



Application

# 磁気ビーズ法によるNGSライブラリーのノーマライゼーション BeNUS (Beads-based Normalization for Uniform Sequencing) 法 によるシーケンスカバレッジの均一化

製品名

Agencourt AMPureXP Kit

メーカー名

ベックマン・コールター株式会社

このアプリケーションノートは、国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門 細道一善 様のご厚意により掲載させていただきました。

## はじめに

我々は次世代シーケンサー (NGS) とNextera DNA Sample Prep Kitによるヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) のシーケンスを進めている。Nexteraは最大96サンプルの多検体のライブラリー調製が可能だが、一方で、調製したライブラリー間でのシーケンスリードのばらつきをコントロールするためには、各サンプル間のモル濃度を均一化する必要がある。我々は磁気ビーズ法を改変することでライブラリーサイズとモル濃度を均一化し、サンプル間で均一なシーケンスカバレッジを得ることに成功した。

ここでは、その手法 : BeNUS (Beads-based Normalization for Uniform Sequencing) 法について紹介する。

## 方法およびワークフロー

次世代シーケンサー : MiSeq (イルミナ社)  
ライブラリー調製キット : Nextera DNA Sample Prep Kit (イルミナ社)  
磁気ビーズ法精製キット : Agencourt AMPure XP (ベックマンコールター社)  
マグネットスタンド\*1 : NGS Magna Stand (日本ジェネティクス社 FG-SSMAG2)

### 〈カスタムAMPure XP用に準備する試薬〉

塩化ナトリウム, ポリエチレングリコール8000 (PEG), イソプロパノール

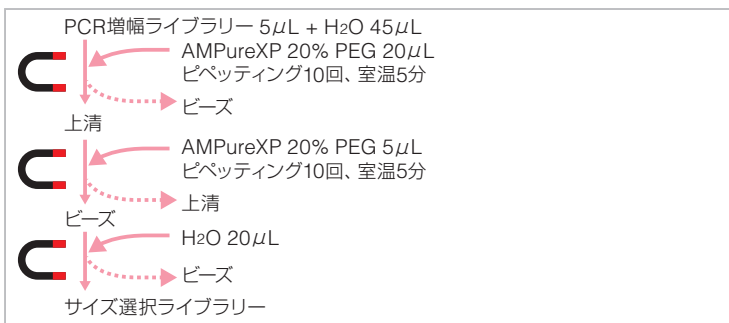
### Nextera DNA Sample Preparation Kit とMiSeq によるロングアンプリコンシーケンス ライブラリー調製ワークフロー

ターゲット領域のロングPCR増幅

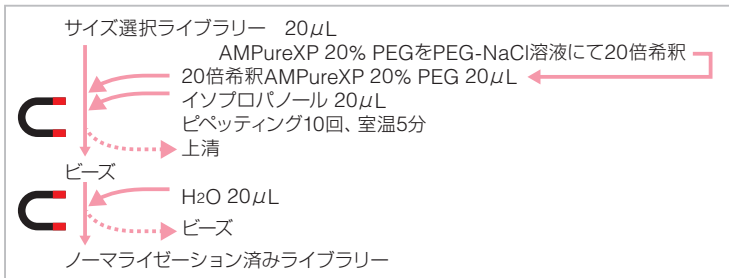
↓  
Tagmentation

↓  
ライブラリーのPCR増幅\*2

↓  
AMPureXP 20%PEG\*3によるサイズセクション



↓  
AMPureXPビーズによるDNA濃度のノーマライゼーション



↓  
ノーマライゼーション済みライブラリーのプール

↓  
遠心濃縮装置によるライブラリーの濃縮

↓  
Agilent バイオアナライザーによるサイズおよび濃度確認

↓  
濃度調整後、MiSeqによるシーケンシング

\*1 マグネットスタンドについて  
カスタムAMPure XP によるノーマライゼーション  
には微量のビーズ回収に優れたNGS MagnaStand  
(日本ジェネティクス社 FG-SSMAG2) を推奨



\*2 KAPABIOSYSTEMS

KAPAライブラリー増幅キット (KK2612) を用いることで、GC含量が高い領域でも増幅バイアスを軽減し、シーケンスカバレッジが改善されました。詳しくは、アプリケーションノート2013<04>「次世代シーケンサー (NGS) を用いた、ヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) タイピング法の開発」をご覧ください。  
[http://www.n-genetics.com/file/application\\_note\\_13\\_04KAPALAKitNGS\\_HLAtyping.pdf](http://www.n-genetics.com/file/application_note_13_04KAPALAKitNGS_HLAtyping.pdf)

\*3

AMPureXP 20%PEG :  
カスタムAMPureXPとして、AMPureXP ビーズをPEG-NaCl溶液 (20%PEG、2.5M NaCl) でビーズが2倍濃度になるよう調製したものを。(図1参照)

### Agencourt® AMPure®XP Kit



## BeNUS法の条件最適化

開発したHLAタイピング法では、初めにロングPCRによるHLA-B 上流および下流領域を含む約4.4kbを増幅し、得られたPCR増幅産物をNextera DNA Sample Prep Kitを用いてタグメンテーションを行う。

ライブラリーは2種類のインデックスの組み合わせにより、最大96種類のサンプルを同一のランで解析可能である。このときインサートサイズは500bpから1000bpの幅を持たせて調製する。

PCR増幅後のそれぞれのライブラリーの切断サイズおよびDNA濃度にはばらつきがあるため、各ライブラリーのノーマライゼーションを行う。インサートサイズとモル濃度をそろえるためには、各サンプルのバイオアナライザでの測定ならびにアガロースゲルやPippin Prep (Sage Science社)によるサイズ選択が必要となるが、サンプル数が多い場合にはこれらの作業は煩雑であり、時間的にもコスト的にもパフォーマンスが悪い。

このため、開発したのが磁気ビーズを用いたBeNUS法である。

我々はPEG濃度を再調整したAMPure XP ビーズ (図1) を用い、ライブラリーサイズ選択 (図2 および図3) ならびにDNA濃度のノーマライゼーション (図4 および図5) を最適化した。

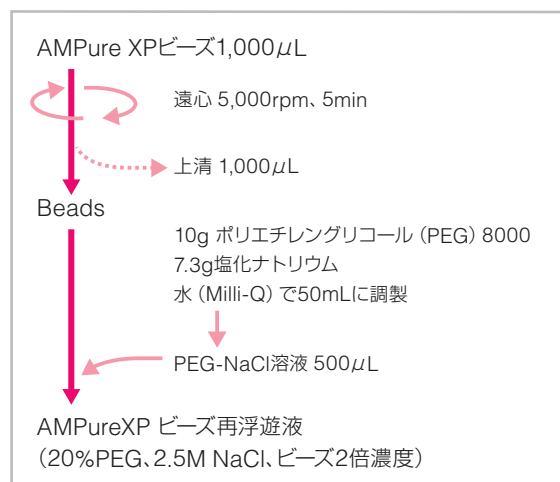


図1 AMPureXP 20% PEGの調製

本プロトコルで用いるAMPureXPは、記載した組成にて20%PEG, 2.5M NaCl でビーズ濃度2倍に調製したものをを用いる

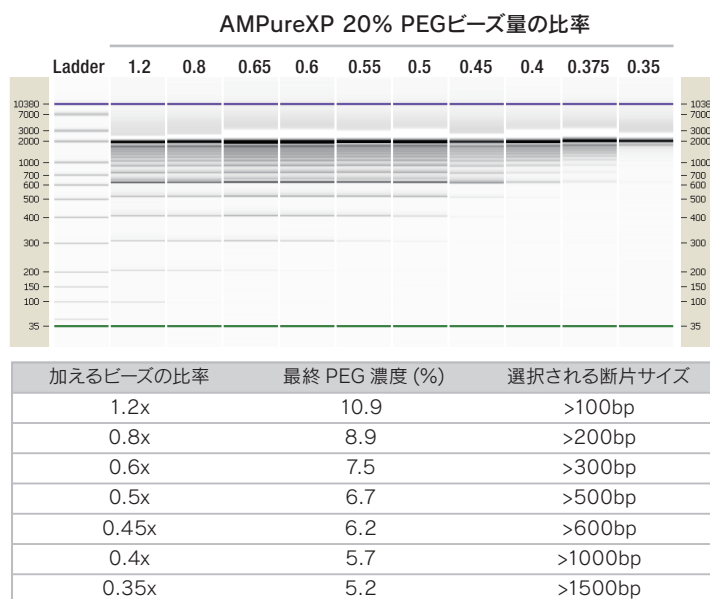


図2 AMPureXP 20% PEGの比率と選択されるDNA断片長

DNAに対するAMPureXPビーズの割合を変えることで、結合するDNAの長さの範囲を選択することが可能

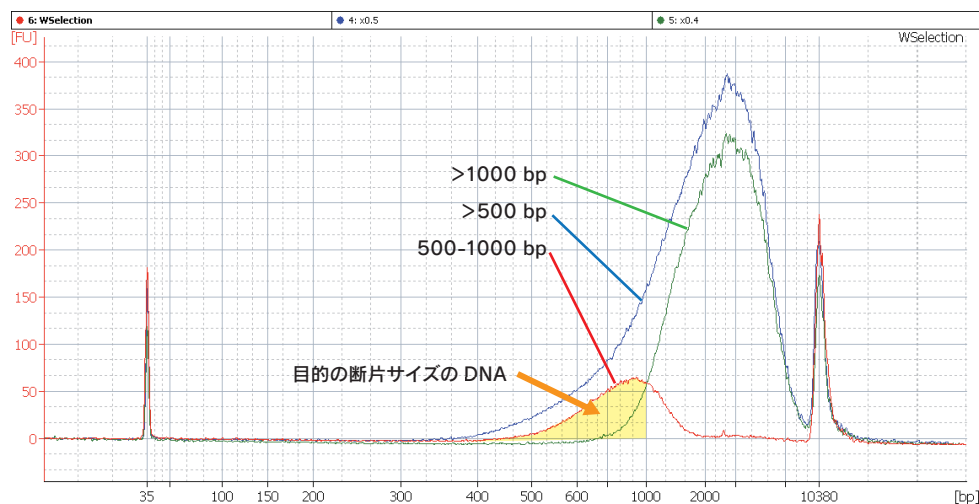


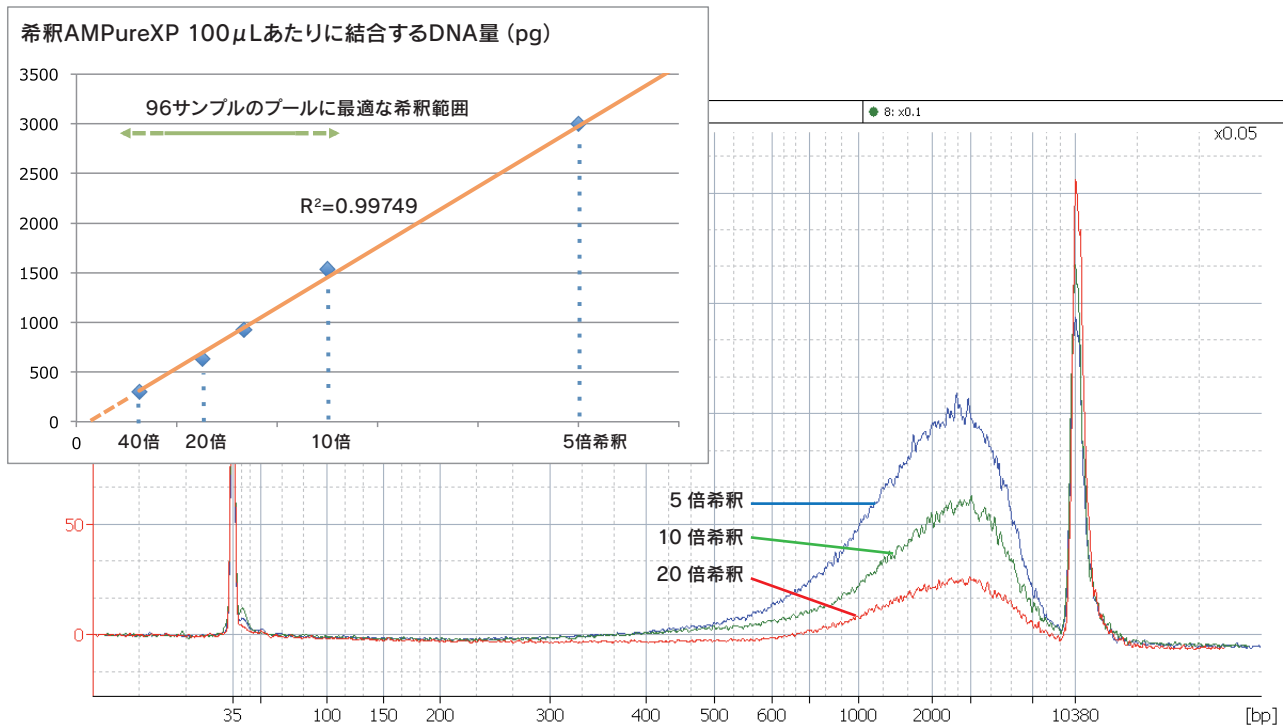
図3 本プロトコルにおけるDNA断片長の選択

サイズ選択は2回のAMPureXP 20%PEG 添加により行う。

1回目の添加 (比率0.4) によって1000bp以上のDNA断片をビーズに結合させ、1000bp以下の断片が含まれる上清を得る。

次いで2回目の添加 (比率0.1, 合計比率0.5) によって500bp以上のDNA断片をビーズに結合させ、結合したDNAを回収することで500bpから1000bpの範囲のDNA断片を得る。

## BeNUS法の条件最適化 (つづき)

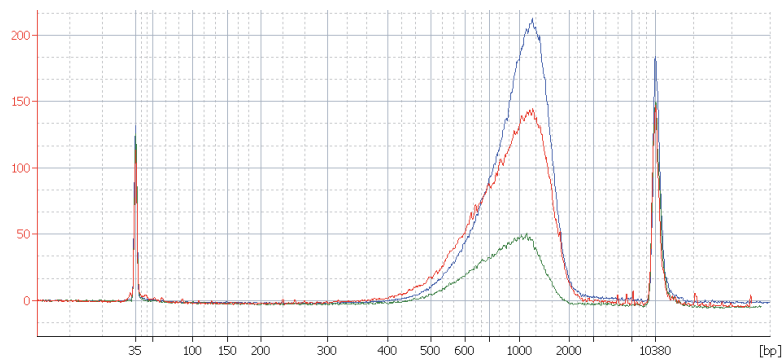
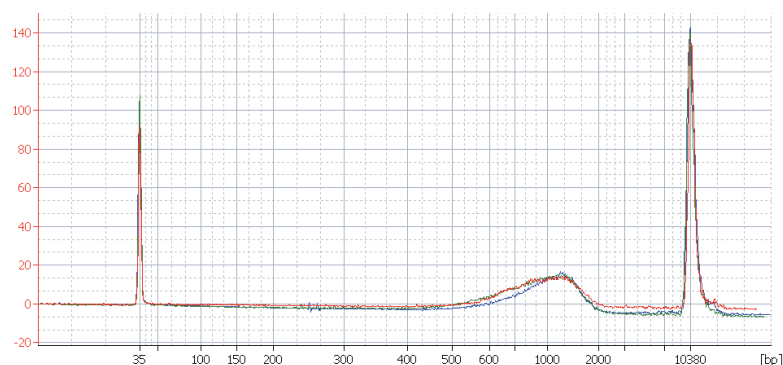

**図4 DNA濃度のノーマライゼーション条件検討**

AMPureXP 20%PEGを更にPEG-NaCl溶液 (20%PEG、2.5M NaCl) で希釈し、回収されるライブラリーDNA濃度のノーマライゼーションを検討した。

AMPureXP 20%PEG の最適な希釈範囲は各ライブラリーの最低DNA濃度に依存する。

よって希釈条件は低濃度に合わせるのが安全だが、20倍以上ではビーズが微量であり、回収が不安定となる。

本プロトコルでは微量のビーズに対応したマグネットスタンドNGS MagnaStand (日本ジェネティクス株式会社) を用いて20倍希釈AMPureXPの条件にてノーマライゼーションを行った例を示す。

**ノーマライゼーション前**

**ノーマライゼーション後**


20倍希釈AMPureXP 20μLで調製

**図5 DNA濃度のノーマライゼーション**

希釈したAMPureXPを用いることで、ライブラリーのDNA濃度を低濃度にて揃えることが可能であった。

## BeNUS法の効果

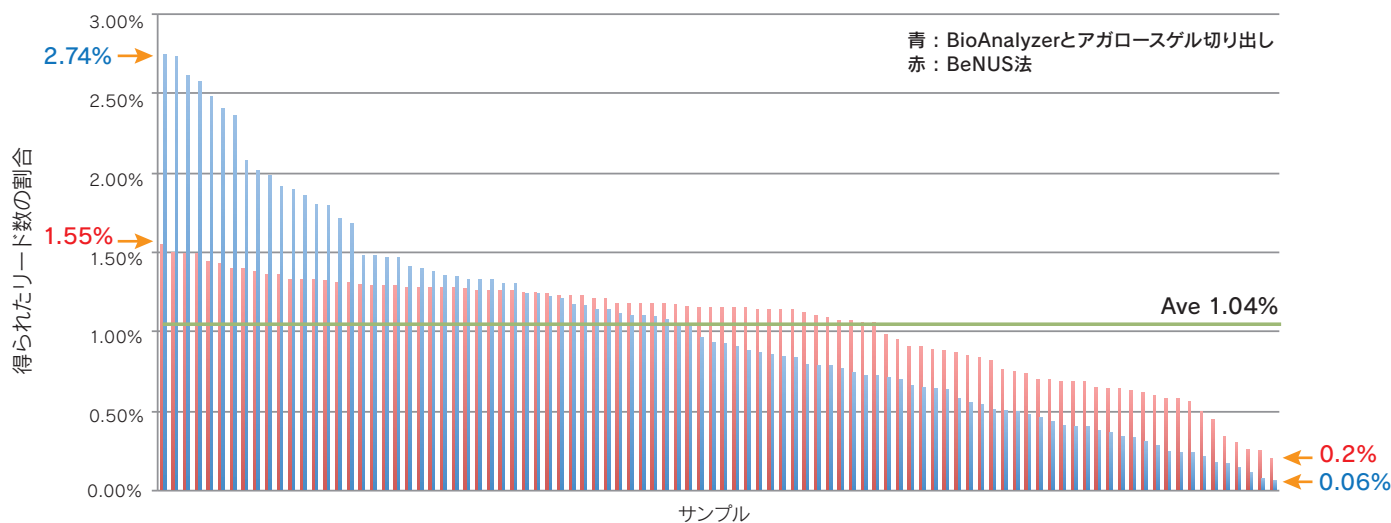


図6 96サンプルにおけるリード数の分布

得られるリード数の割合をBioAnalyzerとアガロースゲル切り出しにより調整した結果と比較したところ、最小と最大リード数の割合差が低下し、データ量がより均一化されている。

## BeNUS法の応用

### ライブラリー長の最適化

ライブラリー調製に用いるPCR産物のDNA量はQubit等で測定し、厳密に調整する必要がある。PCR産物のDNA量の違いはtagmentationへの影響が大きく、ライブラリーの平均断片長はDNA量が多すぎる場合は長く、少なすぎる場合は短くなる。HLA遺伝子の配列決定には500bpから1000bpのライブラリーを調製したが、これは通常のプロトコールに比べて長鎖のライブラリーである。他の遺伝子については目的に応じて最適なライブラリー長を決定し、PCR産物量を調整する必要がある。

### ノーマライゼーションの最適化

本稿で記載したノーマライゼーション法は一例であり、ある程度汎用性を考慮したが、ライブラリー調製に用いるPCR産物の濃度が適切で無い場合に目的サイズのライブラリー回収率が下がることも予測される。また、本来はモル濃度によりノーマライゼーションすべきであるところをサイズとDNA濃度によって調整しているため、目的サイズ範囲におけるライブラリー断片の分布により得られるシーケンスリードにばらつきが認められる。

### 参考文献

- 1) Hosomichi K, Jinam TA, Mitsunaga S, Nakaoka H, Inoue I. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. BMC Genomics. 2013 14:355.



お客様のコメント

NGSのスループット向上と最大96インデックス使用可能な簡便なライブラリー調製キットにより、1ランで多検体のシーケンスが可能となりました。ところが、調製した96サンプルのライブラリーから均一なリードを得るには個々にモル濃度を調整する必要があり、作業が複雑でした。本法により、時間的にもコスト的にもより手軽に多検体のシーケンスできるようになりました。

本法はある程度汎用性を考慮しましたが、ライブラリー調製に用いるPCR産物の濃度が適切で無い場合に目的サイズのライブラリーが十分に得られないことも予測されます。また、本条件はHLA遺伝子のシーケンスに用いるために長いライブラリー長で最適化をしております。通常のアンプリコンシーケンスには300bp程度のサイズで十分であり、より短いライブラリーは長いライブラリーに比べてサイズのコントロールがしやすいため、目的に応じて最適なライブラリー長を決定して頂くことをお奨めいたします。