

Nanobind UL Library Prep Kit

和文マニュアル

Cat.No. HBK-ULN-001
Version 1.0

※ 本資料は、Nanobind UL Library Prep Kit Handbook (Release Date: 03/24/2021) を翻訳した資料です。
事前にオリジナルの英文マニュアルを必ずご確認ください。

目次

目次	2
キットの仕様	3
キット構成	3
保存条件	3
使用期限	3
使用目的	3
保存条件	3
使用期限	3
安全性に関する注意	3
使用目的	3
機器・試薬一覧	4
序文	5
キットの概要	5
ワークフロー	6
シーケンスデータ	7
R9.4 シーケンスの要約	7
R10.3 シーケンスの要約	7
最長リード	8
細胞株からのシーケンス	9
ヒトパンゲノムリファレンスウルトラロングシーケンス ベータテスト	10
細菌からのウルトラロングシーケンス	11
ヒト血液からのウルトラロングシーケンス	12
有核血液からのウルトラロングシーケンス	13
組織からのウルトラロングシーケンス	14
植物からのウルトラロングシーケンス	15
R10.3 細胞株からのウルトラロングシーケンス	16
プロセスとシーケンスのヒント	17
Nanobind UHMW DNA の抽出	17
インプット DNA 要件	17
プロセスのヒント	17
MinION へのローディング	18
PromethION へのローディング	18
リードの分割	18
インプット DNA の滴定	19
インプット FRA の滴定	19
ヌクレアーゼフラッシュスループットとポアリカバリー	21
UHMW (50 kb-1+ Mb) DNA 抽出プロトコル	22
UHMW DNA 抽出 - 培養細胞 (EXT-CLU-001)	22
UHMW DNA 抽出 - グラム陰性菌 (EXT-GNU-001)	22
UHMW DNA 抽出 - グラム陽性菌 (EXT-GPU-001)	22
UHMW DNA 抽出 - 哺乳類全血 (EXT-BLU-001)	22
UHMW DNA 抽出 - 有核血液 (EXT-NBU-001)	22
ウルトラロングライブラリー調製プロトコル	23
Nanobind ライブラリー Prep - Ultra long sequencing (LBP-ULN-001)	23
QC 手順	23
ライブラリーの保存	23
トラブルシューティング FAQ	23

キットの仕様

キット構成

Nanobind UL Library Prep Kit	v1
Part Number	NB-900-601-016
Number of Samples	6
Nanobind Disks	6
Buffer NAF	3.3 mL
Buffer WAF	13.2 mL
Buffer EB+	10 mL

保存条件

すべての試薬は室温（18～25℃）で保管してください。

使用期限

Nanobind UL Library Prep Kitの使用期限は購入日から1年間です。

使用目的

Nanobind UL Library Prep Kitは研究用のみを目的としています。

UHMW DNA Aux Kit	v1
Part Number	NB-900-101-01
Number of Samples	10
Buffer RBC 10X	10 mL
Proteinase K	0.25 mL
RNase A	0.25 mL
Buffer CLE3	0.45 mL
Buffer ULL	5 mL
Buffer CS	0.5 mL

保存条件

RNase AおよびBuffer RBC10Xは4℃で保存してください。
その他の試薬はすべて室温（18～25℃）で保管してください。

使用期限

UHMW DNA Aux Kitの使用期限は購入日から1年間です。

安全性に関する注意

Buffer ULLにはグアニジン塩酸塩が含まれています。
グアニジン塩酸塩は、飲み込んだり吸入したりすると有害であり、皮膚や眼の刺激を引き起こします。漂白剤や酸性溶液と混ぜないでください。

使用目的

UHMW DNA Aux Kitは研究用のみを目的としています。

機器・試薬一覧

機器・試薬	メーカー・製品番号
Nanobind UL Library Prep Kit	Circulomics (NB900 601 01)
Ultra-Long DNA Sequencing Kit	Oxford Nanopore Technologies (SQK-ULK001)
Flow Cell Wash Kit	Oxford Nanopore Technologies (EXP-WSH004)
Flow Cell Priming Kit	Oxford Nanopore Technologies (EXP-FLP002)
MinION Flow Cell (R9.4 or R10.3)	Oxford Nanopore Technologies (FLOMIN106D or FLOMIN111)
PromethION Flow Cell (R9.4 or R10.3)	Oxford Nanopore Technologies (FLO-PRO002 or FLOPRO111)
MinION, GridION, or PromethION Sequencer	Oxford Nanopore Technologies
Magnetic Tube Rack	Thermo Fisher DynaMag-2 (12321D)
Mini-Tube Rotator	Fisher Scientific Mini-Tube Rotator (05-450-127)
Heat Block (or Water Bath)	Fisher Scientific Isotemp Dry Bath Incubator (11-715-125DQ)
Mini-centrifuge	Ohaus (FC5306)
Micro-centrifuge	Eppendorf (5404000413)
1.5 mL DNA LoBind Microcentrifuge Tubes	Eppendorf (022431048)
Wide Bore 200 μ L Pipette Tips	USA Scientific (1011-8410)
Wide Bore 1000 μ L Pipette Tips	Thermo Scientific (2079G)
UV/Vis	Thermo Fisher Scientific NanoDrop 2000
Fluorescent DNA Quantification	Thermo Qubit 3.0, dsDNA BR and RNA BR Assay Kits

キット、バッファー、消耗品の正しい保管方法については、Oxford Nanopore Technologiesのマニュアルに従ってください。

序文

Nanobindは、高密度シリカのナノ構造で覆われた磁気ディスクであり、高品質なDNAおよびRNAの迅速な抽出や精製に用いることができます。高表面積とユニークな結合機構により、非常に高い結合能が得られ、高純度の高分子量DNAを、マイクロ遠心管を用いて単離することができます。このシリカDNA抽出技術には、一般的な溶解法、結合法、洗浄法、溶出法を用いています。各チューブに1枚のディスクを使用します。しかし、長鎖DNAを切断する磁気ビーズやシリカスピンカラムとは異なり、Nanobindは断片化せずにDNAを結合・遊離させ、メガベースまでのDNAを得ることができます。

キットの概要

Nanobind UL Library Prep Kitは、Nanobind Ultra Long Sequencingで使用され、Oxford Nanopore MinION / GridION / PromethIONでウルトラロング（100 kb - 1+ Mb）リードを生成します。この方法は、100+ kbおよび200+ kbのリード生成を最大化するように設計されており、以前のウルトラロングシーケンスメソッドよりも10~100倍高いデータスループットを生成します。MinIONではフローセルあたり10~25+ Gb、PromethIONではフローセルあたり40~125+ Gbのスループットで50~100+ kbのRead LengthのN50を生成します。ランには通常、長さが1~2+ Mbに及ぶロングテールのリードがあります。このキットを使用して生成された現在までの最長リード長は4.2 Mbです。

まず、適切なNanobind Big DNA kit（CBB、組織、または植物）を使用して、40 µgのUHMW（50 kb - 1+ Mb）DNAを抽出します。最良の結果を得るには、DNAが非常にきれいで、500 kb以上のDNAが多く含まれている必要があります。新しいNanobind UHMW DNA抽出プロトコルは、より長く、より粘性の低いmegabaseサイズのDNAを生成するために開発されました。UHMW DNA Aux kitは、これらの新しいプロトコルを実行するためにNanobind Big DNA kitと組み合わせて使用されます。

次に、Oxford Nanopore Ultra-Long DNA Sequencing Kit（SQKULK001）を使用して、ライブラリー調製します。これは、断片化を最小限に抑えながらUHMW DNAを効率的に適応させるように最適化された転置ライブラリー調製です。

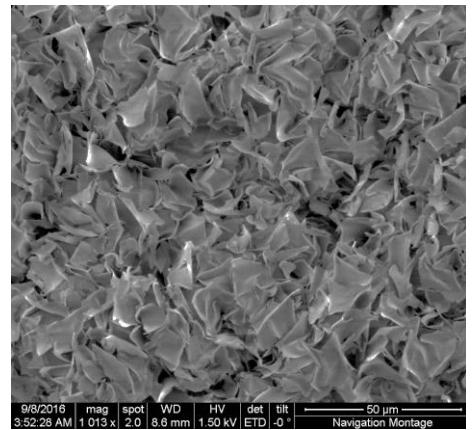
その次に、Nanobind UL Library Prep Kitを使用してライブラリーをクリーンアップします。Nanobind diskは、切断することなくメガベース長のライブラリー精製を可能にします。精製産物は、すべてのOxford Nanoporeシーケンシングプラットフォームおよびキットと互換性があります。

最後に、シーケンスは、R9.4またはR10.3フローセルのいずれかを使用して、任意のOxford Nanopore社の機器で実行されます。標準的なライブラリー調製プロトコルは、MinION / GridION用の6Xスケールライブラリー、または1Xフラクションに分割されたPromethION用の3Xスケールライブラリーを用います。各1Xライブラリーフラクションは、ヌクレアーゼ洗浄ステップによって間隔を空けて、24時間ごとに同じフローセルに順次ロードされ、合計72時間のシーケンスが行われます。抽出からライブラリー調製およびシーケンシングまでのワークフロー全体が最適化されており、ウルトラロングリードと高いポア占有率を実現します。高いポア占有率を維持することは、高いシーケンススループットをえるためのキーとなります！

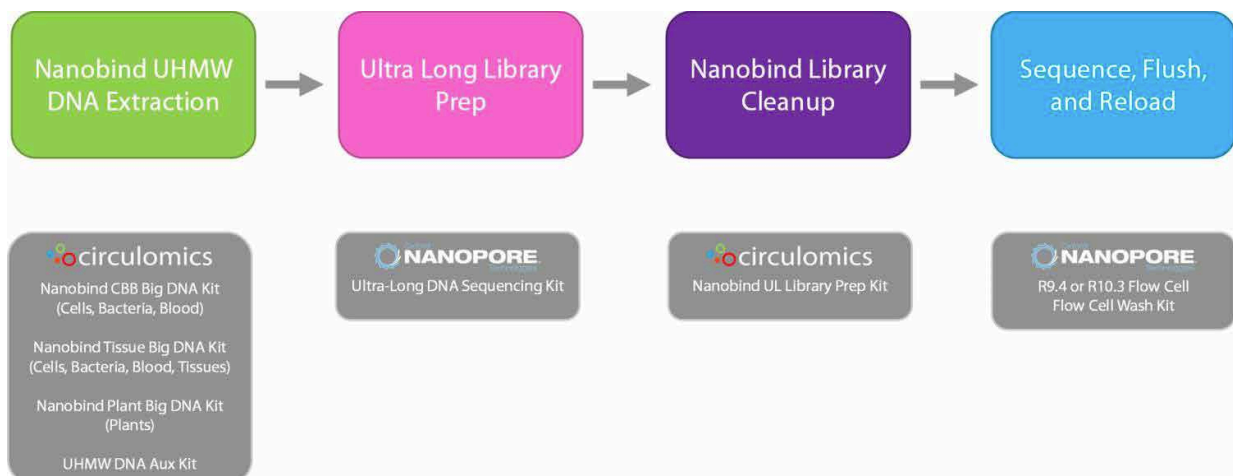
MinIONまたはPromethIONシーケンスのいずれかに使用できる単一のライブラリー調製プロトコルが提供されています。唯一の違いは、フローセルのロードステップにあります。

検証済みのさまざまなサンプルタイプ用のUHMW DNA抽出プロトコルも提供されています。

プロトコルは随時更新および追加されるため、最新のリストとプロトコルの現在のバージョンについては、Nanobindサポートページを確認してください（<http://www.circulomics.com/support-nanobind>）。

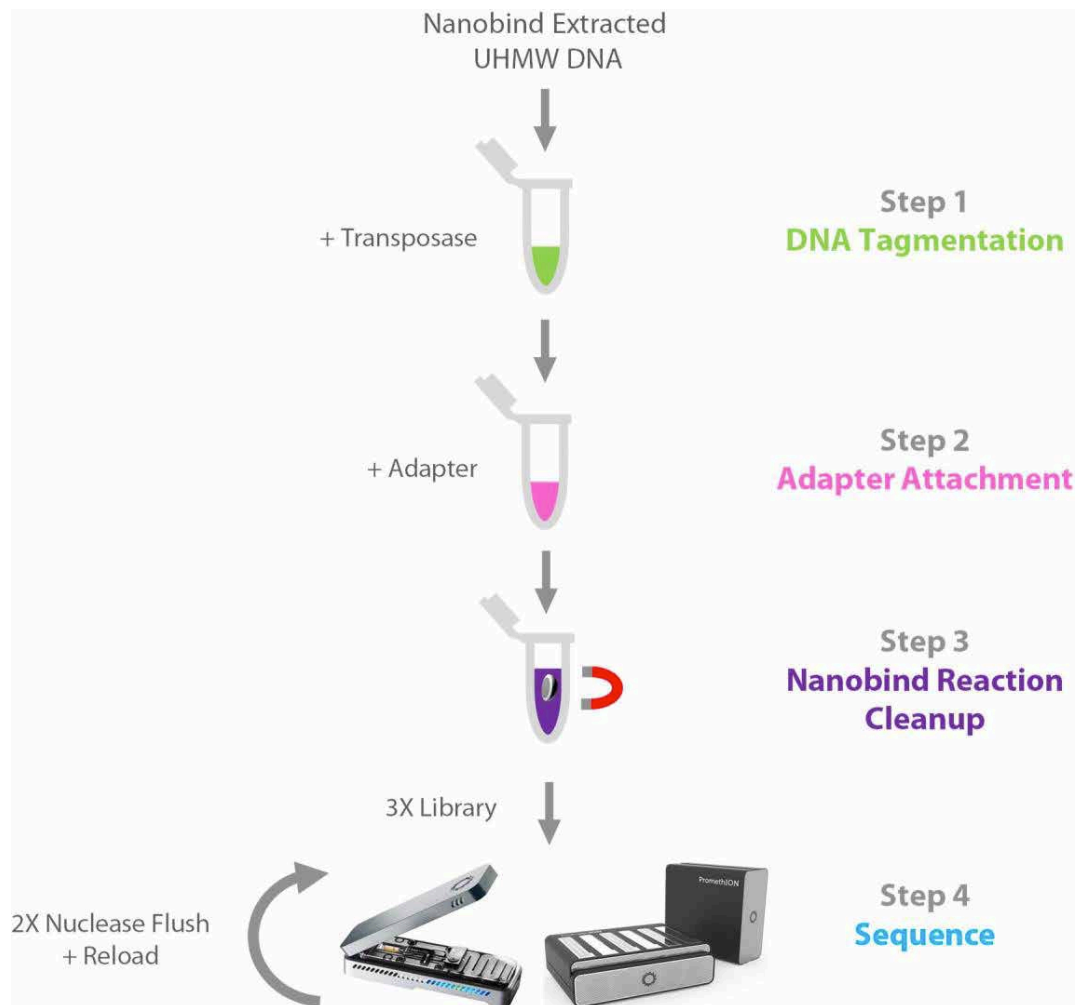


Nanobindによる高密度シリカ表面構造のSEM画像



Nanobind Ultra Long Sequencingは、UHMW DNA抽出、ライブラリー調製、ライブラリークリーンアップ、およびシーケンシング用のキットの組み合わせを使用して、多数のウルトラロングリード（> 100 kb）を生成します。

ワークフロー



Nanobind Ultra Long Sequencing Library調製とシーケンスのワークフロー

シーケンスデータ

以下は、適切なNanobind Big DNA Kitを用いて、Nanobind UHMW DNA抽出を行い、次に、Nanobind UL Library Prep KitおよびOxford Nanopore Ultra-Long DNA Sequencing Kitを用いて、ライブラリー調製およびシーケンスを行うことによって得られたデータです。要約を以下の表に示します。最新のデータについては、ホームページをご確認ください。

サンプルはMinIONとPromethIONのリード長分布がほとんど同じですが、全データ処理量はPromethIONの方が3~5倍高いという主な違いがあります。ライブラリーは、R9.4およびR10.3の両方のフローセルと互換性があります。

R9.4 シーケンスの要約

Nanobind Ultra Long Sequencing – R9.4 Sequencing Metrics							
Sample	Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
HG02723 Human Cell Line	MinION	24.5	96.8	11.9	4.7	6	1.2
HG02723 Human Cell Line	PromethION	129.6	93.1	60.5	20.3	0	0.99
Human Blood	MinION	18.6	104.6	9.9	4.2	11	1.5
Human Blood	PromethION	67.6	84.4	28.4	8.1	6	1.3
<i>E.coli</i>	MinION	25.9	66.4	8.6	2.7	1	1.1
<i>E.coli</i> ¹	PromethION	77.4	128	47.1	22.5	133	3.3
<i>L.monocytogenes</i>	MinION	22	50	4.8	1.3	1	1.2
<i>L.monocytogenes</i>	PromethION	58	53	13.2	3.6	3	1.0
FishBlood	MinION	16.8	98.6	8.3	3.4	1	1.0
Shingleback Lizard Blood ²	PromethION	62.8	78.4	24.0	5.8	3	1.6
Bovine Lung ³	PromethION	38.5	51	8.9	1.9	3	0.9
Pepper Leaf ⁴	MinION	9.0	51.5	1.9	0.3	0	0.52

1 Data generated in collaboration with Oxford Nanopore Technologies

2 Data generated in collaboration with Garvan Institute

3 Data generated in collaboration with USDA

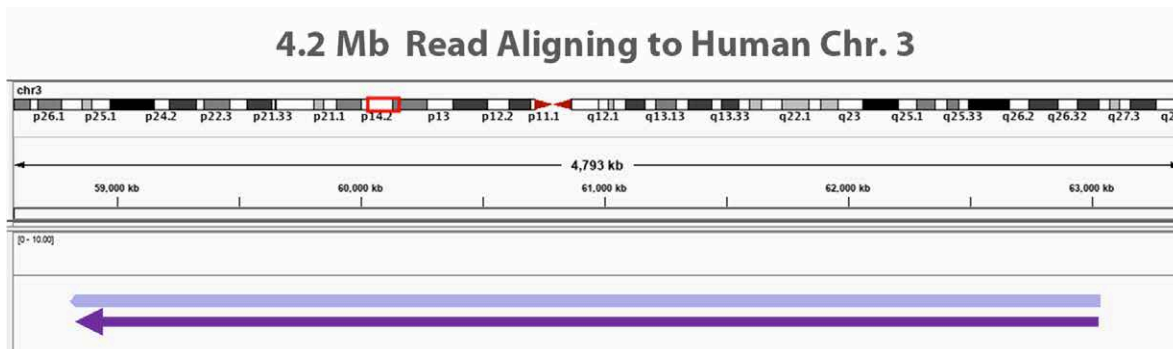
4 Data generated in collaboration with Keygene

R10.3 シーケンスの要約

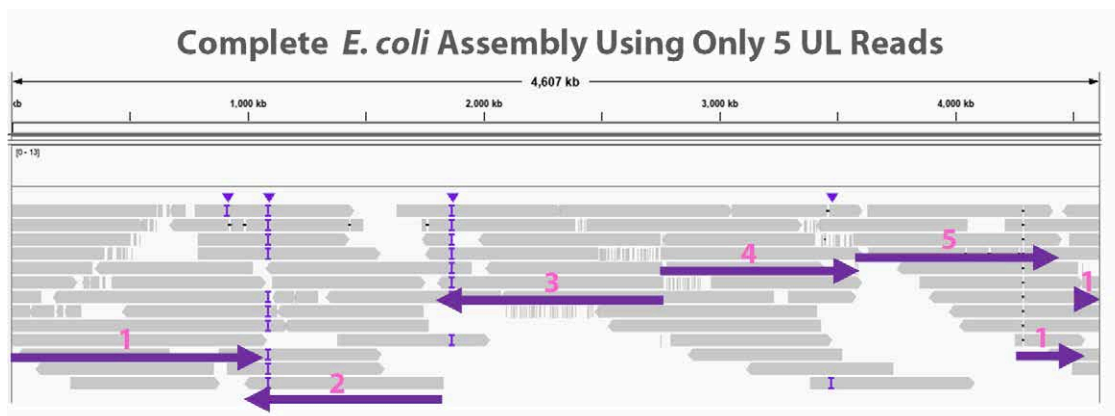
Nanobind Ultra Long Sequencing – R10.3 Sequencing Metrics							
Sample	Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
HG02723 Human Cell Line	PromethION	89.7	83.3	37.2	11.0	1	1.1
Human Blood	PromethION	43.3	90.3	19.5	5.9	14	1.6

最長リード

Nanobind Ultra Long Sequencingは、最長のシーケンスリードを生成するために使用されています。現在までの最長記録は、ヒト3番染色体への4.2 Mb リードマッピングです。このリードは、Oxford Nanoporeによって細胞株から取得されました。各ランで1~2 + Mbのロングリードが見られます。



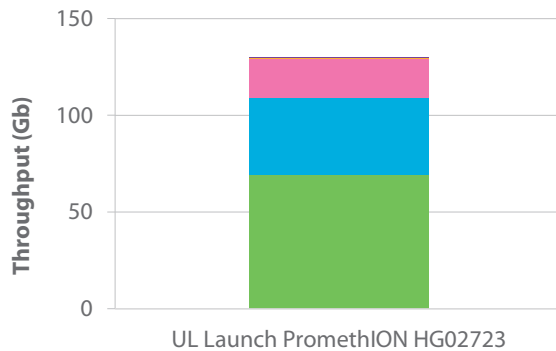
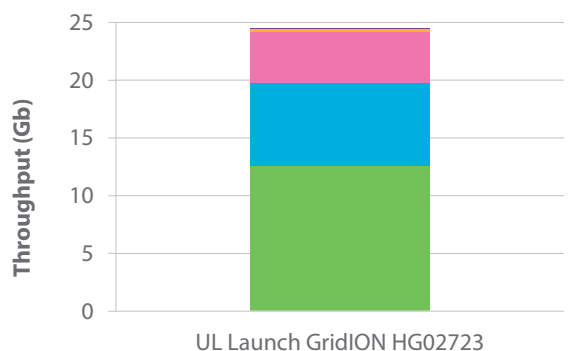
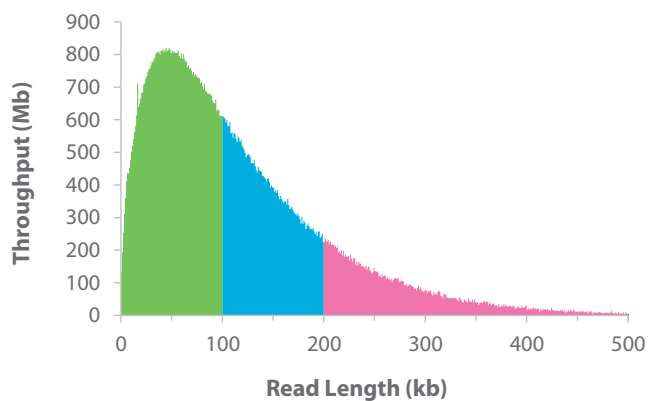
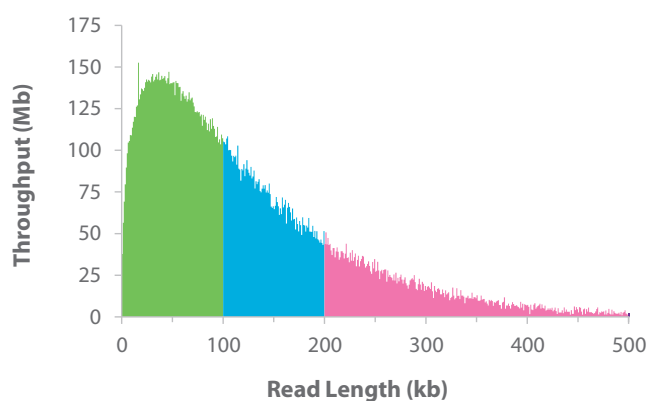
以下は、大腸菌を用いた1回のMinIONからの600 kb以上のリードです。Miniasmは、5回のリードのみを用いて完全なゲノムを組み立てました（コンティグN50 = 4,597,548）。



細胞株からのシーケンス

ウルトラロングライブラリーをHG02723細胞から調製し、MinIONとPromethION上でシーケンスしました。

- UHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Cultured Cells Protocolを使用して 6×10^6 細胞から抽出されました。
- 3Xライブラリーは、R9.4 MinION (FLO-MIN106D) およびPromethION Flow Cells (FLOPRO002) で、Nanobind Library Prep – Ultra Long Sequencing Protocolを使用して調製され、シーケンスされました。
- MinIONとPromethIONは同様のリード長分布を生成し、PromethIONは5倍以上のデータを生成しました。
- 細胞株は通常、Read LengthのN50が75~100+ kb、スループットがMinIONで15~25+ Gb、PromethIONで40~125+ Gbになります。
- Read LengthのN50が予想よりも短い場合は、インプットDNAを増やしてください。



■ Mb <100 kb ■ Mb 100-199 kb ■ Mb 200-499 kb
■ Mb 500-999 kb ■ Mb >1000 kb

■ Mb <100 kb ■ Mb 100-199 kb ■ Mb 200-499 kb
■ Mb 500-999 kb ■ Mb >1000 kb

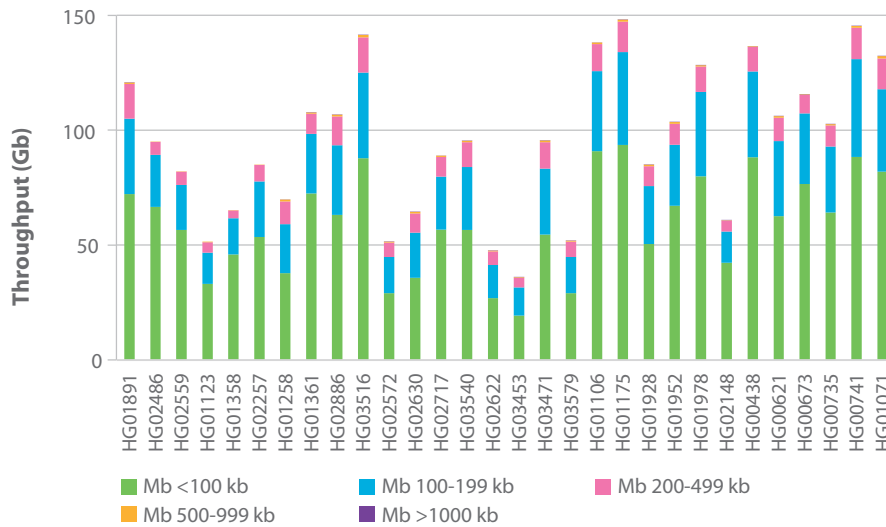
Nanobind Ultra Long Sequencing – HG02723 Human Cell Line						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
MinION (left)	24.5	96.8	11.9	4.7	6	1.2
PromethION (right)	129.6	93.1	60.5	20.3	0	0.99

ヒトパンゲノムリファレンスウルトラロングシーケンス ベータテスト

Nanobind Ultra Long Sequencing のベータ版は、UC Santa Cruz Genomics InstituteおよびOxford Nanopore Technologies と共同でHuman Pangenome Reference Programの最初の30ゲノムでテストされました。

- UHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Cultured Cells Protocolを使用して 10×10^6 細胞から3回抽出されました。
- 3Xライブラリーは、R9.4 PromethION Flow Cells (FLO-PRO002) で、Nanobind Library Prep – Ultra Long Sequencing Protocolのベータ版を使用して調製およびシーケンスされました。
- 細胞株ごとに3つのフローセルを使用しました (合計91のフローセル)。
- ランの結果、平均Read LengthのN50は77.9 kb、スループットはフローセルあたり20~50+ Gb、フローセルあたり平均17 Mbで、最長リード長は3.5 Mbでした。
- Nanobind Ultra Long Sequencing プロトコルでは、HG01175の合計データを148 Gb生成するために、3つのPromethION フローセルが必要でした。

Nanobind Ultra Long Sequencing – Human Pangenome Beta Test						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
Average Per Genome	95.3	77.5	35.9	9.7	50.2	3.5
Average Per Flow Cell	31.4	77.9	11.8	3.2	16.6	3.5

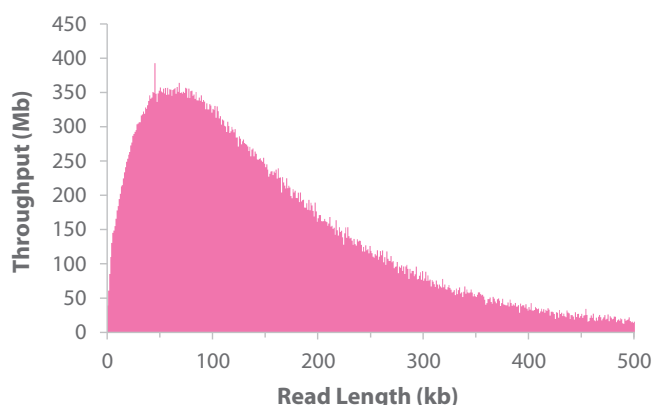
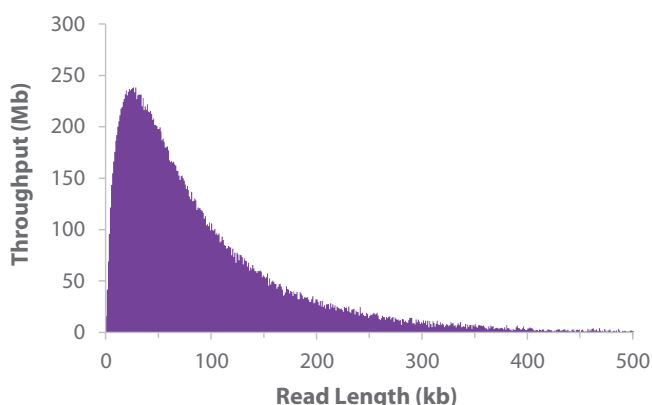


Data throughput categorized by Read Length for each genome.

細菌からのウルトラロングシーケンス

ウルトラロングライブラリーは、培養した大腸菌とリステリア・モノサイトゲネスのペレットから調製され、MinIONとPromethION上でシーケンスされました。

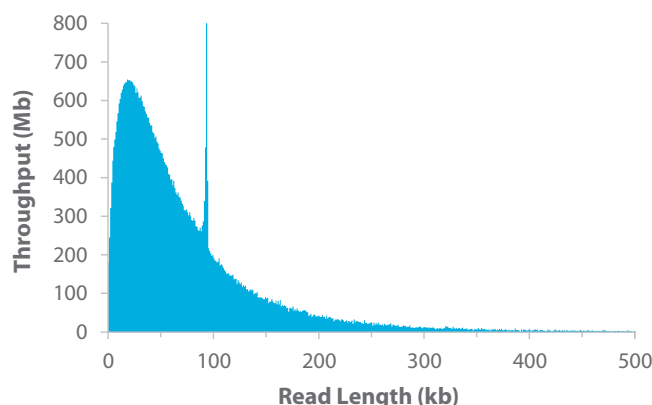
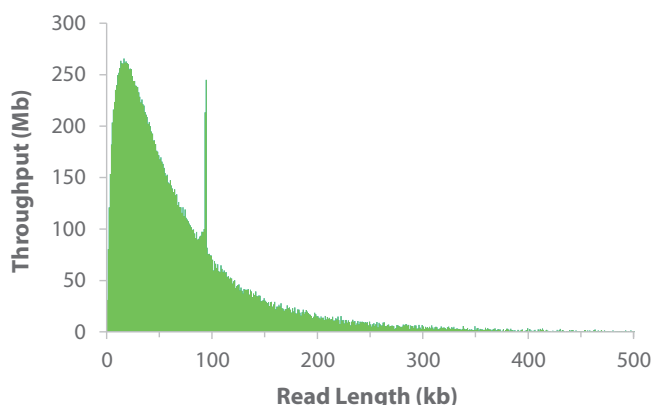
- 大腸菌のUHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Gram-Negative Protocolを使用して 1×10^9 細胞から抽出しました。
- リステリア・モノサイトゲネスのUHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Gram-Positive Protocolを使用して 5×10^9 細胞から抽出しました。
- 大腸菌のデータは、Oxford Nanoporeと共同で取得しました。
- 3Xライブラリーを調製し、R9.4 MinION (FLO-MIN106D) およびPromethION Flow Cells (FLOPRO002) で、Nanobind Library Prep – Ultra Long Sequencing Protocolを使用してシーケンスしました。
- 細菌は通常、Read LengthのN50が50~100+ kb、スループットがMinIONで15~25+ Gb、PromethIONで40~125+ Gbになります。
- Read LengthのN50が予想よりも短い場合は、インプットDNA量を増やしてください。



Nanobind Ultra Long Sequencing - Gram-negative bacteria, <i>E. coli</i>						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
MinION (purple) ¹	25.9	66.4	8.6	2.7	1	1.1
PromethION (pink) ²	77.4	128	47.1	22.5	133	3.3

¹ Sequenced using a single load for 72 h

² Data generated in collaboration with Oxford Nanopore Technologies. Sequenced using a single load for 72 h.

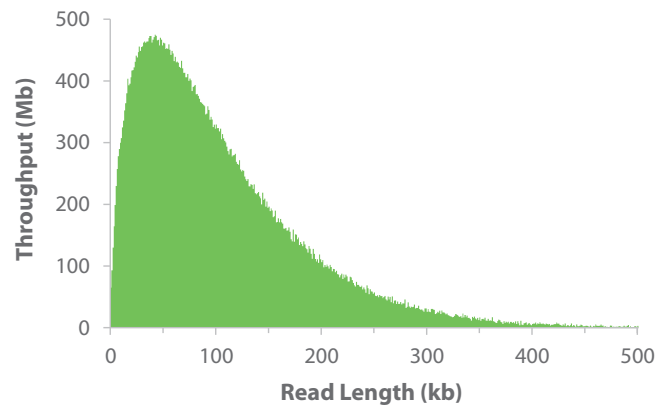
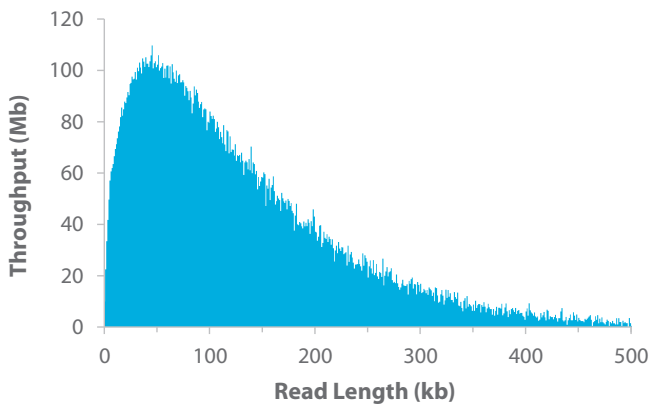


Nanobind Ultra Long Sequencing – Gram-positive bacteria, <i>L. monocytogenes</i>						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
MinION (green)	22	50	4.8	1.3	1	1.2
PromethION (blue)	58	53	13.2	3.6	3	1.0

ヒト血液からのウルトラロングシーケンス

ウルトラロングライブラリーは、ヒト全血サンプルから調製され、MinIONおよびPromethION上でシーケンスされました。

- UHMW DNAは、 Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Human Blood Protocolを使用して 1.5 mLの凍結ヒト全血から抽出されました。
- 3Xライブラリーは、 R9.4 MinION (FLO-MIN106D) およびPromethION Flow Cells (FLOPRO002) で、 Nanobind Library Prep – Ultra Long Sequencing Protocolを使用して調製およびシーケンスされました。
- ヒトの血液は通常、Read LengthのN50が75~100 + kb、スループットがMinIONで15~25+ Gb、PromethIONで40~125+ Gb になります。
- Read LengthのN50が予想よりも短い場合は、インプットDNA量を増やしてください。

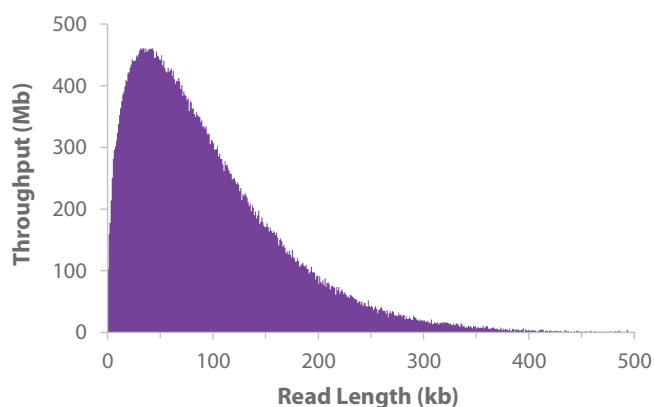
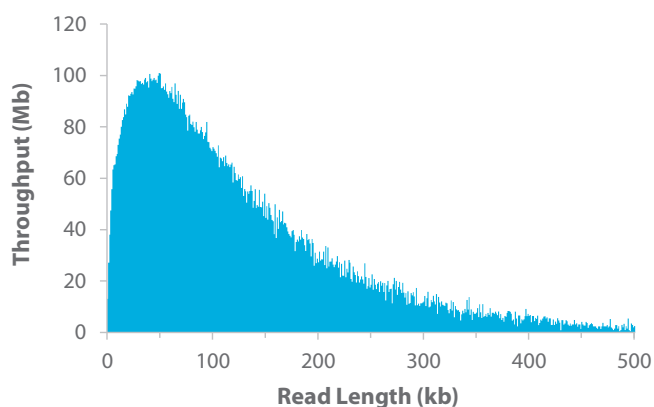


Nanobind Ultra Long Sequencing – Human Blood						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
GridION (blue)	18.6	104.6	9.9	4.2	11	1.5
PromethION (green)	67.6	84.4	28.4	8.1	6	1.3

有核血液からのウルトラロングシーケンス

魚類とトカゲの有核血液サンプルからウルトラロングライブラリーを調製し、MinIONとPromethION上でシーケンスしました。

- UHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Nucleated Blood Protocolを使用して、10 µLの凍結された魚血液、または、凍結されたトカゲ血液から抽出されました。
- トカゲ血液のデータはGarvan Instituteと共同で作成しました。
- 3Xライブラリーを作成し、Nanobind Library Prep - Ultra Long Sequencing Protocolを用いて、R9.4 Minion Flow Cells (FLO-MIN106D) 上でシーケンスしました。
- 有核血液は通常、Read Length のN50が75-100+ kbであり、MinION上で15-25+ Gb、PromethION上で40-125+ Gbのスループットを生じます。
- Read Length のN50が予想より低い場合は、インプットするDNAを増やしてください。

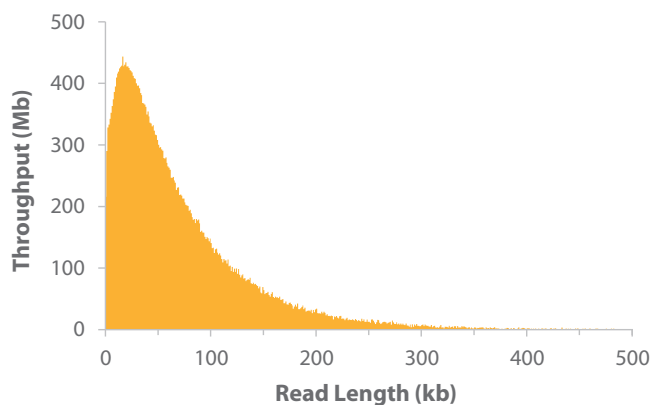


Nanobind Ultra Long Sequencing – Nucleated Blood						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
Fish Blood (GridION, blue)	16.8	98.6	8.3	3.4	1	1.0
Australian Sleepy Lizard (PromethION, purple)	62.8	78.4	24.0	5.8	3	1.6

組織からのウルトラロングシーケンス

ウシ胎児の肺組織からウルトラロングライブラリーを調製し、Promethion上でシーケンスしました。これらのデータは予備的なものであり、参考にするために示しました。

- UHMWDNAは、Nanobind Tissue Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction -TissueRuptor TissueProtocolを用いて、34 mgのウシ胎児の肺組織から抽出した。
- データは、USDAと共同で作成しました。
- 3Xライブラリーを調製し、Nanobind Library Prep - Ultra Long Sequencing Protocolを用いて、R9.4 Promethion Flow Cell (FLO-PRO002) 上でシーケンスしました。
- Read Lengthと処理能力を高めるための開発が進行中です。

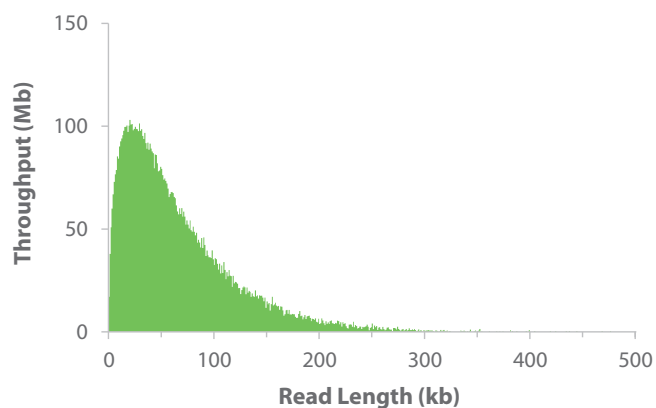


Nanobind Ultra Long Sequencing - Bovine Fetal Lung						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
PromethION	38.5	51	8.9	1.9	3	0.9

植物からのウルトラロングシーケンス

胡椒の葉からウルトラロングライブラリーを調製し、GridION上でシーケンスしました。これらのデータは予備的なものであり、参考にするために示しました。

- UHMW DNAは、Nanobind Plant Nuclei Big DNA KitおよびNanobind HMW DNA Extraction-Plant Nuclei Protocolを使用して5 gの胡椒の葉から抽出しました。
- データは、Keygeneと共同で作成しました。
- 3Xライブラリーを調製し、Nanobind Library Prep - Ultra Long Sequencing Protocolを用いて、R9.4 Minion Flow Cell (FLO-MIN106D) 上でシーケンスしました。
- Read Lengthと処理能力を高めるための開発が進行中です。

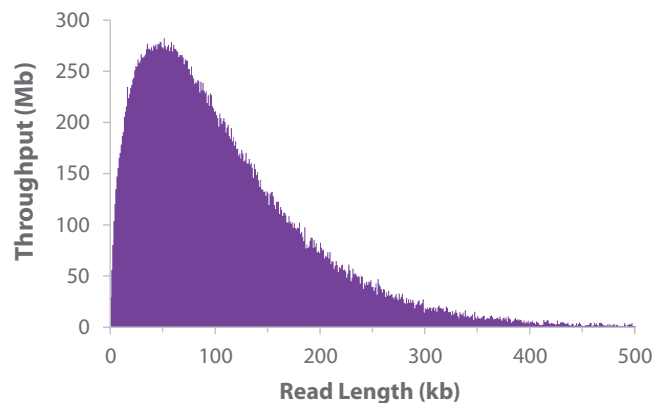
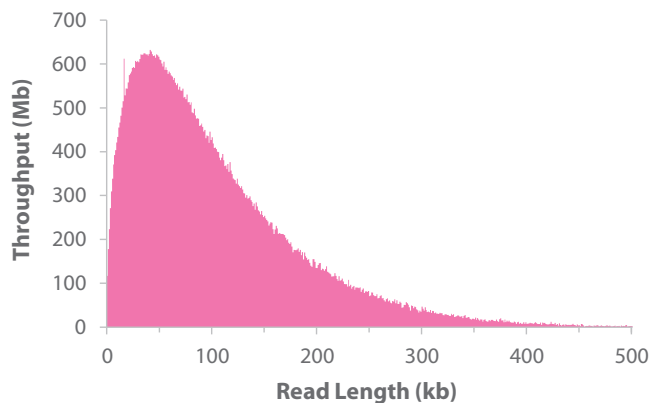


Nanobind Ultra Long Sequencing - Pepper						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
MinION	9.0	51.5	1.9	0.3	0	0.52

R10.3 細胞株からのウルトラロングシーケンス

HG02723細胞およびヒト全血からウルトラロングライブラリーを調製し、R10.3フローセルを用いてPromethION上でシーケンスしました。

- UHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNA KitおよびNanobind UHMW DNA Extraction – Cultured Cells Protocolを用いて 6×10^6 細胞から抽出しました。
- UHMW DNAは、Nanobind CBB Big DNAキットおよびNanobind UHMW DNA Extraction- Human Whole Blood Protocolを用いて、凍結された1.5 mLのヒト全血から抽出しました。
- 3Xライブラリーを調製し、Nanobind Library Prep - Ultra Long Sequencing Protocolを用いて、R10.3 Promethion Flow Cells上でシーケンスしました。
- R10.3 PromethION Flow Cellsの結果、Read LengthのN50は75-100+ kb、スループットは40-90 Gbとなりました。



Nanobind Ultra Long Sequencing – Pepper						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
HG02723 (pink)	89.7	83.3	37.2	11.0	1	1.1
Human Blood (purple)	43.3	90.3	19.5	5.9	14	1.6

プロセスとシーケンスのヒント

Nanobind UHMW DNAの抽出

このプロトコルでは、非常に清潔で大きなUHMW (50kb-1+ Mb) DNAが必要になります。適切なNanobind Big DNA Kitで抽出されたヒト細胞株、グラム陰性菌およびグラム陽性菌、ヒト血液、有核血液、動物組織、植物など、様々なサンプルタイプにわたって検証されています。品質の悪いDNAからのシーケンスのばらつきを最小限にするために、検証済みのNanobind UHMW DNA抽出プロトコルのみを用いることを推奨します。最新のNanobind UHMW DNA extraction protocolとNanobind Big DNA Kit Handbookは、Circulomicsサポートページ (<https://www.circulomics.com/support-nanobind>) でご覧いただけます。

インプットDNA要件

サイズ：Bio-Rad CHEF gelにより確認された100kb - 1+ Mb がUHMW DNAの重要な部分

量：750 µL のBuffer EB+に概ね40 µgのUHMW DNA

- インプットDNA量を35 µgに減らしてもシーケンスに悪影響を与えない可能性があります。
- インプットDNA量を20 µgに減らすと、Read Lengthが若干短くなりますが、高いスループットが得られます。
- インプットDNA量が増加すると、Read Length のN50は増加しますが、スループットが低下する可能性があります。

推奨インプット方法：UHMW DNAの測定CVは抽出のばらつきよりも有意に大きいため、正確に制御されたインプットでDNA抽出を行い、その後のライブラリー調製で溶出液全体を使用することを推奨します。

- 二倍体ヒト細胞については、 6×10^6 個の細胞から抽出し、全溶出液を使用することを推奨します。二倍体でない細胞やヒト以外の細胞では、gDNAを40 µg含むように細胞のインプット量を調整してください。
- ヒトの血液では、全血1.5 mLから抽出し、全溶出液を使用することを推奨します。このインプット方法は、正常な白血球 (WBC) 数のサンプルに適しています。白血球数が非常に少ないサンプルでは、Read Lengthが許容できないほど短い場合、40 µgのDNAを生成するようにインプットする血液を調整してください。
- バクテリアについては、 5×10^9 - 5×10^{10} 細胞から抽出し、全溶出液を使用することを推奨します。細菌のインプット量は、ゲノムサイズに基づいて、gDNA 40 µgを含むように調整してください。
- 詳細なインプット量および期待されるDNA回収量については、各抽出プロトコルを参照してください

代替インプット法：インプット量に基づいて抽出量が容易に推定されない試料の種類 (例えば、動物の組織や植物) については、Nanodropの反復測定の前平均値に基づいて、約40 µgのUHMW DNAを用いることを推奨します (n=3~5)。

- DNA濃度は、チューブの上部、中央部、下部からのUV/Vis吸光度測定値の反復 (n=3~5) 平均をとることで決定してください。(例：Nanodrop UV/Vis) サンプルの種類によっては、濃度測定の前CVが100%を超える可能性があります。必要に応じて追加測定を行ってください。
- 最小限度：Nanodropの測定値のうち、少なくとも1つが30ng/µLを超えていること。
- 最大限度：(前平均値-標準偏差)は100 ng/µL未満。前平均値及び標準偏差はそれぞれNanodrop測定値の前平均値及び標準偏差です。
- 260/280および260/230比が1.8から大きく逸脱した場合、コンタミネーションを考慮するために、Nanodrop核酸濃度測定値を適宜調整する必要があります。
- Qubit DNA測定は、UHMW DNA濃度を過小評価し、補足的な方法でのみ使用すべきであることがわかりました。Nanodrop濃度を優先すべきです。
- Qubit RNA測定が高いRNA (>50%) 濃度を示している場合、RNAを考慮してNanodropの核酸濃度測定値を減少させる必要があります。

溶出Buffer：Circulomics Buffer EB+でDNAを溶出しなければなりません。

- 別の溶出Bufferを使用した場合、正しい溶出Bufferを用いて再度抽出を行ってください。

プロセスのヒント

激しく十分に混合してください。不十分な混合は、スループットが低下し、シーケンスの性能が低下します。

Nanobindの抽出/クリーンアップでは、すべての溶出液を必ず回収します。10,000 xgで遠心後、すべての液体を回収するためにナローポアのP200を使用してください。ワイドポアのピペットを使用するよりも、すべてを回収することが重要です。すべてのDNA/ライブラリーが回収されない場合、シーケンスのスループットが大幅に低下しますが、標準的なピペットの使用はMb+リードの数を減少させますが、N50のリードには大きな影響は与えません。

MinIONへのローディング

ライブラリーの粘度が高く、SpotONポートに流れにくい場合は、ピペットを用いて下側の隣接ポートから穏やかに吸引することにより陰圧を加えることができます:1) 清潔な手袋をはめた指でWaste Port 2とPriming Portを覆います;2) P200ピペットを用いて、Waste Port 1に先端を挿入します;3) 非常にゆっくりと吸引してライブラリーをSpotON sample portに引き込みます。SpotON sample portのライブラリーをよく観察してください。ライブラリーがポートに引っ張られ始めたら、すぐにピペットを完全に取り外します。5) ライブラリーをロード後、空気の間隙がないことを確認します。

Waste Port 2に陰圧をかけてもライブラリーがロードされない場合は、ライブラリー/SQB混合物を除去し、1.5 mLのEppendorf DNA LoBindチューブに加えることができます。75 μ Lに設定されたナローボアのP200ピペットで5回ゆっくりと混合し、ワイドボアP200ピペットを使用してフローセルに再ロードします。

PromethIONへのローディング

ヌクレアーゼ洗浄とflush bufferのロードを行った後は、loading port周囲を清潔かつ乾燥した状態を保つようにします。これには二つの理由があります。1) サンプルを分解し、Read Lengthを短くさせるヌクレアーゼの混入を避けるために、過剰なヌクレアーゼはDNAローディング前に除去すべきです。2) 30 μ Lのサンプルを滴下する際には、ポートの上にしかりとした液滴を形成する必要があります。ポートの周りに余分な液体が残っていると、液滴が広がってしまい、サンプルロードの効率が悪くなります。ライブラリーの粘度が高すぎてinlet portに吸い込まれない場合は、ピペットを用いてPort 2から静かに吸引することで陰圧をかけることができます。

ライブラリーの粘度が高すぎてinlet portに吸い込まれない場合は、ピペットを用いてPort 2から静かに吸引することで陰圧をかけることができます。1) P1000ピペットを200 μ Lに設定します。2) Port 2にチップを挿入します。3) 容量設定ホイールを多く回転させて吸引し、チャンネル内に陰圧を作り、ライブラリーをinlet port (Port 1) に引き込みます。inlet portのライブラリーをよく見てください。ライブラリーがportに引っ張られ始めたら、すぐにピペットを完全に外します。5) ライブラリーをロード後、空気の間隙がないことを確認します。

waste portに陰圧をかけてもライブラリーがロードされない場合は、ライブラリー/SQB混合物を除去し、1.5 mLのEppendorf DNA LoBindチューブに加えることができます。75 μ Lに設定されたナローボアのP200ピペットで5回ゆっくりと混合し、ワイドボアP200ピペットを使用してフローセルに再ロードします。

リードの分割

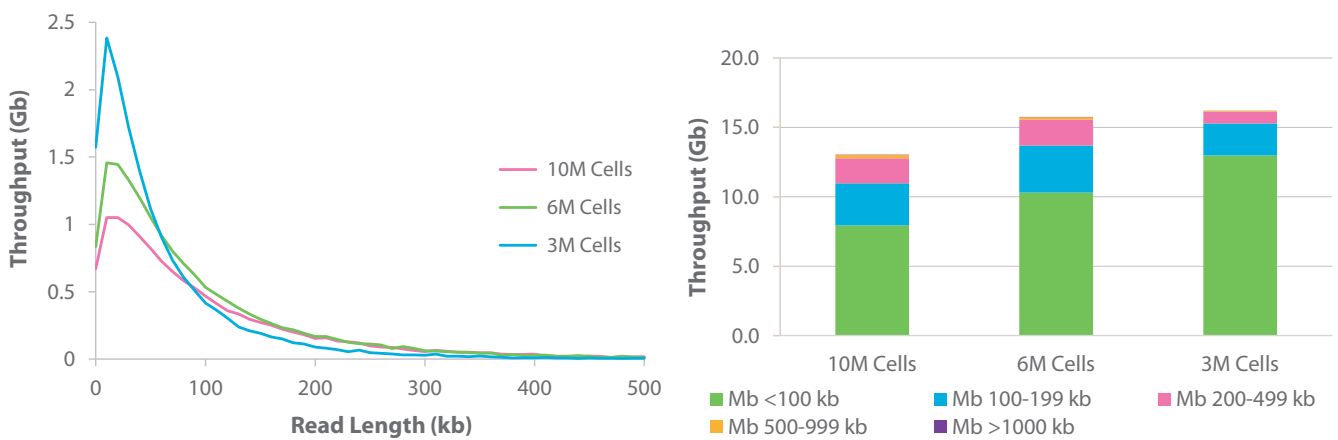
MinKNOWは、ウルトラロングリードを誤って分割することがあります。シーケンスを開始するときにSQK-ULK001キットを選択し、リードの分割を最小限に抑え、re-mux時間を6時間に延長してください。

適切なリファレンスが存在する場合、Payne *et al.* Bioinformatics 2018のスクリプトを用いて分割したリードを識別することができます。
(<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty841>))

インプットDNAの滴定

ウルトラロングライブラリーは 3×10^6 , 6×10^6 , 10×10^6 のHG02723セルペレットから作成し、MinION上でシーケンスしました。

- UHMW DNAを、Nanobind CBB Big DNA KitとNanobind UHMW DNA Extraction - Cultured Cells Protocolを用いて、 3×10^6 , 6×10^6 個、および 10×10^6 個から抽出しました。
- 各抽出から得られたすべてのDNAをライブラリープレップに用いました。
- 3Xライブラリーを作成し、Nanobind Library Prep - Ultra Long Sequencing Protocolを用いてR9.4 MinION (FLO-MIN106D) フローセル上でシーケンスしました。セルのインプット以外は、他のパラメータは変更しませんでした。
- インプットDNAが減少すると、断片化が増加し、Read Length N50が低下します。しかし、全体的なシーケンス収率は増加します。インプットDNAをさらに減らすと、スループットの減少を引き起こす可能性があります。
- ウルトラロングデータの最高絶対量 (i.e. Gbあたり、Read Length > 100および > 200 kb) は、断片化とポア占有率のバランスが取れており、適度なRead LengthのN50で最大となります。
- Read Lengthが短すぎる場合は、DNAのインプット量を増やします。
- スループットが低すぎる場合は、DNAのインプット量を減らします。

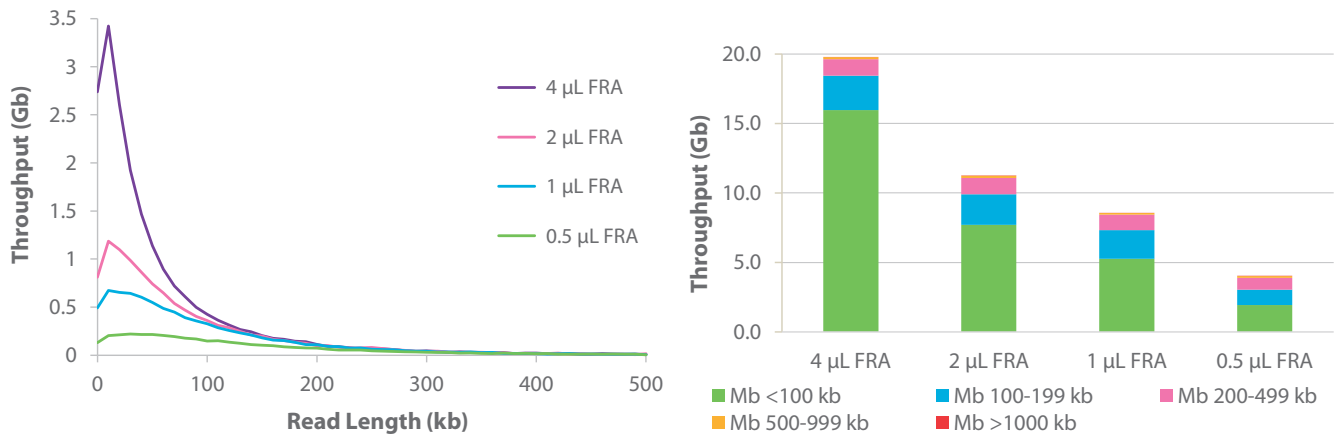


Nanobind Ultra Long Sequencing - ONT MinION DNA Input Titration Sequencing Metrics						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
10x10 ⁶ Cells (10M)	13.0	74.4	5.1	2.1	13	1.3
6x10 ⁶ Cells (6M)	15.8	66.1	5.4	2.0	6	1.6
3x10 ⁶ Cells (3M)	16.2	42.2	3.2	0.9	1	1.3

インプットFRAの滴定

ウルトラロングライブラリーをHG02723細胞から調製し、MinION上でシーケンスしました。

- UHMW DNA を、Nanobind CBB Big DNA KitとNanobind UHMW DNA Extraction – Cultured Cells Protocolを用いて、 10×10^6 個の細胞から抽出しました。
- 3Xライブラリーを作成し、Nanobind Library Prep - Ultra Long Sequencing Protocolを用いてR9.4 MinION (FLO-MIN106D) フローセル上でシーケンスしました。各ライブラリーにおいて、標識中に異なる量のFRAを使用しました。他のパラメータは変更しませんでした。
- FRAを減らすことでRead Lengthを増やすことができますが、これにより全体のスループットが低下することが多いです。
- ウルトラロングデータの最高絶対量 (i.e. Gbあたり、Reads>100および>200kb) は、断片化とポア占有率のバランスが取れており、適度なRead Length のN50で最大となります。



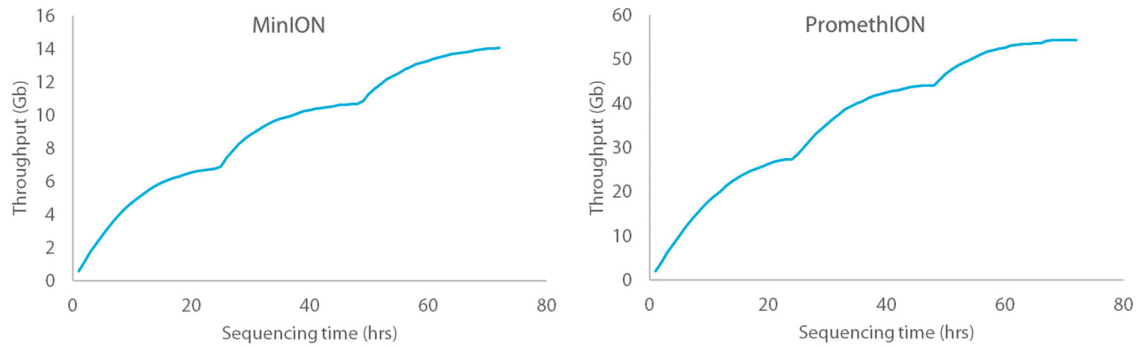
Nanobind Ultra Long Sequencing – ONT MinION DNA Input Titration Sequencing Metrics						
Instrument	Total Bases (Gb)	N50 (kb)	Gb >100 kb	Gb >200 kb	Number Reads > 1 Mb	Longest Read (Mb)
4 µL FRA	19.8	35.5	3.8	1.3	4	1.1
2 µL FRA*	11.3	59.2	3.5	1.3	5	1.2
1 µL FRA	8.6	74.0	3.3	1.2	4	1.2
0.5 µL FRA	4.0	105.2	2.1	1.0	11	1.4

* only two libraries were loaded.

ヌクレアーゼフラッシュスループットとポアリカバリー

標準プロトコルは、6X (MinION/GridION) または3X (PromethION) スケールライブラリーを生成し、これを1Xフラクションに分割し、同じフローセル上で順次シーケンスします。各フラクションを24時間シーケンスされた後、72時間のシーケンスが完了するまでヌクレアーゼフラッシュを用いてフローセルが洗浄されます。

- 理想的な条件下では、各1Xフラクションは全データの約1/3を生成します。
- 通常、初期のロードは、その後のロードよりもわずかに多くのデータを生成します。
- その後のロードで、これまでのロードよりもはるかにデータスループットが低下したり、N50が低下したりする場合、抽出またはライブラリーの準備に何か誤りが生じています。トラブルシューティングのヒントを参照してください。
- ヌクレアーゼウォッシュを行う場合は、従来のウォッシュキットやプロトコルではなく、EXP-WSH004キットと添付のプロトコルを用いることが重要です。



MinION (左) およびPromethION (右) 上のウルトラロングHG02723シーケンスの経時的データスループットです。フローセルあたりのスループットを最大化するために、各3Xライブラリーを3分の1ずつ24時間かけてシーケンスし、フローセルを洗浄して新たな3分の1をロードしています。

UHMW (50kb-1+ Mb) DNA 抽出プロトコル

現時点で、UHMW (50kb-1+ Mb) DNA抽出には以下のプロトコルが利用可能です。これらのプロトコルはメガベースサイズのDNAを大量に生成するため、Oxford Nanopore装置上でのウルトラロングシーケンスとオプティカルマッピングにのみ推奨されています。これらは、Nanobind Ultra Long Sequencing用に特に最適化されており、以前のUHMW DNA抽出プロトコルよりも優先されます。これらは、標準的なロングリードシーケンスアプリケーションでの使用は推奨されていません。標準的なロングリードシーケンスへの応用では、HMW (50-300+ kb) DNA抽出プロトコルを用いた方が優れた結果が得られます。Nanobind Ultra Long Sequencing以外のアプリケーションでUHMW (50kb - 1+ Mb) DNA Extraction Protocolsを使用したい場合は、お問い合わせください。プロトコルは頻繁に更新および追加されます。最新バージョンについては、Circulomics Support Page (<https://www.circulomics.com/support-nanobind>) を、追加資料・ガイダンスは適切なNanobind Kit Handbookを参照してください。

UHMW DNA抽出-培養細胞 (EXT-CLU-001)

このプロトコルでは、培養細胞からのUHMW DNAの抽出について説明します。このプロトコルは、GM12878およびHG02723を含むいくつかの細胞型で検証されています。このプロトコルには、1) Nanobind CBBig DNA Kit (NB-900-001-01) またはNanobind Tissue Big DNA Kit (NB-900-701-01)、2) Nanobind UL Library Prep Kit (NB-900601-01)、3) UHMW DNA Aux Kit (NB-900-101-01) が必要です。

UHMW DNA抽出-グラム陰性菌 (EXT-GNU-001)

このプロトコルでは、グラム陰性菌からのUHMW DNAの抽出について説明します。このプロトコルは大腸菌で検証されています。このプロトコルには、1) Nanobind CBBig DNA Kit (NB-900-001-01) またはNanobind Tissue Big DNA Kit (NB-900-701-01)、2) Nanobind UL Library Prep Kit (NB-900-601-01)、3) UHMW DNA Aux Kit (NB-900-101-01) が必要です。

UHMW DNA抽出-グラム陽性菌 (EXT-GPU-001)

このプロトコルでは、グラム陽性菌からのUHMW DNAの抽出について説明します。このプロトコルは、リステリア・モノサイトゲネスで検証されています。このプロトコルには、1) Nanobind CBBig DNA Kit (NB-900-001-01) またはNanobind Tissue Big DNA Kit (NB-900-701-01)、2) Nanobind UL Library Prep Kit (NB-900-601-01)、3) UHMW DNA Aux Kit (NB-900-101-01) が必要です。

UHMW DNA抽出-哺乳類全血 (EXT-BLU-001)

このプロトコルでは、哺乳類全血からのUHMW DNAの抽出について説明します。プロトコルは全血1~3 mLからの抽出に最適化されています。ヒトおよびウシの血液について検証されています。

このプロトコルでは、1) Nanobind CBBig DNA Kit (NB-900-001-01) またはNanobind Tissue Big DNA Kit (NB-900-701-01)、2) Nanobind UL Library Prep Kit (NB-900-601-01)、3) UHMW DNA Aux Kit (NB-900-101-01) が必要です。

UHMW DNA抽出-有核血液 (EXT-NBU-001)

このプロトコルでは、有核血液からのUHMW DNAの抽出について説明します。プロトコルは、有核血液5~30 µLからの抽出に最適化されています。凍結された魚およびトカゲの血液について検証されています。

このプロトコルには、1) Nanobind CBBig DNA Kit (NB-900-001-01) またはNanobind Tissue Big DNA Kit (NB-900-701-01)、2) Nanobind UL Library Prep Kit (NB-900-601-01)、3) UHMW DNA Aux Kit (NB-900-101-01) が必要です。

ウルトラロングライブラリー調製プロトコル

現時点で、ウルトラロングライブラリー作成には以下のプロトコルが利用可能です。これらのプロトコルは、Nanobind Ultra Long Sequencing Protocolを用いてOxford Nanopore社でウルトラロングリード（100kb-1+ Mb）を作成するために推奨されます。プロトコルは頻繁に更新および追加されています。Circulomics Support Page（最新版は<https://www.circulomics.com/support-nanobind>）、追加資料・ガイダンスは該当するNanobind Kit Handbookを参照してください。

Nanobindライブラリー調製 - ウルトラロングシーケンス（LBP-ULN-001）

このプロトコルでは、ライブラリークリーンアップのためにNanobindディスクを用いてOxford Nanopore社のMinION/GridION/PromethION上でウルトラロング（100kb - 1+ Mb）リードを作成するための6X（MinION/GridION）または3X（PromethION）スケールライブラリーの作成について説明します。シーケンススループットを最大化するために、各1Xライブラリーフラクションを24時間シーケンスし、その後、ヌクレアーゼウォッシュを使用してライブラリーを除去し、ポアを回復させることで、次の1Xライブラリーフラクションをロードしてシーケンスすることができます。このプロセスを3つのライブラリーを用いて、全部で72時間のシーケンスを繰り返します。このプロトコルは、1) Circulomics UL Library Prep Kit（NB-900-601-01）、2) Oxford Nanopore Ultra-Long DNA Sequencing Kit（SQK-ULK001）、および3) Oxford Nanopore Flow Cell Wash Kit（SQK-WSH004）を必要とします。このプロトコルを始める前に、UHMW DNAの抽出には適切なCirculomics Nanobind Big DNA Kitを使用する必要があります。

Oxford Nanopore Technologyは、使用可能なウルトラロングライブラリー調製プロトコルの詳細を公開しています（<https://community.nanoporetech.com/protocols/ultra-long-Reads-ULK001>）このプロトコルには、フローセルのプライミングとローディングに関する詳細なガイダンスが含まれているので、そちらを参照してください。

QC 手順

UHMW DNAの正確な定量は、試料の不均質性のため困難であり、しばしばCVs >100%の濃度測定につながります。UHMW DNA抽出には、Nanodrop UV/Vis、Qubit BR DNA Assay、およびQubit BR RNA Assayの測定を繰り返し行うことを推奨します。ライブラリー調製には、Nanodrop UV/Vis測定のみを実施することを推奨します。

詳細なガイダンスについては、個々のUHMW DNA抽出およびライブラリー調製プロトコルを参照してください。

ライブラリーの保存

6Xまたは3Xスケールライブラリーを、Nanobindディスクから室温で一晩溶出した後、混合し、2時間静置してから、最初のロードをシーケンスしてください。残りのライブラリーは4℃で保存してから使用してください。ライブラリーは、4℃で3日間まで保存でき、最初のロードから始めることができます。

トラブルシューティング FAQ

詳細については、個々のUHMW DNA抽出およびライブラリー調製プロトコルを参照してください。



日本ジェネティクス株式会社

<https://www.n-genetics.com> info@genetics-n.co.jp

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階 TEL 03 (3813) 0961 FAX 03 (3813) 0962

本製品はライフサイエンス分野における研究での使用を目的としています。仕様は2021年4月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。

M0151