

# Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

全ゲノムシーケンス  
アプリケーション向けの、  
高性能で迅速な統合型の  
ワークフロー

- 最適化されたライブラリー調製性能により、高精度で信頼度の高い結果を生成
- 柔軟なプロトコールにより、高感度シーケンスアプリケーションでも幅広い種類のサンプルに対応
- 少量のインプットDNAでも対応、合計時間約1.5時間の迅速で自動化対応のワークフロー

illumina®

## はじめに

次世代シーケンサー (NGS) は、ランあたりに生成できるデータの量と質を劇的に向上させ、結果を得るまでのコストと時間を削減することにより、ゲノム研究の進め方に革命をもたらしました。イルミナのシーケンステクノロジーは近年急速に進歩していますが、PCRに依存したライブラリー調製プロトコールには依然として大きな課題があります。PCRのバイアスにより、特に塩基組成が不均一な領域では、ゲノム全体にわたるカバレッジの不均一を生じる可能性があります。この課題に対処するために、Illumina DNA PCR-Free Prep Tagmentation (Illumina DNA PCR-Free) は、オンビーズタグメンテーションとPCRフリーワークフローを独自に組み合わせています (図1)。

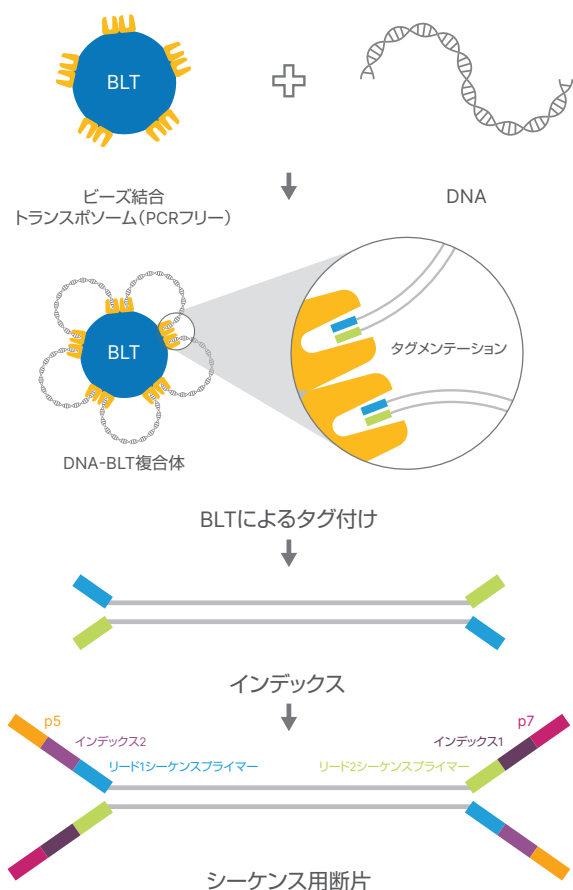


図1: Illumina DNA PCR-Freeケミストリー: サンプルライブラリーの調製とインデックス付けのための効率的なソリューション。

## 原理について

タグメンテーションは、タグ付けとDNA断片化を単一の高速反応に組み合わせる、トランスポソームを介した反応です。オンビーズタグメンテーションは、ビーズ結合トランスポソームを使用し、溶液中でのタグメンテーションと比較してより均一なタグメンテーション反応を実施します。ビーズ結合トランスポソームがDNAで飽和すると、さらなるタグメンテーションは生じないため、一貫したライブラリー収量と均一なライブラリーインサートサイズが得られます。<sup>1,2</sup> さらに、Illumina DNA PCR-Freeケミストリーは、PCR増幅のステップをなくすことにより、PCRに起因するバイアスを排除し、腫瘍—正常バリアントの識別またはヒト全ゲノムシーケンス (WGS) などの高感度アプリケーションに高精度の配列情報を提供します。Illumina DNA PCR-Freeアッセイは抽出したゲノムDNA (gDNA) から90分、または血液や唾液などの生サンプルから2.5時間で完了できます (表1)。

表1: Illumina DNA PCR-Freeの仕様

パラメーター	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq™ DNA PCR-Free
DNAインプットの種類	gDNA、血液、唾液、プラスミド、乾燥血液スポット	gDNA
DNAインプット量	25 ng~300 ng <sup>a</sup>	1~2 µg
断片化手法	オンビーズタグメンテーション	Covaris超音波処理
サンプルマルチプレックス	384種類のデュアルインデックス <sup>b</sup>	96種類のデュアルインデックス
対応するシーケンスシステム	MiniSeq™システム、MiSeq™システム、NextSeq™ 550システム、NextSeq 1000システム、NextSeq 2000システム、NovaSeq™ 6000システム、NovaSeq Xシステム	すべてのイルミナシーケンスシステム
合計ワークフロー時間 <sup>c</sup>	~90分 <sup>d</sup> (抽出gDNA) ~2.5時間 (生の血液または唾液)	~11時間
インサートサイズ <sup>d</sup>	450 bp	350 bpまたは550 bp

a. Illumina DNA PCR-Freeの最大インプット量は2 µgです。

b. マルチプレックス化されたライブラリー間のばらつきを軽減するためのインデックス補正については、[\[Balancing sample coverage for whole-genome sequencing\]](#) を参照してください。

c. ワークフローの合計時間には、DNAの抽出と定量、タグメンテーション、ライブラリーリングのステップが含まれます。

d. 飽和量のインプットgDNA (300 ng) を用いた時のワークフロー時間。

e. インサートサイズを350 bpまたは550 bpに調整する方法の詳細については、[\[Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation\]](#) を参照してください。

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。

## ヒトWGSの非常に均一な全ゲノムカバレッジ

カバレッジの均一性は、シーケンスランのゲノム全体にわたるデータの包括性の指標です。均一なカバレッジにより、平均深度から離れたバリエーションもより正確にコールすることができます。<sup>3</sup> さまざまなGCコンテンツにわたるカバレッジ性能を評価するために、Illumina DNA PCR-FreeおよびTruSeq DNA PCR-Freeからノーマライズしたカバレッジデータをヒトゲノムコンテンツに対してGCの割合ごとにプロットしました。ヒトゲノムデータの大部分は20~70%のGC配列で構成されています。どちらのキットも、ヒトWGSデータで表されるように幅広いGCコンテンツにわたって均一なカバレッジレベルを示すことから(図2)、Illumina DNA PCR-FreeがヒトWGSアプリケーションに非常に適していることが示されました。

## 高GC領域または高AT領域でも均一なカバレッジ

ヒトゲノム転写の構造要素により、ヒト遺伝子プロモーター領域はGCリッチまたはATリッチであることが多く、PCRでの増幅が困難な場合があります。<sup>4</sup> PCRを含まないキットを使用して調製したヒトWGSライブラリーは、GCリッチなプロモーター領域でカバレッジが改善する可能性があります。Illumina DNA PCR-Free、TruSeq DNA PCR-Free、およびTruSeq DNA Nano (PCRを含む) のカバレッジ性能を比較するために、ヒト細胞株NA12878のgDNA (Coriell Institute) からライブラリーを調製しました。すべてのライブラリーはHiSeq™システム\*、150 bp × 2のラン構成でシーケンスしました。データは32~40 ×カバレッジまでダウンサンプリングしました。TruSeq DNA Nanoデータと比較して、Illumina DNA PCR-FreeのデータセットとTruSeq DNA PCR-Freeのデータセットはともに、ヒトのRNPEL1遺伝子の高GCギャップ領域にわたって優れたカバレッジを示しました(図3)。Illumina DNA PCR-Freeを使用すると、困難な領域全体のカバレッジが向上します。

\* HiSeqシステムの取扱いは終了しています。ただし、掲載した情報は、表1にリストされたその他のシステムに適用されます。

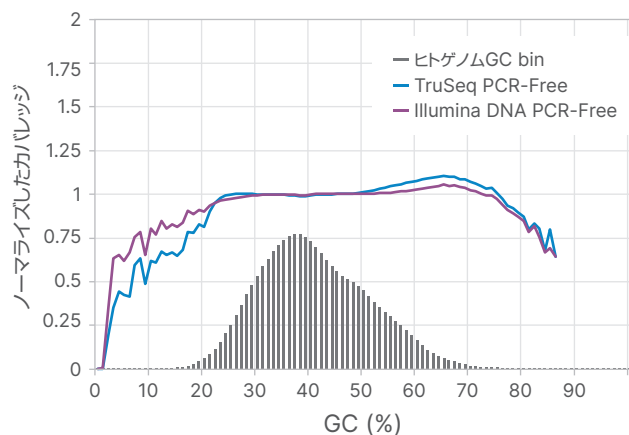
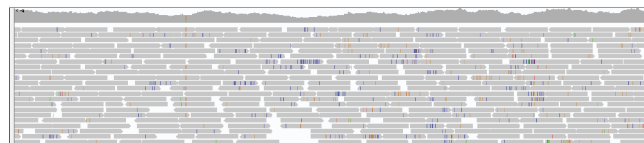
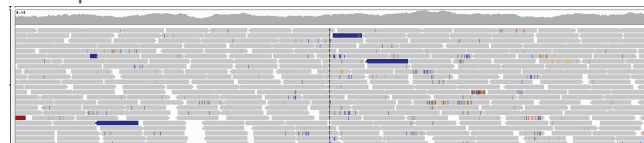


図2: Illumina DNA PCR-Freeカバレッジの均一性: Illumina DNA PCR-Freeは、ヒトゲノムの幅広いGCコンテンツにわたって均一なカバレッジを提供します。

### Illumina DNA PCR-Free



### TruSeq PCR-Free



### TruSeq Nano

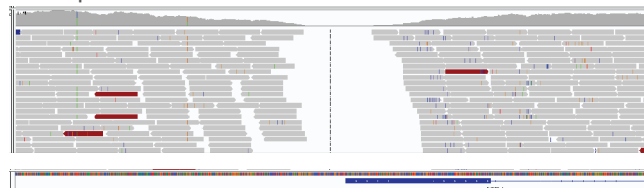


図3: GCリッチ領域全体のリードカバレッジの比較: TruSeq DNA PCR-FreeおよびTruSeq DNA Nano Library Prep Kitとの比較では、Illumina DNA PCR-Freeは、ヒトRNPEL1遺伝子のGCリッチプロモーター領域全体で優れたリードカバレッジを提供します。リードマップは、BaseSpace™ Sequence Hubで利用可能なIntegrative Genomic Viewer (IGV) Appで視覚化しました。

## 幅広いDNAインプット量にわたる優れた性能

ILLUMINA DNA PCR-Freeの性能を、さまざまなDNAインプット量で評価しました。ライブラリーはヒト細胞株gDNA (Coriell Institute、カタログ番号: NA12878) から調製し、TruSeq DNA PCR-Freeでは600 ng、ILLUMINA DNA PCR-Freeでは20~200 ng<sup>†</sup> のインプット量を使用しました。ライブラリーはNovaSeq 6000システム、150 bp × 2のラン構成でシーケンスし、40 ×の平均カバレッジにダウンサンプリングしました。クオリティスコア、ベースコーリング、およびバリエーションコーリングのメトリクスを比較しました。各ライブラリータイプからのデータは非常に正確であり、NovaSeq 6000システム上で85%以上がQ30以上の塩基スコアを示しました (図4A)。また、データセットは、常染色体とエクソンの両方内で同等のベースコーリング性能および同等のバリエーションコーリングを示しました (図4B)。また、わずか20 ng<sup>†</sup> のインプット量を含むすべてのDNAインプット量でのデータクオリティ、ベースコーリング性能およびバリエーションコーリングも同等でした。

## オンビーズタグメンテーションおよびPCRフリープロトコール

ILLUMINA DNA PCR-Freeは、オンビーズタグメンテーションとPCRフリーケミストリーを活用したユニークで強力な組み合わせを提供します。ILLUMINA DNA PCR-Freeのオンビーズ飽和点は、gDNA 300 ng以上です。オンビーズ飽和により、ロバストなインサートサイズ制御と300 ngを超えるDNAインプット量からノーマライズされた収量を得ることが可能になります。このプロトコールにより、ライブラリー調製前後の定量ステップが最小限に抑えられます。ノーマライズされたライブラリーは容量でプールができるため、時間のかかるライブラリー定量を回避できます。ILLUMINA DNA PCR-Freeは、定量とPCRステップをなくしたため、効率化された90分間のアッセイとなっています (図5)。ノーマライゼーションはインプット量が150 ng以上の時のみ達成されますが、解析可能な高性能ライブラリーはわずか20 ng<sup>†</sup>のインプットDNAからでも生成できます。少ないDNAインプットからPCRフリーのライブラリー調製を実行できるため、乾燥血液スポットから、WGSなどの新しいアプリケーションが可能になります。

† ILLUMINA DNA PCR-Freeの最大インプット量は2 µgです。

## ハイスループットアプリケーション向けの効率的なサンプルマルチプレックス

ILLUMINA DNA PCR-Freeは、ILLUMINA DNA Unique Dual Indexesとともに使うことで、ILLUMINAシーケンスシステムでのサンプルの正確なマルチプレックスが可能になります。最大384種類のインデックスにより、ハイスループットのシーケンスプロジェクトに最大限の柔軟性が提供されます。

## 自動化対応ワークフロー

ILLUMINA DNA PCR-Freeは、迅速かつシンプルなワークフローであるため、自動化と高い親和性があります。ビーズベースのワークフローの一貫性と自己ノーマライゼーションにより、血液または唾液の生サンプルから開始し、ILLUMINA Lysisプロトコールを実行して、定量ステップなしでライブラリー調製に進むことができます。これらの性能により、自動分注機プラットフォームで生サンプルの自動化バッチ処理を行う簡単なワークフローが可能になります。

自動化による効率化を実証するために、TruSeq DNA PCR-Freeの自動化ワークフローと競合他社2社の酵素ベースのPCRフリーワークフローをILLUMINA DNA PCR-Freeと比較しました。ハミルトン自動分注機ロボットを使用した、96サンプルバッチのライブラリー調製に必要なタッチポイント、ラボウェア、チップ数、および時間を、ワークフローごとに計算しました。比較すると、ILLUMINA DNA PCR-Freeは大幅に時間を節約できることが示されました (表2)。

## ILLUMINA DNA PCR-Freeでコストを削減

ラボウェア、チップ、qPCR試薬は、NGS用のライブラリーを調製する際の追加コストの原因となります。ビーズベースのテクノロジーの主な利点は、バッチで調製されたすべてのライブラリーを自動的にビーズベースでノーマライズできることです。この自己ノーマライゼーションにより、個々のライブラリーの定量が不要になり、等量をプールするシンプルなライブラリープーリングが可能になります。マルチプレックス化されたライブラリー間でのインデックス特異的な性能の変動を補正する方法については、テクニカルノート『Balancing sample coverage for whole-genome sequencing』を参照してください。

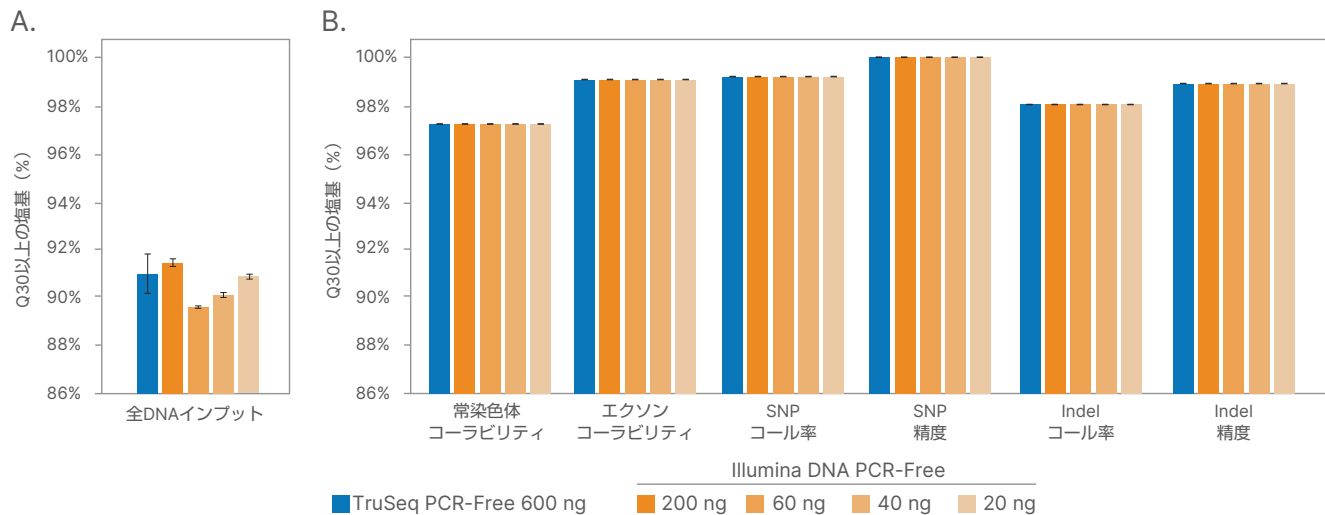


図4:さまざまなDNAインプット量に及ぶIllumina DNA PCR-Free Prep性能:さまざまなDNAインプットから調製したIllumina DNA PCR-Freeライブラリーは、(A) すべてのDNAインプットに対する品質仕様に合格し、(B) 同等のコーラビリティ性能を示しています。Q30スコア:99.9%の推定ベースコール精度。常染色体コーラビリティ:ジェノタイプコールをパスした常染色体中のN以外のリファレンス位置の割合。エクソンコーラビリティ:ジェノタイプコールをパスしたエクソン中のN以外のリファレンス位置の割合。SNP:1塩基多型。Indel:挿入欠失変異。精度(正確さ):[真陽性コール数/(真陽性コール数+偽陽性コール数)]の割合として計算。コール率(感度):[真陽性コール数/(真陽性コール数+偽陰性コール数)]の割合として計算。

TruSeq DNA PCR-Free		
アダプターライゲーションとインデックスタグ付けによるライブラリー調製	手動によるライブラリー定量とノーマライゼーション	手作業ブローニング
5時間	2時間	0.5時間

K社		
K社ワークフローによるライブラリー調製	手動によるライブラリー定量とノーマライゼーション	手作業ブローニング
~2.5時間	2時間	0.5時間

N社		
N社ワークフローによるライブラリー調製	手動によるライブラリー定量とノーマライゼーション	手作業ブローニング
~2.5時間	2時間	0.5時間

Illumina DNA PCR-Free、血液または唾液		
Illumina Lysis Kit	PCRフリーのビーズ結合タグメンテーションによるライブラリー調製	容量によるブール
~1.5時間	1.5時間	0.5時間

Illumina DNA PCR-Free、gDNA	
PCRフリーのビーズ結合タグメンテーションによるライブラリー調製	容量によるブール
1.5時間	0.5時間

図5: Illumina DNA PCR-Freeワークフロー: Illumina DNA PCR-Freeワークフローは、断片化またはタグメンテーションからライブラリーのクリーンアップまで、合計90分の迅速アッセイ時間を実現します。社内資料 Illumina, Inc. 2019.ご注意: N社は、イルミナアダプターと組み合わせた独自の試薬を使用しています。

表2: 96サンプル分の自動化に使用した消耗品<sup>a</sup>

メソッド	サンプルの種類	タッチポイント	96サンプルプレート	チップ	時間
TruSeq DNA PCR-Free	gDNA	20	20	5,504	10時間10分
K社	gDNA	13	19	4,076	6時間21分
N社	gDNA	13	17	3,266	5時間42分
Illumina DNA PCR-Free (+ オプションのqPCR定量プール)	血液、唾液	2 (6)	10 (12)	2,016 (2,072)	2時間32分 (4時間7分)
Illumina DNA PCR-Free (+ オプションのqPCR定量プール)	gDNA	2 (6)	8 (10)	1,604 (1,660)	1時間32分 (3時間7分)

a. 96コアヘッド + 8チャンネル自動分注システムでHamilton Star用のHamiltonソフトウェアを使用してモデル化されています。qPCRは、サンプルごとにすべてのワークフローの自動化モデリングに含まれています。Illumina DNA PCR-Free以外のワークフローでは、各サンプルはqPCRで測定、調整、プールされることを想定しています。サンプルプーリングは、24サンプルからなる4つのプールに基づいています。社内資料 Illumina, Inc. 2019.ご注意: N社は、イルミナアダプターと組み合わせた独自の試薬を使用しています。

PCRフリーライブラリーは通常qPCRで定量されますが、Illumina DNA PCR-Freeはライブラリー調製プロトコルは全体に渡り（例: PCRライブラリーの増幅およびライブラリー調製後の定量）qPCRを排除または大幅に削減します。qPCR試薬、ラボウェア、定量試薬、チップ、サードパーティー製抽出キットを含む追加コスト試算から、Illumina DNA PCR-Freeワークフローでは大幅に節約できることがわかります。<sup>5</sup> 例えば、追加コストは、TruSeq PCR-Freeワークフローでは総コストの約56%、競合他社の酵素ベースのPCRフリーキットでは約44%を占める可能性があります。<sup>‡</sup> Illumina DNA PCR-Freeワークフローの場合、追加コストはわずか約21%であり、他のライブラリー調製キットと比較して大幅な削減となります。<sup>†</sup>

## まとめ

Illumina DNA PCR-Freeは、オンビーズタグメンテーションとPCRフリーケミストリーステップを活用したユニークな組み合わせを提供します。オンビーズタグメンテーションにより、ビーズベースのノーマライゼーション、簡単な容量ベースのライブラリープーリング、およびライブラリー定量前後のステップが排除されます。PCRフリーのワークフローは、ワークフローを簡素化して全体の時間を短縮すると同時に、リピートや不均一なゲノム領域全体にわたって非常に均一なカバレッジを提供します。ワークフローに統合されたFlex Lysis Reagent Kitは、生サンプルインプットとしての血液、唾液、乾燥血液スポットに使うことができます。Illumina DNA PCR-Freeは、ヒトWGS、微生物ゲノムの*de novo*アセンブル、または腫瘍-正常バリアントコールなどの高感度アプリケーションに対して、優れた使いやすさ、均一なカバレッジ、高精度のデータを提供します。

## 詳細はこちら

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

† ライブラリー調製キットのコストは、この計算に一致します。追加コストは変動し、ワークフローの想定に基づいて総コストの割合として計算されています（表2）。



## 製品情報

製品	カタログ番号
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 samples)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 samples)	20041795
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 Lysis Reagent Kit	20042221

## 参考文献

1. Illumina. Illumina DNA Prep. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf). Published 2020. Accessed September 1, 2023.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722. Published 2018 Oct 1. doi:10.1186/s12864-018-5096-9
3. Illumina. Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits. [illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote\\_truseq\\_comparison.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote_truseq_comparison.pdf). Published 2013. Accessed January 31, 2022.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-125.
5. Data on file. Illumina, Inc., 2019.

## 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](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illuminakk](https://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](http://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](http://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**<sup>®</sup>