

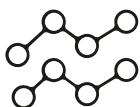


MiSeqTM i100シリーズを 使用したライブラリーQC

ハイスループットシステムでのシーケンス前に
ライブラリー品質評価とライブラリープーリング
最適化を提供



迅速かつ柔軟なシーケンスにより、効率的なライブラリー品質管理を即日実施可能



自動オンボード計算に導かれたシンプルなライブラリーリバランス



検出されるインデックスの割合の高い相関性により、ハイスループットシステムで
生成された結果の信頼度を向上

はじめに

ハイスループットシーケンスの効率を最大化するには、開始ライブラリーの品質を知ることが重要です。低品質なライブラリーは、大規模なシーケンスプロジェクトの成功を阻害し、コストと時間を要する反復実験につながります。蛍光光度法やqPCRによるライブラリー定量/定性といったライブラリー品質管理（QC）を実施するための従来の方法は、機能的なアッセイではなく、目的のライブラリーが正しいインデックスを使って調製されたかどうかを評価できません。MiSeq i100シリーズは、NovaSeq™ 6000システムまたはNovaSeq Xシリーズでフルスケールのランを実行する前にライブラリー品質の迅速かつ機能的なアッセイが可能であるため、時間と費用を節約しつつ、良い結果につながります。

MiSeq i100シリーズは、シンプルかつ効率的なワークフローを使用して詳細な品質メトリクスを迅速に生成します。これらのメトリクスは、ライブラリー調製の失敗またはラン計画中のインデックスのミスアライメントのいずれかに起因するサンプルドロップアウトの検出に使用でき、プールのリバランスのための自動計算を実施し、サンプル間で均一に検出されるインデックスの割合を確保します。このアプリケーションノートでは、NovaSeq XシリーズまたはNovaSeq 6000

システムでのシーケンス前に高品質なライブラリーを得るための、MiSeq i100シリーズの迅速、シンプルかつコスト効率の良いライブラリーQCワークフローを説明します（図1）。

MiSeq i100シリーズを使用したライブラリーリバランス

MiSeq i100シリーズはライブラリーQCツールとして使用でき、ライブラリードロップアウトのスクリーニングやプール内でより均一に検出されるインデックスの割合を得るためにライブラリーをリバランスします。MiSeq i100シリーズに搭載されたオンボードソフトウェアのDRAGEN Library QCアプリv1.0.13は、自動的にシーケンスリードをデマルチプレックスし、計算を実施し、ハイスループットシーケンスシステムでのシーケンス前に行うライブラリーリバランスを導くレポートを生成します（図2）。自動リバランス計算とインデックスファーストシーケンスを組み合わせたMiSeq i100シリーズは、わずか約3.2時間でライブラリーデマルチプレックス情報を提供できます。



図2：DRAGEN Library QCアプリのライブラリーリバランス計算のレポート例

illumina

DRAGEN Reports

Demultiplex Report



Run name

DRAGEN_LibraryQC_requeue

Created on

2025-02-17 03:09

Demultiplex Stats

Top Unknown Barcodes

Index Hopping Counts

Library Rebalancing

Library Rebalancing Stats

[Download CSV](#)

Sample ID	Index 1	Index 2	Reads	% Reads	Rebalancing Factor	Rebalanced Input Volume
Sample1	TACTCATA	CCTGTGGC	7,896,538	0.2544%	1	5
Sample2	CGTCTGCG	TTCACAAT	7,005,661	0.2257%	1.1272	5.6358
Sample3	TCGATATC	ACACGAGT	7,756,899	0.2499%	1.018	5.09
Sample4	CTAGCGCT	GTGTAGAC	7,507,949	0.2419%	1.0518	5.2588

DRAGEN Library QCアプリには2つのモードがあります：FastQCおよびFull Pipeline (MiSeq i100シリーズの製品文書に概説されています)：

FastQモードはBCL Convert/デマルチプレックスのみを実行し、一次メトリクスとともにリバランス計算を提供します。

方法

ライブラリー調製

ライブラリーは、Illumina DNA PCR-Free Prep (イルミナ、カタログ番号：20041795) と Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (イルミナ、カタログ番号：20091654) および Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) (イルミナ、カタログ番号：20091656) を使用して、インプットNA12878ゲノムDNA (gDNA) (Coriell Institute for Medical Research、カタログ番号：NA12878) 300 ngからBiomek NGenius Next Generation Library Prep System (Beckman Coulter、カタログ番号：C62703) で調製しました。また、これらのライブラリーは、TruSeq™ DNA Nano (イルミナ、カタログ番号：20015965) と IDT for Illumina DNA UD Indexes v2 (96 indexes, 96 samples) (イルミナ、カタログ番号：20040870) を使用して、インプットgDNA100 ngから手動でも調製しました。

シーケンスおよびリバランス

調製したライブラリーは等量にプールし、MiSeq i100 Series 5M Reagent Kit (300 cycles) (イルミナ、カタログ番号：20126566) を使用して、MiSeq i100 Plusシステムで、24プレックス、151 bp × 2のラン構成でシーケンスしました (表1)。比較のために、同一ライブラリーを、iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle) kit (イルミナ、カタログ番号：20031371) を使用して、iSeq™ 100システムでシーケンスしました。

シーケンスデータは、ライブラリーリバランス計算を自動で実施するDRAGEN™ Library QCアプリv1.0.13を使用して、MiSeq i100 Plusシステムでオンボード解析しました。ライブラリープールは、リバランス後にNovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システムで151 bp × 2のラン構成でシーケンスし、インデックスCVを検証しました。

表1: MiSeq i100シリーズでのライブラリーQC			
パラメーター	Illumina DNA PCR-Free Prep	Illumina DNA PCR-Free Prep	TruSeq DNA Nano
オートメーション	Beckman Coulter Biomek NGeniusS	Beckman Coulter Biomek NGeniusS	手動
ゲノムDNA	CoriellヒトNA12878	CoriellヒトNA12878	CoriellヒトNA12878
DNAインプット量	300 ng	300 ng	100 ng
アダプター	Illumina Set A UDI 1-24	Illumina Set B UDI 97-120	IDT for Illumina TruSeq UDI 1-24
ローディング濃度	120 pM	120 pM	120 pM
占有率	91.59%	89.27%	91.43%
パスフィルター率	80.42%	77.20%	85.02%

結果

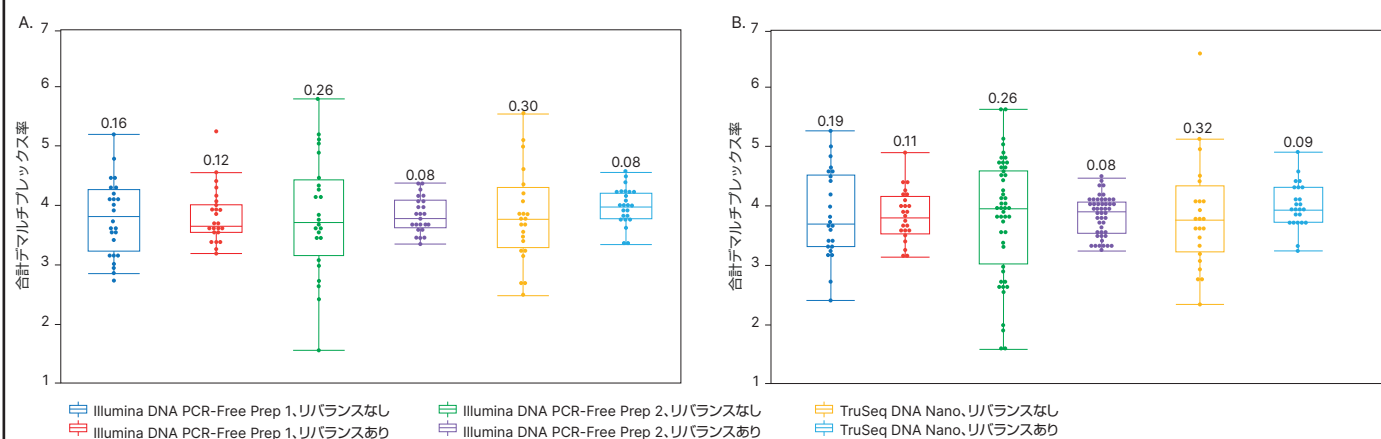
ライブラリーリバランスによるインデックスCVの向上

Illumina DNA PCR-Free PrepおよびTruSeq DNA Nanoで調製したライブラリーをMiSeq i100シリーズでシーケンスしました。ライブラリーリバランス係数は、オンボードのDRAGEN Library QCアプリv1.0.13で取得しました。リバランスしたライブラリーとリバランスしていないライブラリーを、NovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システムでシーケンスしました。結果より、NovaSeq X Plusシステム (図3A) およびNovaSeq 6000システム (図3B) の両システムについて、3つすべてのライブラリープールのリバランス後にインデックスCVの改善が認められました。

検出されるインデックスの割合のシステム間での相関

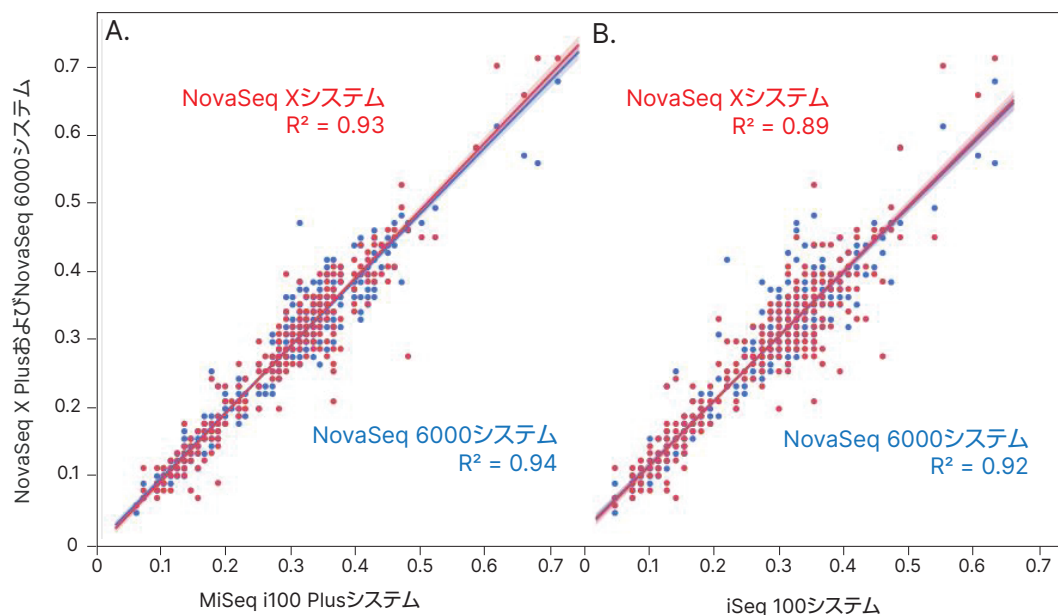
検出されるインデックスの割合のベースライン相関は、MiSeq i100 Plusシステム、iSeq 100システム、NovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システム間で評価しました。384プレックスのIllumina DNA PCR-Free Prepのライブラリープールは、Hamilton STAR自動分注機を使用してCoriellヒトNA11992 gDNAから調製しました。プールしたライブラリーのシーケンスは、MiSeq i100 Plusシステム、iSeq 100システム、NovaSeq XシステムおよびNovaSeq 6000システムで実施しました。MiSeq i100 Plusシステムから得られたデマルチプレックス情報は、NovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システムで得られたデマルチプレックス情報とR2 > 0.9 (図4A) での高い相関を示し、iSeq 100システム (図4B) から得られたデマルチプレックス情報と同等でした。

図3: MiSeq i100 Plusシリーズを使用したライブラリーリバランス



3つの24プレックスヒトライブラリープール、Illumina DNA PCR-Free Prep 1、Illumina DNA PCR-Free Prep 2およびTruSeq DNA NanoをMiSeq i100 Plusシステムでシーケンスしました。ライブラリーリバランス係数は、オンボードのDRAGEN Library QCアプリv1.0.13で取得しました。次に、リバランスしたライブラリーとリバランスしていないライブラリーをNovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システムでシーケンスしました。(A) NovaSeq X Plusシステムおよび(B) NovaSeq 6000システムの両システムについて、3つすべてのライブラリープールのリバランス後にインデックスCV (平均値は各ボックスプロットの上) の改善が認められました。

図4: 検出されるインデックスの割合の相関



(A) MiSeq i100シリーズの検出されるインデックスの割合はNovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システムとの間で高い相関を示しました。これは (B) iSeq 100システムとNovaSeq X PlusシステムおよびNovaSeq 6000システム間との相関と同程度です。

まとめ

MiSeq i100シリーズは、ライブラリーQCのための迅速、シンプルかつコスト効率の良いワークフローを提供し、わずか約3.2時間でライブラリーデマルチプレックス情報を生成します。検出されるインデックスの割合の高い相関により、特定のセットのインデックスペアに対して、ハイスループットシーケンスシステム上で検出されるインデックスの割合の予測が可能になります。ライブラリーQC機能を活用することで、NovaSeq XシリーズおよびNovaSeq 6000システムの性能を最大化することができます。

詳細はこちら

[MiSeq i100シリーズ](#)

[NovaSeq Xシリーズ](#)

[NovaSeq 6000システム](#)

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/illumina

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

© 2025 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[®]