

Illumina Complete Long Read Prep, Human

ロングリードでのヒト全ゲノムシーケンスに対応した高性能かつ拡張性のあるソリューション

- 同一装置からの、ロングリードとショートリード両方を用いた包括的なヒトWGS
- 非常に正確で信頼できる結果を得るための、最適化されたライブラリー調製と解析性能
- わずかなDNAインプットしか必要としない、1日で実施可能な自動化対応ワークフロー

illumina®

はじめに

次世代シーケンサー (NGS) により、サイエンティストがゲノムを解読し、より深く生物学を理解することが可能となっています。実績のあるイルミナ Sequence by Synthesis (SBS) ケミストリーと受賞歴のある DRAGEN™ 二次解析との組み合わせから、非常に高い精度で全ゲノムシーケンス (WGS) データが生み出されます。¹ DRAGEN 解析の最新の進歩により、最もマッピングが難しい遺伝子に残るギャップが埋められつつあります。^{2,3} それでもなお、非常にわずかな遺伝子領域では、より長いリード長を活用することで、これら困難な領域の正確な解析とマッピングを行うことができます。しかし、多くのロングリード対応シーケンスソリューションは多量の DNA インプットが必要で、複雑なワークフローでスループットは低く、結果がばらつくなどの悩みがあり、これらのソリューションは実用性と適用範囲に限界があります。⁴⁻⁷

ILLUMINA Complete Long Reads なら、ゲノム研究においてロングリードシーケンスをより利用しやすく、効率化できるようになります。ILLUMINA Complete Long Prep, Human は、この新しいロングリード技術に基づく最初の製品です。標準 NGS ワークフローを用いる高性能 WGS アッセイが、NovaSeq™ 6000 システムおよび NovaSeq X シリーズ上で連続的ロングリードシーケンスを生成します (図1)。効率的かつ所要時間1日のライブラリー調製プロトコルは、ハイスループット研究に対応して簡単にスケールアップでき、わずか 50 ng の DNA インプットしか必要とせず、特別な抽出、断片化、サイズ選択は不要です。

NovaSeqプラットフォームでの高品質ロングリードの生成

ILLUMINA Complete Long Read Prep, Human は NovaSeq X Plus システム、NovaSeq X システム および NovaSeq 6000 システム 対応しており、同一装置でロングリードとショートリード両方のデータが入手できます (表1)。アッセイは、他のロングリードソリューションよりも必要となるインプット DNA 量が 90% 少なく、品質の異なるサンプルから一貫性のある結果を生み出します (図2)。本アッセイは一般的な阻害剤と夾雑物に耐性があるため、血液、唾液、組織からの DNA に高い効果を発揮します。

ILLUMINA Complete Long Reads は独自のライブラリー調製アッセイ、実績のあるイルミナ SBS ケミストリー、そしてパワフルな DRAGEN 二次解析の組み合わせにより、正確性の高いロングリードデータを生成します (図3)。長い単一分子の DNA 断片に、酵素的に固有のパターン (「目印 (ランドマーク)」) を付け、その後増幅、シーケンスします。この目印からソフトウェアが繰り返し領域やマッピングが難しい領域を識別し、N50 が 5~7 kb のロングリードを生成します (図2)。ロングリードデータは目印を付けていない WGS ライブラリーと統合され、オリジナルの単一分子断片を完全かつ正確に表す連続したロングリードが産生されます。



図1: ILLUMINA Complete Long Read ワークフロー: 拡張性のある最適化されたライブラリー調製プロトコル、NovaSeq 6000 システムまたは NovaSeq X シリーズでのシーケンス、および DRAGEN 二次解析からの包括的なロングリード WGS へのアクセス。標準的な 30 × WGS ライブラリーは ILLUMINA Complete Long Read ライブラリーと別に調製、シーケンス、解析されている必要があります。

a. 最小インプットは 10 ng ですが、50 ng の DNA を推奨します。

表1: Illumina Complete Long Readアッセイ推奨サンプルスループット^{a,b,c}

300サイクル 試薬キット	フローセル あたりのサンプル	フローセル あたりの出力	ランタイム
NovaSeq 6000 システムS4試薬	4	~3 Tb	~44時間
NovaSeq Xシリーズ 10B試薬	4	~3 Tb	~24時間
NovaSeq Xシリーズ 25B試薬	10~11	~8 Tb	~48時間

- a. Illumina Complete Long Readsの約30×カバレッジを生成する、150 bp × 2でのシーケンスランが必要です。
- b. 解析には、同一サンプルからの30×カバレッジの標準的なショートリードヒト全ゲノムデータが必要です。Illumina DNA PCR-Free Prepが推奨されます。サードパーティー社製のWGSキットも互換性があります。目印を付けていないライブラリーは同時に調製またはシーケンスする必要はなく、過去のランサンプルからのFASTQファイルを使用できます。
- c. NovaSeqプラットフォームでIllumina Complete Long Readライブラリーをシーケンスすると、ランのQ30スコアがNovaSeqシステムの仕様を下回る場合があります。これはシーケンスランやライブラリーの性能の問題を示すものではありません。

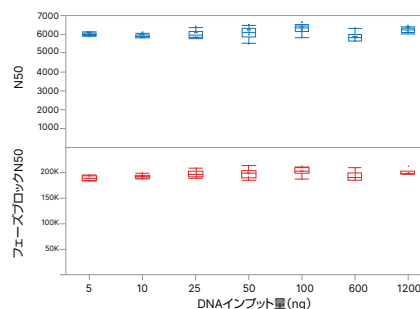


図2: Illumina Complete Long ReadアッセイはDNAインプット量が異なっても一貫性のある結果を生成: N50およびフェーズブロックN50について、5 ng~1,200 ngのDNAインプットから同様のデータ品質が生成されます。N50は、アセンブリの合計長の半分となる時の、最も短いコンティグの配列長として定義されます。フェージングブロックの大きさの測定値としても用いることができます。

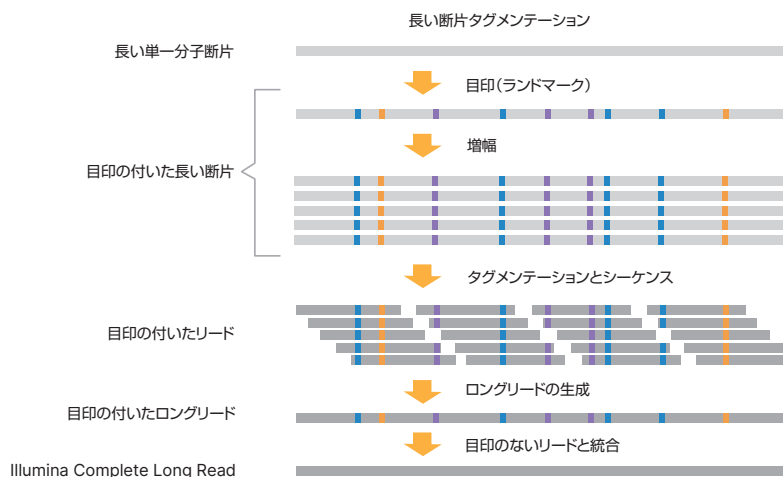


図3: Illumina Complete Long Readsアッセイの仕組み: 本アッセイはタグメンテーション[®]を用いて長いDNA断片 (> 10 kb) を生成するため、断片化またはサイズ選択は不要です。長い断片に単一分子規模で「目印 (ランドマーク)」を付けることで、断片内のロングリード情報をキャプチャーして保存します (複雑なバーコードやアダプターは不要)。目印の付いた長い断片を増幅し、2回目のタグメンテーションステップでシーケンス用のライブラリーを調製します。パワフルなDRAGENソフトウェアが解析中にロングリードを生成し、そのデータを (同一サンプルからの、別途シーケンスされた) 標準的な目印を付けていないWGSライブラリーと組み合わせ、非常に正確で完全なロングリードを生み出します。

高い正確性のWGSを利用

ILLUMINA Complete Long Readデータは標準的なショートリードのWGSデータを補完し、以下によってより包括的な全ゲノムを生み出します。

- 相関性が高いまたは繰り返し領域を含む困難かつマッピングが難しい領域におけるバリエントをコール
- 複雑な構造多型、偽遺伝子、および大きな挿入/欠失 (Indel) を解明
- バリエントのフェージングとハプロタイプのコール

ライブラリー調製にILLUMINA DNA PCR-Free Prep、そしてDRAGEN二次解析を用いて生成された高い正確性のヒトWGSデータ⁹と比べ、ILLUMINA Complete Long Readデータは、どのバリエントタイプに対してもバリエントコールの正確性が向上することを示しています (図4)。PrecisionFDA Truth Challenge v2データセットを対象とした場合、ILLUMINA Complete Long Readアッセイを用いたWGSでは精度と感度を反映するF1スコアは99.87%でした (図5)。^{9,10}

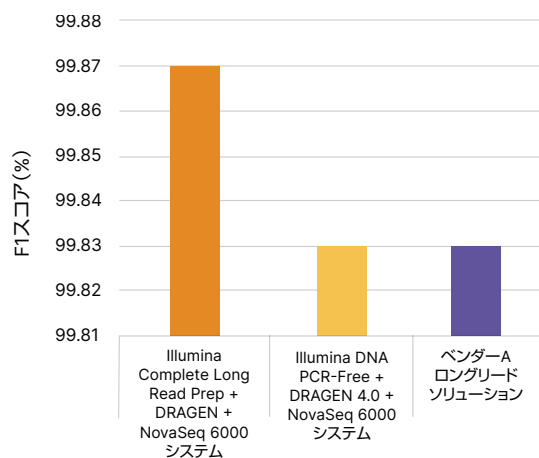


図5: 高い精度の新基準: ILLUMINA Complete Long Read Prep, Humanは、WGSでは精度と感度を反映するF1スコア (%) で判断できるように、非常に高い精度でバリエントをコールします。

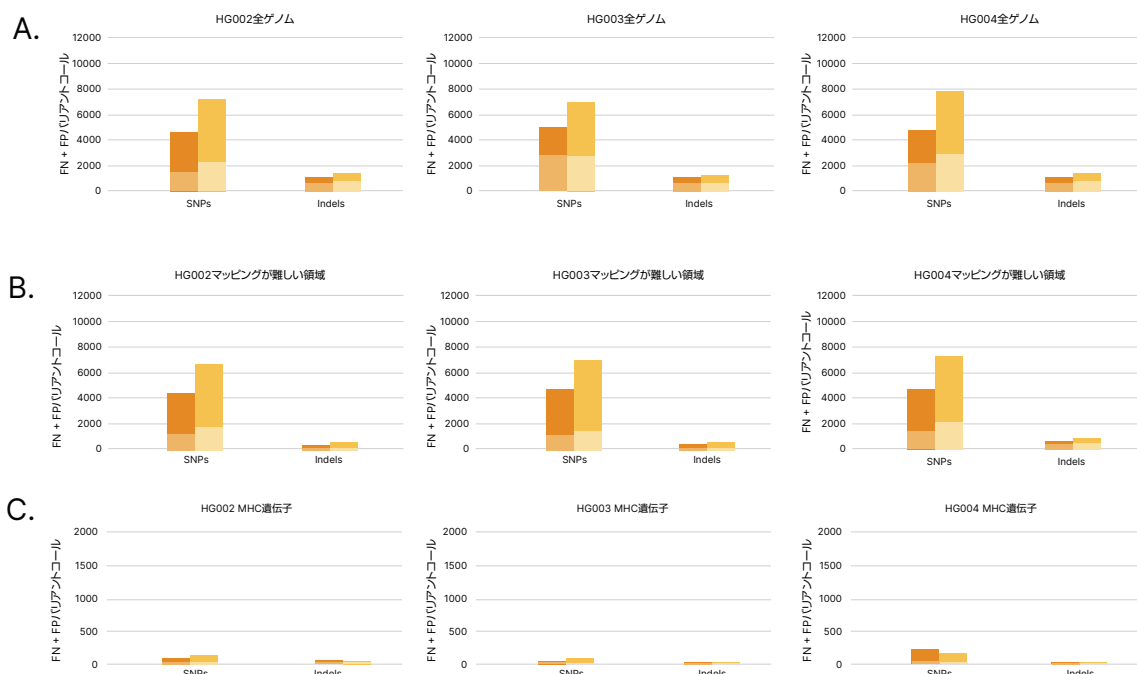


図4: ILLUMINA Complete Long Readアッセイは困難な遺伝子領域に対して高い正確性でバリエントコールを実施: Genome in a BottleのヒトリファレンスサンプルHG002、HG003およびHG004¹¹における一塩基多型 (SNP) およびIndelバリエントコールの正確性を偽陽性 (FP) および偽陰性 (FN) として測定しました。(A) 全ゲノム、(B) マッピングが難しい領域、および (C) MHC遺伝子について、ILLUMINA Complete Long Readアッセイ (オレンジ) およびILLUMINA DNA PCR-Free Prep (黄色) からのWGSデータを比較しています。

ハイスループット研究に対応する拡張性のある効率的なワークフロー

ILLUMINA Complete Long Read Prepワークフローは高い拡張性があり、多サンプルの包括的なWGSに対応します。シンプルなライブラリー調製プロトコルは所要時間約8時間（約4時間のハンズオンタイムを含む）で、必要なものは標準的なラボ用機器だけであり、簡単に自動化できます。NovaSeq X Plusシステムを用いた場合、年間最大3,000の高精度ゲノムを生成することができます。* ILLUMINA Complete Long Readsは既存のWGSデータセットを拡大する、またはより詳細なバリエーションを発見するためのリフレクションツールとして使うことができます。

まとめ

ロングリードの情報はゲノムの最も困難な領域の解明に役立ちます。ILLUMINA Complete Long Read Prep, Humanを用いることでゲノミクスラボは同一装置でロングリードとショートリードの両方を利用し、包括的なWGSを簡単に実現できるようになります。効率的で馴染みのあるワークフローと、実績のあるILLUMINA SBSケミストリーとDRAGEN解析の相乗効果によって、市販の製品中で最も拡張性が高く正確な全ゲノムを生み出します。ILLUMINA Complete Long Readsの有用性は、今後提供される製品によりさらに高まります。

詳細はこちら

[ILLUMINA Complete Long Read Prep, Human](#)

[ロングリードシーケンステクノロジー](#)

* ILLUMINA Complete Long Read Prep, HumanをNovaSeq X Plusシステム25Bフローセルデュアルフローセルランで使用した場合の、見込みのスループット。

参考文献

1. Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN Wins at Precision-FDA Truth Challenge V2 Showcase Accuracy Gains from Alt-aware Mapping and Graph Reference Genomes. illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html. Accessed January 12, 2023.
2. ILLUMINA.DRAGEN Bio-IT Platform data sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680/dragen-bio-it-data-sheet-m-gl-00680.pdf. Published 2022. Accessed February 1, 2023.
3. ILLUMINA.Accuracy improvements in germline small variant calling with the DRAGEN Bio-IT Platform. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016/dragen-v4-accuracy-app-note-m-gl-01016.pdf. Published 2022. Accessed February 1, 2023.
4. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. pacb.com/wp-content/uploads/Technical-Note-Preparing-DNA-for-PacBio-HiFi-Sequencing-Extraction-and-Quality-Control.pdf. Published 2022. Accessed January 12, 2023.
5. Pacific Biosciences.Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-checklist-Preparing-whole-genome-and-metagenome-libraries-using-SMRTbell-prep-kit-3.0.pdf. Published 2022. Accessed January 12, 2023.
6. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. store.nanoporetech.com/us/ligation-sequencing-kit110.html. Accessed January 12, 2023.
7. Pacific Biosciences. Low Yield Troubleshooting Guide. pacb.com/wp-content/uploads/Guide-Low-Yield-Troubleshooting.pdf.Published 2018. Accessed January 12, 2023.
8. ILLUMINA.Tagmentation. illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html. Accessed January 12, 2023.
9. ILLUMINA.社内資料2022.
10. PrecisionFDA.Truth Challenge V2:Calling Variants from Short and Long Reads in Difficult-to-Map Regions. precision.fda.gov/challenges/10. Accessed January 12, 2023.
11. Genome in a Bottle. National Institute of Standards and Technology. nist.gov/programs-projects/genome-bottle. Accessed January 12, 2023.

製品情報

製品	カタログ番号
Illumina Complete Long Read Prep, Human (24 samples)	20089108
Illumina Complete Long Read Prep, Human (8 samples)	20086823
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
Illumina Complete Long Read WGS App	20100421

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

© 2023 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[®]