

NextSeqTM 1000 およびNextSeq 2000システムでの 16S rRNAシーケンス

微生物群の効率的かつ
ハイスループットな特性評価

illumina[®]

微生物群研究のための16SリボソームRNAシーケンス

16SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子は、RNAからタンパク質への翻訳に関与しており、種を超えて保存されています。遺伝子自体は約1,550 bpであり、保存領域と可変領域が混在しているため、系統分類のためのシーケンスアプリケーションに役立ちます。¹ このアプリケーションノートでは、NextSeq 1000/2000試薬P1/P2 600サイクルキットを使用して16S遺伝子のV3およびV4可変領域をシーケンスするための包括的なワークフローについて説明します。シーケンス性能は、MiSeq™システムで実施するMiSeq試薬v3 600サイクルキットの確立された性能と比較しました。

NextSeq 1000/2000試薬600サイクルキットは、NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムの処理能力とシーケンス出力を拡張します。これらのキットは、他の次世代シーケンシング (NGS) プラットフォームや手法と比較し、より高いサンプルリード深度と出力をより短い時間で達成できるため、16S rRNAシーケンスに最適です。16Sメタゲノムワークフローは、ライブラリー調製、確立されたイルミナNGS、およびBaseSpace™ Sequence Hubで利用可能な16S Metagenomics Labsアプリを介したプッシュボタン操作の二次データ解析を一体化したものです。(図1)。

メソッド

IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A~Dにより、ユーザーは384の16Sライブラリーを生成できます。NextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットで384の16Sライブラリーをシーケンスすると、属レベルでの分類には十分である、サンプルあたり100,000~200,000リードが生成されます。NextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットでは合計最大1億リード、NextSeq 1000/2000 P2試薬600サイクルキットでは最大3億リードが生成されます。

ライブラリー調製

微生物のゲノムDNAサンプルは2つのソースから入手しました。American Type Culture Collection (ATCC) 20 Strain Staggered Mix Genomic Material (ATCC、カタログ番号: MSA-1003) は、グラム染色、GCコンテンツ、および孢子形成などの属性に基づいて選択された細菌株から調製されたゲノムDNAの交互分布で構成される模擬微生物群集です。さらに、カリフォルニア州スタンフォードにあるスタンフォード大学の研究者と協力して、解析のために実際の糞便サンプルを取得しました。²

16S解析用のライブラリーは、確立された16Sメタゲノムシーケンスライブラリーのワークフローに従って調製しました。16S rRNA遺伝子のV3およびV4領域のPCR増幅には、科学文献から選択した細菌のプライマーペアを用いました (表1)。³ 次に、10 µLのイルミナシーケンスアダプターと固有のデュアルインデックスバーコード (IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation, カタログ番号: 20027213) を用いて2回目のPCRを実施し、NextSeq 2000システムと互換性のあるアンプリコンを生成しました。16Sラ



図1: 16Sメタゲノミクスシーケンスワークフロー: 16Sシーケンスワークフローは、ライブラリー調製、シーケンス、二次データ解析を含みます。NextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットのシーケンスランタイムは約34時間であり、NextSeq 1000/2000 P2試薬600サイクルキットのランタイムは約44時間です。

ライブラリーの精製には、Illumina Purification Bead, 100 mL (カタログ番号: 20060057) を使用することを推奨します。得られたライブラリーは手作業でノーマライズし、シーケンス用にプールしました (図2)。

このメソッドは、16S RNAの他のアンプリコン、またはゲノム上の他の遺伝子をターゲットにする場合にも使用できます。⁴ オーバーハングアダプターシーケンスは、ターゲット領域に特異的なプライマーに追加する必要があります。

表1: 16S V3およびV4アンプリコンシーケンス用のプライマー配列

プライマー名	配列 ^{a,b}
16SアンプリコンPCRフォワードプライマー	5'-TCGTCGGCAGCGTCA GATGTGTATAAGAGACAG- CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
16SアンプリコンPCRリバープライマー	5'-GTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGTATAAGAGACAG- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

a. 国際純正化学連合 (IUPAC) ヌクレオチド命名法: N = 任意の塩基、W = AまたはT、H = AまたはCまたはT、V = AまたはCまたはG。
 b. ハイフンの前のプライマー配列は、イルミナオーバーハングアダプター配列です。ハイフンの後のプライマー配列は座位特異的な配列です。

シーケンス

ライブラリー調製後、40% (v/v) PhiXを添加した1,000 pM 16Sライブラリー20 µLを、NextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットまたはMiSeq試薬v3 600サイクルキットのフローセルにロードしました。シーケンスは、NextSeq 2000システムとMiSeqシステムでそれぞれ実施しました。代表的なシーケンスランと解析データは、[BaseSpaceデモデータページ](#)で公表しています。

添加した塩基多様性を評価するために、3つのゲノム細菌分離株 (大腸菌、*B.cerus*、*R.sphaeroides*、ATCC、カタログ番号: それぞれ700926、10987、17023) を使用して、塩基バランスの取れた40% Illumina DNA Prepのライブラリーを2つのテクニカルレプリケートで調製し、別の16Sプールに追加しました。^{*} これらのライブラリーは、Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation (24 Samples, IPB) (イルミナ、カタログ番号: 20060060) およびIDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples) (イルミナ、カタログ番号: 20027213) を用いて調製しました。代表的なシーケンスランと解析データは、[BaseSpaceデモデータページ](#)で公表しています。

* 他のバランスの取れたライブラリーを追加する前に、インデックスの組み合わせを確認してください。各サンプルに十分なリードがあることを確認するには、個別の評価が必要です。

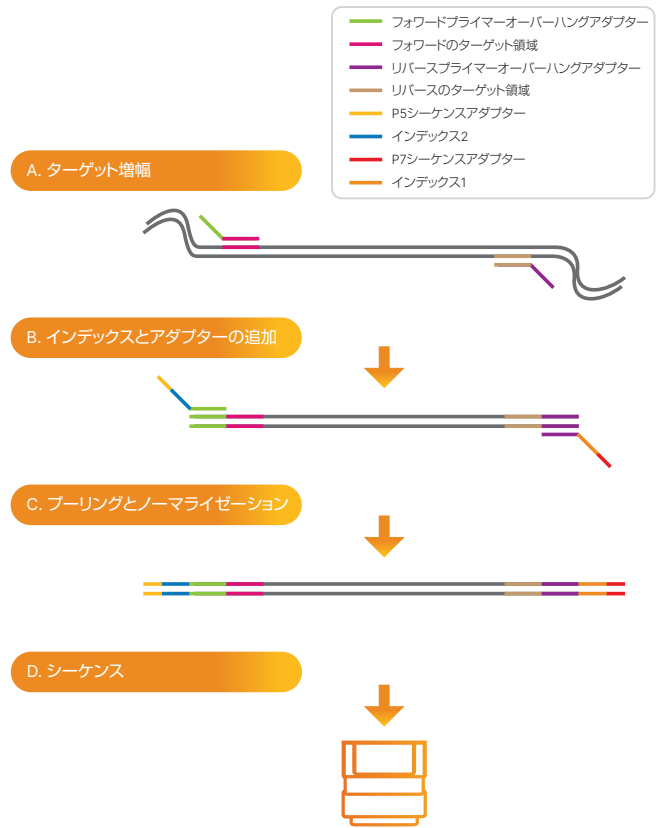


図2: 16S V3およびV4のライブラリー生成: (A) ゲノムDNAの増幅は、ライブラリー生成用のオーバーハングアダプターを含む16Sプライマーを使用します。(B) IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexesを使用して、インデックスとシーケンスアダプターをアンプリコンに追加します。(C) ライブラリーをプールし、ノーマライズします。(D) シーケンスは、ベンチトップシーケンスシステムで実施します。

結果

主要なシーケンスメトリクスの改善

NextSeq 2000システムに使用したNextSeq 1000/2000 試薬600サイクルキットは、MiSeqシステムに使用したMiSeq試薬v3 600サイクルキットと比較した場合、Q30リードクオリティスコア (Qスコア) の向上を示しました。また、NextSeq 2000システムは、MiSeqシステムよりも4倍多くのシーケンス出力を提供し、シーケンスランあたりの時間は約20時間短縮しました (図3)。

ATCCサンプルの16S解析

システム間のパフォーマンスを比較するために、20 Strain Staggered Mix Genomic Material (ATCC、カタログ番号: MSA-1003) をNextSeq 2000システムとMiSeqシステムでシーケンスしました。BaseSpace Sequence Hubで使用する16S Metagenomics Labs アプリは、分類学的分類を行うための下流解析に使用しました。16S シーケンス結果の解析より、細菌群集のうちの予想されるすべての細菌が特定され、NextSeq 2000システムとMiSeqシステムの間で同等の結果が示されました (図4)。検証したすべてのサンプルのコミュニティプロフィールも、NextSeq 2000システムとMiSeqシステムの間で高い一致を認めました (図5)。これらの結果は、MiSeqシステムとNextSeq 1000およびNextSeq 2000システムの間での16Sメタゲノムアプリケーションのパフォーマンスの同等性を裏付けています。

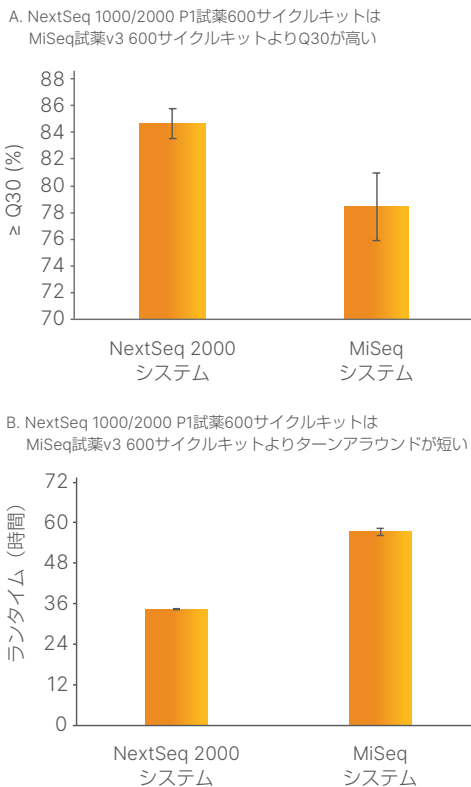


図3: 主要なシーケンス性能メトリクス: NextSeq 2000システムに使用したNextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットは、MiSeqシステムで実施した16S rRNAシーケンスと比較した場合、(A) Q30リードクオリティスコアが高く、(B) 約20時間シーケンスランタイムが短縮します。

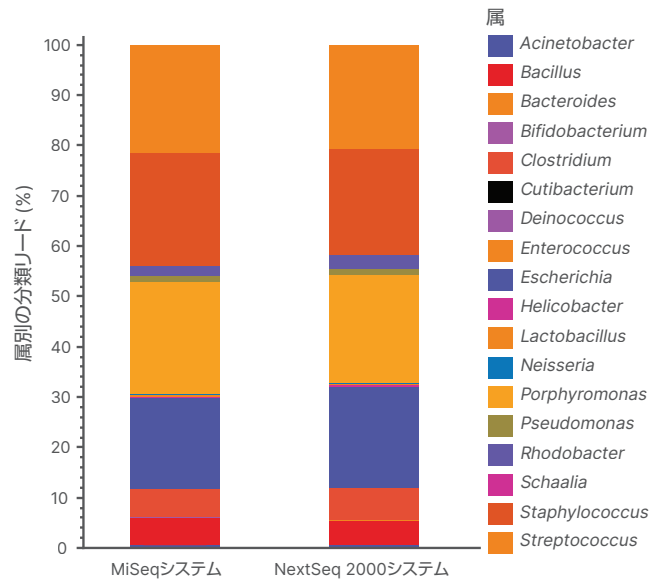


図4: NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムでのATCCサンプルの微生物組成の比較解析: NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムによるATCCサンプルの微生物組成の解析では、属について同様の優れたカバレッジを示しています。

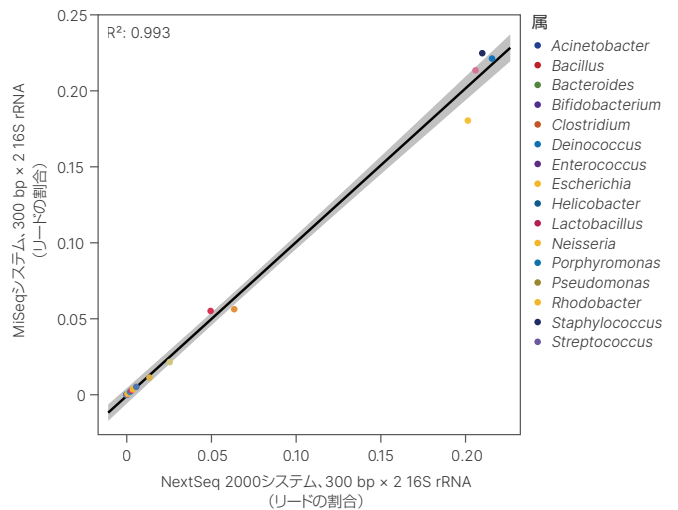


図5: NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムのATCCサンプルの微生物組成からの16S解析の比較: 各システムで実行したサンプルから定量化された細菌属の比例表現をプロットしています。細菌表現に関するサンプルの解析では、NextSeq 2000システムとMiSeqシステムの間で高い一致を認めます (R² = 0.993)。

糞便サンプルの16S解析

実際の糞便サンプルで性能を実証するために、最も代表的な10の属をNextSeq 2000システムとMiSeqシステムで比較しました。最も存在量の多い属について、各システムにおいて類似した分布を示すサンプルの例が示されています(図6)。ATCCリファレンスサンプルでの性能と同様、実際の糞便サンプルの16Sのコミュニティプロフィールについても、すべてのサンプルでNextSeq 2000システムとMiSeqシステムの間で高い一致を認めました(図7)。これらの結果は、さまざまなソースからのサンプルを使用した16SメタゲノムアプリケーションにおけるNextSeq 2000システムの使用をさらに支持しています。

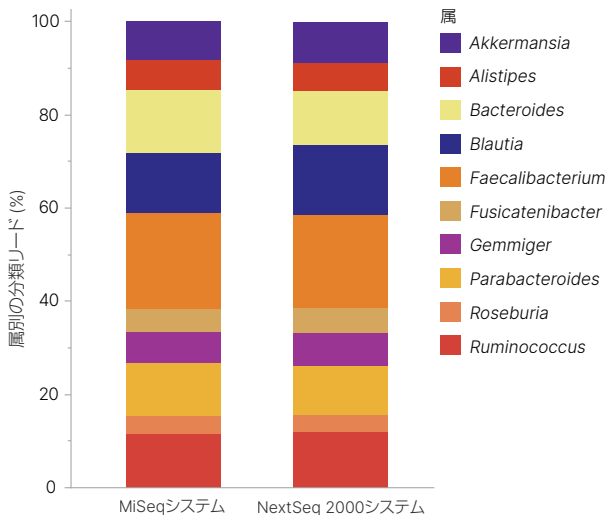


図6: NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムを用いた糞便サンプルで同定された非常に典型的な10属の16S微生物シーケンスの比較表現: NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムによる糞便サンプルの微生物組成の解析では、属レベルの同様の優れたカバレッジを示しています。

多様性の低い16Sライブラリーを用いた解析

16S rRNAシーケンシングライブラリーなどの多様性の低いライブラリーのシーケンシングでは、塩基組成のバランスが崩れているため、クラスターの大部分が各サイクルで同じ塩基を示すことにより、いくつかの固有の問題が生じます。この不均衡によって引き起こされる高いシグナルにより、クオリティスコアが低くなり、解析に影響します。この不均衡は、互換性のあるバランスの取れたライブラリーをフローセルに追加することでは対処できません。バランスの取れた添加ライブラリーは、16Sサンプルに外挿できるベースコール率の計算に使用

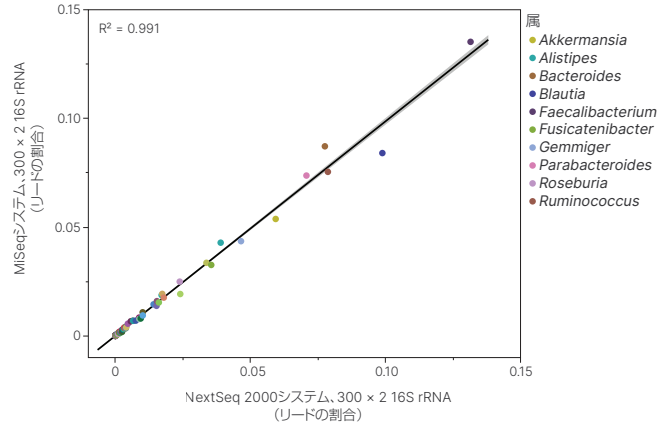


図7: NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムを用いた糞便サンプルに同定された16S微生物組成の相関関係: 各システムで実行したサンプルから定量化された細菌の属の比例表現をプロットしています。サンプルの細菌の比率を同定する解析は、NextSeq 2000システムとMiSeqシステム間で高度に一致しています ($R^2 = 0.991$)。

することができます。バランスの取れたライブラリーには、他のサンプルまたはコントロールサンプルを用いることができ、エラー率の計算に使用できます。40%のライブラリーの追加はスタート時の推奨事項であり、実験のニーズに合わせて各ラボで最適化できます。ユーザーは、ライブラリーのバリデーションを実施し、アダプターの互換性を確認する必要があります。%Occupiedおよびローディング濃度率の指標は、16Sアンプリコンのようなバランスの取れていないライブラリーには関係しないことに注意してください。

ランにバランスの取れたライブラリーを40% (v/v) 追加したとしても、NextSeq 1000/2000 600サイクルキットを使用すると、たくさんのアンプリコンサンプルをプールすることができます。例えば、40% PhiX添加ライブラリーを使用する場合、NextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットは、16Sサンプルに対して6,000万リードを提供します(表2)。一般的に、16S分類にはサンプルあたり15,000~100,000リードで十分です。⁵⁻⁷

表2: 40%添加ライブラリーを使用した場合の16SサンプルライブラリーあたりのNextSeq 1000/2000 P1試薬600サイクルキットの出力リード数

	サンプルあたりのシングルリード (クラスター)	サンプルあたりのペアエンドリード
96サンプル	625,000	1,250,000
384サンプル	156,250	312,500

まとめ

このアプリケーションノートの結果は、16S rRNAシーケンシングにおいて、NextSeq 2000システムとMiSeqシステムのシーケンシング性能が同等であることを示しています。NextSeq 1000/2000 P1試薬 600サイクルキットは、16S NGS解析に一般的に使用されるMiSeq試薬v3 600サイクルキットと同等のリード長です。ただし、NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムは、シーケンス出力が4倍多く、ランタイムが約20時間短縮されているため、シーケンス深度、ターンアラウンドタイム、Q30クオリティスコア、および16Sメタゲノム研究のスケラビリティが大幅に向上します。NextSeq 1000システムは、記載されている600サイクルキットを使用することで、NextSeq 2000システムと同じように機能し、これらの装置は同一の性能仕様を備えています。

詳細はこちら

[NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム](#)

[NextSeq 1000/2000試薬](#)

PhiXコントロールライブラリーを使用した16Sシーケンスラン、[プロジェクトのリンク](#)、[ランのリンク](#)

Illumina DNA Prepコントロールライブラリーを使用した16Sシーケンスラン、[プロジェクトのリンク](#)、[ランのリンク](#)

参考文献

1. Clarridge JE 3rd. [Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.](#) *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840-862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
2. Maghini D, Dvorak M, Dahlen A, Roos M, Kuersten S, Bhatt AS. [Achieving quantitative and accurate measurement of the human gut microbiome.](#) *bioRxiv.* 2022;09.28.509972; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.09.28.509972>
3. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. [Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.](#) *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1. doi:10.1093/nar/gks808
4. Illumina. 16S metagenomic sequencing library preparation. support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf. Accessed February 9, 2023.
5. Peterson D, Bonham KS, Rowland S, Pattanayak CW; RESONANCE Consortium, Klepac-Ceraj V. [Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes.](#) *Front Microbiol.* 2021;12:670336. Published 2021 Jul 15. doi:10.3389/fmicb.2021.670336
6. Sanchez-Cid C, Tignat-Perrier R, Franqueville L, Delaurière L, Schagat T, Vogel TM. [Sequencing Depth Has a Stronger Effect than DNA Extraction on Soil Bacterial Richness Discovery.](#) *Biomolecules.* 2022;12(3):364. Published 2022 Feb 25. doi:10.3390/biom12030364
7. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. [Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform.](#) *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(17):5112-5120. doi:10.1128/AEM.01043-13

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

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。

販売店

illumina[®]