



ナノポアシーケンスとEPI2ME™ワークフローによる迅速なプラスミド解析

新規タンパク質を合成しようとする研究者の根幹となる能力は、対象タンパク質をコードする遺伝子と、発現や遺伝的特徴を制御して任意の選択圧をかける補助的要素を含むプラスミドを構築する能力です。プラスミド構築により精巧な制御が可能になりますが、実験を成功させるにはすべての機能が存在し、正確であることを確認することがきわめて重要です。

ナノポアシーケンスではインハウスで完全長プラスミドの高精度で柔軟かつ安定した解析を数時間で実施できます。これにより構築したプラスミドを評価のために外部へ送付する必要がなくなります。1回の実験で完全なシーケンスデータを取得することにより、複数の技術を用いて構築したプラスミドの正確性を確認する必要もなくなります。

ここでは、シーケンス機器 MinION または GridION™ 解析プラットフォーム EPI2ME で MinION™ Flow Cell を用いてプラスミド構築物のシーケンスアセンブリを行うための柔軟かつ迅速なワークフローを紹介します。



EPI2ME

抽出： 高分子量DNAを取得

夾雑物（洗浄剤、変性剤、キレート化剤、高塩濃度溶液など）を効果的に除去する抽出法を選択することにより、不純物のない高品質な DNA サンプルからライブラリ調製を行うことができます。

そのために VWR **Plasmid Miniprep Kit II** など、プラスミドのミニプレップキットの使用をおすすめします。最大 200 サンプルを一晩培養して信頼性の高い量の高純度 DNA を抽出できます。その後、サンプル毎に 400 ng のプラスミド DNA からサンプル調製を行います。DNA の正確な定量には **Qubit fluorometer** の使用をおすすめします。

プラスミド抽出に関する指針と推奨事項の詳細は、
当社の抽出プロトコールライブラリをご覧ください：
nanoporetech.com/docs/prepare/extraction_protocols



Recommendations for plasmid DNA extraction

This info sheet includes three methods linked below which Oxford Nanopore Technologies have tested to extract plasmid DNA. The extracted samples were sequenced using the [Plasmid Sequencing \(using SOK-RBK004\)](#) protocol with the [Rapid Barcoding Sequencing Kit \(SOK-RBK004\)](#) on MinION R9.4.1 (FLO-MIN106D). However, alternative extraction methods

ライブラリ調製： サンプルのマルチプレックス

シーケンスとダウンストリーム解析用にライブラリを準備するには、12 または 96 プレックスの **Rapid Barcoding Kit** を選択することができます。この PCR フリーキットでは、シーケンスアダプターを付加する前に、バーコードを断片化してプラスミド DNA に付着させるトランスポザーゼを使用します。

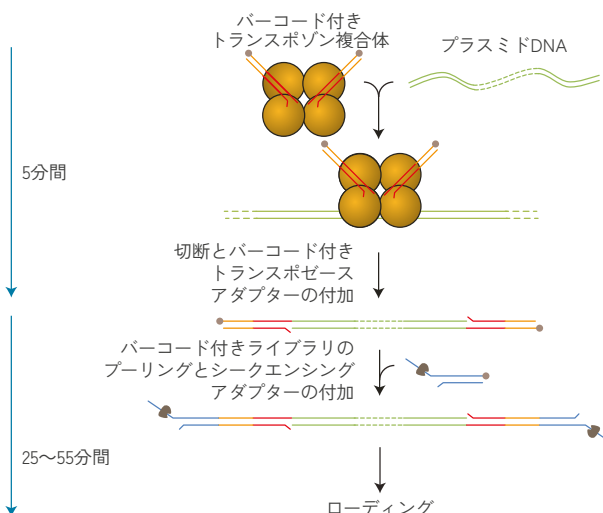
シーケンスパフォーマンスを向上させるため、**Agencourt AMPure XP** などの溶液により、ビーズを用いたライブラリの洗浄を実施することも可能です。必須ではありませんが、洗浄によりシーケンスの効率が向上し、より短時間で多くのデータを得ることができます。

1枚の MinION Flow Cell で多くのサンプルのマルチプレックスを行うことにより、サンプル当たりのコストを大幅に下げることができます。96種類のバーコードをすべて使用した場合、サンプル当たりわずか13ドルでデータを生成できます。

サンプル数	12 個のプラスミド	96 個のプラスミド
サンプル当たりの価格	84 ドル	13 ドル

96-plex rapid barcoding kit の詳細：
store.nanoporetech.com/rapid-barcoding-kit-1

Rapid Barcoding Kit のワークフロー



シーケンス：必要な読取りカバレッジに達するまで実施



プラスミドライブラリは MinION Flow Cell でシーケンスすることをおすすめします。これは、ポータブル機器の **MinION** と **MinION Mk1C** で使用でき、ルーチンのシーケンスを容易に実施することができます。多くのサンプルを定期的に解析する場合、ペンチトップ型機器の **GridION** により、一度に最大 5 枚のフローセルでオンデマンドシーケンスを行えます。

クローンバリデーション解析ワークフローでは、迅速、高精度または非常に高精度なベースコールモデルからプラスミドのコンセンサス配列を作成することができます。きわめて高い1塩基当たりの精度が要求される実験では、非常に高精度なベースコールモデルと GridION 機器の使用をおすすめします。

MinION の詳細：
nanoporetech.com/products/minion



ランタイムはサンプル数とプラスミド長によりますが、信頼性の高い結果を得るのに必要なリードはプラスミド当たりわずか2,500前後です。約 5 kb のプラスミドを 96 プレックスで解析する場合、2 時間未満で作成可能です。**Flow Cell Wash Kit** を用いれば、ライブラリの除去後にフローセルを再利用することができ、さらにコストを削減できます。

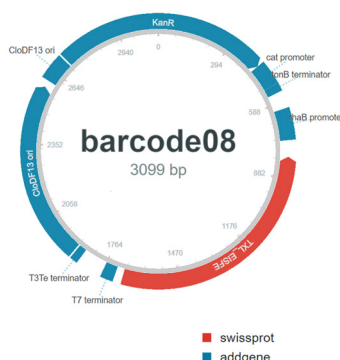
ナノポアシーケンスプラットフォームの詳細と比較：nanoporetech.com/products/comparison

解析：EPI2MEを使用 Clone Validationワークフロー

プラスミドのアセンブリとアノテーションは、**EPI2ME** (当社の安全なクラウドベースの解析プラットフォーム) または **EPI2ME Labs** (ローカル機器上で作動するチュートリアルベースの解析プラットフォーム) で、**Clone Validation ワークフロー** を用いて行います。Clone Validation ワークフローは、Canu¹ (プラスミドのアセンブリ)、Tricycler² (アセンブリの環状化と精製)、Medaka³ (シーケンスのポリッシング)、pLannotate⁴ (アノテーション、Swiss-Prot⁵ や Addgene⁶ などのデータベースのデータを使用) など、プラスミドのアセンブリとアノテーション用の多くのベストプラクティスツールを使いやすい解析パイプラインに組み込んだものです。

このワークフローにより作成されるレポートには、同定されたプロモーター、オペレーター、タンパク質コード遺伝子などの情報が、同定に使用されたデータベース毎に色分けされて表示されます。

EPI2ME Labs のチュートリアルの詳細：
labs.epi2me.io/nbindex



各機能に関する補足情報は外部リンク先で確認できます。各プラスミドの完全な FASTA シーケンスをダウンロードして、他のダウンストリーム解析に使用することも可能です。

ナノポアシーケンス製品の一覧：store.nanoporetech.com



Twitter : @nanopore
www.nanoporetech.com

参考文献：

1. Koren, S. et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research* 27, 722-736 (2017).
2. Wick, Ryan R. et al. Tricycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes. *Genome Biol.* 22, 266 (2021).
3. Oxford Nanopore Technologies. Medaka. Software. Available at: <https://nanoporetech.github.io/medaka> [Accessed: 14 January 2022]
4. McGuffie, M. & Barrick, J. pLannotate: engineered plasmid annotation. *Nucleic Acids Research* 49, W516-W522 (2021)
5. UniProtKB/Swiss-Prot - SIB Swiss Institute of Bioinformatics | ExPASy. [Expasy.org](https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot) (2022). at <https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>
6. Kamens, J. The Addgene repository: an international nonprofit plasmid and data resource. *Nucleic Acids Research* 43, D1152-D1157 (2014).

Oxford Nanopore Technologies、Wheel icon、MinIONおよびGridIONは様々な国で登録されたOxford Nanopore Technologies plcの商標です。その他のすべての商標および名称は、該当する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_1146(JP)_V1_17Jan_2022.