

MiSeqTM i100 シリーズでの 性能の最大化

ランの成功を保証するライブラリーローディング
最適化ステップ

ライブラリーローディングの最適化	性能の最大化	低い多様性にも対応
MiSeq i100シリーズフローセルの最適なローディング濃度の決定	シーケンス性能を最大限引き出すためにインサートサイズを改善	ライブラリーの複雑性をPhixで調整することで多様性の低いライブラリーをシーケンス

はじめに

MiSeq i100シリーズは最もシンプルで高速なベンチトップシーケンサーです。システム設計の画期的な進歩、XLEAP-SBS™ケミストリーおよび内蔵データ解析により、使いやすさの向上、高精度のデータ、並外れたスピードを実現し、初期MiSeqシステムの最大4倍のスピードで結果を出すことができます。エンドツーエンドのNGSソリューションの一部として、MiSeq i100シリーズは、微生物学、感染症、腫瘍学などの主要な領域におけるトランスクリプトミクス、微生物学ゲノミクス、およびターゲット遺伝子シーケンシング研究など、さまざまなアプリケーションに対して即日結果を提供します。

別のシーケンスシステムからMiSeq i100シリーズにプロジェクトを移行する際は、ライブラリーローディングの最適化がデータ出力と品質の最大化に役立ちます。このテクニカルノートでは、ライブラリーローディング濃度、ライブラリー品質およびヌクレオチド多様性に関する考慮事項のガイダンスを含め、MiSeq i100シリーズでの結果を最適化するための推奨事項をご紹介します。

最適なライブラリーローディング

ローディング濃度とは、シーケンスのために装置にロードするライブラリーの最終濃度のことです。ライブラリーは調製後に、ライブラリーの種類、シーケンスシステム、試薬キットに応じて適切なローディング濃度に希釈されます。

高すぎたり低すぎたりする濃度でライブラリーをローディングすると、シーケンス品質と出力の低下につながることがあり、極端な条件下ではランが失敗する可能性もあります。過少ローディングは、ナノウェル占有率（% Occupied）の低下と重複リードの増加につながることがあり、これによりターゲットカバレッジを達成するにはより多くのリードが必要になります。一方過剰ローディングは、クラスター・パス・フィルター率（PF）の低下を生じることがあります。MiSeq i100シリーズでの最適なローディング濃度を決定するには、% Occupiedおよび% PFメトリクスをSequencing Analysis Viewerでプロットすることで、ランが過少ロードされた、最適にロードされた、または過剰ロードされたかどうかを判断できます。以下の実験例のアプローチは、最適ローディング濃度検討と、一次および二次メトリクスの評価に使用できます。



詳細については、『Optimizing library loading for Illumina NGS systems with patterned flow cells』をご一読ください。

最適ローディング濃度の決定

最適ローディング濃度を見つけるには、幅広い濃度を検証することが重要です。% PFや% Occupiedなどの一次メトリクスと、重複、インサートサイズおよびカバレッジなどの二次メトリクスを使用して、さまざまなローディング濃度で性能を測定し、特定のアプリケーションに対する「使用可能な収量」を決定します。

ステップ1: 最適濃度検討実験のデザイン

初期MiSeqシステムからMiSeq i100シリーズへプロジェクトを移行する場合には、MiSeq Reagent Kit v2ローディング濃度の約10.4倍およびMiSeq Reagent Kit v3のローディング濃度の約6.5倍を中心とした最適濃度を検討してください。推奨される中央濃度は、MiSeq i100シリーズで使用するライブラリー調製キットの種類によって異なります（表1）。その他すべての場合については、中央濃度には100 pMを使用することが推奨されます。

この例では、Illumina DNA Prepを使用して調製した*Bacillus pacificus*、*Cereibacter sphaeroides*および*Escherichia coli*からの細菌ゲノムサンプルから成るライブラリープールを、40 pM、80 pMおよび120 pMのローディング濃度で検証しました。

ステップ2: ナノウェル占有率とクラスターPFの評価

各ローディング濃度に対するシーケンスランからの% PFと% Occupiedメトリクスをプロットし、どの濃度が過少、過剰、または均衡の取れたローディング結果になったかを判断します。この実験では、検証した3つすべての濃度（40 pM、80 pM、120 pM）が% PF対% Occupiedのプロットで最適なローディング形状（正の傾きの点の集まり）を示したことから、MiSeq i100シリーズは幅広いライブラリーローディング濃度範囲内でロバストな結果を達成できることが実証されました（図1）。

ステップ3: 重複の評価

重複割合を解析することでターゲット濃度範囲を狭めます。重複はローディング濃度の増加に伴って減少する傾向があります。この例では、検証した3つすべての濃度で重複は15%未満であり、80 pMおよび120 pMは最低値でした（図2）。

ステップ4: インサートサイズの解析

インサートサイズを確認します。ライブラリーとアプリケーションの最適な範囲は、ワークフロー要件に応じて異なることがあります。この例では、3種類の細菌株すべてのインサートサイズが検証した濃度範囲で異なっており、40 pMおよび80 pM間で大きな差が認められました（図2）。

表1: MiSeq i100シリーズでの最適濃度検討実験のデザインに推奨される中央濃度

ライブラリー調製キット	中央濃度
Illumina DNA Prep	80 pM
Illumina DNA Prep with Enrichment	60 pM
Illumina RNA Prep with Enrichment	80 pM
Illumina DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA Nano	120 pM
Illumina Viral Surveillance Panel v2	80 pM
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B	80 pM
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel	80 pM
Urinary Pathogen ID/AMR Panel	80 pM
TruSight RNA Pan Cancer	80 pM
16S rRNA Amplicon	80 pM
Pillar oncoReveal Myeloid Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Essential MPN Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel	80 pM
Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA 2 plus CNV Panel	80 pM
PhiX Control v3	120 pM
PhiX Indexed Control (1000 cycles)	120 pM
a. 二本鎖DNAライブラリーは、蛍光分析法のQubit dsDNA Quantitation High Sensitivityアッセイ (Thermo Fisher、カタログ番号: Q32851) を使用して定量し、Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent、カタログ番号: 5067-4626) を使用して平均断片サイズを推測しました。一本鎖DNAライブラリーは、Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher、カタログ番号: Q10212) を使用して定量しました。	
b. 16S rRNAアンプリコンライブラリーは、『16S Metagenomic Sequencing Library Preparation』(パート番号: 15044223 Rev.B)に記載のワークフローを使用して調製しました。	

ステップ5: その他のアプリケーションに依存するメトリクスの確認 (カバレッジ、マッピングなど)

アプリケーションの最適な性能については、その他の二次解析メトリクスを確認します。この例では、マッピングされたリード数の割合のメトリクスから、検証した3つすべてのローディング濃度でロバストな結果が示されています (図2)。二次メトリクスは、装置上およびクラウドソリューションとして利用できるDRAGEN™ Small Whole Genome Sequencingアプリで生成しました。

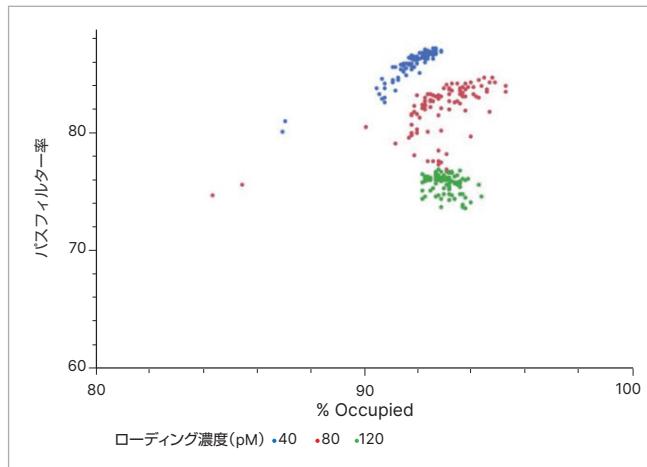


図1: 広範囲なライブラリーローディング濃度にわたる最適なナノウェル占有率

40 pM、80 pMおよび120 pMでローディングしたライブラリーのシーケンスが最適なローディング形状を示していることから、MiSeq i100シリーズは幅広いローディング濃度でロバストな結果を達成できることが示されました。

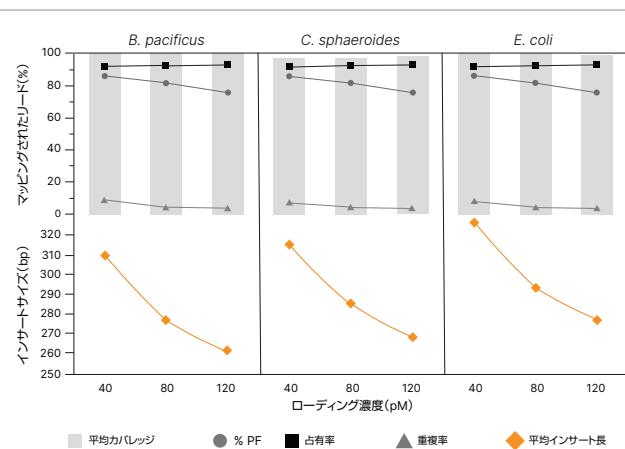


図2: MiSeq i100シリーズのシーケンス性能の最適化
重複、平均カバレッジ、インサートサイズを調べるために最適濃度検討実験の例。

ライブラリー品質

アダプターダイマー、プライマーダイマーおよび部分的なライブラリー生成物など、ライブラリー調製中に生じた短いインサートと夾雑物は、MiSeq i100シリーズのクラスタリングに負の影響を及ぼすことがあります。短いインサートは、長いインサートよりも効率的にクラスターを形成します。シーケンスリード長がライブラリーインサートサイズよりも長い場合、シーケンスはインサートを通過してアダプター配列に進行し、さらにフローセルへ進行する可能性があります。シーケンスがフローセルへ進行すると、リードに塩基を取り込むためのテンプレートがなくなり、シグナル強度が低下します。このためMiSeq i100シリーズでは、Q30スコアの急激な低下またはGベースコールの増加(NextSeq™ 1000およびNextSeq 2000システム、NovaSeq™ 6000システム、NovaSeq Xシリーズなど、その他のイルミナの2チャネル装置でも同様)のいずれか、または両方が発生する可能性があります。

 詳細については「[How short inserts affect sequencing performance](#)」をご一読ください。

これらの短いインサートや夾雑物をクリーンアップまたはサイズ選択ステップ中に除去することが重要です。MiSeq i100シリーズで500 bp × 2のリード長を用いて最適な性能を得るには、ライブラリー平均インサートサイズは600~1200 bpの範囲とし、500 bp未満のインサートではライブラリー全体の質量の1%未満となるようにする必要があります。必要であれば、短いインサートと夾雑物は、オプションのビーズ精製ステップをライブラリー調製プロトコールに加えることで、より効果的に除去できる場合があります。ライブラリー調製が完了したら、シーケンスを実施する前にすべてのライブラリーの品質と純度を検証してください。アジレントバイオアナライザー、Fragment AnalyzerシステムまたはTapeStationを使用して、ライブラリーの完全性、平均インサートサイズおよび夾雑物を確認します。

MiSeq i100シリーズのシーケンスの性能向上に使用された、追加のビーズ精製手順の例を2つご紹介します。1つ目の例では、インサートサイズ分布が幅広い、濃縮されたライブラリーの短いインサートを選択的に除去した結果、Gオーバーコールが排除され、シーケンス性能が向上しました。2つ目の例では、インサートが長いアンプリコンライブラリー中のアダプターダイマー夾雑物を除去すると、500 bp × 2シーケンスにおけるラン性能およびクオリティスコアが改善されることを示しています。

短いインサートの除去によるシーケンス精度の向上

この例では、Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kitを使用して調製した廃水サンプルのライブラリーを、ビーズ対サンプルの比を0.8倍にして、追加のビーズ精製を実施しました。追加のビーズ精製により、250 bp未満(アダプターなしで100 bp未満のライブラリーインサートに相当)の断片のほとんどが効率的に除去され、ライブラリー収量の合計除去率は約35%でした(図3)。

追加のビーズ精製を行ったものと行っていないViral Surveillance Panel v2ライブラリーを、MiSeq i100シリーズで150 bp × 2のリード長でシーケンスし、DRAGEN Microbial Enrichment Plusアプリで解析しました。追加のビーズ精製を行ったライブラリーのシーケンスでは、プロトコールを変更していない場合と比べて、Gオーバーコールが減少し、平均リード長およびポストクオリティリード率などの二次メトリクスが改善し、微生物検出の増加が認められました(図4)。

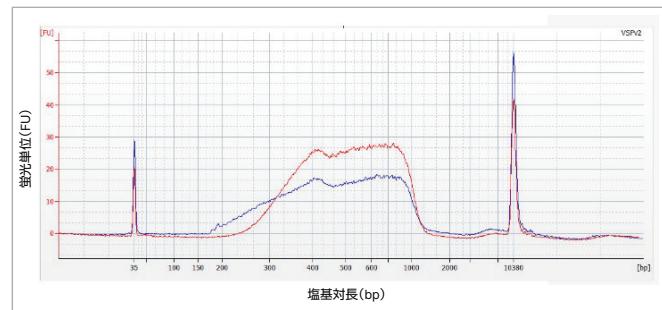
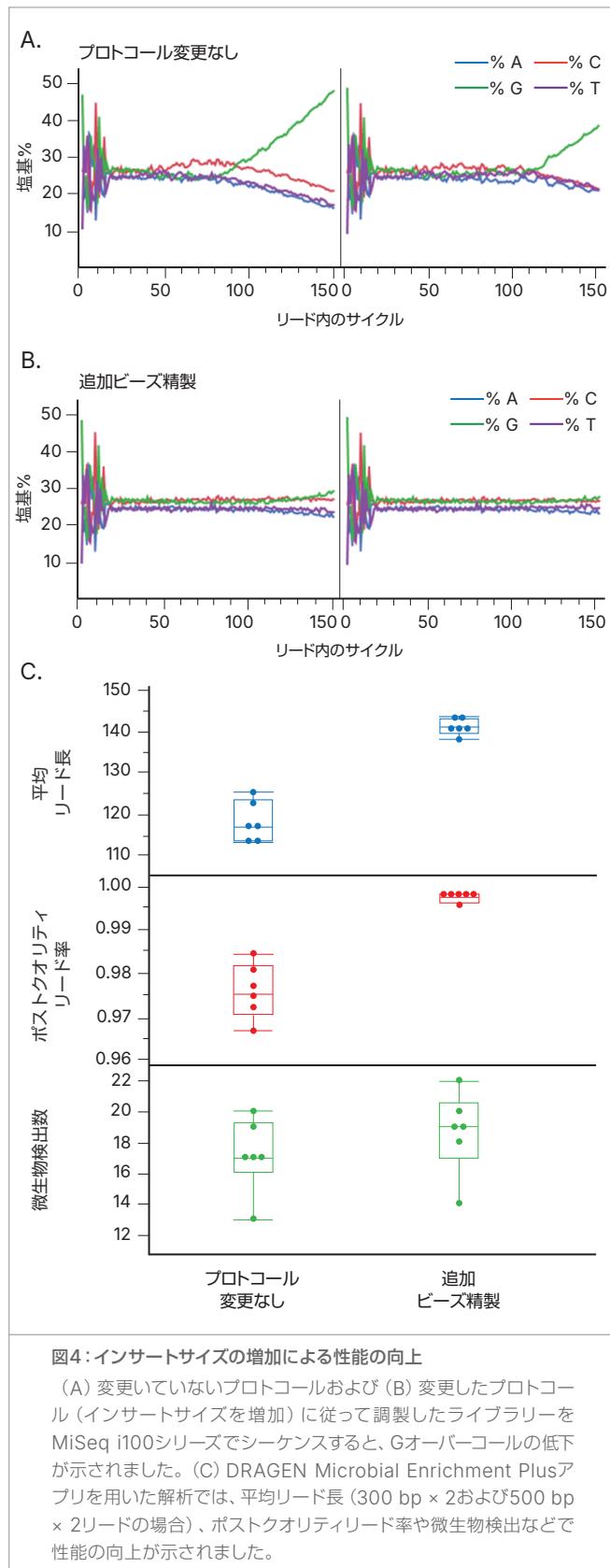


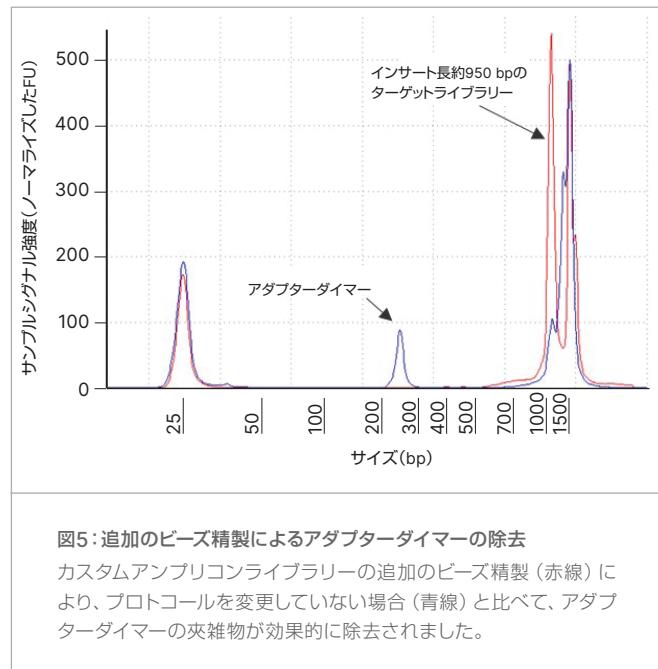
図3:追加のビーズ精製によるインサートサイズの増加

追加のビーズ精製(赤線)により、プロトコールを変更していない場合(青線)と比べて、250 bp未満のほとんどの断片が効率的に除去されました。

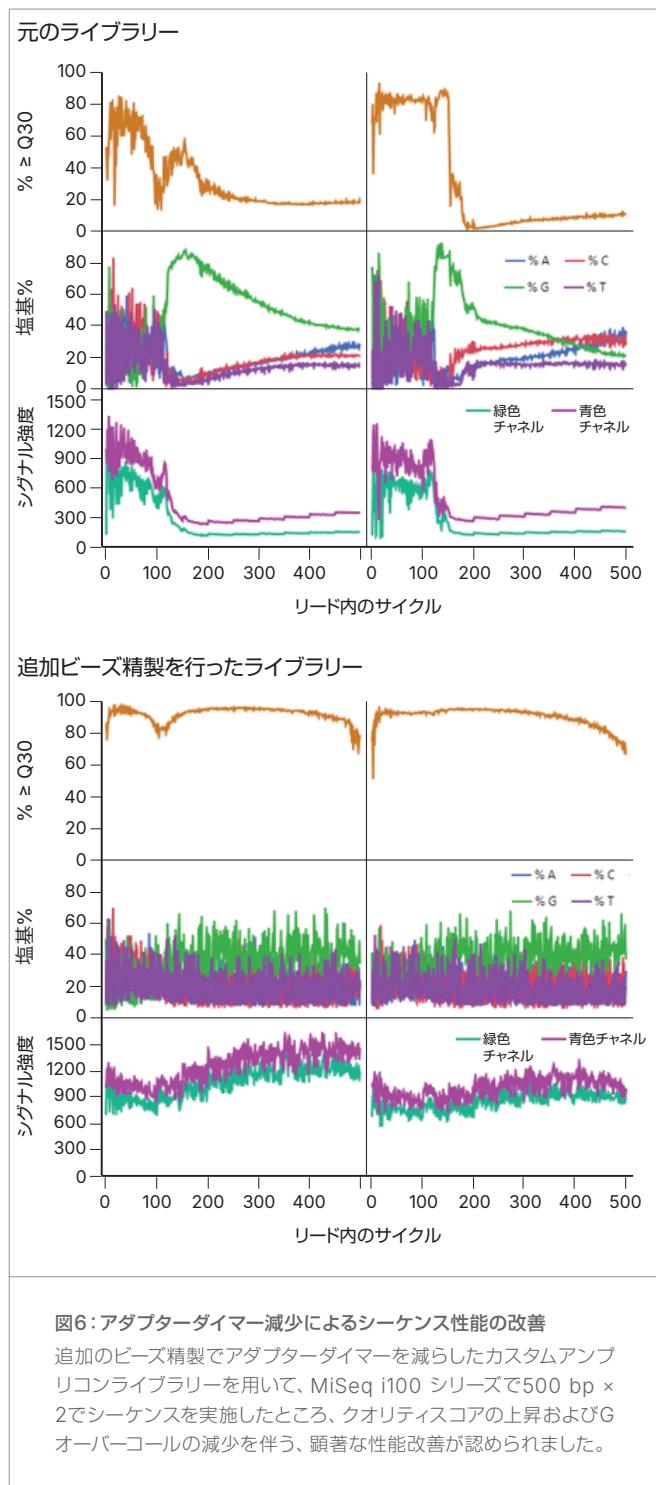


アラブターダイマー夾雑物除去によるシーケンス性能の最適化

この例では、950 bpのターゲットインサート長を含むカスタムアンプリコンライブラリーを、ビーズ対サンプルの比を0.6倍にし、追加のビーズ精製を3回連続で実施しました。TapestationでのライブラリーQCでは、追加のビーズ精製によって断片長約250 bpのアダプターダイマー夾雑物の大部分が選択的に除去され、目的のライブラリーは保持されていることが示されています(図5)。



追加のビーズ精製を行ったものと行っていないカスタムアンプリコンライブラリーを、MiSeq i100シリーズで500 bp × 2のリード長でシーケンスしました。元のライブラリーを用いたシーケンスランでは、サイクル100付近から性能低下の開始が示されています。この問題はアダプターダイマーの存在に起因し、シグナル強度の急激な低下、Q30スコアの低下、およびGベースコールの増加といった特徴が認められました。追加のビーズ精製を行ったライブラリーのシーケンスでは、性能の向上が示されました(図6)。



ヌクレオチドの多様性

ヌクレオチドの多様性は、ランの各サイクルに存在する各塩基 (A, C, G, T) の相対的な割合を示します。ヌクレオチドの均衡は、シーケンスシステムによるカラーマトリックス修正およびシグナル強度のノーマライゼーションに重要です。MiSeq i100 シリーズ搭載の適応型 Real-Time Analysisソフトウェアは、多様性の低いライブラリーの正確なベースコール用に入念に開発されました。多様性の低いライブラリーのシーケンスの最適な性能は、最小のPhiX添加率 ($\geq 5\%$) によって達成され、高品質リード数を最大化できます。

この例では、MiSeq i100 シリーズでシーケンスした 5% および 20% PhiX を添加した多様性の低い 16S アンプリコンライブラリーが、多様性の高いヒト Illumina DNA Prep ライブラリーの性能と同等のパフォーマンスを示しています (図7)。

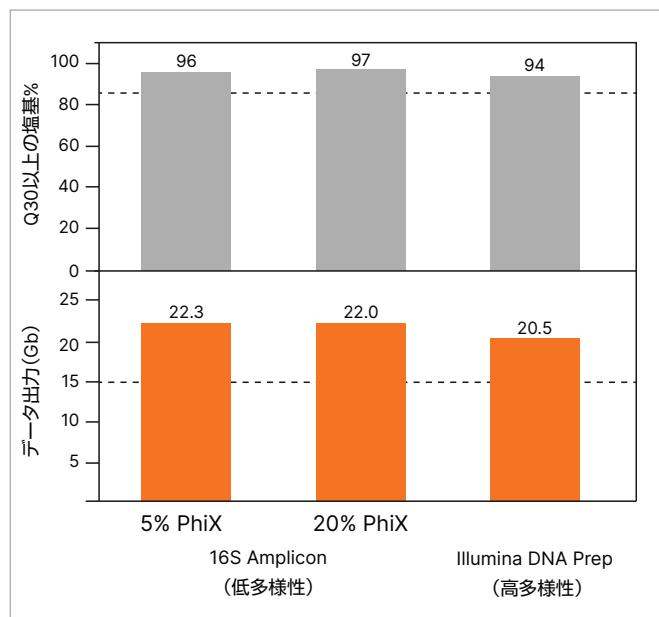


図7:多様性の低いライブラリーへの対応

MiSeq i100 シリーズに搭載されたソフトウェアは、Q30 以上でベースコールされた塩基の割合と Gb 出力で示されるように、多様性の低いライブラリーのシーケンス性能を最適化します。すべてのランは、MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (600 cycles) を使用し、リード長 301 bp × 2 でシーケンスしました。破線は性能仕様を表しています。

まとめ

シーケンスケミストリーの画期的な進歩とMiSeq i100シリーズの統合型データ解析が、使いやすさの向上、精度の高いデータ、並外れたスピードを実現します。このテクニカルノートで説明したベストプラクティスに従い、ライブラリーの品質評価、ローディング濃度の最適化、およびライブラリーのブーリングを実施することで、MiSeq i100シリーズの性能を最大化できます。

詳細はこちら

[MiSeq i100およびMiSeq i100 Plusシーケンスシステム](#)

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/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

© 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。

Pub. No. M-GI-03322 v2.0-JPN 27NOV2025

