

# Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human

イルミナシーケンスシステムで  
柔軟性の高い、コスト効率の良い  
正確なロングリードを実現

- ターゲットロングリードとショートリードを組み合わせ、ヒトゲノムに対する洞察を補完的に向上
- 少量のDNAインプットから信頼性の高い結果をもたらす、スケーラブルかつロバストなライブラリー調製
- 特別な機器が不要で自動化対応の2日間のライブラリー調製ワークフロー

**illumina**<sup>®</sup>

## はじめに

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は、非常に高い精度の全ゲノムシーケンス (WGS) データを提供します。<sup>1,2</sup> それでも、ゲノムのごく一部、特に相同性の高い領域や繰り返し領域などをショートリードだけでマッピングすることは困難です。このような場合、ロングリードシーケンスが標準のショートリードWGSデータを補完できます。高精度のショートリードとロングリードを併用すると、従来困難であった領域の解析とマッピングを向上させることができます。

これまで、ロングリードシーケンシングは、厳密なDNA品質と多量のインプット必要量により、多くの種類のサンプルと互換性がありませんでした。<sup>3-6</sup> Illumina Complete Long Readテクノロジーにより、単一の解析パイプラインを使用して同じシステム上でショートリードと相補的ロングリードの両方を利用可能にすることで、ゲノミクスラボがロングリードシーケンスにアクセスできるようになりました。この高性能アッセイは、標準的なイルミナ次世代シーケンス (NGS) ワークフローを使用して連続したロングリードシーケンスを生成します。特別な抽出、断片化、サイズ選択を必要とせず、わずか10 ngのDNAインプットから調製が可能です (図1)。

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanはターゲットロングリードシーケンスのためのコスト効率の良い柔軟性の高いソリューションを提供します。濃縮を含む、効率的な2日間のライブラリー調製ワークフローは自動化に対応可能で、ハイスループットな研究のために簡単に拡張できます。

ターゲットロングリードは、標準的なショートリードシーケンスではマッピングが困難であることが知られている領域に対して、使用することができます。あるいは、ターゲットロングリードを遺伝子全体または領域全体に適用し、最大数百キロベースのフェーシングシーケンスを可能にして、ハプロタイプを解析することもできます。Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanを使用して、より広範なバリエーション検出のためのリフレックスツールとして既存のWGSデータセットを拡大します。

## NovaSeq™ プラットフォームからの高品質なターゲットロングリード

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, HumanはNovaSeq X Plusシステム、NovaSeq Xシステム、NovaSeq 6000システムおよびNovaSeq 6000Dx システム (研究 (RUO) モード) で検証されています。この柔軟性のあるアッセイは、他のロングリードシーケンスソリューションよりも90%少ないインプットDNA量で、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。イルミナでは最小インプットDNAとして50 ngを推奨していますが、わずか10 ngからでもロバストな結果を得ることが可能です。Illumina Complete Long Readテクノロジーは、一般的な阻害剤や夾雑物に対して耐性があり、血液、唾液、組織からのDNAに対して高い効果を発揮します。<sup>7,8</sup> これにより、他のロングリードソリューションよりも多くのサンプルタイプから包括的な洞察を得ることができます。

Illumina Complete Long Readは専用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二次解析が一体となって、正確性の高いロングリードデー



図1: Illumina Complete Long Reads with Enrichmentワークフロー: スケーラブルで最適化されたライブラリー調製プロトコール、実績のあるイルミナシーケンスケミストリー、およびDRAGEN二次解析を使用して、コスト効率の良いターゲットロングリードWGSデータが得られます。解析には同一サンプルからの30 xカバレッジ以上の標準的なショートリードWGSデータが必要です。以前にランを実施したサンプルのFASTQファイルを使用できます。

タを生成します (図2)。長い単一分子のDNA断片に、固有のパターン (すなわち「目印」) を付け、その後増幅、濃縮、シーケンスを実施します。ターゲットプローブパネルを使用したハイブリッドキャプチャー濃縮ステップを追加することで、ロングリード情報から最も恩恵を受ける領域に焦点を当てたシーケンスが可能になります。目印により、繰り返し領域またはマッピングが難しい領域を区別して、N50が5~7 kbのロングリードを生成できます。<sup>7</sup> ロングリードデータは目印のない標準的なWGSライブラリーと統合され、ターゲット濃縮した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生成されます。

## 必要な箇所でのロングリード

高精度のショートリードWGSデータにターゲットロングリードを重ねることで、研究者はシーケンス資金を既知の解析が困難なゲノム領域に集中させることができます。ターゲットロングリードは高い柔軟性があり、複数のプレデザインパネル、または無料で使いやすいアッセイデザインツールであるイルミナ DesignStudio™ ソフトウェアによって設計できるカスタムパネルを選択することができます (表1、表2)。研究のニーズに最適な濃縮プローブパネルを選択することで、ゲノムの低カバレッジ領域またはフェーズ領域を拡張することができます。

### Illumina Human Comprehensive Panel

大規模なIllumina Human Comprehensive Panelは、ロングリードの恩恵を受ける可能性のある遺伝子領域に対応し、6,500を超えるタンパク質コーディング遺伝子全体のうち、カバレッジの低い箇所をターゲットにしています。<sup>9</sup> このパネルの開発において、イルミナは、20,000以上のタンパク質コーディング遺伝子の全セットを評価し、マッピングが難しい領域をターゲットにしました。ショートリードだけで包括的にカバーされる遺伝子は除外しました。Human Comprehensive Panelは、ターゲット領域全体のカバレッジとバリエーション機能の向上をもたらします (図3A)。このパネルは、Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanで使用するために最適化されており、既製のパネルとして、またはDesignStudioツールでカスタマイズできるプレデザインパネルとして利用できます。

### DesignStudioソフトウェアを使用したプレデザインパネル

低コストでハイスループットのオプションとして、ロングリード濃縮のためのパネルを選択できます (表1)。DesignStudioソフトウェアではいくつかのプレデザインパネルが利用可能であり、これらをカスタマイズできます (表2)。

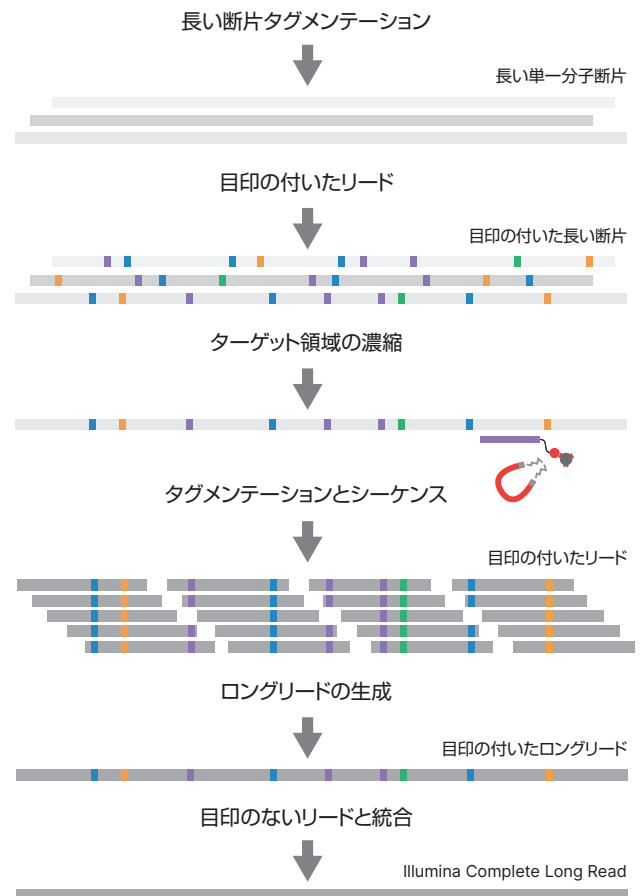


図2: Illumina Complete Long Readアッセイの仕組み: 本アッセイはタグメンテーションを用いて長いDNA断片 (10 kb以上) を生成するため、断片化またはサイズ選択は不要です。長い断片に単一分子規模で「目印」を付けてキャプチャーすることで、断片内のロングリード情報を保存します (複雑なバーコードやアダプターは不要です)。目印の付いた長い断片は、ハイブリッドキャプチャープローブパネルを使用してターゲット領域に対して濃縮されます。次に、濃縮された長い断片にもう一度タグが付けられ、シーケンス用のライブラリーが得られます。データ解析からロングリードが生成され、そのデータを (同一サンプルからの、別々にシーケンスされた) 目印のない標準的なWGSライブラリーと組み合わせ、非常に正確で完全なIllumina Complete Long Readを生み出します。

表1: Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanで30×の最終カバレッジを生成するための推奨されるサンプルスループット<sup>a,b,c</sup>

	Illumina Human Comprehensive Panel	大型パネル	中型パネル	小型パネル		
ターゲット領域のサイズ <sup>d</sup>	> 95 Mb	~20 Mb	~10 Mb	~5 Mb		
サンプルあたりの推奨データ <sup>a</sup>	90~120 Gb	30~60 Gb	15~30 Gb	7.5~15 Gb		
300サイクル試薬キット		フローセルあたりのサンプル数 <sup>e</sup>			フローセルあたりの出力	ランタイム
NovaSeq 6000 SP試薬	2	8	16	32	~250 Gb	~25時間
NovaSeq 6000 S1試薬	4	16	32	66	~500 Gb	~25時間
NovaSeq 6000 S2試薬	10	40	82	166	~1.25 Tb	~36時間
NovaSeq 6000 S4試薬	24	100	200	400 <sup>f</sup>	~3 Tb	~44時間
NovaSeq Xシリーズ1.5B試薬	4	16	32	66	~500 Gb	~21時間
NovaSeq Xシリーズ10B試薬	24	100	200	400 <sup>f</sup>	~3 Tb	~25時間
NovaSeq Xシリーズ25B試薬	64	266	532 <sup>f</sup>	1,066 <sup>f</sup>	~8 Tb	~48時間

a. Illumina Complete Long Readの約30×最終カバレッジを生成するための、150 bp × 2でのシーケンスランおよびMbターゲット領域あたり500万~1,000万のペアエンドリード（約1.5~3 Gbデータ）が必要です。サンプルあたりのカスタムパネルデータ要件は、推奨される出発点にすぎません。ユーザーはパネルの性能に基づいて割り当てられたデータを最適化できます。

b. 解析には同一サンプルからの30×カバレッジ以上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。

d. ターゲット領域のサイズは、パディングしたプローブ位置の長さの合計であり、重複する部分で結合されます。

e. Mbターゲット領域あたり500万ペアエンドリード（1.5 Gbデータ）に対して計算されたサンプルスループット数の例を示しています。

f. 最大384のユニークデュアルインデックスが利用できます。NovaSeq Xシリーズの場合、独立したレーンローディングにより、より多くのサンプルのマルチプレックスが可能になります。NovaSeq 6000システムでの独立したレーンローディングには、NovaSeq 6000 Xpワークフローを使用します。

これらのパネルは、医学的に重要な難読遺伝子（CMRG）<sup>10</sup>、ファーマコゲノミクス（PGx）検査アッセイで一般的にターゲットとされる遺伝子<sup>11-13</sup>、米国臨床遺伝・ゲノム学会（ACMG）の二次的所見リスト（ACMG SF v3.1）に掲載されている遺伝子<sup>14</sup>、または主要組織適合性複合体（MHC）領域全体<sup>15</sup>をターゲットとしています。

#### カスタムパネル

ユーザーは自身の知識を活用して、特定の遺伝子のサブセットに焦点を当てた独自のパネルを作成できます。DesignStudioツールは、長い断片濃縮用に調整されたアルゴリズムを用いて、カスタムパネルデザインに対応します。サードパーティー社製のオリゴパネルもIllumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanと互換性があります。

## スケラブルかつハイスループットなワークフロー

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanワークフローは自動化が簡単で、標準的なラボ機器のみを必要とし、より多くのサンプルに対する包括的なWGSに対応するための高いスケラビリティがあります（図1）。シンプルなライブラリー調製プロトコルは、1日目に約6.5時間（ハンズオンタイムは約3時間）、一晩のハイブリダイゼーション反応の後、2日目は5.5時間（ハンズオンタイムは約3時間）かかります。

NovaSeq Xシリーズ10Bまたは25Bフローセルを使用すると、大規模なコホート解析のためのスループットが向上し、大型パネルを用いた解析を高いコスト効率で実施することができます（表1）。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15,000の拡張された高精度なゲノムを生成することができます。小型パネルの解析にはNovaSeq Xシリーズ1.5Bフローセルなどのロースループットの消耗品を使用することで、バッチ処理の要件が軽減します。

表2: Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human用にデザインされたハイブリッドキャプチャープローブパネル

パネル	ターゲットの遺伝子または領域	パネルサイズ
Illumina Human Comprehensive Panel <sup>a</sup>	6,500を超えるタンパク質コーディング遺伝子全体の低カバレッジスポット <sup>9</sup>	> 95 Mb
CMRGパネル <sup>b</sup>	ショートリードでは解析が困難であることが知られている391の医学的に関連する遺伝子 <sup>10</sup>	22.5 Mb
PGxパネル <sup>b</sup>	薬理遺伝学的検査アッセイの一般的なターゲットである98遺伝子 <sup>11-13</sup>	8.1 Mb
ACMGパネル <sup>b</sup>	ACMG二次的所見リスト (ACMG SF v3.1) からの78の固有の遺伝子 <sup>14</sup>	7 Mb
MHCパネル <sup>b</sup>	GRCh38.p14アセンブル内の全MHC領域 (140以上の遺伝子) <sup>15</sup>	4.9 Mb

a. 最適化された既製のパネル。  
b. DesignStudioソフトウェアでは、プレデザインパネルとカスタムパネルが利用可能です。CMRG=医学的に重要な難読遺伝子、PGx=ファーマコゲノミクス、ACMG=米国臨床遺伝・ゲノム学会、MHC=主要組織適合性複合体。

## 効率化された包括的なデータ解析

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanのデータ解析はBaseSpace™ Sequence Hubアプリ、またはIllumina Connected Analytics経由で行うことができます。この単一のDRAGENパイプラインはショートリードとロングリードの両方を解析して、包括的なWGS結果を提供します。結果は、DRAGENターゲットコーラーを含む単一セットの出力ファイルに統合されます。<sup>16</sup>

## 濃縮したロングリードデータを使用して高精度のWGSにアクセス

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanのデータは、標準的なショートリードWGS単体と比較して、ターゲット濃縮した解析が困難な領域のカバレッジと精度の向上が示されています (図3、図4)。ターゲット濃縮したIllumina Complete Long Readは、完全な遺伝子のハプロタイプの解析も実現し、MHCのような高い多型性のある領域の大きなブロックをフェージングすることができます (図5)。

## まとめ

Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanは、実績のあるイルミナWGSを補完し、最大の価値を提供するロングリードに焦点を当てた、柔軟でコスト効率の良いソリューションです。Illumina Complete Long Readによって、単一のDRAGEN解析パイプラインを使用して同じ装置でロングリードとショートリードの両方を使用可能にすることで、ゲノミクスラボは包括的なWGSに簡単にアクセスできるようになります。効率化された馴染みのあるワークフローにより、市場で最もスケーラブルで正確な全ゲノムアッセイが実現します。

## 詳細はこちら

[Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Human Comprehensive Panel](#)

[ロングリードシーケンステクノロジー](#)

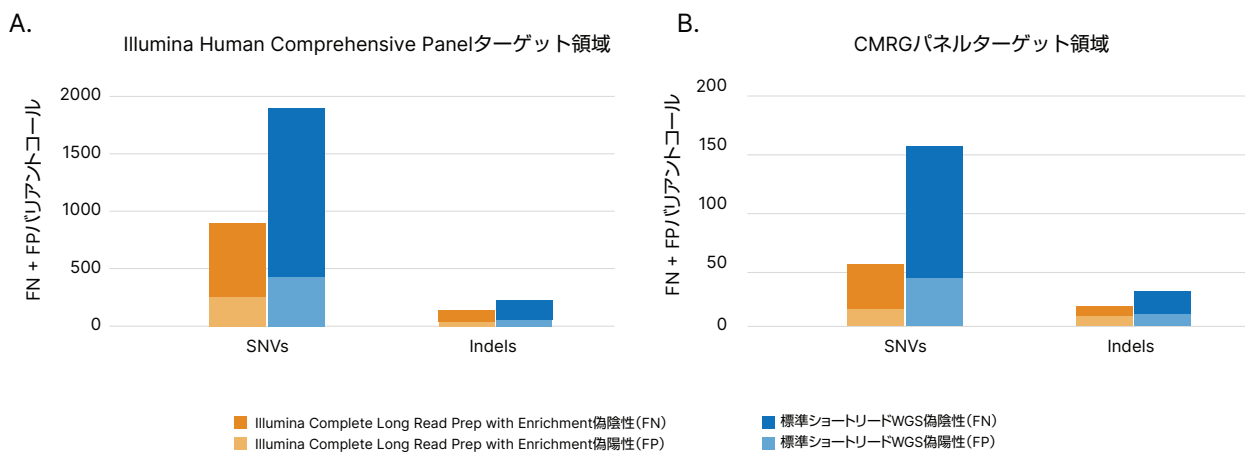


図3: ターゲットロングリードにより、解析が困難な領域でのバリエーションコール精度が向上: (A) Illumina Human Comprehensive Panelまたは (B) CMRG/パネルのターゲットであるHG002遺伝子領域のSNVおよびIndelに対する偽陰性 (FN) と偽陽性 (FP) のバリエーションをコール。Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment (オレンジ) と標準ショートリードWGS (青) 使用時の比較。

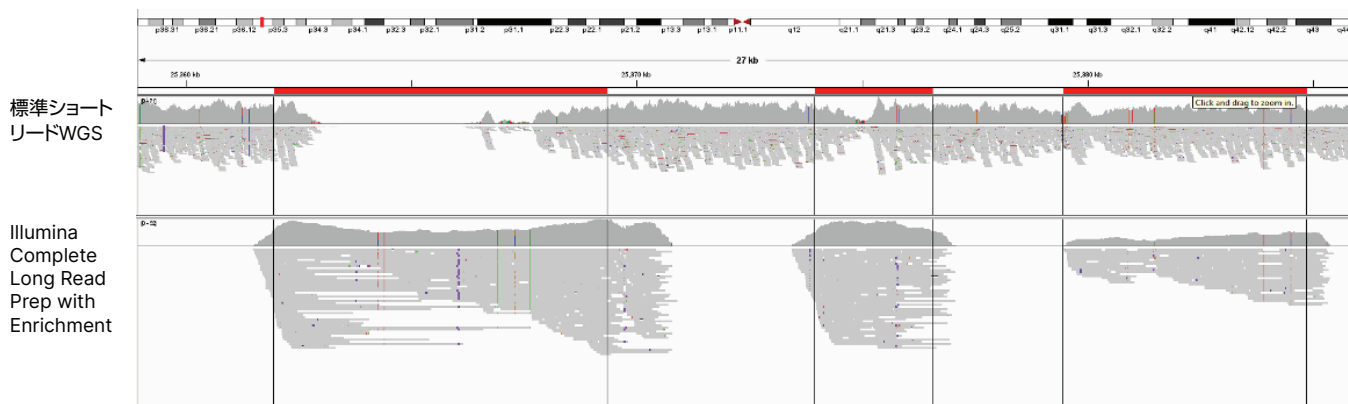


図4: 解析が困難な領域でのコスト効率の良いヒト全ゲノムカバレッジを実現: Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanは、標準的なショートリードヒトWGSを補完し、RHCE遺伝子の解析が困難な領域におけるカバレッジの向上に役立ちます。標準的なショートリードWGS (上) とIllumina Complete Long Read Prep with Enrichment (下) を使用してシーケンスしたRHCEのIntegrative Genomics Viewer (IGV) プロット。ターゲット領域は赤色で示されています。

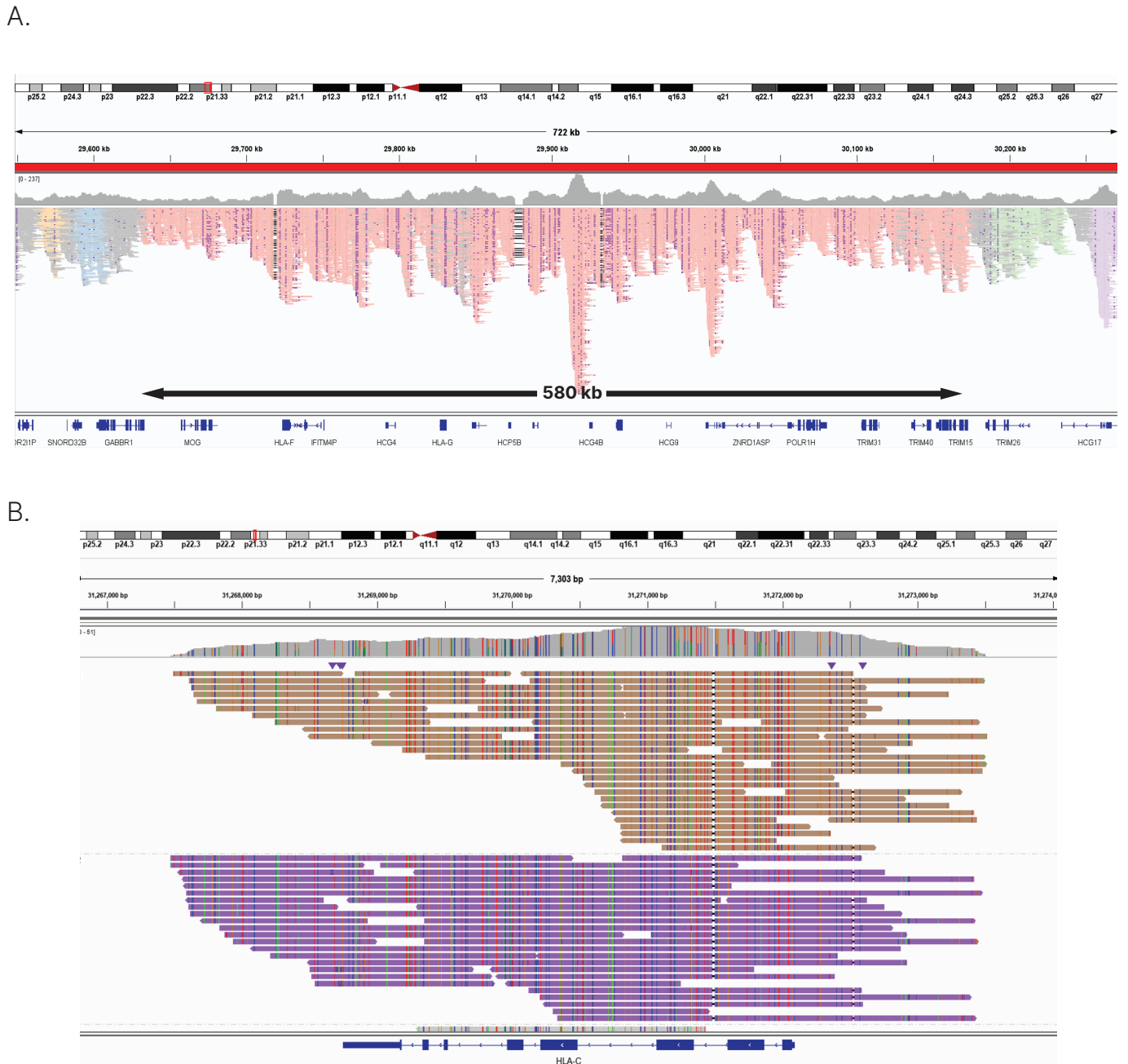


図5:ターゲットロングリードは、多型遺伝子のハプロタイプの解析に役立ちます: Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Humanを使用したロングリードシーケンスからのIGVプロット。(A) MHC遺伝子座位の722 kb領域にわたるフェージング。580 kbは1つのフェーズブロックに含まれる領域(ピンク)です。(B) HLA-C遺伝子は完全にフェージングされています。リードはハプロタイプ別に分離されています。



## 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](https://www.illumina.com/science/genomics-research/dragen-wins-precisionfda-challenge-showcase-accuracy-gains.html). Published 2020. Accessed January 12, 2023.
2. 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.
3. Pacific Biosciences. Preparing DNA for PacBio HiFi sequencing—Extraction and quality control. [pacb.com/literature/technical-note-preparing-dna-for-pacbio-hifi-sequencing-extraction-and-quality-control/](https://www.pacb.com/literature/technical-note-preparing-dna-for-pacbio-hifi-sequencing-extraction-and-quality-control/). Published 2022. Accessed January 12, 2023.
4. 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](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 October 5, 2023.
5. Oxford Nanopore Technologies. Ligation Sequencing Kit. <https://store.nanoporetech.com/us/productDetail?id=ligation-sequencing-kit-v14>. Accessed October 5, 2023.
6. 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.
7. Illumina. Illumina Complete Long Read Prep, Human data sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-data-sheet-m-gl-01420/illumina-long-read-prep-data-sheet-m-gl-01420.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-data-sheet-m-gl-01420/illumina-long-read-prep-data-sheet-m-gl-01420.pdf). Published 2022. Accessed September 22, 2023.
8. Illumina. Comprehensive whole-genome sequencing with Illumina Complete Long Read Prep, Human technical note. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-tech-note-m-gl-01421/ilmn-long-read-hu-tech-note-m-gl-01421.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-long-read-prep-human-tech-note-m-gl-01421/ilmn-long-read-hu-tech-note-m-gl-01421.pdf). Published 2022. Accessed September 22, 2023.
9. Bekritsky MA, Colombo C, Eberle MA. Identifying genomic regions with high quality single nucleotide variant calling. [illumina.com/science/genomics-research/articles/identifying-genomic-regions-with-high-quality-single-nucleotide-.html](https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/identifying-genomic-regions-with-high-quality-single-nucleotide-.html). Published 2021. Accessed August 30, 2023.
10. Wagner J, Olson ND, Harris L, et al. Curated variation benchmarks for challenging medically relevant autosomal genes. *Nat Biotechnol.* 2022;40(5):672-680. doi:10.1038/s41587-021-01158-1
11. PharmGKB. VIPs: Very Important Pharmacogenes. [pharmgkb.org/vips](https://www.pharmgkb.org/vips). Accessed September 22, 2023.
12. National Library of Medicine. GTR: Genetic Testing Registry. Precision HealthPGx Panel (25 Genes). [ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/](https://ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/593428/). Updated November 29, 2022. Accessed September 22, 2023.
13. Pratt VM, Everts RE, Aggarwal P, et al. Characterization of 137 Genomic DNA Reference Materials for 28 Pharmacogenetic Genes: A GeT-RM Collaborative Project. *J Mol Diagn.* 2016;18(1):109-123. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.08.005
14. Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2022;24(7):1407-1414. doi:10.1016/j.gim.2022.04.006
15. Kulski JK, Suzuki S, Shiina T. Human leukocyte antigen super-locus: nexus of genomic supergenes, SNPs, indels, transcripts, and haplotypes. *Hum Genome Var.* 2022;9(1):49. doi:10.1038/s41439-022-00226-5
16. Roessler K. Illumina Complete Long Reads software analysis workflow for human WGS. [illumina.com/science/genomics-research/articles/complete-long-read-software-analysis.html](https://www.illumina.com/science/genomics-research/articles/complete-long-read-software-analysis.html). Published 2023. Accessed September 22, 2023.



## 製品情報

製品	カタログ番号
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human (24 samples)	20113832
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human (96 samples)	20113833
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Comprehensive Panel (24 samples)	20113834
Illumina Complete Long Read Prep with Enrichment, Human Comprehensive Panel (96 samples)	20113835
Illumina Human Comprehensive Panel (24 samples)	20113836
Illumina Human Comprehensive Panel (96 samples)	20113837
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (32 µl, 120 bp)	20073953
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (384 µl, 120 bp)	20073952
Illumina Custom Enrichment Panel v2 (1536 µl, 120 bp)	20111339

## 製品情報

製品	カタログ番号
Illumina Unique Dual Indexes, LT (48 indexes, 48 samples)	20098166
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 Analytics - 1 iCredit	20042038

## 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](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

© 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。

