

# illumina Complete Long Read Prep, Human

ロングリードのヒト全ゲノム  
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、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
- 最適化されたライブラリー調製と解析性能で、非常に正確で信頼できる結果を提供
- 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) は、ゲノムを解読し、より深く生物学を理解することを可能にしています。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。<sup>1</sup> 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の残された隙間が埋められつつあります。<sup>2,3</sup> それでもなお、より長いリード長を活用すれば正確な解析とマッピングを行うことができる遺伝子領域がわずかに残っています。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インプット要件、複雑なワークフローでロースルーブットおよび変動性の高い結果により、実用性と採用に限界があります。<sup>4-7</sup>

Illumina Complete Long Readは、ロングリードシーケンスへのアクセスを可能にし、効率化します。Illumina Complete Long Read Prep, Humanは、この新しいロングリードテクノロジーに基づいた初めての製品です。標準NGSワークフローを用いるWGS用の高性能アクセシビリティが、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、ハイスルーブ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シーケンスシステムに対応しており、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)。このフレキシブルなアクセシビリティは、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)。本アクセシビリティ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 Readは専用のライブラリー調製アクセシビリティ、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二次解析が一体となって、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 (すなわち「目印」) 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がマッピング困難な領域かを識別でき、5~7 kbのN50を含む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のないショートリード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二次解析から包括的なロングリードWGSが入手できます。標準的な30 × WGSライブラリーはIllumina Complete Long Readライブラリーで調製、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アッセイに推奨されるサンプルスループット<sup>a,b,c</sup>

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	11	~8 Tb	~48時間

- a. Illumina Complete Long Read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。目印の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、ランの報告されるQ30スコアがNovaSeq仕様を下回る場合があります。これは、シーケンスランまたはライブラリー性能の問題を示すものではありません。

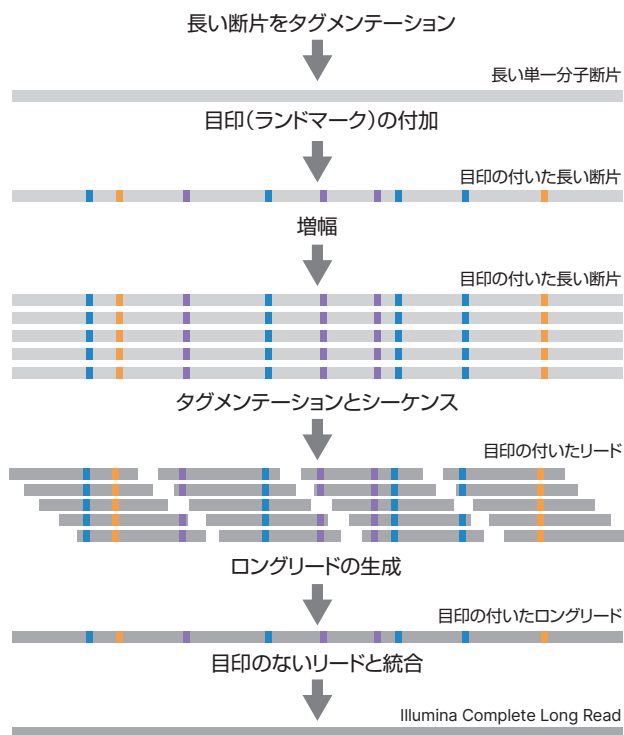


図3: Illumina Complete Long Readアッセイの仕組み: 本アッセイはタグメンテーション<sup>8</sup>を用いて長いDNA断片 (10 kb以上) を生成するため、断片化またはサイズ選択は不要です。長い断片に単一分子規模で「目印」を付けることで、断片内のロングリード情報を捕捉して保存します (複雑なバーコードやアダプターは不要です)。目印の付いた長い断片を増幅し、2回目のタグメンテーションステップでシーケンス用のライブラリーを調製します。強力なDRAGENソフトウェアが解析中にロングリードを生成し、そのデータを (同一サンプルからの、別々にシーケンスされた) 標準的な目印のない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。

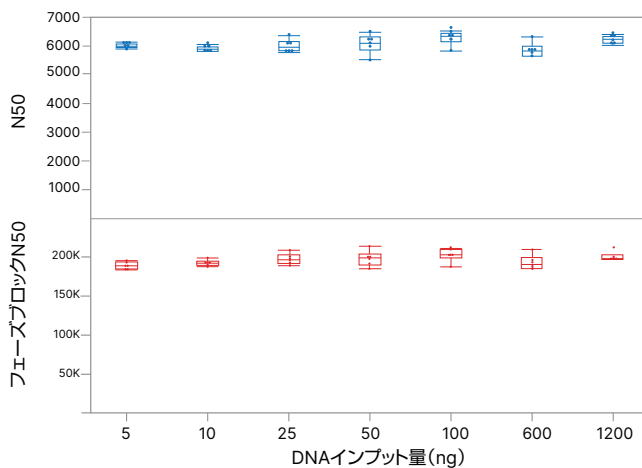


図2: Illumina Complete Long Readアッセイはあらゆる量のDNAインプットから一貫性のある結果を生み出します: N50およびフェーズブロックN50について、5 ng~1,200 ngのDNAインプットから同様のデータ品質が生成されます。N50はアセンブリの合計長の半分となる時の最も短いコンティグの配列長として定義されます。フェージングブロックの大きさの測定値としても用いることができます。

## 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。

- 相同性が高いまたは繰り返し領域を含むマッピング困難な領域の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) を分解
- バリエントのフェージングとハプロタイプのコール

ライブラリー調製用のILLUMINA DNA PCR-Free Prepおよび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<sup>3</sup>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の向上を示しています (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では精度とコール率を反映するF1スコアは99.90%でした (図5)。<sup>9,10</sup>

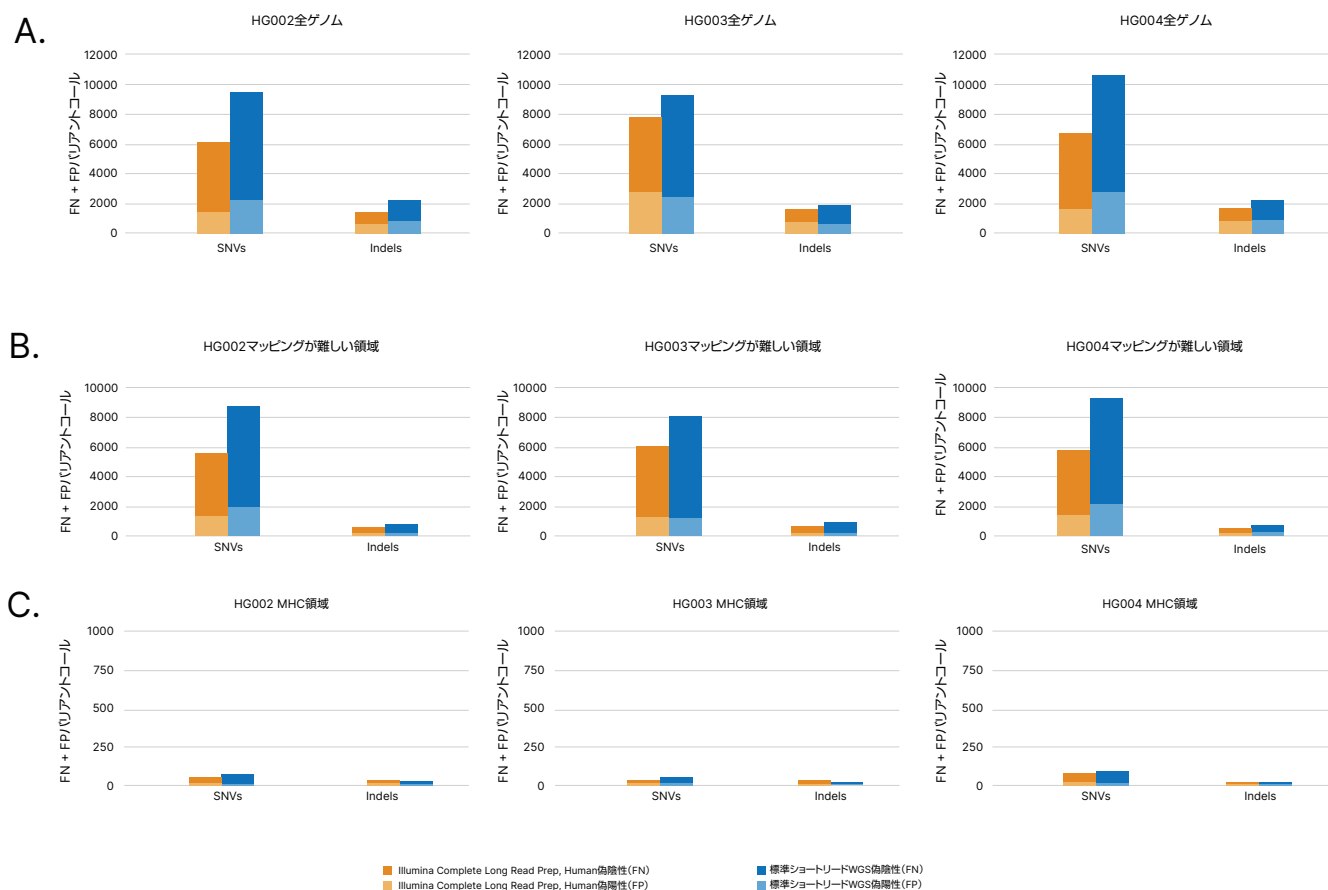


図4: ILLUMINA Complete Long Readアッセイは困難な遺伝子領域に対して高い正確性でバリエントコールを実施します: Genome in a BottleのヒトリファレンスサンプルHG002、HG003およびHG004<sup>11</sup>における一塩基多型 (SNP) およびIndelバリエントコールの正確性を偽陽性 (FP) および偽陰性 (FN) として測定しました。(A) 全ゲノム、(B) マッピングが難しい領域、および (C) 主要組織適合複合体 (MHC) 領域について、ILLUMINA Complete Long Readアッセイ (オレンジ) およびILLUMINA DNA PCR-Free Prep (青) からのWGSデータを比較しています。

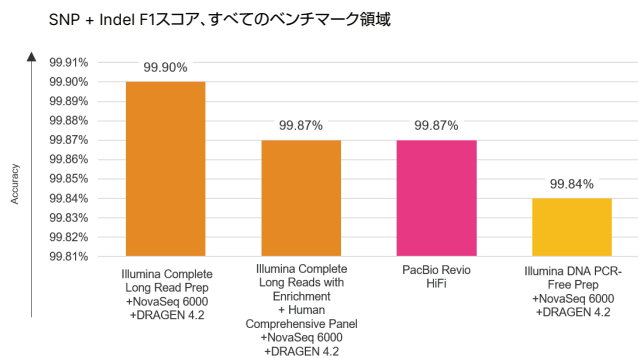


図5：精度における新基準：Illumina Complete Long Read Prep, Humanは、F1スコア（%）（WGSの精度とコール率を反映）によって判断されるとおり、バリエーションコールに対して非常に高い精度を生み出します。PrecisionFDA Challenge v2ベンチマークサンプルHG002を使用して生成されたデータ。

## 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、多くのサンプルの包括的なWGSに対応します。サンプルライブラリー調製プロトコルの所要時間は約8時間（5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、ユーザーは1年あたり最大3,000の高精度なゲノムを生成することができます。<sup>\*</sup> Illumina Complete Long Read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析に役立ちます。Illumina Complete Long Read Prep, Humanを用いることで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イルミナSBSケミストリーとDRAGEN解析の相乗効果によって、市場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。

<sup>\*</sup> Illumina Complete Long Read Prep, HumanをNovaSeq X Plusシステム、25Bフローセルを用いた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。

## 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](#)

### 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 Analytics - 1 iCredit	20042038

## 参考文献

1. Mehio R, Ruehle M, Catreux S, et al. DRAGEN wins at PrecisionFDA Truth Challenge V2 showcase accuracy gains from alt-aware mapping and graph reference genomes. <https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/dragen-wins-precisionfda-challenge-accuracy-gains.html>. Published November 9, 2020. 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](https://www.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](https://www.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](https://www.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. <https://www.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](https://www.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](https://www.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](https://www.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/tagmentation.html). Accessed January 12, 2023.
9. Illumina. Data on file. 2022.
10. PrecisionFDA. Truth Challenge V2: Calling Variants from Short and Long Reads in Difficult-to-Map Regions. [precision.fda.gov/challenges/10](https://www.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](https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle). Accessed January 12, 2023.

## 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](https://jp.illumina.com/tc)

© 2024 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](https://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。

