

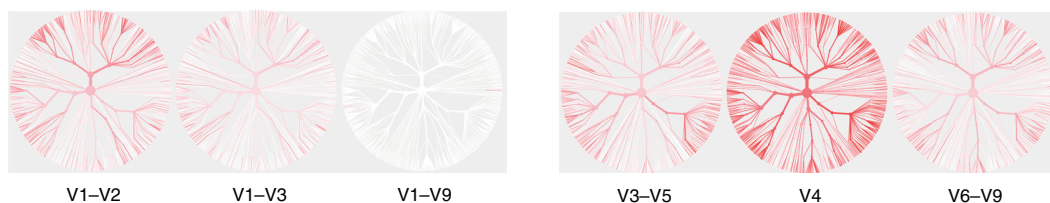
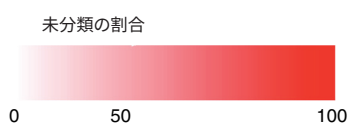
HiFi リードを用いたメタゲノムシーケンシングのベストプラクティス

高精度のロングリード (HiFi リード) と 1 分子レベルの解像度により、1 分子リアルタイム (SMRT®) シーケンシングは 16S rRNA 全長シーケンシング、メタゲノムプロファイリング、メタゲノムアセンブリに最適です。

- 低コストの 16S 全長シーケンシングにより、種または株レベルで群集組成を決定
- 効率的で費用対効果の高いメタゲノムプロファイリングで、1 本の HiFi リードから 6 ~ 8 個の完全な遺伝子を同定
- わずか 4 Gb の HiFi データで、マルチプレックス化したヒト糞便サンプルあたり最大 20 個の高品質なメタゲノムアセンブルゲノム (MAG) を生成
- 近縁株のコンティグとプラスミドを関連付けるためにエピゲノムデータを活用

16S rRNA 全長シーケンシング

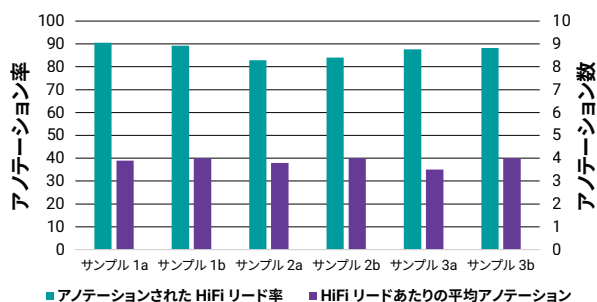
種レベルでの系統解析



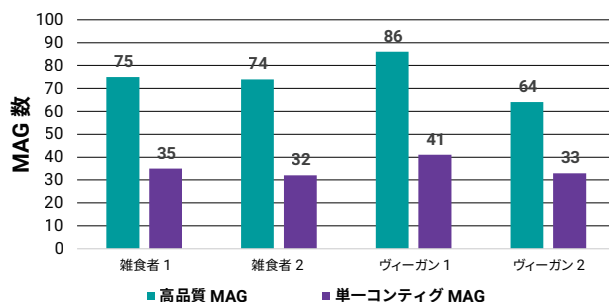
各細菌属の 16S 配列のうち、種レベルで同定できないものの割合は、どの可変領域を用いるかによって大きく変わります。ヒトの腸内には幅広い種類の細菌群が存在するため、全長配列 (V1 ~ V9) のみ、存在する可能性のあるすべての種をバイアスなしに同定することが可能です¹。

HiFi メタゲノミクス

低カバレッジでも、正確な種のプロファイリング、より多くの機能アノテーション、より高品質な MAG、より多くの環状 MAG



1 本の HiFi リードあたり最大 9 個の完全な遺伝子を含む PacBio のデータは、豊富な機能情報を提供します。微生物群集に存在する生物学的機能の理解に、ほぼすべてのリードが寄与します²。



ロングリードと高精度という他には見られない組み合わせにより、同一サンプル内の近縁株の識別や、単一コンティグ MAG の生成など、メタゲノムアセンブリに伴う多くの課題を克服します。上図は The BioCollective から得られた 4 つのヒト腸内細菌叢サンプルの解析例です³。高品質 MAG とは、完全性：>70%、コンタミネーション：<10%、コンティグ数：<10 のものを指します。

卓越したメタゲノムアセンブリを実現：

- 1 サンプルあたり 65 ~ 85 個の高品質 MAG (約 17 Gb、多くは単一コンティグ)
- 4 つのサンプルで合計 299 個の高品質 MAG
- 1 サンプルあたり約 35 個、合計 141 個の単一コンティグ MAG
- 約 143 種類の種/株、約 86 種類の属

DNA から微生物群集を詳細に解析

16S rRNA 全長シーケンシング

微生物群集の研究に最適な高解像度かつ費用対効果の高いスクリーニング


メタゲノムプロファイリング

微生物群集の組成や機能をバイアスなしに評価

メタゲノムアセンブリ

微生物集団から完全またはほぼ完全なゲノムアセンブリを生成


ライブラリー調製⁴

	SMRTbell® テンプレート調製	推奨プライマーを用いた全長 16S rRNA プロトコル ⁵ に従うか、Shoreline Complete StrainID または Complete V1-V9 キットを用いて、DNA 抽出と PCR 増幅 ⁷	HiFi メタゲノム用の 10 kb ライブラリーを作製 ⁶
		マルチプレックス化とライブラリーの自動化に対応	

Sequel® II または IIe システムを用いた SMRT シーケンシング

	生成	1.6 kb HiFi リード	10 kb HiFi リード	
		10 時間のムービーコレクションで最大 350 万本 (>Q20) のリードを生成	30 時間のムービーコレクションで最大 290 万本 (>Q20) のリードを生成	
	スループット拡大*	SMRT® Cell 8M あたり最大 192 個の群集を解析	SMRT Cell 8M あたり最大 48 個の群集をマルチプレックス化し、分類学的または機能的プロファイリングを実行	SMRT Cell 8M あたり 4 サンプルをマルチプレックス化し、1 サンプルあたり最大 35 個の高品質 MAG を生成


SMRT® Analysis または PacBio® DevNet で利用可能なデータ解析ツール

	二次解析	SMRT Analysis を用いて CCS (Circular consensus sequencing、環状コンセンサスシーケンシング) 解析では、1 本鎖の環状テンプレートを繰り返しシーケンシングして HiFi リードを生成	hifiasm-meta、metaFlye または HiCanu を用いて、99.999% (Q50) を超える高精度のコンセンサスで高品質メタゲノムを de novo アセンブリ ^{8,9,10}
	三次解析	Shoreline Biome SB Analyzer ⁷ 、DADA2 ¹¹ 、QIIME2 ¹² 、microbiomehelper ¹³ 、One Codex ¹⁴ 、EZBiome ¹⁵ で、または GitHub に掲載した当社のパイプライン ¹⁶ で 16S データを解析	DIAMOND や MEGAN-LR と、GitHub に掲載した当社のパイプラインまたは BugSeq を一緒に用いてメタゲノムの組成や機能を研究 ^{17,18,19}

* リード長、SMRT Cell 8M あたりのリードおよびデータ、その他のシーケンシング性能は、サンプルの品質や種類、インサートサイズによって異なります。

主な参考文献

- Johnson, J. S., et al. (2019) Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. 10(1), 5029.
- Gehrig, J., et al. (2022) Finding the right fit: evaluation of short-read and long-read sequencing approaches to maximize the utility of clinical microbiome data. *Microbial Genomics*, 8(3), 10.1099/mgen.0.000794.
- PacBio datasets and NCBI PRJNA750084
- Overview – Sequel systems application options and sequencing recommendations. PacBio documentation.
- Procedure & checklist – Full-length 16S amplification, SMRTbell library preparation and sequencing. PacBio documentation.
- Procedure & checklist – Preparing whole genome and metagenome libraries using SMRTbell prep kit 3.0. PacBio documentation.
- Shoreline Biome Kits | Shoreline Biome SB Analyzer
- <https://github.com/xfengnfx/hifiasm-meta>
- Kolmogorov, M., et al. (2020) metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. *Nature methods*, 17(11), 1103–1110.
- Koren, S., et al. (2020) HiCanu: accurate assembly of segmental duplications, satellites, and allelic variants from high-fidelity long reads. *Genome Research*. 30, 1291-1305.
- Callahan, B. J., et al. (2019) High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), e103.
- <https://qiime2.org/>
- [https://github.com/LangilleLab/microbiome_helper/wiki/PacBio-CCS-Amplicon-SOP-v1-\(qiime2\)](https://github.com/LangilleLab/microbiome_helper/wiki/PacBio-CCS-Amplicon-SOP-v1-(qiime2))
- <https://www.onecodex.com/>
- <https://ezbiome.com/>
- <https://github.com/PacificBiosciences/pb-16S-analysis/wiki/Analyzing-PacBio-HiFi-Mock-Community-16S-Data-with-QIIME-2>
- Huson, D. H., et al. (2018) MEGAN-LR: new algorithms allow accurate binning and easy interactive exploration of metagenomic long reads and contigs. *Biology direct*, 13(1), 6.
- <https://github.com/PacificBiosciences/pb-metagenomics-tools>
- <https://bugseq.com/>

 Learn about metagenome sequencing:
pacb.com/microbial-pop

研究用のみに使用できます。診断目的およびその手続き上の使用はできません。

Information in this document is subject to change without notice. PacBio assumes no responsibility for any errors or omissions in this document. Certain notices, terms, conditions and/or use restrictions may pertain to your use of PacBio products and/or third party products. Refer to the applicable PacBio terms and conditions of sale and to the applicable license terms at <http://www.pacb.com/legal-and-trademarks/terms-and-conditions-of-sale/>. PacBio, the PacBio logo, SMRT, SMRTbell, and Sequel are trademarks of PacBio. All other trademarks are the sole property of their respective owners.

© 2022 PacBio. All rights reserved. Research use only. Not for use in diagnostic procedures.
102-193-684 REV02 05MAY2022

PacBio