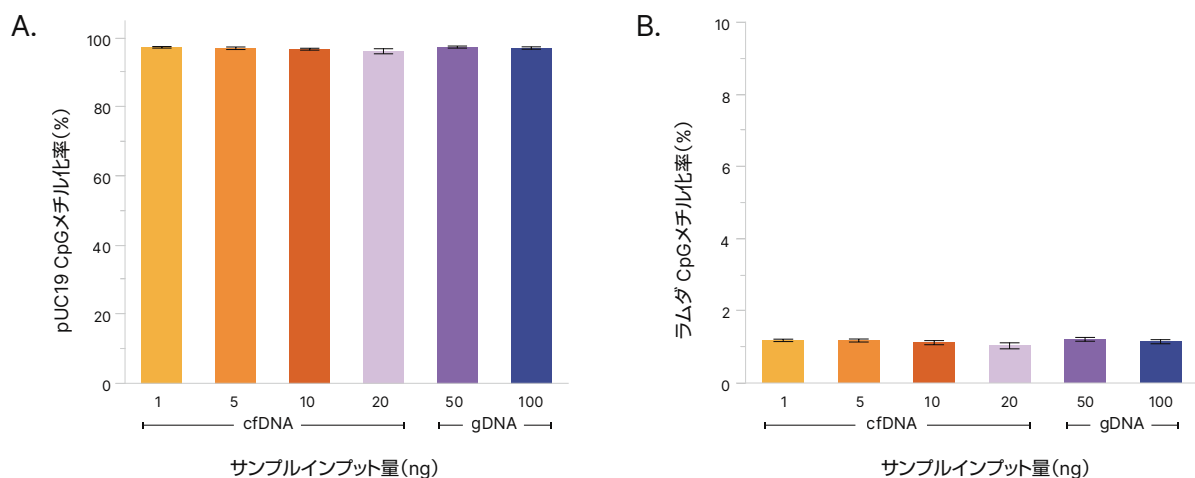


図11: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた選択的メチル化変換

幅広いサンプルインプット量とサンプルタイプに対し高い選択性と一貫性を示すメチル化変換は、幅広いアプリケーションに対応します。キットに含まれる小さなゲノムコントロールである (A) メチル化pUCと (B) 非メチル化ラムダは、メチル化変換品質管理 (QC) のために対象のサンプルに添加できます。インプット量は、健康なドナー由来の1~20 ng cfDNA、ヒトリファレンスサンプルNA12878由来の50~100 ng gDNAを使用し、NA12877 gDNAを5%添加しました。二次データ解析はDRAGEN Enrichment v4.4.6で実施しました。

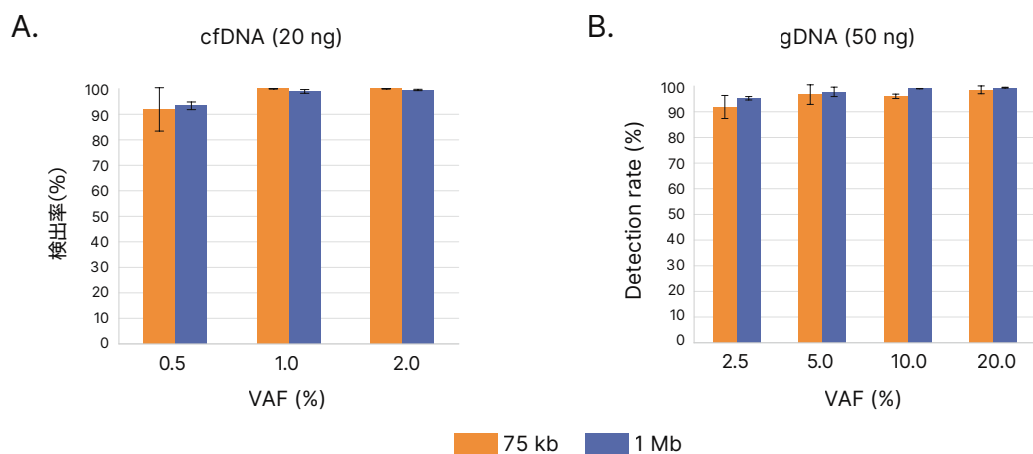


図12: Illumina 5-base DNA Prep with Enrichmentによる低頻度バリエーションの高精度な検出

(A) 0.5%、1%、2%のバリエーションアリル頻度 (VAF) を有するcfDNAを再現するために、NA12877およびNA12878由来のnpDNAを混合したサンプルから調製したライブラリー、および (B) 2.5%、5%、10%、20% VAFの真のバリエーションを得るために、NA12877およびNA12878由来のgDNAを混合したサンプルから調製したライブラリーにおけるバリエーション検出率。ライブラリーは、Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment向けに設計されたIllumina Custom Enrichment Panel v2を用いて濃縮し、ゲノムの75 kb (オレンジ) または1 Mb (青色) をターゲットとしました。75 kbパネルで濃縮した混合npDNAライブラリーをNextSeq 2000システムでシーケンスし、データは2,500万クラスター (5,000万ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。1 Mbパネルで濃縮した混合npDNAライブラリーをNovaSeq Xシステムでシーケンスし、データは2億クラスター (4億ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。75 kbパネルで濃縮した混合gDNAライブラリーをNextSeq 2000システムでシーケンスし、データは200万クラスター (400万ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。1 Mbパネルで濃縮した混合gDNAライブラリーをNovaSeq Xシステムでシーケンスし、データは2,500万クラスター (5,000万ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。バリエーションコールはDRAGEN v 4.4.6を用いて実施しました。

まとめ

Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、ライブラリーから解析までのソリューションを提供し、最適化された1回のアッセイでゲノムとメチロームの同時プロファイリングを実現します。カスタム濃縮パネルデザインにより、対象領域を絞ったシーケンスが可能です。Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichmentは、cfDNAからの高感度なメチル化解析とバリエーションコール、さらにゲノムDNAからの体細胞バリエーションコールを可能にし、各リードから最大限の洞察を引き出します。

詳細はこちら →

[Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment](#)

製品情報

Product	カタログ番号
ライブラリー調製	
Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment (24 samples)	20140366
Illumina 5-Base DNA Prep with Enrichment (96 samples)	近日発売予定
パネル	
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (32 µl, 120 bp)	20073953
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (384 µl, 120 bp)	20073952
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (1536 µl, 120 bp)	20111339
インデックス	
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples)	20091660
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
解析	
Illumina DRAGEN server v4	20051343
Illumina Analytics - 1 iCredit	20042038
Illumina Analytics Starter Package - 1000 iCredits	20042039
Illumina Analytics - 5000 iCredits	20042040
Illumina Analytics - 50,000 iCredits	20042041
Illumina Analytics - 100,000 iCredits	20042042

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

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

© 2026 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。

illumina[®]