



ナノポアシーケンスのロングリードにより細菌ゲノムをアセンブリ

微生物の真の多様性と生物学的特徴を理解するには、十分にアノテーションされた完全なゲノムを作成することが不可欠です。しかし、細菌ゲノムの90%は不完全な状態と考えられています¹。

PCRフリーのナノポアシーケンスのロングリードを用いれば、完全かつリファレンス品質の細菌ゲノムシーケンスをアセンブリできます。ナノポアシーケンスは、他のシーケンスプラットフォームとは異なり、GCリッチ領域におけるバイアスが生じないことが示されており²、従来のシーケンス技術ではアクセスできないリピート配列が豊富なシーケンスや構造変異もカバーできます。

ここでは、シーケンス機器のMinIONまたはGridION™でMinION™フローセルを用いて、単一生物の培養から細菌ゲノムアセンブリ作成のための簡易ワークフローを紹介します。



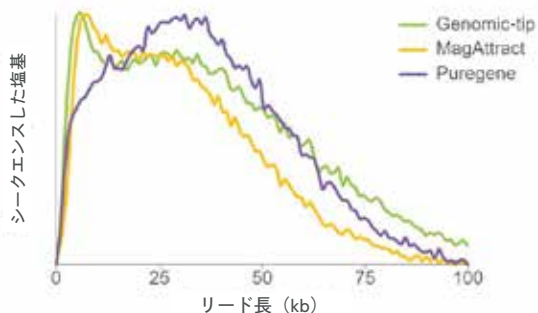
抽出：

高分子DNAを取得



分離菌からのDNA抽出には、**QIAGEN Genomic-tip 500/G**をおすすめします。リード長と収量を最大化できることが確認されています。抽出したDNAに対してサイズセレクションを実施することにより、N50リード長をさらに伸ばすことができます。サイズセレクションのためのオプションには、**Agencourt AMPure XPビーズ**とOxford Nanopore社の**Short Fragment Eliminator Expansion**があります。

糞便、土壌、培養などからの抽出プロトコルや、別のサイズセレクション法の詳細：community.nanoporetech.com/docs/prepare

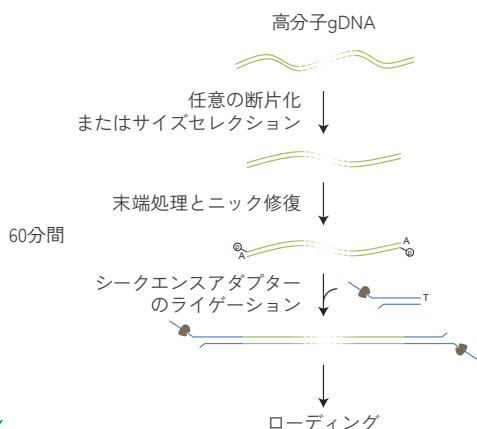


ライブラリ調製：

キットを選択

10分間での作業が可能な迅速なオプションなど、ライブラリ調製キットの詳細：

store.nanoporetech.com/sample-prepare.html



シーケンス用のgDNAを準備するには、スループットを最大化してリード長を制御できる**Ligation Sequencing Kit**の使用をおすすめします。

シーケンスの費用対効果をも高めるマルチプレックスオプションを用意しています。PCRフリーで、1枚のフローセルで最大96のサンプルをマルチプレックスシーケンスできる**Native Barcoding Kit**をおすすめします。また、最大96のサンプルをマルチプレックスシーケンスできるPCRベースのオプションも用意しています。

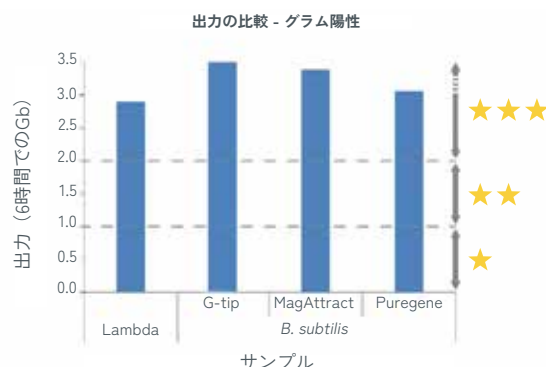


シーケンス：MinION Flow Cellで柔軟性を最大化

MinIONの詳細：
nanoporetech.com/products/minion



細菌ゲノムのシーケンスはMinIONフローセルで行うことをおすすめします。このフローセルは、ポータブル型のシーケンスプラットフォームであるMinIONとMinION Mk1Cで個別に使用できます。また、ペンチトップ型のGridIONでは、最大5枚のMinIONフローセルを用いてオンデマンドシーケンスを実施することができます。そのため、マルチプレックスの規模、サンプル数、実験の目標に合わせてフローセルの数を調整することが可能です。



アセンブリにあたっては、High Accuracy Mode (HAC) でベースコールを行い、ゲノム当たり10 kb以上のリードを30倍以上のカバレッジまでシーケンスすることが推奨されます。フローセル当たり12~24のサンプルをマルチプレックスし、サンプル（予測されるゲノムの長さや断片長の分布など）と実験の目標に合わせて規模を調整することをおすすめします。ただし、変異コールも実施したい場合は、シーケンスのカバレッジを高めることが推奨されます。

ナノポアシーケンスプラットフォームの詳細と比較：nanoporetech.com/products/comparison

解析： アセンブリツールを選択

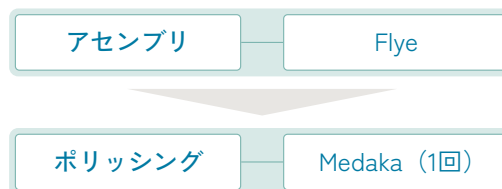
データ解析ソリューションの詳細：
nanoporetech.com/analyse

細菌ゲノムのアセンブリには、サードパーティーのDe novoアセンブリツールFlye³をおすすめします。この解析パッケージは、インプットとしてRawナノポアリードを使用し、出力としてポリッシングされたコンティグを作成する統合されたパイプラインです。また、Medaka⁴によりポリッシングを1回実施することをおすすめします。両ツールはGitHubで公開されています。

最大10 Mb前後の細菌ゲノムであれば、標準的なノートパソコン（メモリ約16 GB）を用いてFlyeによりアセンブリすることが可能です。

この完全な解析パイプラインはEPI2ME Labsでも公開されています。EPI2ME Labsでは、ナノポアシーケンスデータの解析をサポートし、バイオインフォマティクス技術を向上させるためのベストプラクティスワークフローや双方向的なチュートリアルを提供しています。詳細：labs.epi2me.io。

FASTQインプットファイル



出力されたFASTAファイル

詳細：nanoporetech.com/applications/microbiology



Twitter：@nanopore
www.nanoporetech.com

参考文献：

1. Land, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct. Integr. Genomics*. 15(2): 141-161 (2015).
2. Browne, P. D. et al. GC bias affects genomic and metagenomic reconstructions, underrepresenting GC-poor organisms. *GigaScience*. 9(2): g1aa008 (2020).
3. Kolmogorov, M. et al. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotech.* 37: 540-546 (2019).
4. GitHub. Medaka. Available at: <https://github.com/nanoporetech/medaka> [Accessed: 25 August 2022].

Oxford Nanopore Technologies、Wheel icon、GridIONおよびMinIONは様々な国で登録されたOxford Nanopore Technologies plcの商標です。本文書に含まれるブランドと名称はすべて各所有者に帰属します。© 2022 Oxford Nanopore Technologies plc. All rights reserved. Oxford Nanopore Technologies製品は、現在全て研究用です。
WF_1067(JP)_V3_05Sep2022.